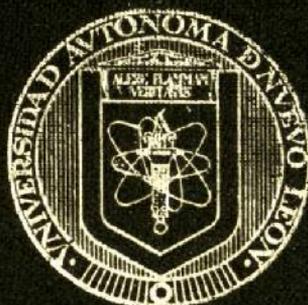


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



USO DE TECNICAS MODERNAS DE ANALISIS  
PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA  
PEROXISOMICINA

Por

M.C. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Química  
Biomédica

Diciembre, 2001

M.C. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS

TD  
QH603  
.P47  
S25  
c.1



1080113487

QH603

P4

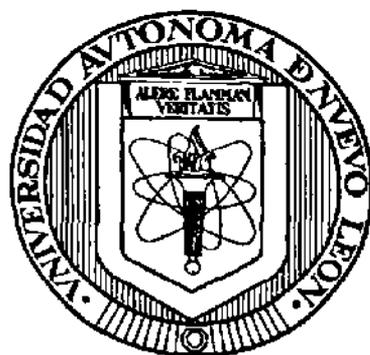
325

C-1

.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**USO DE TÉCNICAS MODERNAS DE ANÁLISIS PARA EL  
CONTROL DE CALIDAD DE LA PEROXISOMICINA**

**Por**

**M.C. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Química  
Biomédica**

Diciembre, 2001



1

**USO DE TÉCNICAS MODERNAS DE ANÁLISIS PARA EL CONTROL  
DE CALIDAD DE LA PEROXISOMICINA**

Aprobación de la Tesis:



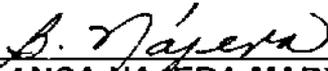
**DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES**  
Director de Tesis



**DR. PEDRO LUIS LÓPEZ DE ALBA**  
Co-Director de Tesis



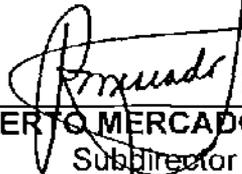
**DR. MED. ALFREDO PIÑEYRO LÓPEZ**  
Comisión de Tesis



**DRA. BLANCA NAJERA MARTÍNEZ**  
Comisión de Tesis



**DRA. GRACIELA GARCÍA DÍAZ**  
Comisión de Tesis



**DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA**  
Subdirector  
de Investigación y Estudios de Posgrado

**“USO DE TÉCNICAS MODERNAS DE ANÁLISIS PARA EL CONTROL  
DE CALIDAD DE LA PEROXISOMICINA”**

Presentado por:

M.C. Ma. de la Luz Salazar Cavazos

Este trabajo se realizó en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Noemí Waksman de Torres y del Dr. Pedro Luis López de Alba.

FIRMAS

Asesor



Dra. Noemí Waksman de Torres

Asesor Externo



Dr. Pedro Luis López de Alba

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Noemí Waksman de Torres y al Dr. Pedro Luis López de Alba, asesores de mi tesis por sus enseñanzas y comprensión durante mi formación.

Agradezco también al Dr. Alfredo Piñeyro López, a la Dra. Blanca Nájera y a la Dra. Graciela García Díaz por formar parte del Comité de Tesis y por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo.

A la Q.C.B. Fátima Uresti, a la Q.B.P. Lucía Ceniceros, al Q.C.B. Adrián Fernández y al estudiante de Q.C.B. Juan Ricardo Lucio, por su apoyo en la realización del trabajo experimental. Al Ing. Rubén Luján por su colaboración en la parte estadística del trabajo.

A mis compañeros, maestros, personal administrativo, técnicos y personal de intendencia de los departamentos de Farmacología y Toxicología y de Química Analítica; así como al personal de la Subdirección de Investigación y estudios de Posgrado. Gracias por su comprensión y ayuda.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios y el desarrollo de mi tesis.

A mi familia por el apoyo moral que siempre me ha brindado.

A Dios.

## Dedicada

A

Mi esposo Héctor y mis hijos  
Héctor Javier y Alejandro Arturo

*Con amor y gratitud*



A

La memoria de mis padres  
Roberto y Elvira

*Seres ejemplares,  
a ellos debo lo que soy*

## RESUMEN

Ma. de la Luz Salazar Cavazos

Graduación: diciembre de 2001

Universidad Autónoma de N.L.  
Facultad de Medicina

**Título del estudio: USO DE TÉCNICAS MODERNAS DE ANÁLISIS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA PEROXISOMICINA**

**Número de páginas: 125**

**Candidata al grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Química Biomédica.**

**Area de Estudio: Química Biomédica**

**Propósito y Método de Estudio:** La Peroxisomicina A1 (PA1), es una hidroxiantraceno dimérica aislada de plantas del género *Karwinskia*. Presenta toxicidad selectiva *in vitro* sobre células neoplásicas, por lo que actualmente se está evaluando su posible efecto antineoplásico. La mayoría de los lotes obtenidos al momento de este compuesto, contienen un bajo porcentaje de IsoPA1, isómero de posición que posee propiedades muy semejantes a la PA1. La identificación y cuantificación de este compuesto se han dificultado. El propósito de este estudio fue mejorar los métodos fisicoquímicos empleados para el control de calidad de la PA1, mediante el desarrollo y validación de métodos analíticos para la detección y/o cuantificación de IsoPA1 en lotes de PA1. Las técnicas utilizadas fueron: Espectroscopia UV-Visible, CLAR, Espectroscopia de IR, Polarimetría y RMN. Para incrementar la resolución y sensibilidad de los análisis, en la mayoría de los casos se recurrió a métodos quimiométricos. Para la comparación de los métodos se consideraron dos parámetros: sensibilidad y precisión.

**Conclusiones y contribuciones** De los métodos comparados, la Espectrofotometría UV-Visible, la CLAR y la <sup>1</sup>HRMN, cubren las características de precisión y sensibilidad para cuantificar IsoPA1 en lotes de PA1, requeridos para el Control de Calidad de PA1. El empleo de métodos quimiométricos permitió incrementar la resolución de señales y por consiguiente la precisión de los análisis. La aplicación de estos métodos permitirá mejorar el análisis de control de calidad de la PA1.

Firma del Asesor

  
Dra. Noemí Waksman de Torres

# TABLA DE CONTENIDOS

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Antecedentes . . . . .	1
1.2 Métodos Alternos para el Control de Calidad . . . . .	8
1.2.1 Métodos Quimiométricos de Análisis . . . . .	10
1.2.1.1 Derivadas . . . . .	10
1.2.1.2 Calibración Multivariante . . . . .	13
1.2.2 Aplicación de Derivadas y Análisis de Pureza en Cromatografía . . . . .	15
Hipótesis . . . . .	17
Objetivo General . . . . .	18
Objetivos Específicos . . . . .	19
2. MÉTODOS . . . . .	20
2.1 Material y Equipo	
2.1.1 Equipo Analítico . . . . .	20
2.1.2 Programas Computacionales . . . . .	21
2.1.3 Material General y de Vidrio . . . . .	21
2.1.4 Estándares . . . . .	22
2.1.5 Reactivos . . . . .	22
2.2 Métodos	
2.2.1 Espectroscopia UV – Visible . . . . .	23
2.2.1.1 Determinación de los Límites de Detección y Cuantificación Instrumentales . . . . .	23
2.2.1.2 Cuantificación con Espectros de Orden Cero . . . . .	24
2.2.1.3 Precisión . . . . .	24
2.2.1.4 Obtención de Espectros Derivados . . . . .	25
2.2.1.5 Calibración con Espectros Derivados (Técnica de Cruce al Cero) . . . . .	25
2.2.1.6 Calibración multivariante . . . . .	26

	<b>Página</b>	
2.2.1.7	Técnica de Adición de Estándar: Cociente de Respuestas a dos Longitudes de Onda con Espectros en Primera Derivada . . . . .	26
2.2.1.8	Cuantificación de IsoPA1 en Lotes de PA1 . . . . .	28
2.2.2	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución . . . . .	28
2.2.2.1	Condiciones de Trabajo . . . . .	28
2.2.2.2	Método de Calibración con Estándar Externo . . . . .	29
2.2.2.3	Método de Adición de Estándar . . . . .	30
2.2.2.4	Calibración con Estándar Interno . . . . .	30
2.2.2.5	Cuantificación de IsoPA1 con Cromatogramas Derivados . . . . .	30
	2.2.2.5.1 Sensibilidad del Método . . . . .	31
	2.2.2.5.2 Precisión y Exactitud del Método . . . . .	31
2.2.2.6	Análisis de Pureza de PA1 por CLAR - Arreglo de Diodos . . . . .	32
2.2.2.7	Robustez del Método de Análisis de Pureza . . . . .	33
2.2.3	Espectroscopia Infrarrojo . . . . .	33
2.2.3.1	Optimación de las Condiciones de Análisis . . . . .	33
2.2.3.2	Cuantificación de PA1 e IsoPA1 en Espectros de Orden Cero . . . . .	35
2.2.3.3	Obtención de Espectros Derivados . . . . .	35
2.2.3.4	Calibración con Espectros Derivados (Técnica de Cruce al Cero) . . . . .	35
2.2.3.5	Calibración Multivariante . . . . .	36
2.2.4	Medida del Poder Óptico Rotatorio . . . . .	37
2.2.4.1	Condiciones de Análisis . . . . .	37
2.2.4.2	Precisión del Método . . . . .	37
2.2.4.3	Sensibilidad del Método . . . . .	38
2.2.4.4	Medida del Poder Óptico Rotatorio en Lotes de PA1 . . . . .	38
2.2.5	Resonancia Magnética Nuclear . . . . .	39
2.2.5.1	Condiciones de Análisis . . . . .	39
2.2.5.2	Límites de Detección y Cuantificación Instrumentales . . . . .	39
2.2.5.3	Cuantificación de IsoPA1 por RMN . . . . .	40
2.2.5.4	Límites de Detección y Cuantificación del Método . . . . .	41
2.2.5.5	Cuantificación con Espectros Derivados . . . . .	41

	<b>Página</b>
<b>2.2.5.6</b> Análisis Estadístico para la Comparación de los Métodos . . . . .	42
<b>2.2.6</b> Comparación de los Métodos de Análisis . . . . .	42
<b>2.2.6.1</b> Sensibilidad . . . . .	43
<b>2.2.6.2</b> Precisión . . . . .	43
<b>3. RESULTADOS</b>	
<b>3.1</b> Espectroscopia UV - Visible . . . . .	44
<b>3.1.1</b> Límites de Detección y Cuantificación Instrumentales . . . . .	44
<b>3.1.2</b> Cuantificación con Espectros de Orden Cero . . . . .	45
<b>3.1.3</b> Precisión . . . . .	48
<b>3.1.4</b> Límites de Detección y Cuantificación del Método . . . . .	49
<b>3.1.5</b> Obtención de Espectros Derivados . . . . .	50
<b>3.1.6</b> Cuantificación con Espectros Derivados (Técnica de Cruce al Cero) . . . . .	50
<b>3.1.7</b> Calibración Multivariante ( Método PLS1) . . . . .	54
<b>3.1.8</b> Técnica de Adición de Estándar. Cociente de Respuestas a dos Longitudes de Onda en Espectros Derivados . . . . .	55
<b>3.2</b> Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución . . . . .	62
<b>3.2.1</b> Separación de los Compuestos . . . . .	62
<b>3.2.2</b> Cuantificación de IsoPA1 . . . . .	63
<b>3.2.2.1</b> Método de Estándar Externo . . . . .	63
<b>3.2.2.2</b> Método de Adición de Estándar . . . . .	64
<b>3.2.2.3</b> Método de Estándar Interno . . . . .	66
<b>3.2.2.4</b> Cuantificación de IsoPA1 con Cromatogramas Derivados . . . . .	67
<b>3.2.2.4.1</b> Sensibilidad del Método . . . . .	68
<b>3.2.2.4.2</b> Precisión y Exactitud del Método . . . . .	70
<b>3.2.3</b> Análisis de Pureza de PA1 por CLAR – Arreglo de Diodos . . . . .	71
<b>3.2.3.1</b> Robustez del Método de Análisis de Pureza . . . . .	74
<b>3.2.3.2</b> Sensibilidad del Método de Análisis de Pureza Espectral . . . . .	74
<b>3.3</b> Espectroscopia Infrarrojo . . . . .	77
<b>3.3.1</b> Optimización de las Condiciones de Análisis . . . . .	77
<b>3.3.2</b> Cuantificación de PA1 e IsoPA1 en Espectros de Orden Cero . . . . .	78
<b>3.3.3</b> Obtención de Espectros Derivados y Calibración con Espectros Derivados (Técnica de Cruce al Cero) . . . . .	80

	<b>Página</b>
3.3.4 Calibración Multivariante . . . . .	82
3.4 Medida del Poder Óptico Rotatorio . . . . .	85
3.4.1 Precisión del Método . . . . .	85
3.4.2 Sensibilidad del Método Polarimétrico . . . . .	86
3.4.3 Medida del Poder Óptico Rotatorio en Lotes de PA1 . . . . .	87
3.5 Resonancia Magnética Nuclear . . . . .	89
3.5.1 Obtención de Espectros . . . . .	89
3.5.2 Límites de Detección y Cuantificación Instrumentales . . . . .	90
3.5.3 Cuantificación de IsoPA1 por RMN . . . . .	91
3.5.4 Límites de Detección y Cuantificación del Método	93
3.5.5 Cuantificación con Espectros Derivados . . . . .	93
3.5.6 Análisis Estadístico para la Comparación de los Métodos de Integración de las Señales . . . . .	95
3.6 Comparación de los Métodos de Análisis . . . . .	96
 4. DISCUSIÓN . . . . .	 97
4.1 Espectrofotometría UV - Visible . . . . .	98
4.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución . . . . .	102
4.2.1 Cuantificación de IsoPA1 . . . . .	102
4.2.2 Análisis de Pureza por CLAR – Arreglo de Diodos . . . . .	106
4.3 Espectroscopia de Infrarrojo . . . . .	108
4.4 Medida del Poder Óptico Rotatorio . . . . .	111
4.5 Resonancia Magnética Nuclear . . . . .	112
4.6 Comparación de los Métodos de Análisis . . . . .	114
 CONCLUSIONES . . . . .	 117
 BIBLIOGRAFÍA . . . . .	 118
 RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
I	Diseño experimental empleado para la cuantificación de PA1 e IsoPA1. Método de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS 1)	27
II	Gradiente de elución empleado en la separación de peroxisomicinas por CLAR	29
III	Variables consideradas en la evaluación de la robustez del análisis de pureza espectral del pico cromatográfico	34
IV	Límites de detección y cuantificación instrumentales a diferentes longitudes de onda	44
V	Datos de regresión de las curvas de calibración de PA1 (espectros orden cero)	46
VI	Datos de regresión de las curvas de calibración de IsoPA1 (espectros orden cero)	47
VII	Precisión de los cocientes de absorbancia de las respuestas a diferentes longitudes de onda para PA1 e IsoPA1	48
VIII	Límites de detección y cuantificación de PA1 a diferentes longitudes de onda en espectros de orden cero	49
IX	Límites de detección y cuantificación de IsoPA1 a diferentes longitudes de onda en espectros de orden cero	49
X	Ecuaciones de regresión de PA1 e IsoPA1 (obtenida con espectros en primera derivada)	53
XI	Ecuaciones de regresión para IsoPA1 obtenidas con espectros en 2ª derivada (cruce al cero)	54
XII	Resultados del análisis multicomponente para PA1	57
XIII	Resultados del análisis multicomponente para IsoPA1	58

XIV	Coeficientes de variación para el cociente de las respuestas en espectros en primera derivada	60
XV	Sensibilidad de la técnica de cuantificación para IsoPA1 en lotes de PA1 en 1ª derivada (cociente de respuesta 285/277nm)	60
XVI	Cuantificación de IsoPA1 en distintos lotes de PA1 (Cociente de la respuesta 285/277 en 1ª derivada)	61
XVII	Comparación entre los valores reales y predictivos para la cuantificación por AMC(PLS1) en lotes de PA1 adicionados con IsoPA1 (1ª derivada)	61
<i>XVIII</i>	Análisis de regresión de la IsoPA1 por CLAR. Método de adición de estándar	69
<i>XIX</i>	Limites de detección y cuantificación del método de adición de estándar por CLAR, cromatogramas en 1a derivada	69
<i>XX</i>	Determinación de la precisión del método de Cuantificación por HPLC (1ª derivada)	70
<i>XXI</i>	Determinación del porcentaje de IsoPA1 en lotes de PA1 (cromatogramas en 1a derivada)	71
<i>XXII</i>	Determinación del efecto de factores externos en el análisis de pureza de PA1	75
<i>XXIII</i>	Diseño experimental para la optimización de parámetros de análisis de pureza espectral por CLAR con detector de arreglo de diodos	75
<i>XXIV</i>	Cálculo de las diferencias de las respuestas para cada parámetro evaluado en el análisis de pureza espectral	76
<i>XXV</i>	Correlación entre la concentración de IsoPA1 y el % de pureza espectroscópica del pico	76
<i>XXVI</i>	Datos de regresion obtenidos de las curvas de calibración de PA1 e IsoPA1 en espectros de IR (orden cero)	80
<i>XXVII</i>	Ecuaciones de las rectas obtenidas por análisis de regresión de los espectros derivados	82

<i>XXVIII</i>	Comparación de los resultados reales y predictivos obtenidos por PLS1 para IsoPA1 en mezclas experimentales	83
<i>XXIX</i>	Comparación de los resultados reales y predictivos obtenidos por PLS1 para IsoPA1 en mezclas experimentales	84
<i>XXX</i>	Análisis de precisión del método polarimétrico	85
<i>XXXI</i>	Análisis de varianza de los valores de rotación específica de las soluciones de PA1 adicionadas con IsoPA1	86
<i>XXXII</i>	Rotación específica de distintos lotes de PA1	88
<i>XXXIII</i>	Valores de rotación específica para diferentes lotes de PA1 e IsoPA1	88
<i>XXXIV</i>	Límites de detección y cuantificación instrumentales de RMN	91
<i>XXXV</i>	Determinación del % de IsoPA1 en muestras de PA1	91
<i>XXXVI</i>	Límites de detección y cuantificación del método	93
<i>XXXVII</i>	Comparación de las técnicas de integración de la señal, en espectros de orden cero y derivados	94
<i>XXXVIII</i>	Análisis de datos en diseño completamente al azar, (arreglo factorial A x B), para la comparación de los distintos métodos de integración a diferentes niveles de concentraciones	95
<i>XXXIX</i>	Comparación de métodos analíticos para la cuantificación de IsoPA1 en presencia de PA1	96

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Antracenas diméricas aisladas de plantas del género <i>Karwinskia</i>	3
2	Espectros de absorción de orden cero, primera y segunda derivada de una señal	11
3	Aplicación de la técnica de cruce al cero para realizar la cuantificación empleando derivadas	13
4	Espectro UV- Visible de PA1 e IsoPA1	14
5	Espectros UV - Visible sobrepuestos de PA1 e IsoPA1	45
6	Curvas de calibración de PA1 a diferentes longitudes de onda (espectros orden cero)	46
7	Curvas de calibración de IsoPA1 a diferentes longitudes de onda (espectros orden cero)	47
8	Cruce al 0 de PA1 e IsoPA1 primera derivada	51
9	Cruce al 0 de PA1 e IsoPA1 en 2a derivada	51
10	Espectros en primera derivada de estándares de PA1 en concentraciones de 1 a 12 µg/mL	52
11	Espectros en primera derivada de estándares de IsoPA1 en concentraciones de 0.8 a 10 µg/mL	52
12	Espectros de absorción de IsoPA1 en 2ª derivada. Concentraciones de 0.8 a 10 µg/mL	53
13	Análisis Multicomponente para PA1 (PLS1)	56
14	Análisis Multicomponente para IsoPA1 (PLS 1)	56
15	Curva de regresión ajustada del cociente de la respuesta 285/277 en primera derivada por adición de estándar	59

16	Cromatogramas sobrepuestos de PA1 e IsoPA1 a 410 nm	62
17	Cromatogramas de estándares de IsoPA1 a concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$	63
18	Graficas de las curvas de calibración de IsoPA1 mediante el método de estándar externo a diferentes longitudes de onda	64
19	Cromatogramas sobrepuestos de estándares de IsoPA1 en matriz de PA1	65
20	Curva de calibración de IsoPA1 en matriz de PA1. Método de adición de estándar	65
21	Cromatograma de una mezcla de estándares PA1, PA2, e IsoPA1	66
22	Curva de Calibración empleada para la cuantificación de IsoPA1 mediante la técnica de estándar interno	66
23	Primera derivada de cromatograma de estándar de PA1 sin adicionar	67
24	Cromatogramas en 1ª derivada de estándares de IsoPA1 en matriz de PA1	67
25	Espectros sobrepuestos de PA1 e IsoPA1 obtenidos de los máximos de las señales cromatograficas de estándares	72
26	Análisis de pureza de un lote de PA1	72
27	Cromatogramas de PA1 normalizados y sobrepuestos obtenidos a longitudes de onda de 269, 310 y 410 nm	73
28	Espectro Infrarrojo de PA1	77
29	Espectro infrarrojo de IsoPA1	78
30	Curva de calibración de PA1 por IR a $1629\text{ cm}^{-1}$ . Espectros orden cero	79
31	Curva de calibración de IsoPA1 por IR a $1603\text{ cm}^{-1}$ en espectros orden cero	79

32	Cuantificación de IsoPA1 en primera derivada a $1600\text{cm}^{-1}$	81
33	Cuantificación de PA1 en primera derivada a $1611\text{cm}^{-1}$	81
34	Análisis de Correlación entre en % de IsoPA1 y la medida del Poder Óptico Rotatorio	87
35	Espectro de $^1\text{HRMN}$ de la PA1	89
36	Espectro de $^1\text{HRMN}$ de la PA1	89
37	Región espectral considerada para el análisis de pureza de la PA1	90
38	Linealidad del Método de Cuantificación de Isopa1 por $^1\text{HRMN}$	92
39	1a derivada del espectro de $^1\text{HRMN}$ de un lote de PA1 en la región de cuantificación	93

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AMC	Análisis multicomponente
C.V.	coeficiente de variación o desviación estándar relativa
CaF <sub>2</sub>	fluoruro de calcio
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CLAR - FR	CLAR Fase Inversa
dA/dt	primera derivada de una respuesta respecto al tiempo
dA/dλ	primera derivada de una respuesta respecto a la longitud de onda
d <sup>2</sup> A/dλ <sup>2</sup>	segunda derivada de una respuesta respecto a la longitud de onda
DMSO-d <sub>6</sub>	dimetil sulfóxido deuterado
D <sup>n</sup>	amplitud de una derivada de orden n
F.R.	factor de respuesta
FT - IR	Infrarrojo con Transformadas de Fourier
IVI	valor absoluto de la diferencia del porcentaje de pureza obtenido durante la variación de parámetros en el análisis de robustez del método de análisis de pureza por CLAR
<sup>1</sup> HMRN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
IR	Infrarrojo
IsoPA1	Isoperoxisomicina A1
LC	límite de cuantificación
LD	límite de detección
λ	longitud de onda
mg	miligramos
mL	mililitros
mm	milímetros
mUA	miliunidades de absorbancia
nm	nanometros
ODS	octadecilsilano (C18)
PA1	Peroxisomicina A1
pH	potencial de hidrógeno
PLS	Mínimos Cuadrados Parciales

PRESS	suma de los cuadrados de los errores residuales de predicción
$t_R$	tiempo de retención
$\alpha$	símbolo de proporcionalidad
$\alpha$	rotación óptica
$[\alpha]$	rotación específica
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	desviación estándar
UV	Ultravioleta
W	ancho de una banda espectral
$\mu\text{g}$	microgramos
$\mu\text{L}$	microlitros
$\mu\text{m}$	micrómetros