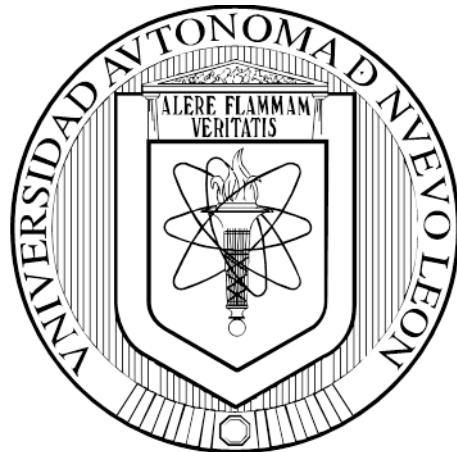


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR RESONANCIA  
MAGNÉTICA NUCLEAR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE  
HEPATODAMIANOL EN EXTRACTOS ESTANDARIZADOS  
DE *Turnera diffusa***

**POR**

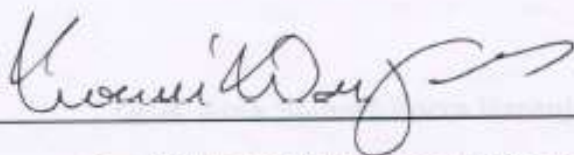
**QCB. AÍDA SALOMÉ PARRA NARANJO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN  
EN QUÍMICA BIOMÉDICA**

**AGOSTO, 2019**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR RESONANCIA  
MAGNÉTICA NUCLEAR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HEPATODAMIANOL  
EN EXTRACTOS ESTANDARIZADOS DE *Turnera diffusa***

**Aprobación de la Tesis:**



**Dra. C. Noemí Waksman de Torres**

**Director de Tesis**



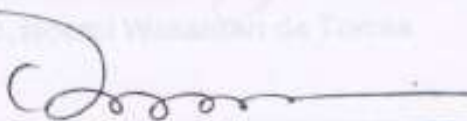
**Dra. C. Alma Saucedo Yáñez**

**Co - Director de Tesis**



**Dra. C. Rocío Castro Ríos**

**Comisión de Tesis**



**Dr. Felipe Arturo Morales Martínez**

**Subdirector de Estudios de Posgrado**

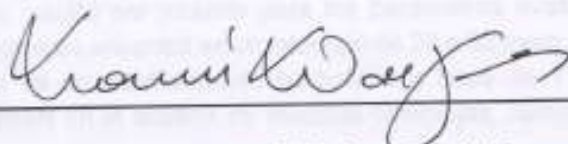
**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR RESONANCIA  
MAGNÉTICA NUCLEAR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HEPATODAMIANOL  
EN EXTRACTOS ESTANDARIZADOS DE *Turnera diffusa***

Presentado por:

QCB. Aída Salomé Parra Naranjo

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina bajo la dirección de la Dr. C. Noemí Waksman de Torres y la co - dirección de la Dr. C. Alma Saucedo Yáñez.

Director



Dra. C. Noemí Waksman de Torres

FRMA DEL DIRECTOR DE TESIS

Co - Director



Dra. C. Alma Saucedo Yáñez

## RESUMEN

QCB. Aída Salomé Parra Naranjo

Fecha de graduación: agosto 2019

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

**Título de estudio:** Desarrollo y validación de un método por Resonancia Magnética Nuclear para la cuantificación de hepatodamianol en extractos estandarizados de *Turnera diffusa*.

Número de páginas: 116

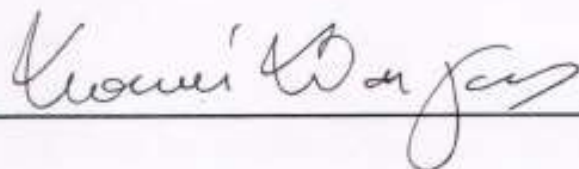
Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Química Biomédica

**Área de estudio:** Química Analítica

**Propósito y método de estudio:** El propósito del presente trabajo fue desarrollar y validar un método por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para la cuantificación de hepatodamianol en extractos estandarizados de *T. diffusa*. Para establecer las condiciones de adquisición de los espectros se obtuvieron los tiempos de relajación longitudinal de los núcleos involucrados en la cuantificación, a través del experimento T1R, se evaluó la estabilidad de los compuestos candidatos a ser empleados como estándar interno y se comparó el desempeño del sistema con la modalidad de estándar interno y externo. Posteriormente se validó el método de cuantificación, donde se evaluaron los parámetros de especificidad, linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación y robustez. Finalmente, el método validado se aplicó para la cuantificación de hepatodamianol en cuatro muestras de extracto estandarizado de *T. diffusa*.

**Conclusiones y contribuciones:** El método desarrollado y validado resultó ser específico, lineal (0.25 – 5.00 mM), preciso y exacto. Los LOD y LOQ se establecieron en 0.125 y 0.250 mM respectivamente. El método resultó ser robusto para los parámetros evaluados. El contenido de hepatodamianol en los extractos se encontró en un intervalo de 28 a 52 mg/g. Este trabajo representa un avance en el desarrollo de un medicamento herbolario a base de *T. diffusa*, y además se demuestra la utilidad de la RMN en el análisis de mezclas complejas, como lo son los extractos de plantas.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



Dr. C. Noemí Herminia Waksman Minsky

*“El hombre atraviesa el presente con los ojos vendados. Sólo puede intuir y adivinar lo que de verdad está viviendo. Y después, cuando le quitan la venda de los ojos, puede mirar al pasado y comprobar qué es lo que ha vivido y cuál era su sentido”.*

Milán Kundera

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer en primer lugar a Dios, por permitirme vida y salud para llevar a cabo los proyectos de mi vida.

En segundo lugar, quiero agradecer a mi familia, mis padres, Aída Naranjo y Mario Parra, y mis hermanos, Aimé e Iván, por apoyarme en las decisiones de mi vida, tanto personal como profesional.

Agradezco también a mi novio Gualberto, por siempre estar ahí para mí, para ayudarme y apoyarme, escucharme en mis momentos de desesperación, y aconsejarme a su manera. Te amo tunito.

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Noemí. Doctora, gracias por todo, gracias por recibirme en su laboratorio hace cinco años, gracias por orientarme, por darme la oportunidad y confianza de trabajar en un proyecto nuevo, del que aprendí mucho. Le agradezco los consejos, el apoyo, tanto en lo personal como en lo profesional. Me duele dejar el departamento, que fue como mi segunda casa en estos últimos años. Le estaré eternamente agradecida y siempre tendrá un lugar especial en mi corazón.

Gracias a la Dra. Alma por aceptarme como su alumna, por la paciencia a la hora de aprender en el equipo y en la teoría, que creo que el aprendizaje a lo largo de este proyecto de tesis fue hacia ambos lados, por los consejos y las charlas.

Gracias a la Dra. Rocío Castro, por orientar en las dudas de validación, y por compartir un poco conmigo de lo mucho que sabe.

Gracias a mis compañeros del cubículo Bárbara, Mitzi y Juan, por hacer este camino un poco más llevadero.

Gracias también a mi cuadro chico del cubículo Yazmín y Omar. Chicos, gracias por las pláticas energéticas, motivacionales, los chismes, los taquitos y la ayuda en dudas, tanto personales como profesionales (y de la tesis).

Gracias especiales también a Ivonne y a Cecy. Cecilia, porque sin tus muestras no hubiera podido hacer nada de esto, ni sacar los 9 mg de hepatodamianol, ni analizar ninguna muestra ni nada, esta tesis no se hubiera hecho si no me hubieras platicado sobre este proyecto. E Ivonne, gracias por escuchar, aconsejar, ayudar, en las dudas de laboratorio y las dudas personales, sin tu ayuda creo que muchos de los que hemos pasado por el laboratorio de extracción hubiéramos sufrido mucho más de lo que lo sufrimos.

Gracias a la Dra. Vero y al coordi Dr. Alejandro, por ser más que profesores, por creer y apoyar y ayudar en la medida de lo posible a que nosotros, los estudiantes, volemos más alto de lo que imaginamos.

Gracias a todo el personal de QA.

Y finalmente gracias al CONACyT, por la beca de manutención durante estos dos años.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
1	<b>Introducción</b>	1
	1.1 Medicina herbolaria	1
	1.2 Regulación y Control de Calidad en los Medicamentos Herbolarios	3
	1.3 Regulación y control de calidad de los productos herbolarios en México	6
	1.4 Técnicas analíticas para el Control de Calidad de Medicamentos Herbolarios	8
	1.5 La Resonancia Magnética Nuclear como técnica para el control de calidad de productos herbolarios	9
	1.5.1 Parámetros para optimizar en un experimento de RMNc.	10
	1.5.1.1 Parámetros de adquisición	11



1.5.1.2	Parámetros de procesamiento	12
1.6	<i>Turnera diffusa</i>	14
1.7	Antecedentes	15
1.8	Justificación	18
1.9	Objetivo General	19
1.10	Objetivos Específicos	19
2	<b>Material y métodos</b>	20
2.1	Material, equipos y reactivos	20
2.1.1	Material	20
2.1.2	Equipos	21
2.1.3	Reactivos	22
2.2	Cromatografía en capa fina (CCF)	23
2.2.1	Sistema de elución	23
2.3	Purificación de hepatodamianol	23
2.3.1	Cromatografía en columna a baja presión	23
2.3.2	Cromatografía de líquidos de alta resolución	25

2.3.3 Cromatografía de exclusión molecular	26
2.4 Verificación de la pureza del hepatodamianol por RMNc	27
2.5 Desarrollo del método de cuantificación por RMN	28
2.5.1 Medición de los tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ )	28
2.5.2 Parámetros de adquisición y procesamiento de espectros	30
2.5.3 Evaluación del hexametilciclotrisiloxano y piridina como estándares internos	31
2.6 Evaluación del sistema empleando como analito modelo rutina	32
2.6.1 Linealidad	32
2.6.2 Precisión	34
2.6.3 Exactitud	35
2.6.4 Límite de detección y cuantificación	35
2.6.5 Robustez	35

2.7 Validación del método de cuantificación por RMN	36
2.7.1 Especificidad	37
2.7.2 Linealidad	37
2.7.3 Precisión	38
2.7.3.1 Precisión del sistema	38
2.7.3.2 Precisión del método	39
2.7.4 Exactitud	39
2.7.4.1 Exactitud del sistema	39
2.7.4.2 Exactitud del método	40
2.7.5 Límite de detección	40
2.7.6 Límite de cuantificación	41
2.7.7 Robustez	41
2.8 Análisis de muestras de extracto estandarizado	42
<b>3 Resultados</b>	<b>44</b>
3.1 Purificación de hepatodamianol	44
3.1.1 Cromatografía en columna preparativa	44

3.1.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución	46
3.2 Verificación de la pureza del hepatodamianol	46
3.3 Desarrollo del método de cuantificación por RMN	48
3.3.1 Medición de los tiempos de relajación longitudinal	48
3.3.2 Evaluación del hexametilciclotrisiloxano y piridina como estándares internos	49
3.4 Evaluación del sistema empleando como analito modelo rutina	51
3.5 Validación del método de cuantificación de hepatodamianol por RMN	53
3.5.1 Especificidad	53
3.5.2 Linealidad	54
3.5.3 Precisión	56
3.5.3.1 Precisión del sistema	56
3.5.3.2 Precisión del método	57
3.5.4 Exactitud	57

	3.5.4.1 Exactitud del sistema	57
	3.5.4.2 Exactitud del método	58
	3.5.5 Límite de detección	60
	3.5.6 Límite de cuantificación	61
	3.5.7 Robustez	61
	3.6 Análisis de muestra	63
4	<b>Discusión</b>	66
5	<b>Conclusiones</b>	84
6	<b>Perspectivas</b>	85
7	Anexos	86
	Bibliografía	103

## LISTA DE TABLAS

		<b>Página</b>
1	Parámetros a optimizar en la adquisición de espectros de RMN	11
2	Parámetros a optimizar en el procesamiento de espectros de RMN	13
3	Condiciones de elución para cromatografía en columna preparativa	24
4	Condiciones de elución para cromatografía en columna preparativa de Fracción 3	25
5	Condiciones de elución para el cromatógrafo de líquidos	26
6	Condiciones de los parámetros de adquisición para verificación de la pureza de hepatodamianol	28
7	Condiciones de los parámetros de adquisición para la obtención de los espectros de RMNc	30

8	Condiciones de los parámetros de procesamiento para los espectros de RMNc	31
9	Concentración de las disoluciones estándar para la curva de calibración y volúmenes de disolución stock empleados	33
10	Modificaciones para la evaluación de la robustez	36
11	Concentración de las disoluciones estándar para la curva de calibración	38
12	Modificaciones para la evaluación de la robustez	42
13	Sitio y fecha de colecta de los extractos estandarizados de <i>T. diffusa</i>	43
14	Resultados del análisis de pureza del hepatodamianol aislado	48
15	Tiempos de relajación longitudinal obtenidos	48
16	Resultados de la evaluación de linealidad, precisión, exactitud, LOD, LOQ y robustez, por estándar externo e interno	52
17	Resultados de %DER para respuesta de rutina, piridina y cociente de rutina y piridina	53

18	Resultados del análisis de regresión para evaluar linealidad	55
19	Resultados de %DER (precisión intradía)	56
20	Resultados de %DER (precisión interdía)	57
21	Resultados de %DER de las muestras de extracto analizadas	57
22	Resultados de porcentaje de error calculado para las disoluciones de rutina	58
23	Resultados del porcentaje de recobro con muestra MH4	59
24	Valores de %DER y % de error para cálculo del límite de cuantificación	61
25	Resultados del análisis de varianza para evaluar robustez nivel bajo (rutina, 0.50 mM)	62
26	Resultados del análisis de varianza para evaluar robustez nivel medio (rutina, 2.00 mM)	62
27	Resultados del análisis de varianza para evaluar robustez nivel alto (rutina, 5.00 mM)	63
28	Resultados del análisis de muestra de extracto estandarizado	65



29	Resultados del análisis de regresión para evaluar exactitud (estándar interno)	91
30	% de error relativo (estándar interno)	91
31	%DER (intradía e interdía, estándar interno)	92
32	Resultados de la evaluación de robustez (estándar interno)	92
33	Análisis de regresión para evaluar exactitud (estándar externo)	95
34	% de error relativo (estándar externo)	95
35	%DER (intradía e interdía, estándar externo)	95
36	Resultados de la evaluación de robustez (estándar externo)	96
37	Resultados del análisis de regresión para evaluar exactitud (estándar externo, estándar certificado)	98
38	Área de CH <sub>3</sub> -6''' de rutina y CH-p de piridina (modalidad de estándar interno)	99
39	Área de CH <sub>3</sub> -6''' de rutina y CH-p de piridina (modalidad de estándar interno, valores de precisión intradía)	100
40	Área de CH <sub>3</sub> -6''' de rutina (modalidad de estándar externo)	101

41	Área de CH <sub>3</sub> -6''' de rutina (modalidad de estándar externo, valores de precisión interdía).	102
42	Área de CH <sub>3</sub> -6''' de hepatodamianol en los extractos estandarizados de <i>T. diffusa</i> analizados	102

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
1	Uso de la medicina tradicional y medicina complementaria y alternativa en países en desarrollo y países desarrollados	2
2	Clasificación de los productos herbolarios en los países miembros de la OMS	4
3	Apariencia de las hojas y flor de <i>T. diffusa</i>	14
4	Estructura química del hepatodamianol	15
5	Cromatograma del extracto metanólico de <i>T. diffusa</i> . La flecha indica el pico correspondiente al hepatodamianol	16
6	Primera derivada del cromatograma del extracto de <i>T. diffusa</i> . La flecha indica el pico correspondiente al hepatodamianol	17

7	Estructura del hepatodamianol. La señal de $^1\text{H-RMN}$ empleada para la cuantificación de este compuesto es el $\text{CH}_3\text{-6}''$	27
8	Estructura química de a) rutina, b) hexametilciclotrisiloxano y c) piridina	29
9	Secuencia de pulsos del experimento de recuperación de la inversión	29
10	Cromatoplasmas representativas de la cromatografía preparativa. Las flechas indican la mancha correspondiente al hepatodamianol. El asterisco indica el estándar de hepatodamianol empleado para identificar el valor de $R_F$	45
11	Cromatoplasmas representativas de la separación de la fracción 3. Las flechas indican la mancha con $R_F$ correspondiente al hepatodamianol	45
12	Cromatograma del hepatodamianol aislado, longitud de onda de detección 254 nm	46
13	Espectro de $^1\text{H-RMN}$ a 400 MHz de hepatodamianol en $\text{MeOD-}d_4$ . La señal integrada corresponde al grupo $\text{CH}_3\text{-6}''$ . El texto en color verde indica la concentración de la	

	disolución de hepatodamianol calculada por el programa ERETIC2	47
14	Espectro de $^1\text{H}$ -RMN a 400 MHz de hepatodamianol en DMSO- $d_6$ . La señal integrada corresponde al grupo CH <sub>3</sub> -6'''. El texto en color verde indica la concentración de la disolución de hepatodamianol calculada por el programa ERETIC2	47
15	Espectros de $^1\text{H}$ -RMN a 400 MHz en DMSO- $d_6$ del extracto estandarizado de <i>T. diffusa</i> con HMCTS (rojo) y piridina (azul). Las flechas indican las señales correspondientes a los compuestos	49
16	Sobreposición de tres espectros de $^1\text{H}$ -RMN de HMCTS obtenidos en días no consecutivos	50
17	Sobreposición de tres espectros de $^1\text{H}$ -RMN de piridina obtenidos en días no consecutivos	51
18	Espectros de 1D-TOCSY selectivo de hepatodamianol (rojo) y extracto estandarizado de <i>T. diffusa</i> (azul) obtenidos al irradiar la señal del grupo CH <sub>3</sub> -6'''	54
19	Curva de calibración de estándar externo con rutina	55

20	Espectros sobrepuestos de muestra de extracto estandarizado de <i>T. diffusa</i> sin adicionar (azul) y adicionada con hepatodamianol 2.5 mM (rojo).	59
21	Espectros de <sup>1</sup> H-RMN de rutina a 400 MHz a 0.25 mM (azul), 0.125 mM (rojo) y 0.100 mM (verde)	60
22	Espectro de <sup>1</sup> H-RMN en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> a 400 MHz de la muestra de extracto estandarizado de <i>T. diffusa</i> MH4. La flecha indica la señal de cuantificación, correspondiente al CH <sub>3</sub> -6'''	64
23	Ampliación de espectros de <sup>1</sup> H-RMN de las cuatro muestras de extracto estandarizado de <i>T. diffusa</i> analizadas. Las flechas indican la señal de cuantificación, correspondiente al CH <sub>3</sub> -6'''	64
24	Gráfico de relajación longitudinal del CH <sub>3</sub> -6''' de la rutina	86
25	Gráfico de relajación longitudinal del CH <sub>3</sub> -6''' del hepatodamianol	87
26	Gráfico de relajación longitudinal del CH <sub>3</sub> del HMCTS	87
27	Gráfico de relajación longitudinal del CH-o de la piridina	88
28	Gráfico de relajación longitudinal del CH-m de la piridina	88

29	Gráfico de relajación longitudinal del CH-p de la piridina	89
30	Curva de calibración de rutina por estándar interno	89
31	Gráfico de residuales de calibración por estándar interno	90
32	Curva de regresión ajustada de calibración por estándar interno	90
33	Gráfico de regresión para evaluar exactitud (estándar interno)	91
34	Curva de calibración de rutina por estándar externo	93
35	Gráfico de residuales de calibración por estándar externo	93
36	Curva de regresión ajustada de calibración por estándar externo	94
37	Gráfico de regresión para evaluar exactitud (estándar externo)	94
38	Gráfico de residuales de calibración por estándar externo (estándar certificado)	96
39	Curva de regresión ajustada de calibración por estándar externo (estándar certificado)	97

40 Gráfico de regresión para evaluar exactitud (estándar externo, estándar certificado)

97



## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Por ciento
%DER	Desviación estándar relativa en porcentaje
°	Grados
°C	Grados Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
ANOVA	Análisis de varianza
AQ	Tiempo de adquisición
C <sub>18</sub>	Octadecilsilano
CCF	Cromatografía en capa fina
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
D	Deuterio
<i>d1</i>	Demora de la relajación
dB	Decibel
DE	Desviación estándar

DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
EE.UU	Estados Unidos
FDA	Administración de Fármacos y Alimentos
FID	Decaimiento libre de inducción
H <sub>2</sub> O	Agua
HMCTS	Hexametilciclotrisiloxano
H <sub>0</sub>	Hipótesis nula
Hz	Hertz
ICH	Conferencia Internacional de Armonización
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
LB	Factor de ensanchamiento de línea o line broadening
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub>	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ms	Milisegundos
NS	Número de incrementos
OMS	Organización Mundial de la Salud

p/p	Peso peso
ppm	Partes por millón
$r^2$	Coefficiente de determinación
$R_F$	Factor de retardo
RG	Ganancia del receptor
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMNc	Resonancia Magnética Nuclear cuantitativa
s	Segundos
S/N	Relación señal ruido
SW	Ventana espectral
$T_1$	Tiempo de relajación longitudinal
$\tau$	Tau
T1IR	Experimento de recuperación de la inversión
TD	Número de puntos
TMS	Tetrametilsilano
v/v	Volumen volumen
ZF	Llenado de ceros
$\delta$	Delta
$\lambda$	Longitud de onda

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

#### **1.1 Medicina herbolaria**

La medicina herbolaria constituye el uso de sustancias o productos derivados de plantas, las cuales no han sido sometidas a procesos industriales, o bien, estos son mínimos, con el fin de tratar enfermedades dentro de un contexto local o regional [1]. Esta forma parte de lo que se conoce como medicina tradicional, la cual es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como “la suma total del conocimiento, habilidades y prácticas basadas en teorías, creencias y experiencias pertenecientes a distintas culturas, empleadas para mantener la salud, así como en la prevención, diagnóstico, mejora o tratamiento de enfermedades físicas y mentales” [2].

Los productos herbolarios contemplados dentro de la medicina herbolaria pueden tomar una gran variedad de formas, tales como la planta completa, o bien

preparaciones como los tés, ungüentos, aceites esenciales, jarabes, tabletas o cápsulas con el extracto seco, etc. [3].

El uso de la medicina herbolaria ha ido en aumento en los últimos años. Prueba de ello es su uso y aceptación tanto en países desarrollados en Europa y Norteamérica, en donde se cuenta con un sistema de salud bien establecido, como en países con economías emergentes en donde la medicina tradicional es el principal sistema de salud empleado por sus habitantes. La figura 1 muestra un gráfico donde se aprecia el porcentaje de la población de distintos países que hace uso de la medicina tradicional [4].

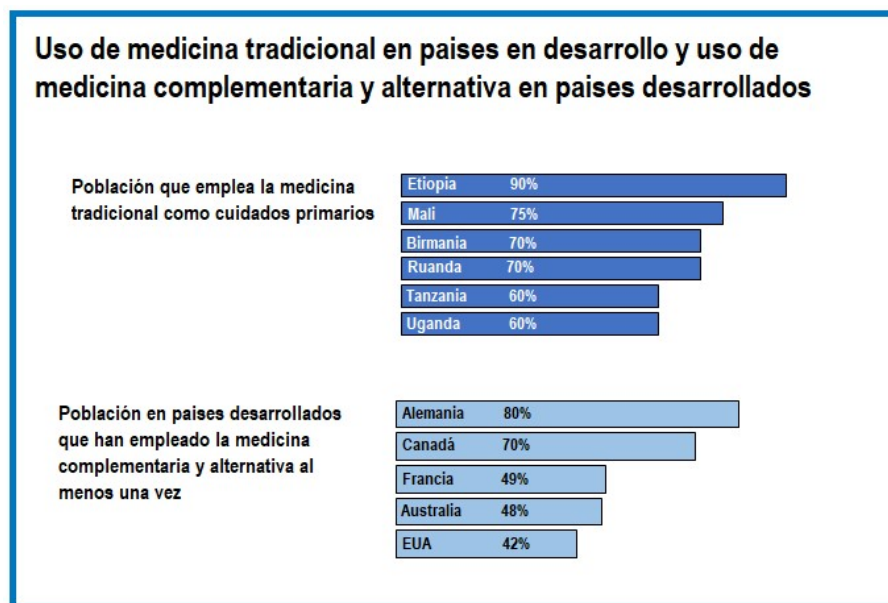


Figura 1. Uso de la medicina tradicional y medicina complementaria y alternativa en países en desarrollo y países desarrollados [4].

Por otro lado, en México, según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en 2011 del total de gasto en los hogares destinado para la salud, 972 millones fueron empleados en productos y servicios de medicina

tradicional, de los cuales la compra de hierbas medicinales, remedios caseros, medicamentos naturistas, entre otros, ocupó un 44.8% [5].

## **1.2 Regulación y Control de Calidad en los Medicamentos Herbolarios**

Así como se ha visto un aumento en el uso de la medicina herbolaria a lo largo de los años, también ha surgido la necesidad de regular o legislar los productos herbolarios para asegurar la calidad y efectividad de estos; evidencia de ello es el aumento en el número de países miembros de la OMS que han adoptado regulaciones para los medicamentos herbolarios, de 65 a 82, entre los años 1999 y 2003, y a 119 para el año 2012 [6].

Sin embargo, debido a la amplia diferencia que existe en la forma de preparación de los medicamentos herbolarios, así como a la falta de homogeneidad respecto a los términos o clasificación dentro de la que caen los productos herbolarios, la regulación de estos se vuelve complicada. La figura 2 muestra un gráfico con algunas de las distintas clasificaciones dentro de las cuales se puede incluir a los productos herbolarios.

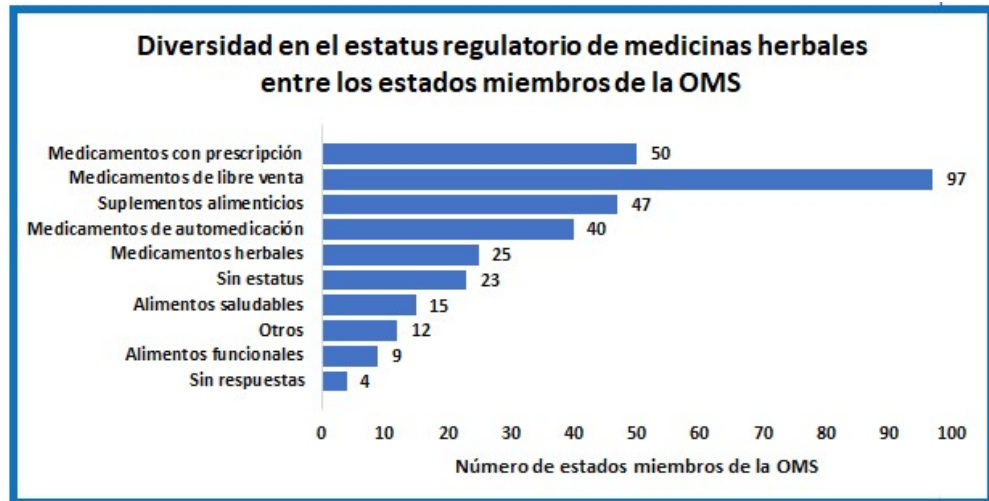


Figura 2. Clasificación de los productos herbolarios en los países miembros de la OMS [4].

Uno de los grandes problemas que surgen a partir de las diferencias en los criterios de clasificación de los productos herbolarios es que la legislación a la que podrían estar sujetos dependería de la clasificación más adecuada para ellos. Así, por ejemplo, en Estados Unidos (EE. UU), los suplementos alimenticios no requieren ser aprobados por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA) para su comercialización, por lo que tampoco se requieren pruebas de seguridad y eficacia [3].

Por otro lado, un aspecto de gran importancia son los criterios de calidad que deben cumplir. En la mayoría de los casos, los medicamentos herbolarios contienen preparaciones o extractos de plantas, por lo que el análisis de la composición de estos es de vital importancia para garantizar su seguridad y efectividad [7].

Es por ello que surge la necesidad de un marco legal regulatorio para estos productos, el cual permita estandarizar los contenidos de los productos herbolarios para asegurar la calidad, seguridad y eficacia de estos. Una de las herramientas que permiten su regulación y control de calidad son las Farmacopeas.

Distintos países cuentan con estos documentos, donde se recogen procedimientos para el análisis y características con las cuales deben de contar los productos farmacéuticos. Dentro de las Farmacopeas también es posible encontrar monografías de plantas, las cuales proveen de información para evaluar la seguridad y eficacia de los productos herbolarios [7].

El control de calidad puede aplicar a distintos niveles, desde la colecta de la planta, el procesamiento que se le da a la misma, hasta el producto final y la evaluación de su estabilidad, esto con el fin de lograr un producto estandarizado [7,8].

Debido a la variabilidad que puede existir en el contenido de los productos herbolarios, una de las estrategias que actualmente se utilizan para su estandarización es el monitoreo de un componente bien identificado, el cual bien puede ser el responsable o uno de los responsables de la actividad terapéutica [9].

La FDA recomienda para el control de calidad la selección de un perfil de componentes químicos como medio para su correcta identificación; la



caracterización química, tanto cualitativa como cuantitativa, permite asegurar la composición química del producto [10].

### **1.3 Regulación y Control de Calidad de los Productos Herbolarios en México**

En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) es la entidad encargada de regular la comercialización de productos herbolarios a través de la entrega de registros sanitarios o claves alfanuméricas. La COFEPRIS distingue entre dos clasificaciones: los remedios y los medicamentos herbolarios.

Los primeros se definen como un “preparado de plantas medicinales, o sus partes, individuales o combinadas, y sus derivados, presentado en forma farmacéutica, al cual se le atribuye por conocimiento popular o tradicional el alivio para algunos síntomas participantes o aislados de una enfermedad; dentro de su formulación no puede contener otra sustancia de síntesis química que tenga un efecto terapéutico, y no puede ir dirigido al tratamiento de una enfermedad o un padecimiento que requiera seguimiento médico. Estos productos son de libre venta, su calidad y seguridad han sido comprobadas, sin embargo, su eficacia es considerada con base en el conocimiento popular de las plantas” [11].

Por otro lado, los medicamentos herbolarios son “productos elaborados con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente principal es la parte

aérea o subterránea de una planta o extractos y tinturas, así como jugos, resinas, aceites grasos y esenciales, presentados en forma farmacéutica, cuya eficacia terapéutica y seguridad ha sido confirmada científicamente en la literatura nacional o internacional; dentro de su formulación no contiene sustancias de síntesis química que tengan un efecto terapéutico, van dirigidos al tratamiento de una enfermedad y estos pueden o no ser diagnosticados por un médico tratante, su calidad, seguridad y eficacia han sido comprobada técnica y científicamente” [11].

Para que un medicamento herbolario obtenga el registro sanitario necesario para su comercialización, es necesario reportar el contenido del constituyente responsable de la actividad terapéutica, o bien si este no se conoce, se requiere una prueba de ensayo mediante el uso de marcadores o determinaciones como la huella cromatográfica [12].

La legislación mexicana contempla dos normas oficiales para los productos herbolarios. La Norma Oficial Mexicana 072 regula los procesos de etiquetado de medicamentos y remedios herbolarios, mientras que la Norma Oficial Mexicana 073 establece los criterios de evaluación para la estabilidad de fármacos, medicamentos y remedios herbolarios [13,14]. Por otro lado, la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, expedida por la Secretaría de Salud, establece los métodos de análisis y especificaciones técnicas (requisitos de identidad, pureza y calidad) que deben cumplir las plantas y los derivados de estas empleados en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios [15].

## **1.4 Técnicas analíticas para el Control de Calidad de Medicamentos**

### **Herbolarios**

Una de las metodologías más empleadas para el control de calidad de medicamentos herbolarios es el análisis de la “huella dactilar química”, ya sea a través de perfiles cromatográficos o espectroscópicos. A partir del análisis cualitativo y cuantitativo de estos perfiles, es posible establecer niveles y requerimientos específicos que debe cumplir el producto terminado, asegurando así la calidad del mismo [16].

En particular, las técnicas cromatográficas han sido ampliamente utilizadas para establecer la huella dactilar de plantas; sin embargo una de las desventajas que presentan es que para lograr separaciones adecuadas de los constituyentes de una muestra es necesario optimizar un gran número de variables, como lo son la composición de la fase móvil, la fase estacionaria que se utiliza para la separación, la técnica de detección, etc. [7,17]; además usualmente involucran un proceso de preparación de muestra elaborado y un tiempo de análisis prolongado.

Por otro lado, los métodos espectroscópicos, ya sea como técnica analítica o acopladas como sistemas de detección a las técnicas cromatográficas, también han sido empleadas en la obtención de huellas dactilares de productos herbolarios para su control de calidad [18–20]. Este tipo de técnicas presentan la ventaja de proveer información tanto cualitativa como cuantitativa acerca de las

muestras que se analizan y permiten un análisis integral de los componentes presentes en la muestra [21].

### **1.5 La Resonancia Magnética Nuclear como técnica para el control de calidad de productos herbolarios**

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica empleada de manera rutinaria para el análisis y elucidación estructural de un gran número de moléculas. Esta técnica se fundamenta en la capacidad de los núcleos magnéticamente activos de adquirir distintos niveles de energía cuando están en presencia de un campo magnético intenso. Esto les permite, al interactuar con radiación electromagnética del orden de las radiofrecuencias, pasar de un estado de menor energía a uno de mayor energía, lo cual se puede observar a través del espectro de RMN [22].

Una de las ventajas de la RMN es que es una técnica cuantitativa por naturaleza, debido a que, en el caso de la  $^1\text{H}$ -RMN, las áreas de las señales que se observan en el espectro son directamente proporcionales al número de núcleos que las generan, lo que permite hacer análisis cuantitativos de manera directa [21,23].

La RMN cuantitativa (RMNc) aprovecha esta característica y permite realizar cuantificaciones usando la relación entre el valor de integración de una señal de interés en el espectro y un estándar de referencia, con la siguiente ecuación [24]:

$$P [\%] = \frac{n_{IC}Int_t MW_t m_{IC}}{n_t Int_{IC} MW_{IC} m_s} P_{IC}$$

La aplicación de la RMN como herramienta cuantitativa presenta una serie de ventajas respecto a otras técnicas, como lo son que los analitos no requieren de una etapa previa de separación de la muestra (siempre y cuando la complejidad del espectro lo permita), lo que conlleva a métodos de preparación de muestra rápidos y sencillos y la posibilidad de obtener información tanto cualitativa como cuantitativa en una sola corrida [21,25,26].

Además, debido a que la RMNc es una técnica de detección “universal”, no requiere de estándares de naturaleza química idéntica para la cuantificación; y es suficiente con contar con un estándar de calibración de alta pureza y estabilidad [27]

Si bien la RMNc presenta numerosas ventajas frente a las técnicas cromatográficas como métodos convencionales de cuantificación, para lograr emplear la técnica con resultados cuantitativos confiables es necesario tomar en cuenta y optimizar una serie de parámetros, que serán mencionados a continuación.

### *1.5.1 Parámetros para optimizar en un experimento de RMNc*

El primer requisito para emplear la RMNc es que la señal empleada para la cuantificación debe ser inequívocamente asignada a un átomo de la sustancia

que desea cuantificarse, y debe estar completamente resuelta en el espectro, ya que esto asegura la pureza de la señal [23].

En muchas ocasiones esto representa un reto por la complejidad de los espectros que se obtienen de los productos herbolarios. Sin embargo, una de las estrategias que se han propuesto para superar este obstáculo es un paso previo de fraccionamiento o purificación de la muestra, lo que reduce significativamente la complejidad del espectro [25].

#### 1.5.1.1 *Parámetros de adquisición*

Para que un experimento de RMN pueda dar resultados cuantitativos reproducibles y confiables es necesario optimizar ciertos parámetros llamados “de adquisición”, que tienen que ver con las condiciones experimentales bajo las cuales se obtiene el espectro. En la tabla 1 se indican estos parámetros, así como los valores recomendados para ellos y algunos comentarios.

Tabla 1. Parámetros a optimizar en la adquisición de espectros de RMN [24,28].

<b>Parámetro</b>	<b>Definición</b>	<b>Criterios</b>
Demora de la relajación ( $d1$ )	Tiempo requerido para que la magnetización alcance el estado de equilibrio después de la	Entre 3 a 5 veces el tiempo de relajación longitudinal

	aplicación del pulso de radiofrecuencia	
Tiempo de adquisición	Tiempo empleado para la adquisición completa de la señal de decaimiento libre de inducción (FID)	Debe asegurarse de ser lo suficientemente largo para evitar que el FID se trunque
Ganancia del receptor	Parámetro que caracteriza la amplificación de la señal proveniente de la muestra; maximiza la relación señal ruido (S/N)	Valores muy altos generan distorsión en la línea base, mientras que valores muy bajos causan pérdidas de la señal del analito o valores muy bajos de S/N

#### 1.5.1.2 Parámetros de procesamiento

Así mismo, otro aspecto que afecta la reproducibilidad de los experimentos de RMNc es el procesamiento de los datos obtenidos. Las distintas etapas de procesamiento permiten mejorar la resolución de los espectros, así como incrementar la relación S/N. Por otro lado, la elección de los parámetros óptimos de procesamiento permite una mayor exactitud y reproducibilidad en la integración de las señales [28].

La tabla 2 muestra algunos parámetros de procesamiento de los datos de RMNc, así como sus definiciones y algunos comentarios.

Tabla 2. Parámetros a optimizar en el procesamiento de espectros de RMN [24,26].

<b>Parámetro</b>	<b>Definición</b>	<b>Comentarios</b>
Funciones de ventana	Funciones que se aplican al FID para mejorar la resolución y la S/N.	Ejemplos de estas: multiplicación exponencial, multiplicación gaussiana
Zero filling (ZF)	Adición de “ceros” al FID para incrementar la resolución digital.	Un exceso de ZF disminuye la S/N. No debe exceder un factor de 2.
Corrección de fase	Parámetro que permite que permite obtener un espectro donde la parte real de los datos muestren líneas en modo de absorción	Tiene un efecto directo en la integración de las señales y, en consecuencia, en la exactitud de los resultados
Corrección de línea base	Parámetro que permite modificar la línea base de manera que esta sea lo más horizontal posible	Afecta de manera directa la exactitud de la integración de las señales



### 1.6 *Turnera diffusa*

*Turnera diffusa*, comúnmente llamada damiana, es un arbusto que crece en las regiones áridas y semiáridas de Sudamérica, México y EE. UU, sus hojas son pequeñas y arrugadas de un olor fuerte y tiene flores amarillas (figura 3). Se ha empleado de forma tradicional como afrodisiaco, para aliviar el catarro y la tos, entre otros [29].



Figura 3. Apariencia de las hojas y flor de *T. diffusa* [30].

Es considerada la especie más importante de las turneráceas, evidencia de ello es el creciente número de publicaciones científicas enfocadas en el estudio de sus efectos terapéuticos, así como en el control de calidad de productos herbolarios [31–39].

## 1.7 Antecedentes

En un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo se demostró la actividad hepatoprotectora de *T. diffusa* en un modelo *in vitro*; mediante aislamiento biodirigido se identificó que uno de los compuestos responsables de esta actividad es el hepatodamianol (figura 4, luteolin 8-C-[6 desoxi-2-O-(alfa-L-ramnopiranosil)-xilo-hexopiranos-3-ulósido]) [39].

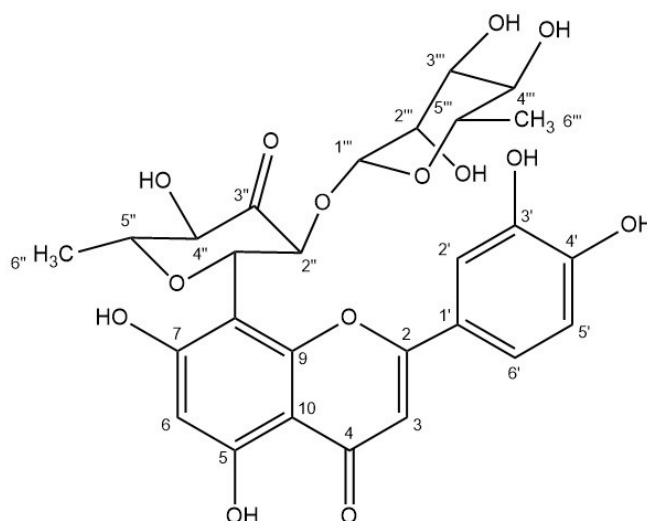


Figura 4. Estructura química del hepatodamianol.

Con base en estos resultados Delgado Montemayor desarrolló en su tesis doctoral un medicamento herbolario a base de *T. diffusa* [40]. Como uno de los objetivos de este trabajo se tuvo establecer parámetros de control de calidad en términos de identidad, pureza y contenido. En ese trabajo el análisis de contenido de hepatodamianol se realizó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) [40].

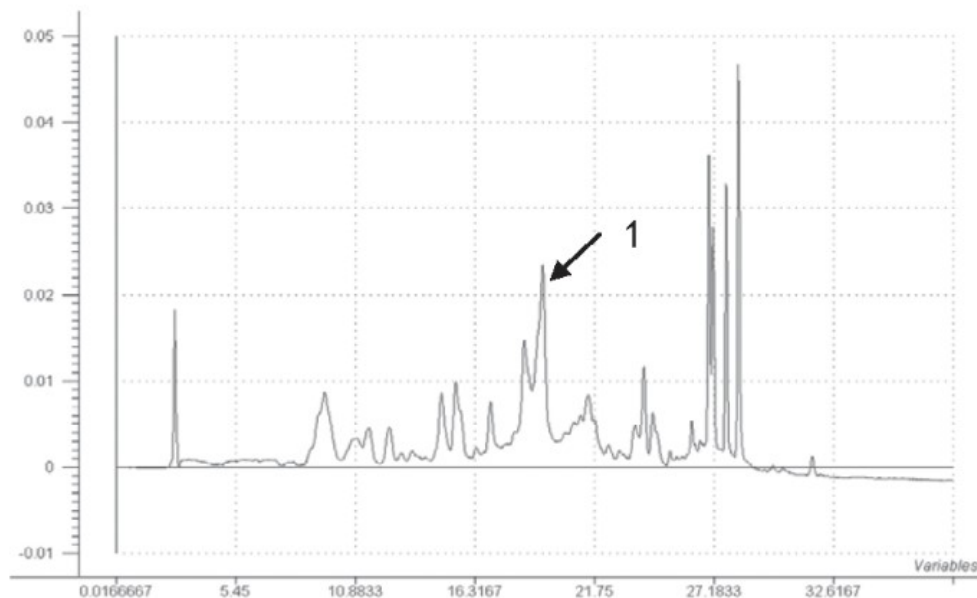


Figura 5. Cromatograma del extracto metanólico de *T. diffusa*. La flecha indica el pico correspondiente al hepatodamianol [35].

Así mismo, hace algunos años se desarrolló en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León un método cromatográfico para la cuantificación de hepatodamianol en extractos de *T. diffusa* [35].

Sin embargo, debido al traslape de las señales de compuestos químicamente similares que coeluyen junto con el hepatodamianol (figura 5) fue necesario aplicar un tratamiento de datos basado en la aplicación de una derivada de primer orden (figura 6) para incrementar la selectividad del método. Por lo que en nuestro grupo de trabajo se ha mantenido vigente el objetivo de generar un desarrollo analítico que no presente estas limitaciones.

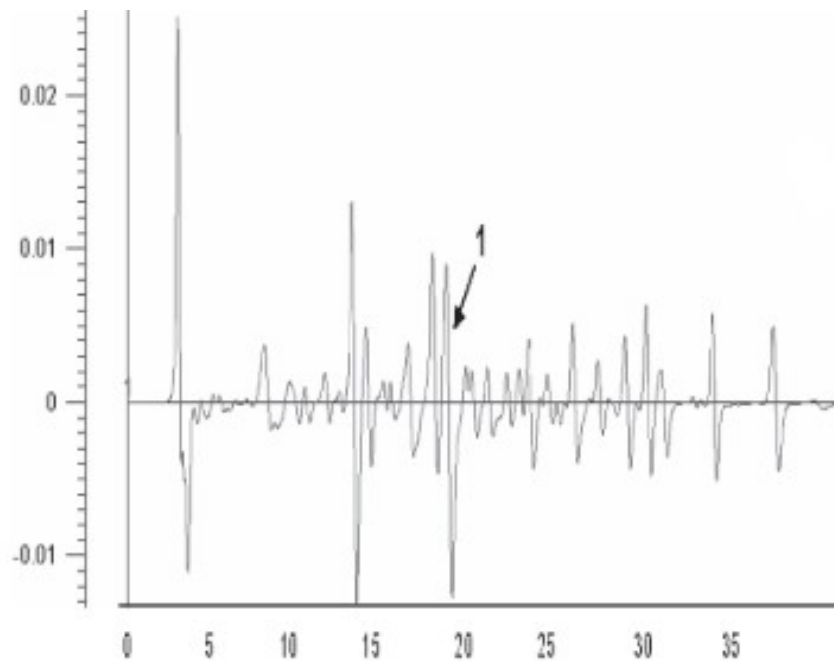


Figura 6. Primera derivada del cromatograma del extracto de *T. diffusa*. La flecha indica el pico correspondiente al hepatodamianol [35].

## 1.8 Justificación

El uso de la medicina herbolaria es cada vez mayor, tanto en países industrializados como en países en vías de desarrollo. *T. diffusa* es una planta con un amplio uso en la medicina herbolaria y con demostrada actividad hepatoprotectora. Estudios recientes han permitido identificar al hepatodamianol como el principal agente hepatoprotector presente en la planta.

Debido al aumento en las regulaciones legales de los productos herbolarios, el desarrollo de estrategias analíticas que contribuyan a verificar la calidad de estos, a través de análisis que permitan asegurar la identidad de los productos, así como de su contenido, es indispensable. Las técnicas espectroscópicas, en particular la Resonancia Magnética Nuclear, presenta una serie de ventajas frente a las técnicas cromatográficas, por lo que en este trabajo de tesis se propone el desarrollo de un método por Resonancia Magnética Nuclear para la identificación y cuantificación de hepatodamianol en extractos estandarizados de *T. diffusa*.

## 1.9 Objetivo General

Desarrollar y validar un método por Resonancia Magnética Nuclear para la cuantificación de hepatodamianol en extractos estandarizados de *T. diffusa*.

### 1.10 Objetivos Específicos

1. Determinar la pureza del hepatodamianol (luteolin 8-C-[6 desoxi-2-O-(alfa-L-ramnopiranosil)-xilo-hexopiranos-3-ulósido]) purificado a partir de *T. diffusa*.
2. Establecer los parámetros adecuados para la adquisición de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del hepatodamianol empleando como analito modelo rutina (2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D glucopiranosiloxi]-4*H*-cromen-4-ona).
3. Desarrollar y validar un método por Resonancia Magnética Nuclear para la cuantificación de hepatodamianol.
4. Cuantificar la cantidad de hepatodamianol presente en extractos estandarizados de *T. diffusa* mediante el método validado.

## CAPÍTULO 2

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 2.1 Material, equipos y reactivos

##### 2.1.1 Material

- Columna preparativa LiChroprep RP 18 310x25 mm (40-63  $\mu\text{m}$ ), Merck
- Columna HPLC C<sub>18</sub> Hypersil Gold 4.6x150 mm, tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , Thermo
- Cromatoplasmas de sílica gel 60F<sub>254</sub> 20x20, Merck
- Cubas cromatográficas de 121x108x80 mm
- Espátulas para polvos
- Gradillas
- Matraces bola de 50, 100 y 500 mL con boca esmerilada 24/40 Pyrex
- Matraces erlenmayer de 250 mL Pyrex
- Matraces de aforación Clase A de 1, 2 y 5 mL, Kimax
- Pipetas automáticas 20-200 y 100-1000  $\mu\text{l}$ , Eppendorf Research Plus

- Pipetas pasteur
- Placas de porcelana de 12 pozos
- Probetas de 25, 50 y 250 mL Pyrex
- Puntillas de 100-1000  $\mu$ l
- Tubos de ensayo de 13x100 Pyrex y Kimax
- Tubos eppendorf claros de 1.5 mL de capacidad Eppendorf
- Tubos de RMN de borosilicato de 5 mm de diámetro, Bruker
- Viales de vidrio de 4 mL con tapa, Wheaton

### *2.1.2 Equipos*

- Balanza analítica modelo PA214C, Pioneer
- Campana de extracción modelo CEE-120, Lumistell
- Centrífuga modelo ECMicro-MB, Internationa Equipment Company
- Colector de fracciones Modelo 2128, BioRad
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo Alliance 1525 con DAD, Waters.
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Avance III HD 400 MHz equipado con una sonda SP BBO de 5 mm con gradientes de campo en Z, Bruker
- Lámpara ultravioleta con luz a  $\lambda$ 254 y 365 nm
- Liofilizadora modelo Freeze Dry System, Freezeone 4.5, Labconco
- Rotavapor modelo Labrota 4000-efficient, Heidolph



- Sonicador modelo 2510, Branson
- Vortex, VWR Scientific Products

### 2.1.3 Reactivos

- Ácetato de etilo grado reactivo, Fermont
- Ácido acético grado reactivo, Fermont
- Ácido fórmico grado reactivo, Fermont
- Agua bidestilada
- Agua destilada
- Dimetilsulfóxido hexadeuterado 99.9% D, Sigma
- Dimetilsulfóxido hexadeuterado con tetrametilsilano (TMS) 99.9% D, 0.03% TMS, Sigma
- Hexametilciclotrisiloxano 98%, Sigma
- Metanol grado reactivo, Fermont
- Metanol grado HPLC, Tedia
- Metanol deuterado 99.8% D, Sigma
- Piridina grado reactivo
- Rutina grado estándar certificado 97.67%, HWI Analytik
- Rutina grado reactivo, 95%, Sigma
- Ácido benzoico, grado estándar certificado,  $5.01 \pm 0.01$  mM, Cambridge Isotope Laboratories

## **2.2 Cromatografía en capa fina (CCF)**

Se utilizaron cromatoplasmas base aluminio de sílica gel 60F<sub>254</sub>, de tamaño 20x10 cm. Las placas se observaron bajo luz ultravioleta a una  $\lambda$  de 254 nm.

### *2.2.1 Sistema de elución*

Se empleó un sistema de elución de acetato de etilo : ácido fórmico: ácido acético: agua en proporción 25:1:1:2.

## **2.3 Purificación de hepatodamianol**

### *2.3.1 Cromatografía en columna a baja presión*

Para realizar la purificación de hepatodamianol se partió de fracciones pre - purificadas de *T. diffusa* con el procedimiento previamente reportado por Delgado Montemayor [40]. Se disolvieron 300 mg de esta fracción pre – purificada en 500  $\mu$ L de metanol:agua (MeOH:H<sub>2</sub>O) al 40% v/v y posteriormente se sembraron en una columna de C<sub>18</sub> previamente acondicionada con 200 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O al 40% v/v. Las condiciones de elución para la columna se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de elución para cromatografía en columna preparativa.

<b>Fase móvil (MeOH:H<sub>2</sub>O % v/v)</b>	<b>Volumen (mL)</b>	<b>Flujo (mL/min)</b>	<b>Clave de identificación</b>
40	200	3.0	1
50	200	3.0	2
55	200	3.0	3
100	200	3.0	4

Se colectó el eluato de cada fase móvil en matraces erlenmeyer de 250 mL y posteriormente se eliminaron los solventes con ayuda de un rotavapor. Los extractos obtenidos se recuperaron con metanol en viales de 4 mL y se identificaron como 1, 2, 3 y 4, como se muestra en la tabla 3. Una vez secos, los extractos se analizaron por CCF de acuerdo con la metodología descrita en el punto 2.2.

Una vez seco, 50 mg del extracto 3 se disolvieron en 100  $\mu$ L de MeOH:H<sub>2</sub>O al 40% v/v y se sembraron en una columna preparativa de C<sub>18</sub> previamente acondicionada con 100 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O al 40% v/v. Las condiciones de elución para la columna se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de elución para cromatografía en columna preparativa de Fracción 3.

Fase móvil (MeOH:H <sub>2</sub> O % v/v)	Tiempo (min)	Flujo (mL/min)
40	60	0.5
50	60	0.5
60	60	0.5
100	60	1.0

A partir de la fase móvil 50% MeOH:H<sub>2</sub>O, se colectaron 100 fracciones de 0.5 mL cada una. Estas se analizaron por CCF de acuerdo con lo descrito en el punto 2.2 y las fracciones que presentaron una mancha con un R<sub>F</sub> de 0.35 se analizaron por CLAR.

### 2.3.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución

Las fracciones que presentaron un R<sub>F</sub> = 0.35 se prepararon para su análisis por CLAR. La separación cromatográfica se realizó con una columna Hypersil – Gold de 4.6x150 mm de fase inversa octadecilsilano (C<sub>18</sub>) y tamaño de partícula de 4 µm. Se inyectaron 10 µL de la muestra disuelta en metanol.

Las condiciones para el sistema de elución se muestran en la tabla 5. La fase móvil consistió en una mezcla de ácido fórmico 0.1% v/v y metanol; que se desgasificó y filtró con una membrana de tamaño de poro 0.45 µm, previo a su uso. El flujo de la fase móvil fue de 0.4 mL/min.

Tabla 5. Condiciones de elución para el cromatógrafo de líquidos.

<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>0.1% ácido fórmico</b>	<b>(MeOH)</b>
0	70	30
20	40	60
25	30	70
30	30	70
40	70	30
45	70	30

Las fracciones cuyos cromatogramas mostraron un pico mayoritario con tiempo de retención igual a 26 minutos se recuperaron y se colectaron en un vial de vidrio de 4 mL.

### *2.3.3 Cromatografía de exclusión molecular*

La fracción rica en hepatodamianol obtenida en el punto anterior se disolvió en 100  $\mu$ L de metanol y se sembró en una columna de pipeta pasteur (7 cm x 5 mm) empleando como fase estacionaria Sephadex G20 y metanol como fase móvil. Se colectaron 30 fracciones de 0.5 mL cada una y se analizaron por CLAR, de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.3.2.

Aquellas fracciones cuyo cromatograma mostró un pico mayoritario con tiempo de retención igual a 26 minutos, correspondiente al hepatodamianol, se

mezclaron. El hepatodamianol obtenido se recuperó en un vial ámbar de 4 mL y se guardó en congelación hasta su posterior uso.

## 2.4 Verificación de la pureza del hepatodamianol por RMNc

Para verificar la pureza, se pesaron en un matraz de aforación de 1 mL 1.8 mg del hepatodamianol obtenido y se llevó a la marca de aforo con metanol deuterado (MeOD- $d_4$ ). Posteriormente 600  $\mu$ L de esta disolución se trasvasaron a un tubo de RMN de 5 mm para realizar un experimento de  $^1\text{H}$ -RMNc empleando el método de referencia electrónica ERETIC2, disponible en el software TopSpin 3.5, con las condiciones de adquisición que se indican en la tabla 6. Para la cuantificación del hepatodamianol se empleó la señal correspondiente al hidrógeno  $\text{CH}_3$  - 6''' ( $\delta = 0.72$  ppm), la cual se indica con una flecha en la figura 7.

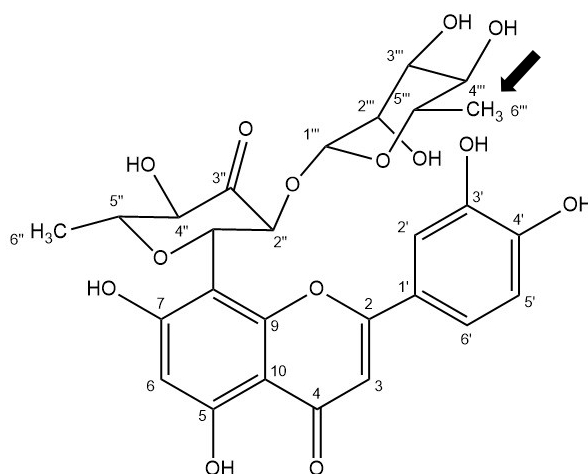


Figura 7. Estructura del hepatodamianol. La señal de  $^1\text{H}$ -RMN empleada para la cuantificación de este compuesto es el  $\text{CH}_3$ -6'''.

Tabla 6. Condiciones de los parámetros de adquisición para verificación de la pureza de hepatodamianol.

Parámetro de adquisición	Valor
Pulso de excitación	90°
Número de incrementos (NS)	16
Ganancia del receptor (RG)	32 dB
Demora de la relajación ( $d1$ )	3 s
Ventana espectral (SW)	20.0 ppm
Número de puntos (TD)	65536
Tiempo de adquisición (AQ)	4.0 s

La señal electrónica de ERETIC2 se calibró con una disolución estándar certificada de ácido benzoico 5 mM, para después emplear la ecuación (1) para el cálculo de la pureza de hepatodamianol [41].

$$C_x = k C_{ref} * \left( \frac{I_x}{I_{ref}} \right) * \left( \frac{T_X}{T_{ref}} \right) * \left( \frac{\theta_x}{\theta_{ref}} \right) * \left( \frac{n_{ref}}{n_x} \right) \quad (1)$$

## 2.5 Desarrollo del método de cuantificación por RMN

### 2.5.1 Medición de los tiempos de relajación longitudinal ( $T_1$ )

Para establecer el tiempo adecuado de  $d1$  se midió  $T_1$  del CH<sub>3</sub>-6''' del hepatodamianol y de la rutina como analito modelo, mediante el experimento de recuperación de la inversión (T1IR). Adicionalmente también fueron

determinados los valores de  $T_1$  del metilo del hexametilciclotrisiloxano (HMCTS) y de los hidrógenos de la piridina, ya que ambos compuestos fueron evaluados para su uso potencial como estándares internos.

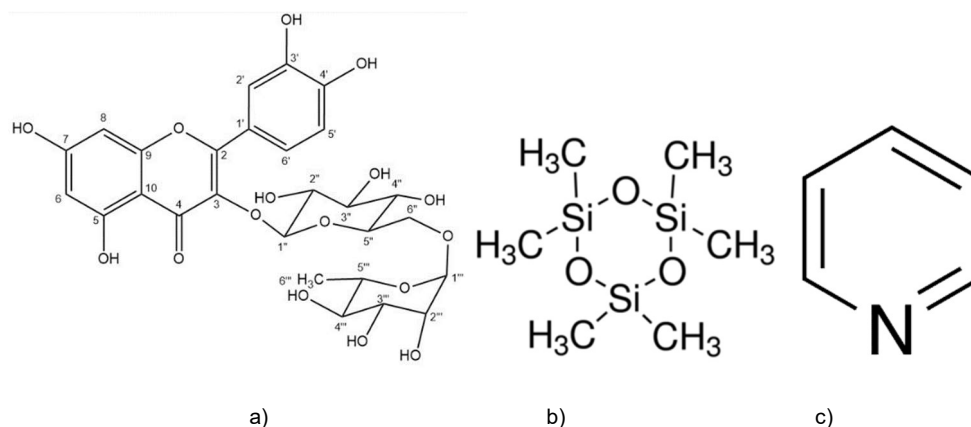


Figura 8. Estructura química de a) rutina, b) hexametilciclotrisiloxano y c) piridina.

Para medir el  $T_1$  se corrió un experimento convencional de  $^1\text{H}$ -RMN de una dimensión, con los parámetros de adquisición descritos en la tabla 6. Posteriormente, se realizó el experimento T1IR, con el programa de pulsos PROTONT1, con una secuencia de pulsos como se indica en la figura 9, empleando 15 s como valor de  $d1$  y un tiempo de espera variable en un intervalo de 0.01 a 85 segundos.

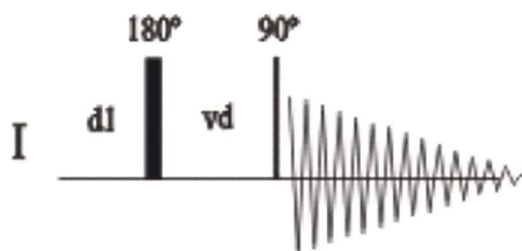


Figura 9. Secuencia de pulsos del experimento de recuperación de la inversión.



### 2.5.2 Parámetros de adquisición y procesamiento de espectros

Todos los espectros se obtuvieron con los parámetros de adquisición indicados en la tabla 7 a una temperatura controlada de 25°C. Así mismo, una vez obtenida la FID de cada espectro, esta se procesó de acuerdo con los parámetros de procesamiento mostrados en la tabla 8. Los espectros se calibraron con la señal de TMS en un desplazamiento químico de 0 ppm.

Tabla 7. Condiciones de los parámetros de adquisición para la obtención de los espectros de RMNc.

<b>Parámetro de adquisición</b>	<b>Valor</b>
Pulso de excitación	90°
NS	16
RG	32 dB
<i>d1</i>	55 s
SW	20.0 ppm
TD	65536
AQ	4.0 s

Tabla 8. Condiciones de los parámetros de procesamiento para los espectros de RMNc.

<b>Parámetro de procesamiento</b>	<b>Valor</b>
Multiplicación exponencial	LB=0.1 Hz
Transformada de Fourier	---
Corrección de fase	Manual
Corrección de línea base	ABSN

### 2.5.3 Evaluación del hexametilciclotrisiloxano y piridina como estándares internos

Para evaluar el uso potencial del HMCTS y de la piridina como estándar interno fue necesario verificar que sus señales no presentaran traslape con las de la muestra de extracto estandarizado de *T. diffusa*. Para ello se obtuvieron los espectros de <sup>1</sup>H-RMN del extracto estandarizado adicionado con a) HMCTS y b) piridina. Una vez verificado esto, se siguió con la evaluación de la estabilidad de las señales de los compuestos antes mencionados.

Para evaluar el HMCTS como estándar interno se prepararon por triplicado disoluciones de rutina (0.50 - 2.50 mM) con HMCTS (1.5 mM) en dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-*d*<sub>6</sub>). Se evaluó la estabilidad de la señal de cada uno de los compuestos durante tres días no consecutivos.

Para evaluar la piridina como estándar interno se prepararon por triplicado disoluciones de rutina (0.50 a 2.50 mM) con piridina (2.50 mM) en DMSO- $d_6$ . Se evaluó la estabilidad de la señal de cada uno de los compuestos durante tres días no consecutivos mediante el monitoreo de cambios en la forma e intensidad de las señales.

## **2.6 Evaluación del sistema empleando como analito modelo rutina**

La evaluación del sistema se realizó de acuerdo con los lineamientos indicados en la Guía para Desarrollo y Validación de métodos por RMN de la Federación Europea de Asociaciones Nacionales de Medidas, Pruebas y Laboratorios Analíticos EuroLab [42], y la Guía de Validación de Procedimientos Analíticos de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) [43]. Los parámetros evaluados fueron linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y robustez.

### **2.6.1 Linealidad**

Se prepararon 5 mL de una disolución stock de rutina 4.8 mM pesando 15.1 mg de un estándar analítico de rutina con pureza de 95%. Por otro lado, se prepararon 2 mL de una disolución stock de piridina 20 mM para utilizar como patrón interno. A partir de estas disoluciones stock se prepararon, por triplicado, disoluciones estándar de rutina como se indica en la tabla 9. A cada nivel de

concentración se le añadieron 120  $\mu\text{L}$  de la disolución de piridina 20 mM. para alcanzar una concentración de 2.42 mM.

Tabla 9. Concentración de las disoluciones estándar para la curva de calibración y volúmenes de disolución stock empleados.

<b>Concentración rutina (mM)</b>	<b>Volumen de stock rutina (mL)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>
0.50	0.102	1.00
1.00	0.203	1.00
1.50	0.305	1.00
2.00	0.407	1.00
2.50	0.509	1.00

Se obtuvieron los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y se realizó la integración de la señal correspondiente al hidrógeno del metilo 6'' de rutina ( $\delta = 0.992$  ppm) y al hidrógeno en *para* al nitrógeno de la piridina ( $\delta = 7.78$  ppm). La integración se realizó en un intervalo de desplazamiento químico de 1.04 a 0.93 y 7.82 a 7.75 ppm respectivamente.

Con los valores de integración de cada nivel de concentración se construyeron curvas de calibración de estándar externo y de estándar interno; para cada curva se realizó un análisis de regresión y se calculó la desviación estándar relativa en porcentaje (%DER) de los factores de respuesta.

### 2.6.2 Precisión

Para evaluar la precisión intradía se calculó %DER de la respuesta de rutina y piridina de manera independiente, y de la relación entre la respuesta de rutina y piridina. Este cálculo se hizo para cada conjunto de triplicados de las disoluciones estándar preparadas en el apartado 2.6.1. mediante la ecuación (2), donde  $s$  representa la desviación estándar y  $x$  el promedio. Los %DER corresponden a las soluciones preparadas y analizadas el mismo día.

$$\%DER = \frac{s}{x} (100) \quad (2)$$

Para evaluar la precisión interdía se analizaron durante tres días no consecutivos los triplicados de las disoluciones estándar de rutina (0.50, 2.00 y 5.00 mM) y piridina preparadas en el apartado 2.6.1. Se calculó el %DER de la respuesta de rutina y piridina de forma individual y de la relación de respuestas de rutina y piridina.

Adicionalmente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con los resultados de tres días de análisis no consecutivos. Como hipótesis nula ( $H_0$ ) se tuvo que no existe diferencia significativa entre las medias de los grupos y como hipótesis alternativa que sí existe diferencia significativa entre las medias de los grupos. Se estableció un valor de  $p > 0.05$  para concluir que no existe diferencia significativa entre las medias de los grupos.

### 2.6.3 Exactitud

La exactitud fue evaluada a través del cálculo del porcentaje de error de las disoluciones preparadas en el apartado 2.6.1 mediante la ecuación (3). El porcentaje de error se obtuvo para las concentraciones calculadas tanto con la ecuación de la curva de estándar externo, como con la ecuación de la curva de estándar interno. Además, se realizó un análisis de regresión con la concentración calculada vs la concentración real.

$\% \text{ error} =$

$$\frac{\text{concentración calculada} - \text{concentración real}}{\text{concentración real}} (100) \quad (3)$$

### 2.6.4 Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ) se calcularon con las ecuaciones (4) y (5), donde  $\sigma$  indica el error asociado al eje y en la curva de calibración y  $S$  indica el valor de la pendiente de la curva de calibración.

$$LOD = \frac{3\sigma}{S} \quad (4)$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S} \quad (5)$$

### 2.6.5 Robustez

La evaluación de la robustez se realizó utilizando las disoluciones del nivel medio (1.50 mM) de concentración; se hicieron modificaciones en los parámetros

de temperatura, número de incrementos y tiempo de *d1*, de acuerdo con lo mostrado en la tabla 10. Con los resultados obtenidos se realizó una prueba de ANOVA para cada nivel de concentración. Como hipótesis nula ( $H_0$ ) se tuvo que no existe diferencia significativa entre las medias de los grupos y como hipótesis alternativa que sí existe diferencia significativa entre las medias de los grupos. Se tomó un valor de  $p > 0.05$  para establecer que no existe diferencia significativa entre las medias de los grupos.

Tabla 10. Modificaciones para la evaluación de la robustez.

<b>Parámetro</b>	<b>Valores evaluados</b>
Temperatura	24.9°C, 25.0°C, 25.1°C
Número de incrementos	4, 16, 32
Tiempo de demora de la relajación	44 s, 55 s, 66 s.

## **2.7 Validación del método de cuantificación por RMN**

La validación del método se realizó de acuerdo con los lineamientos indicados en la Guía para Desarrollo y Validación de métodos por RMN de la Federación Europea de Asociaciones Nacionales de Medidas, Pruebas y Laboratorios Analíticos EuroLab [42], y la Guía de Validación de Procedimientos Analíticos de la ICH [43].

Los parámetros evaluados fueron especificidad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y robustez. Los espectros se obtuvieron con las condiciones de adquisición y procesamiento indicadas en las tablas 7 y 8, a excepción del tiempo de demora de la relajación, el cual se estableció en 3 s.

### *2.7.1 Especificidad*

La especificidad se evaluó con la muestra identificada como MH4 (obtenida por Delgado Montemayor [40]). Ésta se analizó a través del experimento de 1D-TOCSY Selectivo. Para ello se aplicó un pulso selectivo a 219 Hz, con un tiempo de mezclado de 200 ms, aplicando las condiciones establecidas previamente por nuestro grupo de trabajo [44].

### *2.7.2 Linealidad*

Se prepararon 5 mL de una disolución stock de rutina 10.29 mM., pesando 35 mg de un estándar certificado de rutina con pureza de 97.67%. A partir de esta disolución se prepararon, por triplicado, soluciones estándar de rutina de acuerdo con las concentraciones indicadas en la tabla 11.

Se obtuvieron los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y se realizó la integración de la señal correspondiente al hidrógeno del metilo  $6''''$  ( $\delta = 0.992$  ppm), en un intervalo de desplazamiento químico de 1.022-0.960 ppm.



Tabla 11. Concentración de las disoluciones estándar para la curva de calibración.

<b>Concentración (mM.)</b>	<b>Volumen de stock (mL)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>
0.50	0.049	1.00
1.00	0.098	1.00
2.00	0.195	1.00
3.00	0.292	1.00
4.00	0.389	1.00
5.00	0.486	1.00

Con los valores de integración de cada nivel de concentración se construyó una curva de calibración por estándar externo y se realizó un análisis de regresión; además se calculó el %DER de los factores de respuesta.

### *2.7.3 Precisión*

#### *2.7.3.1 Precisión del sistema*

Para evaluar la precisión intradía del sistema se calculó %DER de la respuesta de rutina. Este cálculo se hizo para cada conjunto de triplicados de las disoluciones estándar preparadas en el apartado 2.7.2 mediante la ecuación (2). Los %DER corresponden a las soluciones preparadas y analizadas el mismo día.

Para evaluar la precisión interdía del sistema se analizaron durante tres días no consecutivos los conjuntos de triplicados de las disoluciones estándar de rutina (0.50, 2.00 y 5.00 mM) preparadas en el apartado 2.7.2 y se calculó el %DER de la respuesta de rutina.

Adicionalmente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con los resultados de tres días de análisis no consecutivos. Como hipótesis nula ( $H_0$ ) se tuvo que no existe diferencia significativa entre las medias de los grupos y como hipótesis alternativa que sí existe diferencia significativa entre las medias de los grupos. Se estableció un valor de  $p > 0.05$  para concluir que no existe diferencia significativa entre las medias de los grupos.

#### *2.7.3.2 Precisión del método*

La precisión del método se evaluó con el %DER del triplicado de muestras preparadas en el apartado 2.8.

#### *2.7.4 Exactitud*

##### *2.7.4.1 Exactitud del sistema*

La exactitud del sistema se evaluó a través del cálculo del porcentaje de error de las disoluciones estándar de rutina preparadas en el apartado 2.7.2, mediante la ecuación (3). Además, se realizó un análisis de regresión con la

concentración calculada mediante la ecuación de la curva de calibración y la concentración real.

#### 2.7.4.2 Exactitud del método

La exactitud del método se evaluó a través del porcentaje de recobro. Se preparó una disolución de hepatodamianol a una concentración de 2.50 mM. Para ello se pesaron 4.5 mg del hepatodamianol purificado en el punto 2.3 en un matraz de aforación de 1 mL, y se llevó a la marca de aforo con DMSO- $d_6$ . Esta disolución se analizó de la misma manera que en el apartado 2.4 para complementar los resultados de la verificación de la pureza del hepatodamianol aislado.

Posteriormente se pesó por sextuplicado 20 mg de la muestra identificada como MH4. Tres de estas réplicas se prepararon como se indica en el punto 2.8 y al resto de las muestras se les añadieron 250  $\mu$ L de la disolución de hepatodamianol 2.50 mM. Se obtuvieron los espectros de las disoluciones y el porcentaje de recobro se calculó mediante la ecuación (6).

$$\% \text{ de recobro} = \frac{\text{cantidad inicial} - \text{cantidad final}}{\text{cantidad añadida}} (100) \quad (6)$$

#### 2.7.5 Límite de detección

El límite de detección se estableció como la mínima concentración que permitiera identificar el patrón de señales correspondiente a los hidrógenos CH<sub>3</sub>-

6''' ( $\delta = 0.99$  ppm), CH-1''' ( $\delta = 4.39$  ppm), OH-4''' ( $\delta = 5.08$  ppm), CH-1'' ( $\delta = 5.35$  ppm), CH-5' ( $\delta = 6.85$  ppm), CH-2' ( $\delta = 7.53$ ) y OH-5 ( $\delta = 12.5$  ppm). Para determinarlo se prepararon, por triplicado, disoluciones de rutina (0.25, 0.125 y 0.10 mM) a partir de la disolución estándar de 2.00 mM de rutina, y se obtuvieron los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN.

#### *2.7.6 Límite de cuantificación*

El límite de cuantificación se estableció como la mínima concentración donde se obtiene un coeficiente de variación y un porcentaje de error menor al 5%. Para determinarlo se calcularon estos valores para las disoluciones preparadas en el apartado 2.7.5, mediante las ecuaciones (2) y (3).

#### *2.7.7 Robustez*

La evaluación de la robustez se hizo para los niveles bajo (0.50 mM), medio (2.00 mM) y alto (5.00 mM) de concentración, con las disoluciones estándar preparadas en el apartado 2.7.2; se hicieron modificaciones en los parámetros de valor de LB en la multiplicación exponencial, en el tipo de algoritmo empleado para la corrección de línea base y en el procesamiento de los espectros por analistas distintos, de acuerdo a lo mostrado en la tabla 12, y se realizó una prueba de ANOVA para cada nivel de concentración.

Como hipótesis nula ( $H_0$ ) se tuvo que no existe diferencia significativa entre las medias de los grupos y como hipótesis alternativa que sí existe diferencia significativa entre las medias de los grupos. Se estableció un valor de  $p > 0.05$  para concluir que no existe diferencia significativa entre las medias de los grupos.

Tabla 12. Modificaciones para la evaluación de la robustez.

<b>Parámetro</b>	<b>Valores evaluados</b>
Valor de LB en multiplicación exponencial	0.05, 0.10, 0.15 Hz
Algoritmo de corrección de línea base	ABS, ABSN, ABSD
Procesamiento por analistas distintos	Dra. Cecilia Delgado, QCB. Aída Parra, Dra. Alma Saucedo

## **2.8 Análisis de muestras de extracto estandarizado**

Se analizaron, por triplicado, cuatro muestras de extracto estandarizado. Las muestras fueron proporcionadas por la Dra. Cecilia Delgado y la información sobre el sitio y fecha de colecta se muestra en la tabla 13. El procedimiento de preparación de muestra consistió en someter las muestras a liofilización durante 24 horas. Posteriormente se pesaron por triplicado 25 mg de cada muestra en un tubo eppendorf de 1.5 mL; se adicionaron 600  $\mu$ L de DMSO- $d_6$  y se agitó en vortex hasta lograr la disolución total del extracto.

Una vez disueltas, las muestras se centrifugaron y se trasvasó el contenido del tubo eppendorf a matraces de aforación de 1 mL para llevar a la marca de aforo. Posteriormente se tomaron 600  $\mu$ L de la disolución y se llevaron a un tubo de RMN de 5 mm de diámetro para la obtención de los espectros.

Tabla 13. Sitio y fecha de colecta de los extractos estandarizados de *T. diffusa*.

<b>Sitio de colecta</b>	<b>Fecha de colecta</b>	<b>Clave</b>
Montemorelos, Nuevo León	Noviembre 2014	MH3
Montemorelos, Nuevo León	Diciembre 2015	MH4
Montemorelos, Nuevo León	Abril 2016	MH5
Montemorelos, Nuevo León	Octubre 2015	MH7

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Purificación de hepatodamianol

##### *3.1.1 Cromatografía en columna preparativa*

La mancha con un  $R_F$  correspondiente al hepatodamianol (0.33) se identificó en la fracción 3. En la figura 10 se muestran cromatoplasmas representativas, donde se indica con flechas la mancha correspondiente al hepatodamianol, y con un asterisco el estándar de hepatodamianol del cual se obtuvo el valor de  $R_F$ .

Posteriormente la fracción 3 fue sometida a una segunda etapa de separación cromatográfica, empleando una columna a baja presión. En la figura 11 se muestran las cromatoplasmas representativas de las fracciones obtenidas en este punto; las fracciones donde se identificó la mancha con  $R_F$  correspondiente al hepatodamianol se indican con una flecha.

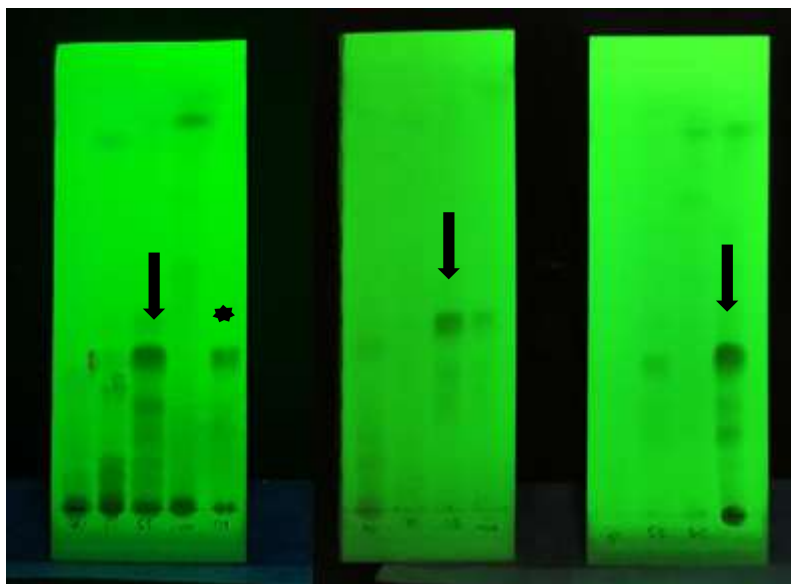


Figura 10. Cromatoplasmas representativas de la cromatografía preparativa. Las flechas indican la mancha correspondiente al hepatodamianol. El asterisco indica el estándar de hepatodamianol empleado para identificar el valor de  $R_F$

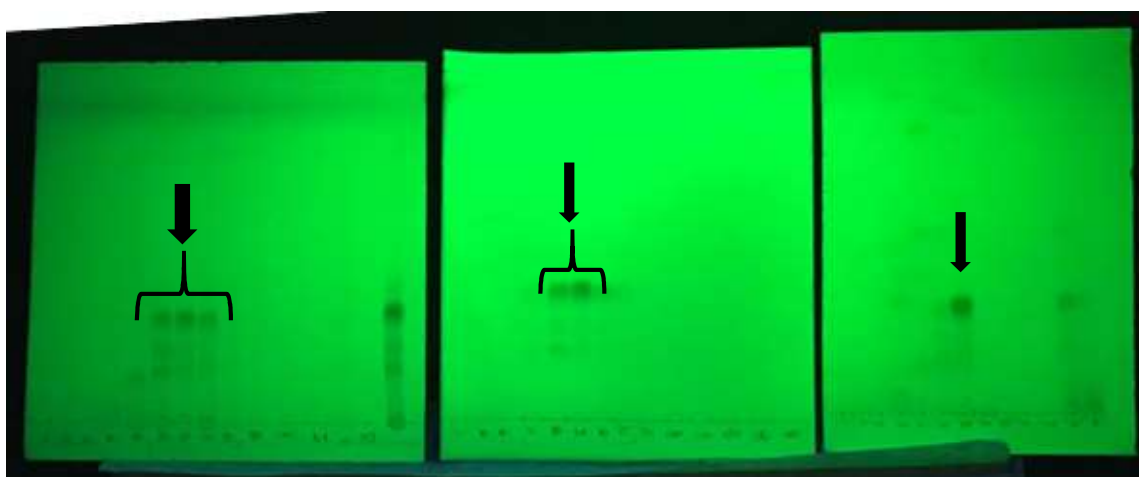


Figura 11. Cromatoplasmas representativas de la separación de la fracción 3. Las flechas indican la mancha con  $R_F$  correspondiente al hepatodamianol.



### 3.1.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución

Las fracciones obtenidas en el apartado 2.3.1 con un  $R_F$  correspondiente al hepatodamianol se analizaron por CLAR; aquellas donde se identificó un pico mayoritario con un tiempo de retención correspondiente al hepatodamianol (26 min) se juntaron y se obtuvieron 9 mg de hepatodamianol. El cromatograma del hepatodamianol aislado se muestra en la figura 12.

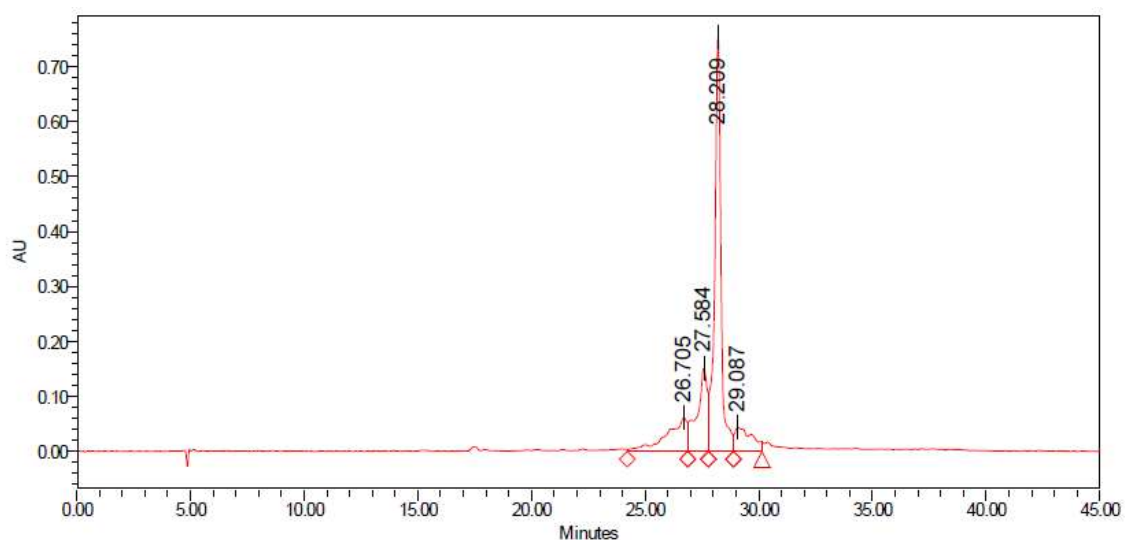


Figura 12. Cromatograma del hepatodamianol aislado, longitud de onda de detección 254 nm.

### 3.2 Verificación de la pureza del hepatodamianol

Las figuras 13 y 14 muestran los espectros en  $DMSO-d_6$  y  $MeOD-d_4$  del hepatodamianol aislado. En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos para el análisis de pureza del hepatodamianol.

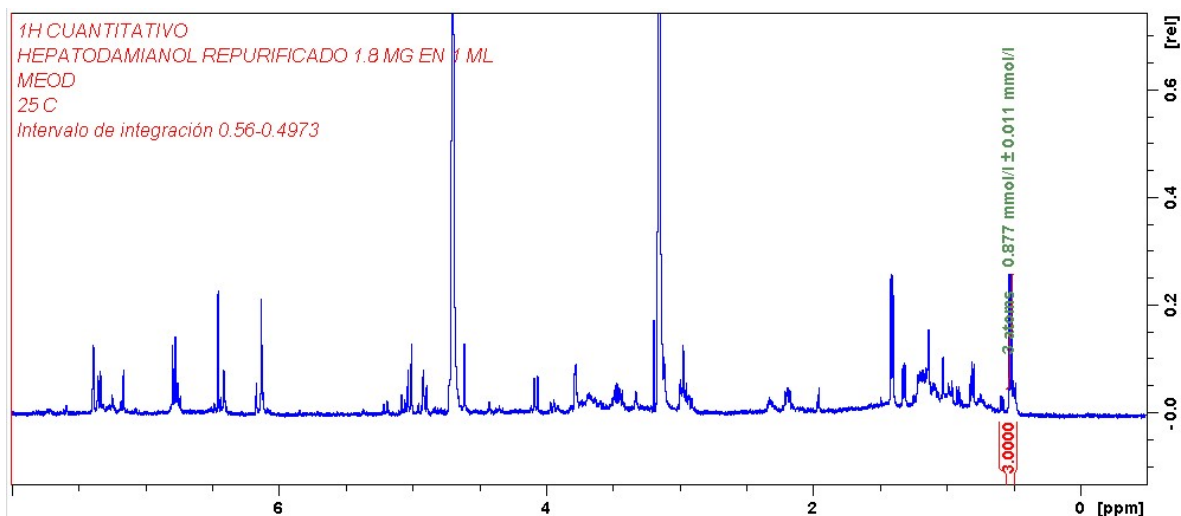


Figura 13. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN a 400 MHz de hepatodamianol en  $\text{MeOD-}d_4$ . La señal integrada corresponde al grupo  $\text{CH}_3\text{-6}''$ . El texto en color verde indica la concentración de la disolución de hepatodamianol calculada por el programa ERETIC2.

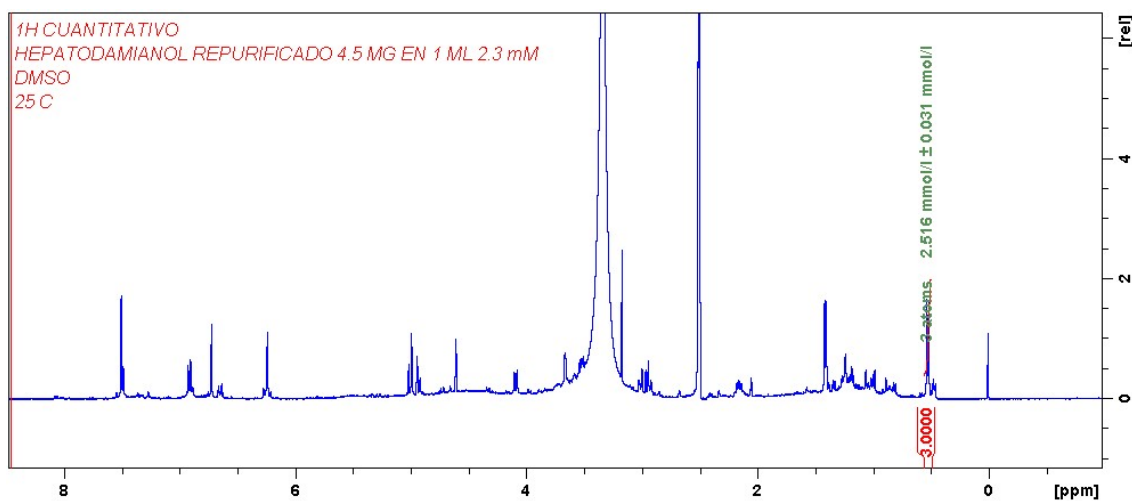


Figura 14. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN a 400 MHz de hepatodamianol en  $\text{DMSO-}d_6$ . La señal integrada corresponde al grupo  $\text{CH}_3\text{-6}''$ . El texto en color verde indica la concentración de la disolución de hepatodamianol calculada por el programa ERETIC2.

Tabla 14. Resultados del análisis de pureza del hepatodamianol aislado.

mg de hepatodamianol	Integral	[mM] ERETIC2	mg/mL	Pureza % p/p
1.7	4155928.58	0.983	0.57	33.37
4.5	10644607.2	2.516	1.45	32.27
<b>Promedio</b>				32.82
<b>Desviación estándar (DE)</b>				0.78
<b>%DER</b>				2.38%

### 3.3 Desarrollo del método de cuantificación por RMN

#### 3.3.1 Medición de los tiempos de relajación longitudinal

Para establecer las mejores condiciones de adquisición de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMNc fue necesario medir el valor de  $T_1$  de los distintos átomos de hidrógeno que serán utilizados para la cuantificación. En la tabla 15 se muestran los valores obtenidos para los núcleos analizados. Las gráficas de  $T_1$  obtenidas para cada uno de estos núcleos se muestran en el anexo I.

Tabla 15. Tiempos de relajación longitudinal obtenidos

Átomo de H / Compuesto	Valor de $T_1$ (s)
CH <sub>3</sub> -6''' rutina	0.43
CH <sub>3</sub> -6''' hepatodamianol	0.53
CH <sub>3</sub> hexametildiclotrisiloxano	2.13

CH - o piridina	10.95
CH - m piridina	10.54
CH - p piridina	10.60

### 3.3.2 Evaluación del hexametilciclotrisiloxano y piridina como estándares internos

La figura 15 muestra los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del extracto estandarizado con a) HMCTS (rojo) y b) piridina (azul). Como puede observarse, la señal tipo singulete del HMCTS ( $\delta = 0.15$  ppm) no presenta traslape con las señales de la muestra. Las señales correspondientes a los hidrógenos en *orto* ( $\delta = 8.58$  ppm) y *para* ( $\delta = 7.79$  ppm) al nitrógeno de la piridina tampoco muestran traslape con las señales del extracto estandarizado de *T. diffusa*.

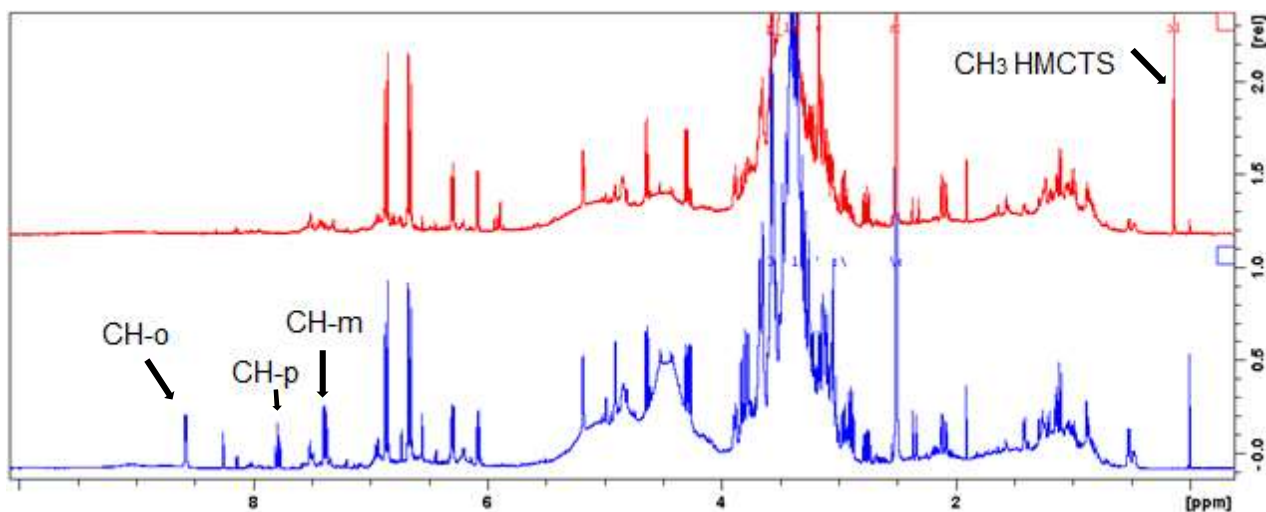


Figura 15. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN a 400 MHz en  $\text{DMSO}-d_6$  del extracto estandarizado de *T. diffusa* con HMCTS (rojo) y piridina (azul). Las flechas indican las señales correspondientes a los compuestos.

En las figuras 16 y 17 se muestran los espectros sobrepuestos de tres días distintos de análisis del HMCTS y de la piridina en DMSO- $d_6$ . Se muestra únicamente la zona ampliada donde aparecen las señales de interés. En la señal del grupo metilo del HMCTS se observan diferencias en la intensidad de la señal, mientras que en la piridina la intensidad de las distintas señales se mantuvo constante.

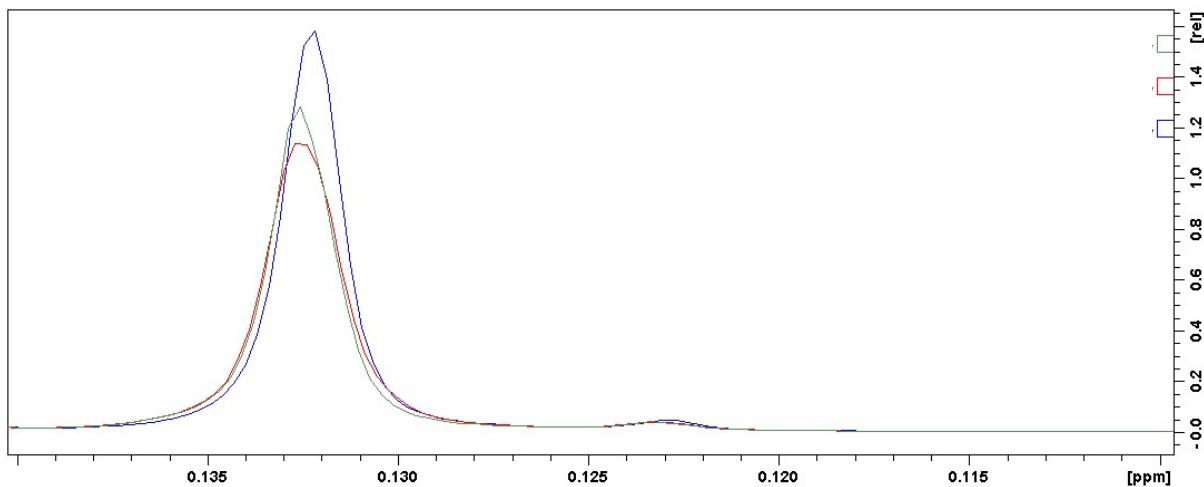


Figura 16. Sobreposición de tres espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del HMCTS obtenidos en días no consecutivos.

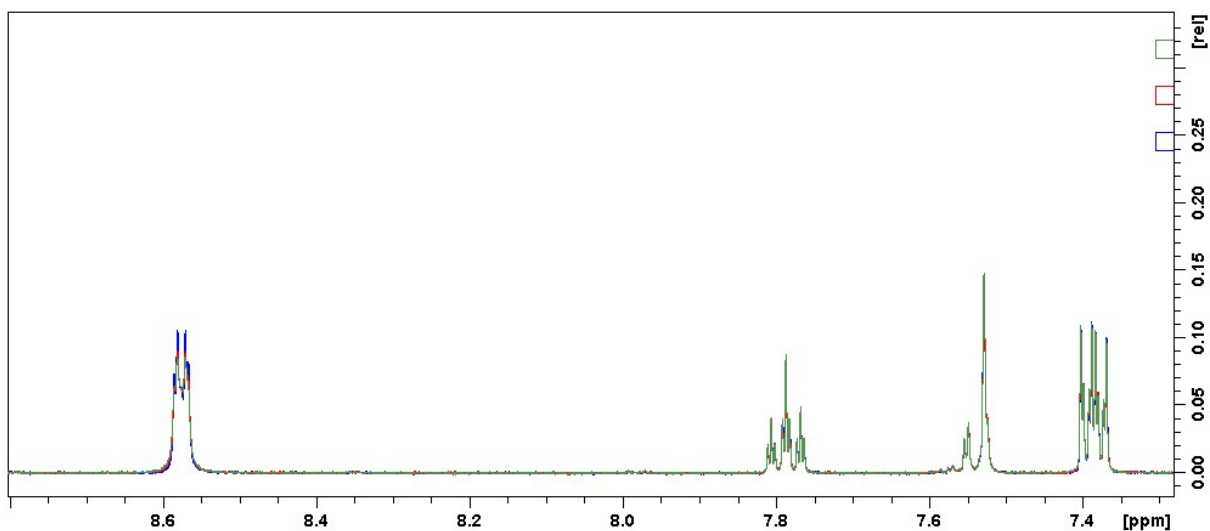


Figura 17. Sobreposición de tres espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de piridina obtenidos en días no consecutivos.

### 3.4 Evaluación del sistema empleando como analito modelo rutina

La tabla 16 muestra un resumen de los resultados obtenidos para la evaluación de la linealidad, precisión y exactitud del sistema, empleando rutina como estándar externo y piridina como estándar interno, así como también los valores calculados para el límite de detección y cuantificación y los resultados del análisis de robustez. Los datos completos de este apartado se muestran en el anexo II.

Tabla 16. Resultados de la evaluación de linealidad, precisión, exactitud, LOD, LOQ y robustez, por estándar externo e interno.

Parámetro	Estándar externo	Estándar interno
Linealidad	$r^2 = 0.9993$ %DER de factores de respuesta: 1.42%	$r^2 = 0.9994$ %DER de factores de respuesta: 1.34%
Precisión	%DER: 0.39-2.65% $p > 0.05$	%DER: 2.18-0.35% $p > 0.05$
Exactitud	$r^2 = 0.9993$ , $m = 0.9990$ % de error : 0.17-0.39%	$r^2 = 0.9994$ , $m = 0.9999$ % de error: 1.14–0.01%
LOD	0.05 mM	0.05 mM
LOQ	0.18 mM	0.17 mM
Robustez	No es robusto para ningún factor	Temperatura y número de incrementos: robusto <i>d1</i> : no robusto

La tabla 17 muestra los resultados del cálculo de %DER de las disoluciones preparadas en el apartado 2.6.1. Se muestran los resultados para rutina y piridina de manera individual y el resultado para el cociente entre las respuestas de estas

dos moléculas. Cabe resaltar que a partir de la concentración de 1.50 mM los %DER fueron mayores para la piridina (estándar interno) que para la rutina (estándar externo).

Tabla 17. Resultados de %DER para respuesta de rutina, piridina y cociente de rutina y piridina

Nivel de concentración [mM]	%DER rutina	%DER piridina	%DER rutina/piridina
0.50	2.65	0.67	2.18
1.00	0.39	0.07	0.35
1.50	1.50	2.01	1.45
2.00	1.54	2.21	0.67
2.50	0.75	1.87	0.81

### 3.5 Validación del método de cuantificación de hepatodamianol por RMN

#### 3.5.1 Especificidad

Para evaluar la especificidad del método, se obtuvo el espectro 1D-TOCSY selectivo tanto del hepatodamianol como de una muestra de extracto estandarizado (MH4), irradiando la señal del grupo CH<sub>3</sub>-6'''. La figura 18 muestra el espectro de 1D-TOCSY selectivo de la muestra MH4 de extracto estandarizado



(azul) y de hepatodamianol (rojo). En ambos espectros se observan las señales características del sistema de espín en el que está acoplado el CH<sub>3</sub>-6'''.

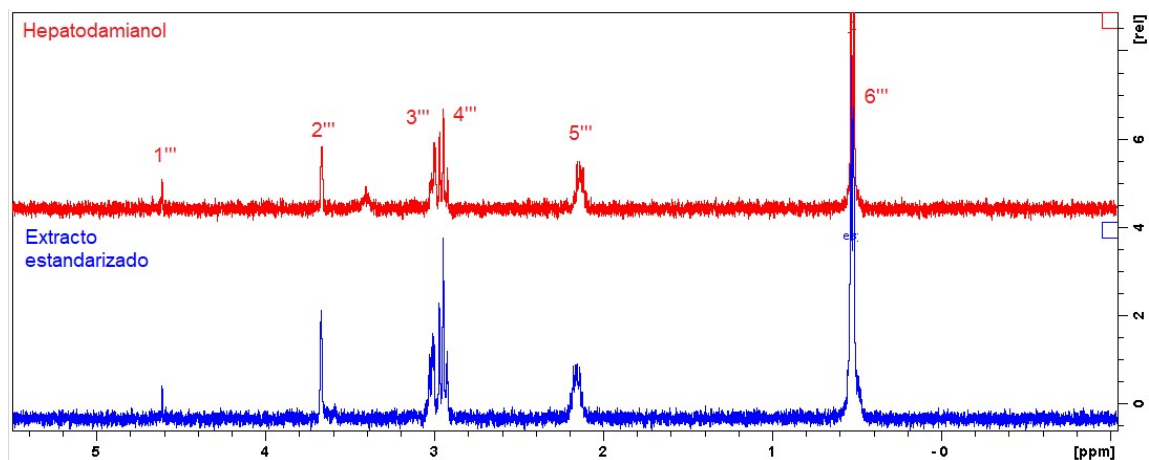


Figura 18. Espectros de 1D-TOCSY selectivo de hepatodamianol (rojo) y extracto estandarizado de *T. diffusa* (azul) obtenidos al irradiar la señal del grupo CH<sub>3</sub>-6'''.

### 3.5.2 Linealidad

La figura 19 muestra el gráfico de la curva de calibración obtenida por el método de estándar externo utilizando rutina como analito modelo. En la tabla 18 se resumen los resultados del análisis de regresión efectuado para evaluar la linealidad.

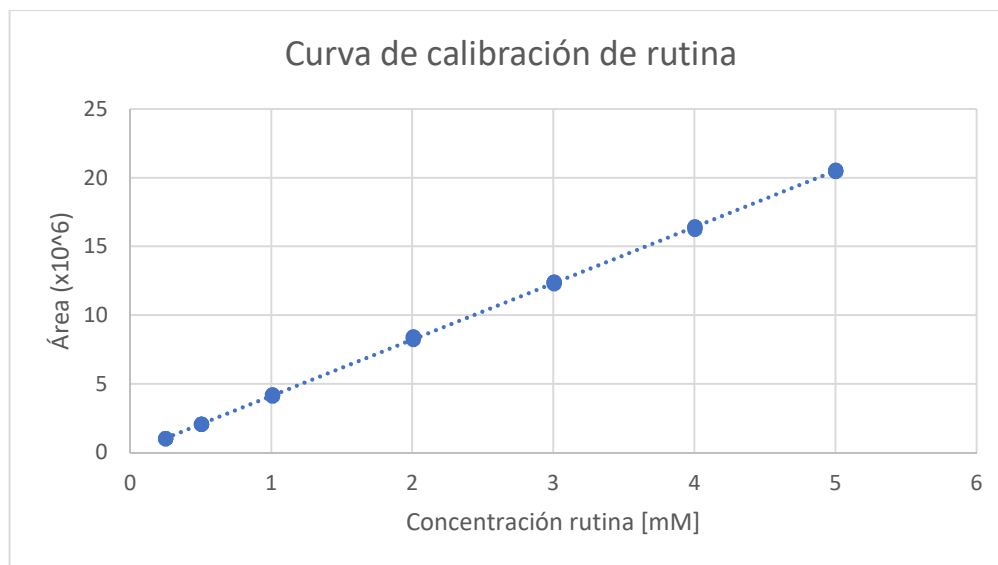


Figura 19. Curva de calibración de estándar externo con rutina.

Tabla 18. Resultados del análisis de regresión para evaluar linealidad.

Parámetro	Valor obtenido
Ecuación de la curva	$y = 32601.21x + 4094508.78$
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9999
%DER de factores de respuesta	0.95%

Estos resultados demuestran que en el intervalo analizado se obtiene una respuesta lineal, con un valor de  $r^2 > 0.98$  y un %DER de los factores de respuesta bajo (<1.0%).

### 3.5.3 Precisión

#### 3.5.3.1 Precisión del sistema

La tabla 19 resume los valores de %DER calculados para evaluar la precisión intradía del sistema. Cabe resaltar que, para cada uno de los niveles de concentración evaluados, el %DER en las lecturas intradía es menor o igual a 1.21%.

La tabla 20 muestra los valores obtenidos de %DER calculados para evaluar la precisión interdía del sistema, en este caso el %DER es menor o igual a 1.50%. Los %DER corresponden a las disoluciones de rutina preparadas en el apartado 2.7.2. En el análisis de varianza realizado para evaluar la precisión interdía se obtuvo un valor de p de 0.99.

Tabla 19. Resultados de %DER (precisión intradía).

<b>Nivel de concentración [mM]</b>	<b>%DER</b>
0.25	0.58
0.50	0.28
1.00	0.89
2.00	1.21
3.00	0.61
4.00	0.62
5.00	0.22

Tabla 20. Resultados de %DER (precisión interdía).

<b>Nivel de concentración [mM]</b>	<b>%DER</b>
0.50	1.10
2.00	1.50
5.00	0.93

### 3.5.3.2 Precisión del método

La tabla 21 muestra los resultados de %DER para las cuatro muestras de extracto estandarizado preparadas en el apartado 2.8.

Tabla 21. Resultados de %DER de las muestras de extracto analizadas

<b>Muestras de extracto estandarizado analizadas</b>				
	MH3	MH4	MH5	MH7
%DER	3.24	2.62	1.37	2.31

Como se puede observar, el %DER oscila entre 1.37 y 3.24% para las muestras de extracto analizadas.

### 3.5.4 Exactitud

#### 3.5.4.1 Exactitud del sistema

La tabla 22 muestra los porcentajes de error calculados para las disoluciones de rutina preparadas en el apartado 2.7.2. En el análisis de regresión

de la concentración calculada vs la real se obtuvo un valor de  $r^2$  y de pendiente de 0.999. Para el nivel de concentración más bajo evaluado, 0.25 mM, el valor obtenido para el % de error es de -4.01, para los demás niveles el % de error siempre fue menor a 2.

Tabla 22. Resultados de porcentaje de error calculado para las disoluciones de rutina.

<b>Nivel de concentración [mM]</b>	<b>% de error</b>
0.25	-4.01
0.50	-0.64
1.00	0.96
2.00	1.53
3.00	0.40
4.00	-0.30
5.00	-0.05

#### 3.5.4.2 Exactitud del método

Para evaluar la exactitud del método fue adicionada una concentración conocida de hepatodamianol a una muestra de extracto estandarizado. La figura 20 muestra una ampliación de los espectros sobrepuestos de una réplica de muestra de extracto estandarizado (MH4) sin adicionar (azul) y la misma muestra de extracto adicionada con hepatodamianol (250  $\mu$ L, 2.50 mM, rojo). En la tabla 23 se resumen los resultados obtenidos para el cálculo del porcentaje de recobro.

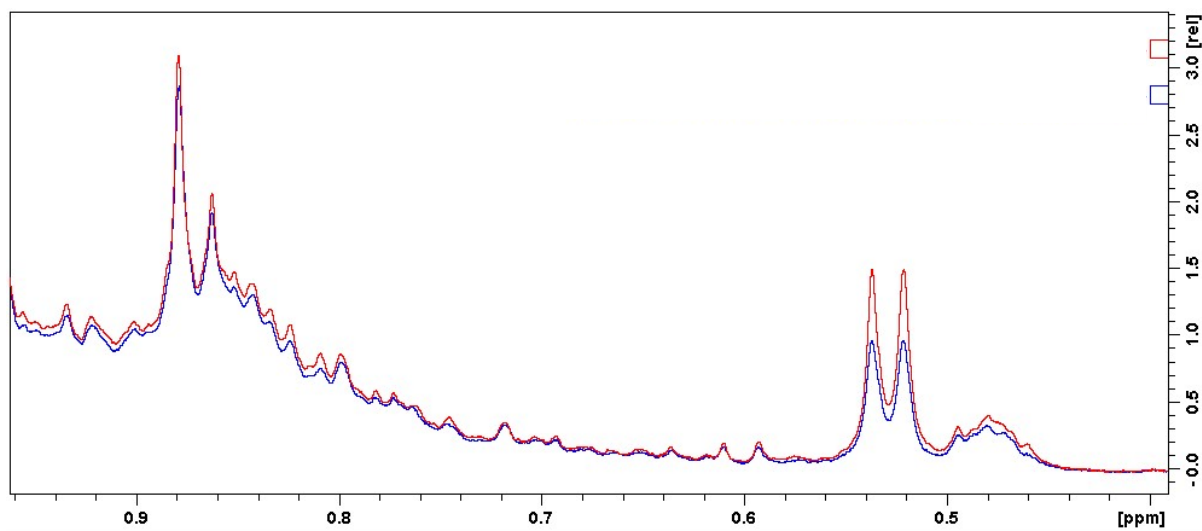


Figura 20. Espectros sobrepuestos de muestra de extracto estandarizado de *T. diffusa* sin adicionar (azul) y adicionada con hepatodamianol 2.5 mM (rojo).

Tabla 23. Resultados del porcentaje de recobro con muestra MH4

Muestra sin adicionar			Muestra adicionada			
	Concentración de hepatodamianol determinada			Concentración de hepatodamianol determinada		
Muestra (mg)	mM	mg/mL	Muestra (mg)	mM	mg/mL	% de recobro
20.00	1.84	1.06	20.40	2.48	1.43	99.50
20.00	1.77	1.02	20.30	2.46	1.42	106.50
20.10	1.86	1.07	20.40	2.47	1.42	93.82
<b>Promedio</b>	1.83	1.05		2.47	1.42	99.94
<b>%DER</b>	2.61	2.61		0.52	0.52	6.36

Se obtuvieron valores de % de recobro de 93 a 106%, con un valor promedio de 99.94% de recobro.

### 3.5.5 Límite de detección

El límite de detección se estableció como la concentración mínima donde se identifica el patrón de señales de rutina correspondiente a los hidrógenos CH<sub>3</sub>-6'' (δ 0.99 ppm), CH-1''' (δ 4.39 ppm), CH-1'' (δ 5.35 ppm), OH-4'' (δ 5.08 ppm), CH-5' (δ 6.85 ppm), CH-2' (δ 7.53 ppm), OH-5 (δ 12.60).

La figura 21 muestra espectros de rutina a concentraciones de 0.25, 0.125 y 0.10 mM; las flechas indican las señales mencionadas anteriormente. El límite de detección se estableció en 0.125 mM, ya que por debajo de esta concentración las señales arriba mencionadas no son totalmente distinguibles.

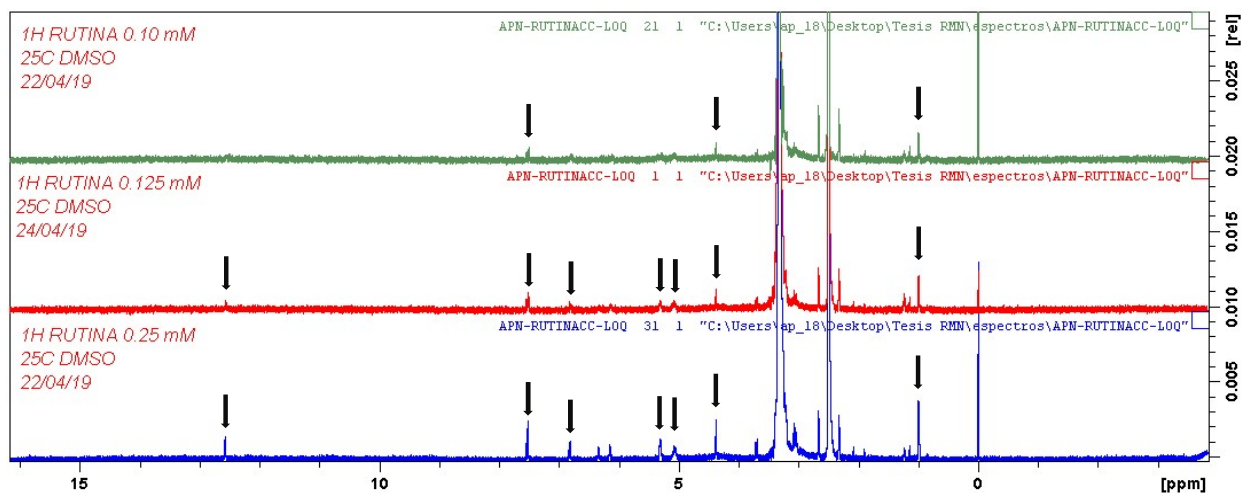


Figura 21. Espectros de <sup>1</sup>H-RMN de rutina a 400 MHz a 0.25 mM (azul), 0.125 mM (rojo) y 0.100 mM (verde).

### 3.5.6 Límite de cuantificación

La tabla 24 muestra los %DER y porcentaje de error de una disolución de rutina 0.125 y 0.250 mM. Con base en estos resultados el límite de cuantificación se estableció en 0.250 mM, debido a que a niveles de concentración menores el % de error es mayor al 5.

Tabla 24. Valores de %DER y % de error para cálculo del límite de cuantificación.

<b>Concentración [mM]</b>	<b>%DER</b>	<b>Porcentaje de error</b>
0.250	0.58	- 4.1
0.125	1.85	-12

### 3.5.7 Robustez

Las tablas 25, 26 y 27 muestran los resultados obtenidos en la prueba de ANOVA para cada parámetro evaluado, a) valor de LB (0.05, 0.10, 0.15 Hz), b) procesamiento por distintos analistas y c) corrección de línea base (ABS, ABSN, ABSD), para las disoluciones de rutina preparadas en el apartado 2.7.2, a niveles bajo (0.50 mM), medio (2.00 mM) y alto (5.00 mM) de concentración.



Tabla 25. Resultados del análisis de varianza para evaluar robustez nivel bajo  
(rutina, 0.50 mM).

<b>Parámetro</b>	<b>Valor de LB</b>	<b>Procesamiento por distintos analistas</b>	<b>Algoritmo de corrección de línea base</b>
Valor de p	0.09	0.28	0.002
Acepta/rechaza Ho	Acepta		Rechaza
Es robusto	Sí		No

Tabla 26. Resultados del análisis de varianza para evaluar robustez nivel medio  
(rutina, 2.00 mM).

<b>Parámetro</b>	<b>Valor de LB</b>	<b>Procesamiento por distintos analistas</b>	<b>Algoritmo de corrección de línea base</b>
Valor de p	0.99	0.99	0.87
Acepta/rechaza Ho	Acepta		
Es robusto	Sí		

Tabla 27. Resultados del análisis de varianza para evaluar robustez nivel alto (rutina, 5.00 mM).

<b>Parámetro</b>	<b>Valor de LB</b>	<b>Procesamiento por distintos analistas</b>	<b>Algoritmo de corrección de línea base</b>
Valor de p	0.70	0.39	0.09
Acepta/rechaza Ho	Acepta		
Es robusto	Sí		

### 3.6 Análisis de muestra

La figura 22 muestra el espectro de <sup>1</sup>H-RMN completo de una muestra de extracto estandarizado (MH4). La señal correspondiente al CH<sub>3</sub>-6''' se indica con una flecha. La figura 23 muestra una ampliación de los espectros de cuatro muestras de extracto estandarizado analizadas, la señal de cuantificación, correspondiente al CH<sub>3</sub>-6''', se indica con una flecha.

La tabla 28 resume los resultados obtenidos para el contenido de hepatodamianol en los extractos estandarizados analizados, así como la DE de cada réplica. Los valores de %DER se muestran en la sección 3.5.3.2 *Precisión del método*.

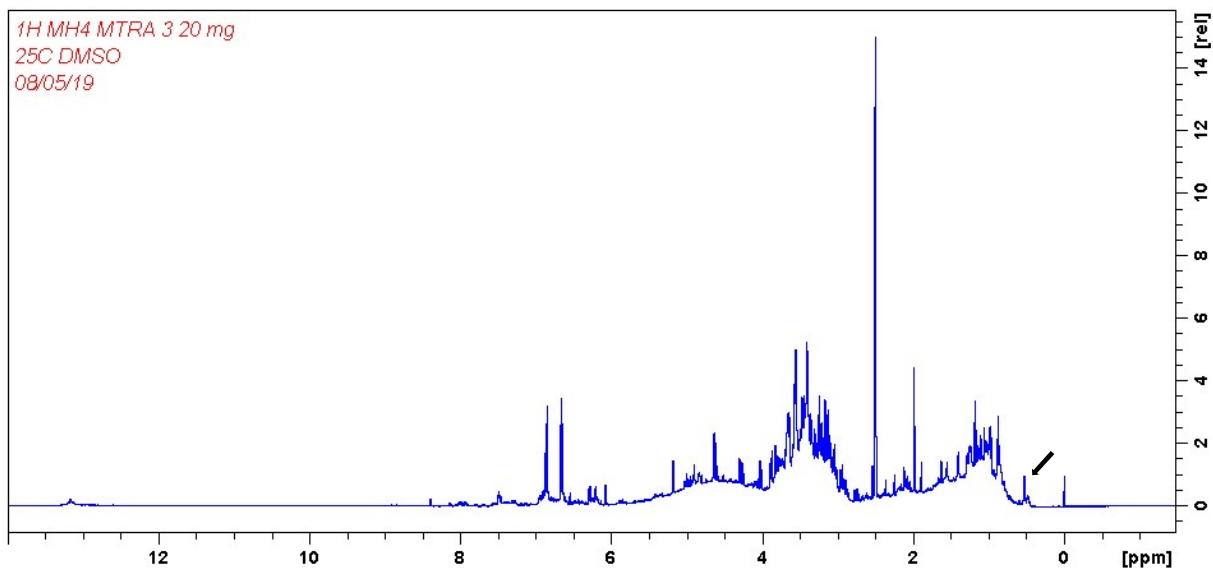


Figura 22. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{DMSO-}d_6$  a 400 MHz de la muestra de extracto estandarizado de *T. diffusa* MH4. La flecha indica la señal de cuantificación, correspondiente al  $\text{CH}_3\text{-6''}$ .

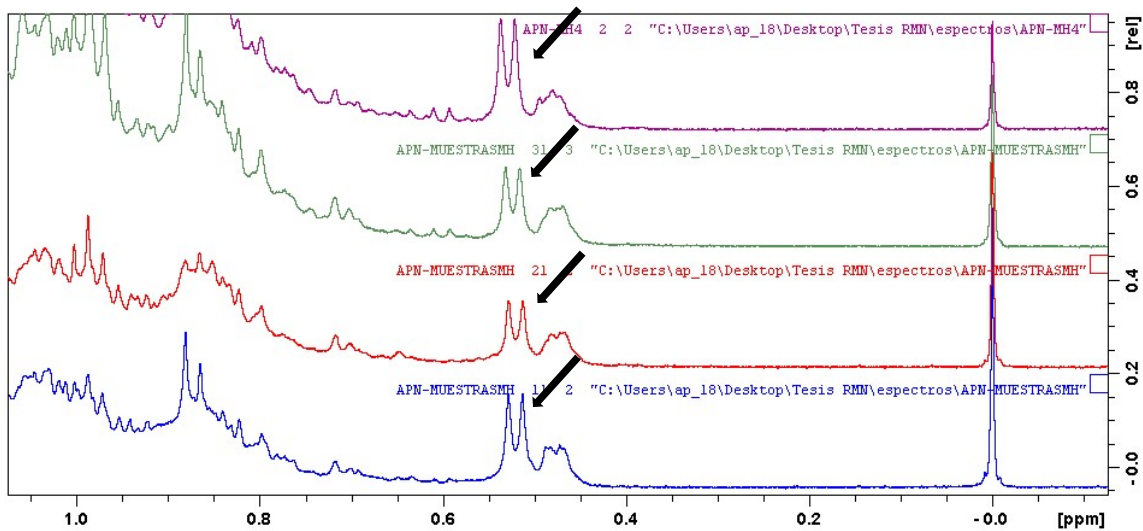


Figura 23. Ampliación de espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de las cuatro muestras de extracto estandarizado de *T. diffusa* analizadas. Las flechas indican la señal de cuantificación, correspondiente al  $\text{CH}_3\text{-6''}$ .

Tabla 28. Resultados del análisis de muestra de extracto estandarizado.

<b>mg de hepatodamianol / g extracto estandarizado</b>				
	MH3	MH4	MH5	MH7
Réplica 1	36.86	52.93	28.30	35.20
Réplica 2	34.78	50.90	29.08	36.56
Réplica 3	36.74	53.51	28.69	36.72
Promedio	36.13	52.44	28.69	36.16
DE	1.17	1.37	0.39	0.84

## **CAPÍTULO 4**

### **DISCUSIÓN**

El uso de la medicina herbolaria es una práctica creciente a nivel mundial. De acuerdo con datos de la OMS, entre el 70 y 95% de la población de países en desarrollo emplea a la medicina tradicional como servicios primarios de atención médica [4].

Con el aumento en el uso de este tipo de productos también se ha buscado el desarrollo de estrategias que permitan asegurar la calidad, tanto de material herbal como de productos herbolarios terminados; prueba de ello son las resoluciones que ha emitido la OMS para el desarrollo de metodologías de monitoreo y aseguramiento de la calidad, seguridad y eficacia de productos herbales [45] .

En la guía de la OMS para la Selección de Marcadores de Sustancias de Origen Herbal para el Control de Calidad de Medicinas Herbales se emiten recomendaciones sobre los criterios de selección de marcadores para la identificación y cuantificación en medicamentos herbolarios. Entre ellos se

encuentran como primera opción los constituyentes con actividad terapéutica conocida [45]. Debido a que en el caso del extracto estandarizado de *T. diffusa* se sabe que el principal constituyente responsable de la actividad hepatoprotectora es el hepatodamianol [39], este representa una excelente opción como marcador, el cual cumple además con el requisito de ser detectable y cuantificable a través de métodos analíticos instrumentales disponibles [35–37,44].

Debido a la falta de estándares de hepatodamianol accesibles comercialmente se decidió aislar y purificar el compuesto directamente de la planta para ser empleado como estándar. Para realizar el aislamiento de hepatodamianol se siguió la metodología reportada por Delgado Montemayor [40] con algunas modificaciones y pasos adicionales. Al final del proceso de aislamiento se obtuvieron 9 mg de hepatodamianol, con una pureza cromatográfica calculada de 57%, esto tomando en cuenta las áreas de los picos obtenidos en el cromatograma del hepatodamianol.

Este método de cálculo de la pureza cromatográfica se conoce como normalización interna, y su uso es común en la determinación de impurezas y sustancias relacionadas en productos farmacéuticos [46–48]. Si bien presenta la ventaja de que no requiere de estándares de referencia, lo cual lo hace sencillo y conveniente, tiene la limitación de que para obtener resultados exactos es necesario que todos los componentes de la mezcla presenten el mismo factor de respuesta y se separen en el sistema cromatográfico. El no cumplir con estas dos condiciones puede llevar a obtener errores en la determinación de la pureza [49].

Una de las principales ventajas de la RMNc es que cuenta con múltiples opciones de calibración, entre las cuales se encuentran el empleo de estándares internos, estándares externos, métodos de adición de estándar y curvas de calibración, así como métodos que emplean el principio de reciprocidad y el uso de señales generadas electrónicamente [24,26].

Entre los últimos se encuentra el método de ERETIC2, el cual se basa en el principio de reciprocidad. Este establece que, si se tiene una sustancia de concentración conocida que sirva como referencia, es posible determinar la concentración de una sustancia desconocida utilizando la ecuación 1 [50].

El método de ERETIC2 permite el cálculo y comparación del área de señales en espectros distintos, al basarse en la intensidad absoluta de las mismas. De esta forma se evita la contaminación de la muestra, lo cual es valioso cuando se trabaja con productos naturales, ya que muchas veces estos son difíciles de aislar y se obtienen en poca cantidad.

El método de ERETIC2 ha sido empleado para la cuantificación de toxinas marinas, de alcaloides en muestras de cocaína y de productos naturales aislados de distintas fuentes [51–53]. En nuestro grupo de investigación se desarrolló recientemente un método analítico de cuantificación de rebaudiósido A empleando este método [54].

Al determinar la pureza del hepatodamianol aislado, con ayuda del programa ERETIC2, la pureza calculada fue de 32.82%, valor muy por debajo de lo calculado por CLAR. Si bien este resultado indica una diferencia importante

entre ambos métodos, coincide con lo reportado en la literatura para comparaciones entre valores de pureza medidos por RMNc y técnicas cromatográficas [26,55,56], donde hay discrepancias de entre 10 y 20% en los resultados entre estas dos técnicas, resultando siempre menor la pureza espectroscópica.

Cabe mencionar que, si bien el resultado de la pureza del hepatodamianol calculada por el método de ERETIC2 (32.82%) y por el método de normalización interna por HPLC (57%) fue significativamente distinto, no ocurre así con la pureza calculada con la curva de calibración de rutina (33.72%). La concordancia entre los resultados de pureza por ERETIC2 y la curva de calibración refuerzan la utilidad de ERETIC2 como un método de cuantificación alternativo.

Las diferencias entre estos resultados pueden deberse a múltiples factores, como lo son la falta de detección o retención de compuestos, lo cual no ocurre con la RMN al ser una técnica de detección universal, las diferencias en la respuesta del detector para el marcador de interés y contaminantes, así como la falta de eficiencia en la separación del compuesto e impurezas, sobre todo cuando se trata de componentes estructuralmente similares al marcador [56].

Tal es el caso de la fracción a partir de la cual se aisló el hepatodamianol. Ésta corresponde a una fracción rica en flavonoides, y se ha reportado la dificultad de obtener una resolución cromatográfica de la fracción rica en hepatodamianol [40]. Precisamente por eso se plantea en este trabajo la cuantificación por RMN.



Tomando en cuenta la baja pureza y cantidad obtenida en el aislamiento del hepatodamianol se decidió desarrollar el método de cuantificación con un estándar externo de naturaleza química distinta al marcador. Es importante resaltar que debido a que la RMNc es considerada un método analítico primario, los materiales de referencia no requieren ser de naturaleza idéntica o incluso no necesitan estar químicamente relacionados con el analito [26,27,57–60].

Con base en lo anterior, se optó por emplear rutina como estándar para el desarrollo y la evaluación del sistema analítico, así como también para la validación del método, con la única diferencia de que el sistema se evaluó con un estándar grado reactivo, mientras que para la validación del método se utilizó un estándar farmacéutico certificado.

Un aspecto importante a mencionar en este punto es que en RMNc existen múltiples opciones de calibración, como lo son mediante el uso de calibrante interno, de estándar externo o incluso con señales generadas de manera electrónica [24], por lo que se decidió evaluar dos modalidades de calibración durante el desarrollo del sistema analítico, una combinación de estándar interno y estándar externo [27] y el método por estándar externo [58].

Existe una serie de consideraciones que deben ser tomadas en cuenta al elegir un estándar interno adecuado, como lo son su solubilidad en el disolvente a emplear, que no presente reacción con los componentes de la muestra [24,60] y un aspecto muy importante y quizá el de mayor dificultad, sobre todo en el análisis de mezclas y extractos de productos naturales, es que su señal no presente traslape con las de la muestra [27].

En el caso de los extractos estandarizados de *T. diffusa* la complejidad del espectro es alta, y la disponibilidad de zonas libres de señales es limitada, como puede apreciarse en la figura 22, por lo que las opciones disponibles de estándar interno son reducidas.

En la literatura se encuentran reportes de diversos compuestos que han sido empleados como estándar interno, y con base en estos reportes se evaluó al hexametilciclotrisiloxano y a la piridina, debido a que ambos presentan señales en zonas libres de interferencias en el espectro del extracto estandarizado de *T. diffusa*, como se observa en la figura 15. El HMCTS presenta una señal tipo singulete en  $\delta = 0.15$  ppm, mientras que la piridina tiene tres señales, en 8.58 ppm, 7.38 ppm y 7.79 ppm, correspondientes a los hidrógenos en *orto*, *meta* y *para* respectivamente.

Como primer paso en el desarrollo del método de cuantificación se obtuvieron los valores de tiempo de relajación longitudinal de todos los posibles núcleos involucrados en la cuantificación, a través del experimento de recuperación de la inversión.

Este experimento consiste en aplicar un pulso de  $180^\circ$ , lo cual provoca que toda la magnetización se invierta hacia el eje -z. Después de un tiempo variable de espera  $\tau$ , durante el cual la magnetización se va recuperando, se vuelve a aplicar un pulso de  $90^\circ$ . Este segundo pulso rota la magnetización hacia el eje y. De manera que al final de esta secuencia de pulsos se obtiene un espectro con señales cuya intensidad es proporcional a la magnetización en z.

Este proceso se repite un cierto número de veces, de manera que se obtienen espectros con señales de intensidad (y grado de relajación) distinta en función del valor de  $\tau$ . Con estos datos se obtiene un gráfico que se ajusta a la función exponencial  $M_Z(t) = M_0 - 2 M_0 e^{-t/T_1}$ , a partir de la cual es posible calcular el valor de  $T_1$ .

Conocer el valor de  $T_1$  es importante para la optimización del tiempo adecuado de espera entre pulsos; se recomienda que este valor sea cinco veces el  $T_1$  más largo, para asegurar que la magnetización se reestablezca por completo [28].

En la tabla 15 se muestran los tiempos de relajación longitudinal obtenidos para cada núcleo analizado. Los valores de  $T_1$  de hidrógeno se encuentran normalmente en un intervalo de 0.3 a 5 segundos [28]. La mayoría de los valores de  $T_1$  se encontraron en este intervalo, a excepción de los tiempos de relajación de los hidrógenos de piridina. La piridina es una molécula que cuenta con dobles enlaces y una estructura anular, lo que le confiere rigidez. Entre los factores que afectan el proceso de relajación longitudinal se encuentra la rigidez, por lo que es de esperarse que tenga valores largos de  $T_1$  [61].

Una vez conocidos los valores de  $T_1$ , se decidió evaluar la estabilidad de los compuestos candidatos a ser usados como estándar interno. Al evaluar la estabilidad de los compuestos a lo largo de tres días de análisis, se observaron cambios en la intensidad de la señal del HMCTS, como se evidencia en la figura 16, lo que sugiere que el compuesto podría estar degradando.

Rundlöf evaluó una serie de compuestos como estándar interno, en donde para el HMCTS menciona que es un compuesto sensible a la humedad, además de ser inestable [62], lo que concuerda con los datos obtenidos. Con base en los resultados obtenidos el uso de este compuesto como calibrante interno fue descartado.

Como segunda opción de estándar interno se evaluó a la piridina, ya que dos de sus señales (CH-o  $\delta = 8.58$  ppm y CH-p  $\delta = 7.79$  ppm) también se encuentran en una zona libre de interferencias en el espectro del extracto estandarizado de *T. diffusa*, como se observa en la figura 15, y su uso como estándar interno también se encuentra reportado en la literatura [63,64].

No se observaron cambios en la forma e intensidad de las señales de la piridina a lo largo de los tres días de análisis, como se observa en la figura 17, lo que indica una buena estabilidad del compuesto. Con base en estos resultados se siguió trabajando con piridina como estándar interno. Debido a que los hidrógenos de la piridina presentaron los tiempos de relajación longitudinal más largos, el valor de  $d1$  se fijó en 55 s, correspondiente a 5 veces el  $T_1$  máximo.

Se continuó con la evaluación del sistema, con piridina como estándar interno y rutina como estándar externo. La tabla 16 muestra los resultados obtenidos en los distintos parámetros evaluados para las dos modalidades.

Al comparar los resultados de ambas modalidades de trabajo no se aprecia una diferencia en el desempeño entre cada una de ellas, ya que en

términos de linealidad, precisión, exactitud y límites de detección y cuantificación se obtienen valores semejantes.

En la literatura se encuentran múltiples reportes de validación de métodos por RMNc con estas dos modalidades de calibración, [65–68], y si bien es más frecuente encontrar métodos validados con estándar interno, los resultados obtenidos en este trabajo muestran evidencia de un desempeño adecuado utilizando únicamente estándar externo.

Pauli refiere que *“considerando que todos los métodos por calibrante interno requieren contaminación de la muestra y frecuentemente producen traslape de señales, el desarrollo de protocolos de RMNc basados únicamente en estándar externo es preferible y su validación será más viable una vez que se cuente con guías específicas para métodos por RMNc”* [27].

Si bien se obtienen resultados similares de precisión para ambas modalidades, la tabla 17 muestra los %DER de las respuestas individuales de cada molécula y se aprecia que la variación de rutina y piridina no se comportan de la misma forma (dadas las diferencias entre sus valores de %DER), y el uso del estándar interno no mejora el desempeño con relación a la precisión.

Para evaluar la robustez se hicieron pequeños cambios en los parámetros de número de incrementos, valor de  $d1$  y temperatura. El sistema no fue robusto para el parámetro de número de incrementos, esto en la modalidad de calibración por estándar externo. La intensidad de las señales cambia porque hay diferencias en el número de incrementos. En el caso de una modalidad por estándar interno,

estos cambios son compensados porque se establece una relación entre las respuestas del estándar externo y el estándar interno, y esta relación se mantiene independientemente de la intensidad de las señales.

En el caso del valor  $d1$ , el sistema no fue robusto en ninguna de las dos modalidades de calibración. Esto se explica fácilmente por la naturaleza del parámetro. Al aplicar valores de  $d1$  más cortos que  $5 \cdot T_1$  máximo, aquellos núcleos que presenten tiempos de relajación longitudinal más largos, en este caso el de piridina, tendrán variaciones en la intensidad de la señal a lo largo de la adquisición, ya que la magnetización no se encontrará completamente reestablecida [69]. Con base en estos resultados se decidió evaluar parámetros distintos en la validación del método.

Debido a que no se obtuvieron mejoras significativas en el desempeño del sistema al emplear un estándar interno, y que su empleo implica un aumento en el costo y tiempo de análisis, se decidió continuar con la validación del método utilizando calibración por estándar externo. Esto permitió reducir el tiempo de  $d1$  de 55 a 3 s, correspondiente a 5 veces el  $T_1$  del hepatodamianol.

Para la validación del método se evaluaron los parámetros de especificidad, linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación y robustez.

De acuerdo con la guía de validación de la ICH la especificidad se define como la habilidad de un método de evaluar el analito de forma inequívoca en presencia de componentes que se espera estén presentes en la muestra. En el

caso de la RMN esto implica la asignación inequívoca de las señales en el espectro a la estructura del analito [70]. Para el hepatodamianol esto ya se encuentra descrito y reportado [71,72].

Se evaluó la **especificidad** a través del experimento 1D-TOCSY selectivo debido a que es un experimento que permite asegurar de manera inequívoca que la señal de cuantificación corresponde al hepatodamianol, ya que no es únicamente una señal la que se toma como confirmación de identidad, sino todo el patrón de señales del sistema de spin involucrado [44].

Este experimento consiste en aplicar de forma selectiva un pulso de radiofrecuencia de manera que en el espectro se observan las señales de los protones acoplados escalarmente en ese sistema de spin [73]. En este caso el pulso selectivo se aplicó en la frecuencia de resonancia del CH<sub>3</sub>-6'''.

Al observar la estructura química del hepatodamianol (figura 4), se identifica que esta contiene una porción de 2-O-alfa-L-ramnopiranosido, donde los hidrógenos 1''', 2''', 3''', 4''', 5''' y 6''' forman un sistema de spin. Si bien en el espectro de <sup>1</sup>H del extracto estandarizado la señal del CH<sub>3</sub>-6''' se identifica fácilmente (figura 22), este no es el caso para el resto de los protones que forman parte del sistema de spin; el espectro de <sup>1</sup>H muestra un gran número de señales y es prácticamente imposible asignar qué señales corresponden al hepatodamianol.

Por otro lado, la figura 18 muestra los espectros de 1D-TOCSY selectivo del hepatodamianol (en rojo) y del extracto estandarizado (en azul); la

complejidad del espectro se reduce significativamente, ya que únicamente se observan las señales de los hidrógenos acoplados en el sistema de spin del núcleo irradiado.

En el espectro de 1D-TOCSY selectivo se identifican claramente las seis señales del sistema de spin que conforma la porción de ramnopiranosido, (CH-1''',  $\delta = 4.60$  ppm, CH-2''',  $\delta = 3.65$  ppm, CH-3''',  $\delta = 3.00$  ppm, CH4''',  $\delta = 2.94$  ppm, CH-5''',  $\delta = 2.12$  ppm y CH<sub>3</sub>-6''',  $\delta = 0.51$  ppm), cuyos valores de desplazamiento químico coinciden con los reportados para la molécula [44]. Con esto se demuestra que la señal en 0.51 ppm corresponde específicamente al CH<sub>3</sub>-6''' del hepatodamianol.

La **linealidad** fue evaluada a través de un análisis de regresión y además con el cálculo del %DER de los factores de respuesta, en un intervalo de concentraciones de 0.25 a 5.00 mM. El coeficiente de determinación fue mayor a 0.9998 y el %DER de los factores de respuesta fue de 0.95%. Este valor es similar a lo reportado por Çiçek y Waksman, quienes desarrollaron métodos cromatográficos para cuantificación en extractos de *T. diffusa*. Ellos reportan valores de  $r^2$  mayores a 0.99 y 0.999 respectivamente [35,74].

La **precisión del sistema** se evaluó a través del cálculo del %DER de la respuesta de las disoluciones de rutina de concentración conocida. Las tablas 19 y 20 muestran los resultados, los cuales se encuentran de 0.22 a 1.21% para la **precisión intradía** y de 0.93 a 1.50% para la **precisión interdía**. En comparación con el método cromatográfico desarrollado por el grupo de trabajo, donde los %DER son de hasta 2% para la precisión intradía y hasta 8% para la precisión



interdía, en el método por RMNc se obtuvieron valores más bajos de %DER, representando esto una mejora para la cuantificación de hepatodamianol en extractos de *T. diffusa*.

Para evaluar la **exactitud del método** se adicionó una alícuota de hepatodamianol a las muestras y se calculó el porcentaje de recobro. Si bien las guías de validación recomiendan la evaluación a niveles de concentración alto, medio y bajo [75], esto no fue posible debido a la limitada cantidad de hepatodamianol con la que se contaba, por lo que se hizo una adición a un solo nivel de concentración (2.50 mM). Para las réplicas se obtuvieron valores de porcentaje de recobro de 99.50, 93.82 y 106.5 %. En promedio se calculó un % de recobro de 99.94%, con un %DER de 6.36%. Los resultados de % de recobro son similares a lo reportado por el grupo de trabajo para el método cromatográfico, los cuales fueron de 110, 99.4 y 97.1% para los niveles de concentración bajo, medio y alto, respectivamente [35].

Los LOD y LOQ son parámetros importantes de desempeño en la validación de un método. Existen diversas formas para calcularlos, pero en general pueden dividirse en métodos estadísticos y empíricos [76,77]. Los primeros consisten en emplear ecuaciones como la (4) y (5), donde el valor promedio del blanco se puede obtener a partir de la curva de calibración (desviación estándar residual o error en intercepto de la curva de calibración); por otro lado, los métodos empíricos consisten en analizar disoluciones con concentraciones cada vez menores, y el LOD y LOQ se establece como aquella

concentración que satisface ciertos criterios de aceptación preestablecidos (en términos de precisión y exactitud).

Si bien ambos métodos son bien aceptados, los métodos estadísticos usualmente conllevan al cálculo de LOD y LOQ menores a los métodos empíricos [77,78] debido a que esta metodología asume que la pendiente y el intercepto de la curva de calibración están exentas de errores, lo cual casi no ocurre en la práctica [78,79]. Además, es deseable que una curva de calibración específica con niveles de concentración cercanos al LOD sea empleada para el cálculo estadístico del LOD y LOQ .

Por otro lado, el método empírico representa un acercamiento más auténtico, ya que toma en cuenta las condiciones reales en que se realizan los experimentos, y se cuenta con datos de %DER y % de error [77], lo cual satisface la definición que se tiene de límite de cuantificación [75,79]. Con base en esto se decidió utilizar una metodología basada en el cálculo empírico de los LOD y LOQ para la validación del método.

El **límite de detección** se define como la mínima concentración a la cual el analito puede ser detectado de forma confiable [75]. En métodos por RMN es deseable que esta concentración permita distinguir el patrón de señales correspondiente al analito [42]. Debido a que tanto la señal de cuantificación del hepatodamianol, como la señal de rutina empleada para la construcción de la curva de calibración corresponden al metilo 6''' de la porción de ramnosa en ambas estructuras, se espera que ambas señales presenten la misma forma,

intensidad y valor de integración a un nivel dado de concentración. Con base en esto, el LOD se evaluó con el patrón de señales de la rutina.

Se estableció un LOD de 0.125 mM, debido a que a niveles de concentración menor no era posible distinguir el patrón de señales completo de rutina. Esto queda evidenciado en la figura 21, donde a una concentración de 0.10 mM (espectro en verde) sólo se identifican las señales de CH<sub>3</sub>-6''' ( $\delta$  0.99 ppm), CH-1''' ( $\delta$  4.39 ppm) y CH-2' ( $\delta$  7.53 ppm), a diferencia de los espectros de rutina de concentración 0.125 y 0.25 mM (espectros en rojo y azul, respectivamente), donde el patrón de señales establecido para el LOD se identifica completamente.

Por otro lado, el **límite de cuantificación** se define como la concentración mínima de analito que puede ser determinada de forma cuantitativa con una precisión y exactitud adecuada [75]. En la tabla 24 se muestran los valores de %DER y porcentaje de error para las disoluciones de rutina con que se evaluó el LOQ. Si bien la concentración de 0.125 mM generó resultados con un %DER aceptable, el % de error se elevó significativamente, por lo que el LOQ se estableció en 0.25 mM, concentración con la cual se obtienen %DER y porcentaje de error menores al 5.

A pesar de que los límites de detección y cuantificación del método cromatográfico desarrollado por Waksman y colaboradores son notablemente menores (LOD = 0.97  $\mu$ M, LOQ = 1.32  $\mu$ M) que los obtenidos en el presente trabajo, esto no representa un problema dado que el contenido de

hepatodamianol en las muestras analizadas se encontró en una concentración de 1.5 mM aproximadamente.

El siguiente parámetro que se evaluó fue la **robustez**. Pauli y colaboradores sugieren una serie de parámetros de procesamiento a evaluar en términos de robustez, entre los que se encuentran el procesamiento por analistas distintos y el tipo de algoritmo empleado en la corrección de línea base [27], por lo que se eligieron estos como factores a evaluar en la robustez del método, además del valor de *line broadening* (LB).

Está reportado que uno de los factores que afectan en mayor medida la calidad de los resultados obtenidos por métodos de RMNc es el procesamiento de los datos por analistas distintos [80]. Aspectos como la integración y la corrección de fase pueden ser subjetivos si el análisis lo realizan distintas personas. Por tal motivo en el presente trabajo se fijó un intervalo para la integración y se llegó a un consenso sobre la corrección de fase, de manera que independientemente del analista el aspecto final del espectro fuera uniforme. Esto permitió que el método fuera robusto para el parámetro de procesamiento de los espectros por analistas distintos en los tres niveles de concentración.

Así mismo, el método también resultó robusto para el parámetro de LB en los tres niveles de concentración evaluados. Monakhova y colaboradores reportan que los resultados de RMNc no se ven influenciados al cambiar el valor de LB en un intervalo de 0.10 a 0.80 Hz [81]; en el presente trabajo los cambios se hicieron en el intervalo de 0.05 – 0.15 Hz.

En cuanto al parámetro de algoritmo de corrección de línea base no se encontró diferencia significativa entre los resultados obtenidos con los tres algoritmos evaluados, tanto para el nivel medio y alto de concentración, pero no para el nivel bajo de concentración.

La forma general en que funcionan los algoritmos de corrección de línea base consiste en tres pasos. En primer lugar, se identifica qué información en el espectro corresponde a señales y qué corresponde a ruido. Posteriormente esta información se emplea para construir un modelo de la línea base para finalmente corregir las señales en el espectro sustrayendo el modelo de línea base de las señales originales [82].

Normalmente para identificar qué partes del espectro corresponden a señales los algoritmos de corrección de línea base calculan la desviación estándar del ruido. Esto podría explicar que el método no sea robusto para niveles bajos de concentración, donde la relación señal ruido es menor y esto genere diferencias significativas entre lo que se considera ruido y señal.

Por último, se realizó la cuantificación de hepatodamianol en las muestras de extracto estandarizado de *T. diffusa*. Se analizaron cuatro muestras por triplicado. La tabla 28 muestra los resultados de este análisis; la concentración de hepatodamianol se encontró en un intervalo de 28 a 52 mg/g de extracto estandarizado.

El método resultó preciso, ya que los %DER de los análisis se encontraron entre 1.3 y 3.2%, valores similares a lo reportado en la literatura para muestras

de productos herbolarios [66,67,83]. Por otro lado los porcentajes de recobro en las muestras adicionadas se encontraron entre 93 y 106%, que también son valores similares a lo reportado en la literatura para métodos de RMNc con productos naturales [53].

El método analítico establecido y validado en el presente trabajo permite cuantificar de manera precisa y exacta el contenido de hepatodamianol en los extractos estandarizados de *Turnera diffusa*. Este es uno de los requisitos que COFEPRIS actualmente solicita para otorgar el registro sanitario a un medicamento herbolario, por lo que este trabajo representa un avance en el desarrollo de un medicamento herbolario a base de *T. diffusa*.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

- Se desarrolló y validó un método de cuantificación por RMN empleando rutina como estándar externo.
- Se aplicó el método validado en la cuantificación de hepatodamianol en extractos estandarizados de *Turnera diffusa*.
- La concentración de hepatodamianol en las muestras se encontró en un intervalo de 28-52 mg de hepatodamianol por gramo de extracto estandarizado.

## CAPÍTULO 6

### PERSPECTIVAS

- Desarrollar un método de preparación de muestra para el extracto estandarizado de *Turnera diffusa*.
- Aplicar el método validado para la cuantificación de hepatodamianol en productos herbolarios.
- Evaluar distinto número de incrementos y duración del pulso de radiofrecuencia para reducir tiempos de análisis.



## CAPÍTULO 7

### ANEXOS

#### Anexo I: Gráficos de relajación longitudinal

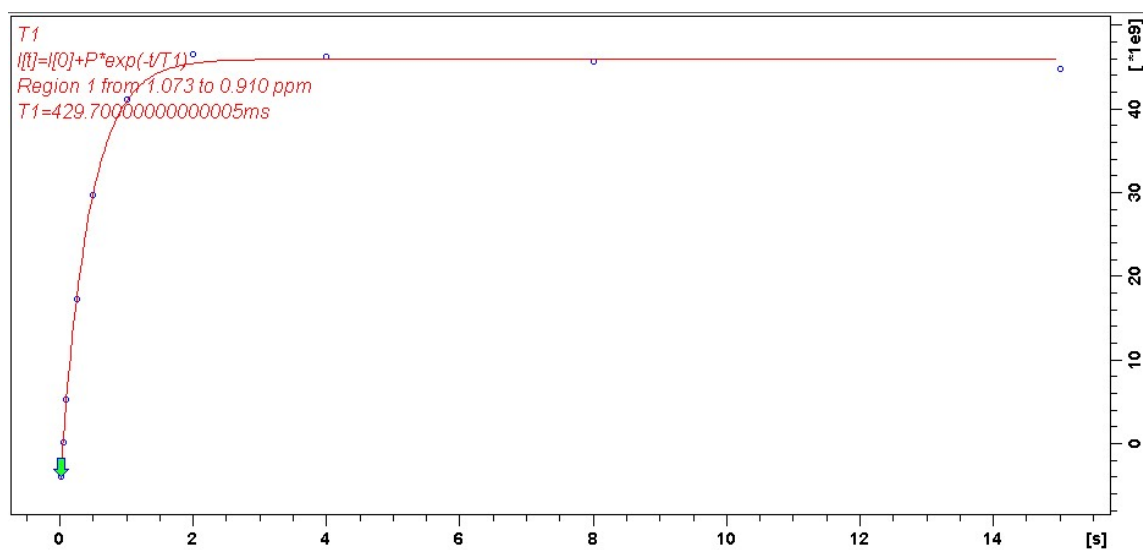


Figura 24. Gráfico de relajación longitudinal del  $\text{CH}_3\text{-6}'''$  de la rutina.

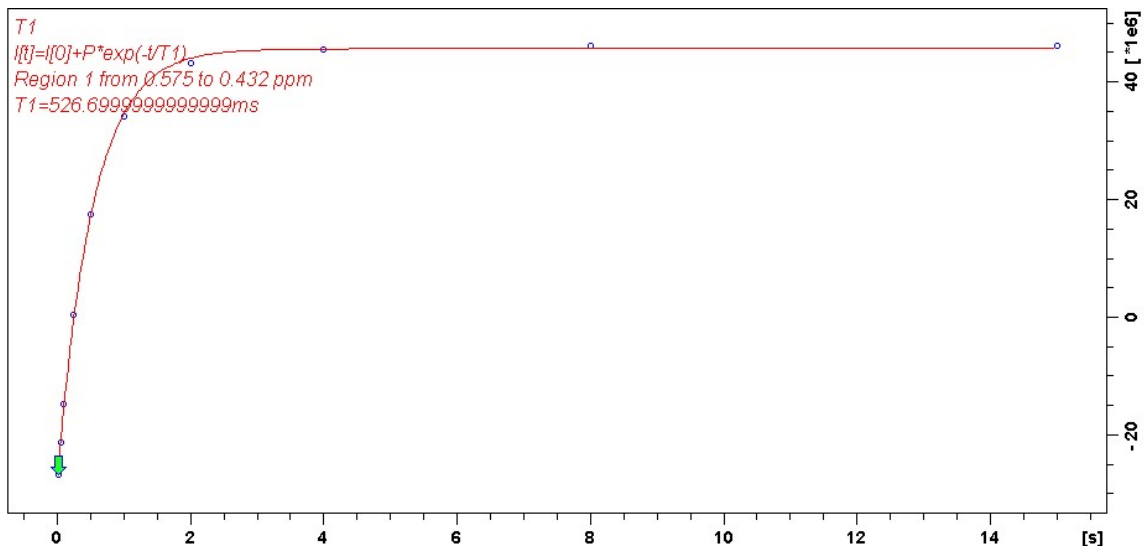


Figura 25. Gráfico de relajación longitudinal del CH<sub>3</sub>-6''' del hepatodamianol.

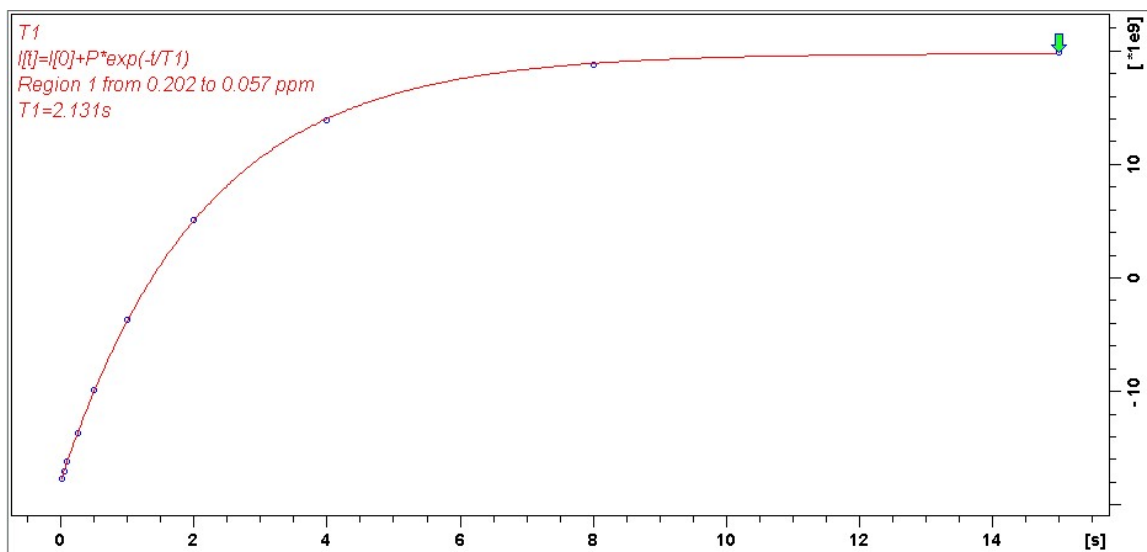


Figura 26. Gráfico de relajación longitudinal del CH<sub>3</sub> del HMCTS.

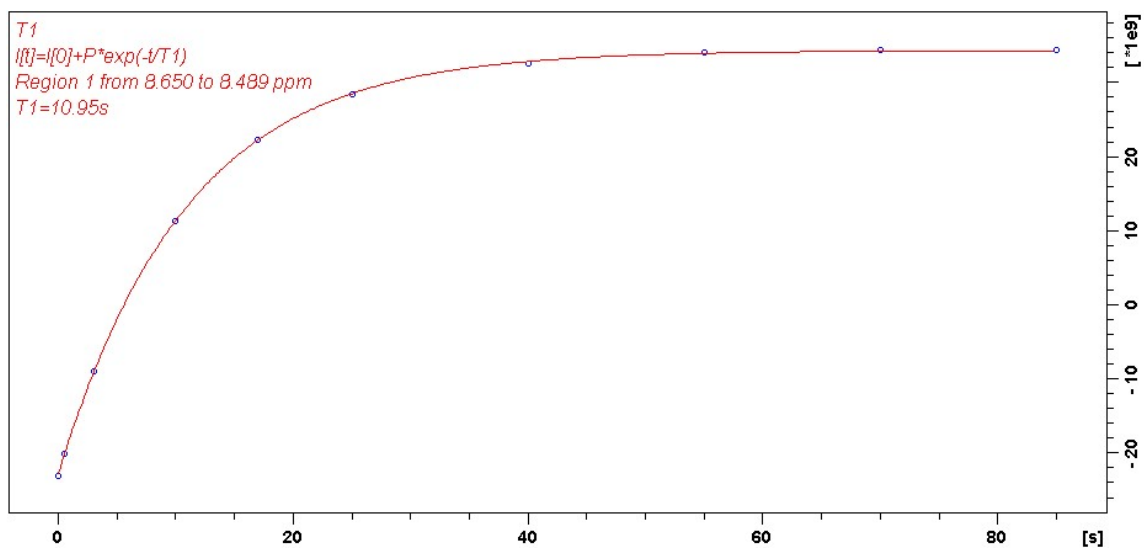


Figura 27. Gráfico de relajación longitudinal del CH-o de la piridina.

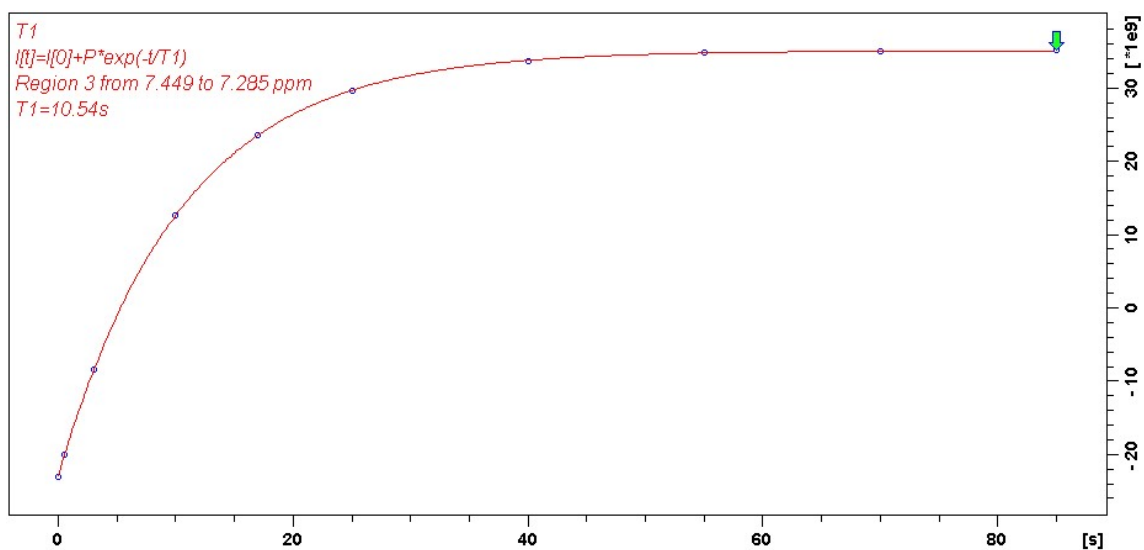


Figura 28. Gráfico de relajación longitudinal del CH-m de la piridina.

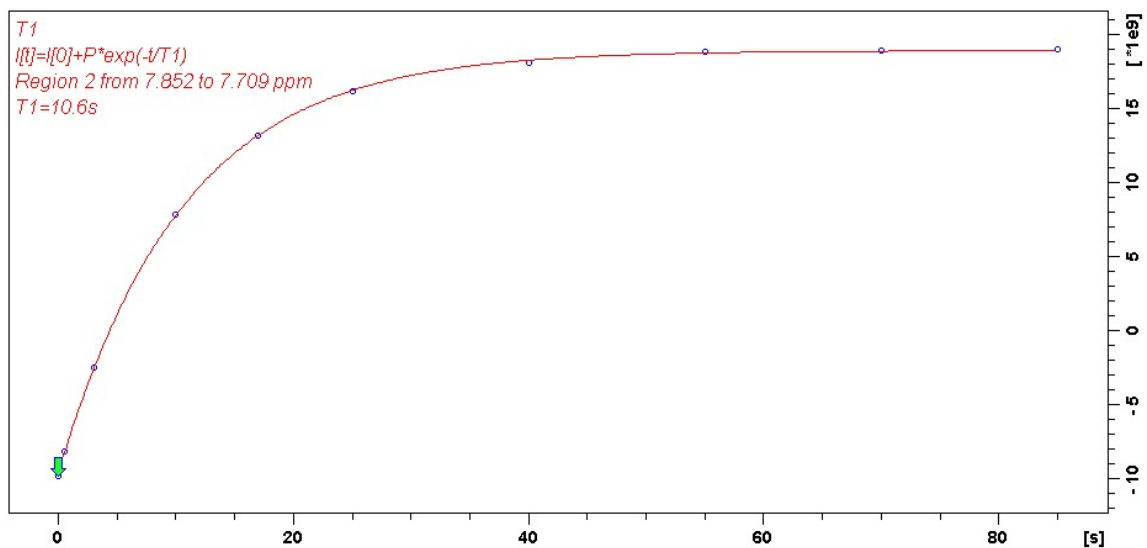


Figura 29. Gráfico de relajación longitudinal del CH-p de la piridina.

### Anexo II: Datos completos de validación

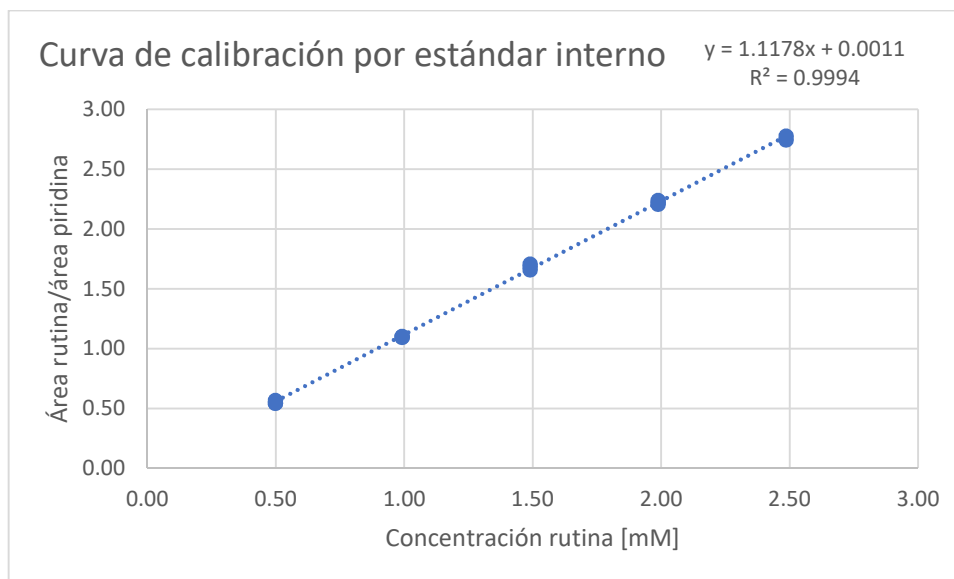


Figura 30. Curva de calibración de rutina por estándar interno.

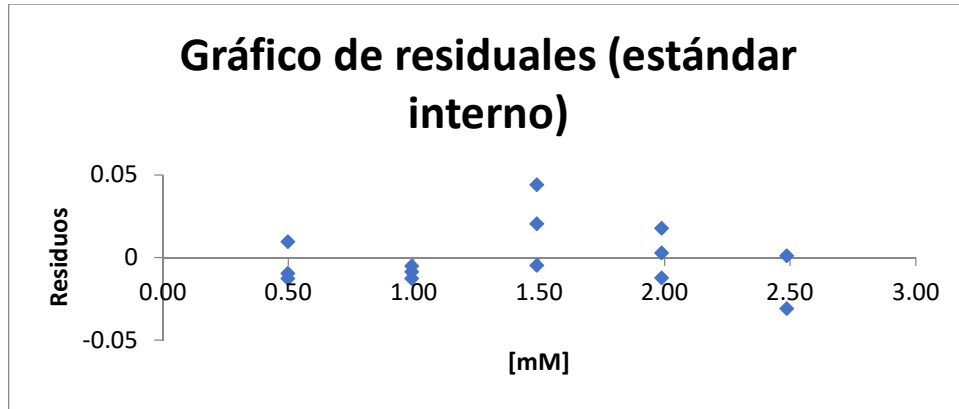


Figura 31. Gráfico de residuales de calibración por estándar interno.

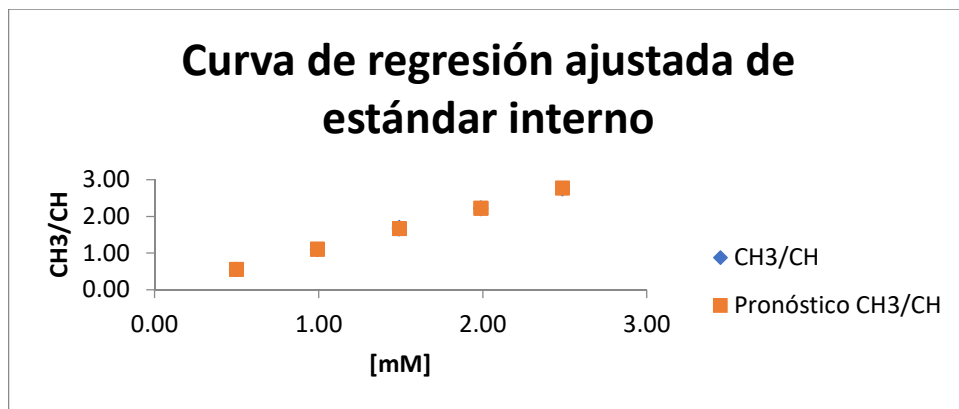


Figura 32. Curva de regresión ajustada de calibración por estándar interno.

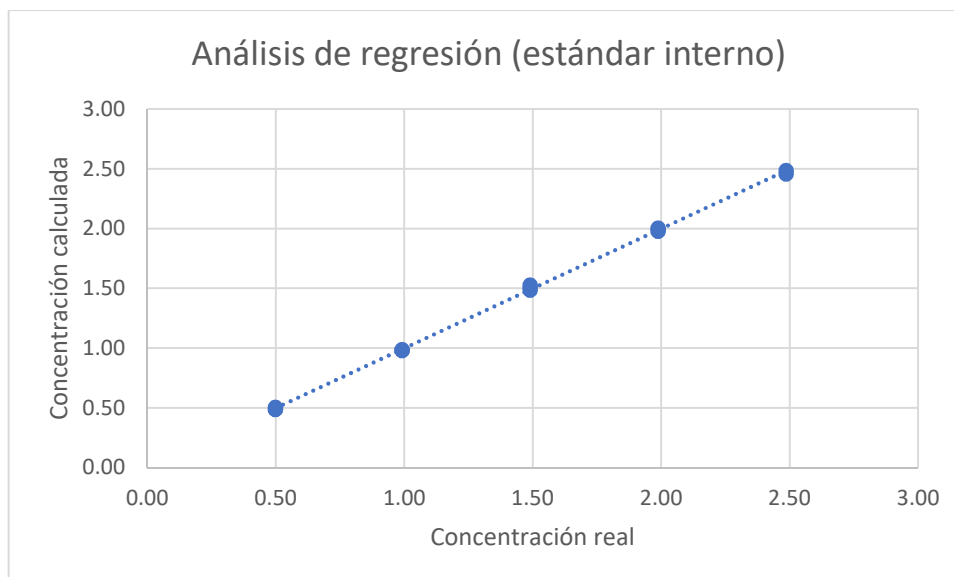


Figura 33. Gráfico de regresión para evaluar exactitud (estándar interno).

Tabla 29. Resultados del análisis de regresión para evaluar exactitud (estándar interno).

	<i>Coefficientes</i>
Intercepto en y	-3.31678E-05
Pendiente	0.999987448
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.999445219

Tabla 30. % de error relativo (estándar interno).

Concentración [mM]	0.50	0.99	1.49	1.99	2.49
% error relativo	1.14	0.67	-1.14	0.01	0.72

Tabla 31. %DER (intradía e interdía, estándar interno).

Concentración [mM]	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50
% DER (intradía)	2.18	0.35	1.45	0.67	0.81
% DER (interdía)	0.82		0.49		0.53

Tabla 32. Resultados de la evaluación de robustez (estándar interno).

Parámetro	F calculado	F crítico	p	Acepta/Rechaza Ho	Es robusto
Temperatura	5.05	5.14	0.06	Se acepta	Sí
Número de incrementos	0.92	5.14	0.50	Se acepta	Sí
<i>d1</i>	5.87	5.14	0.04	Se rechaza	No

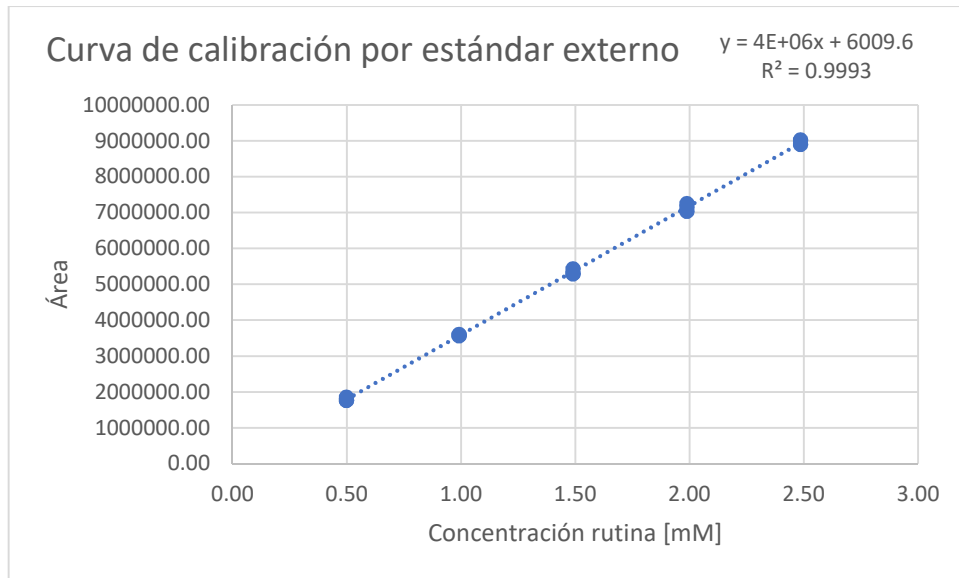


Figura 34. Curva de calibración de rutina por estándar externo.

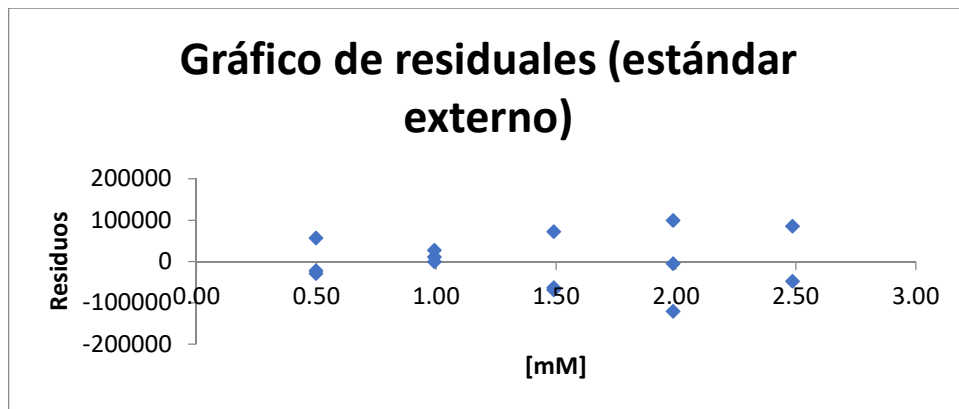


Figura 35. Gráfico de residuales de calibración por estándar externo.



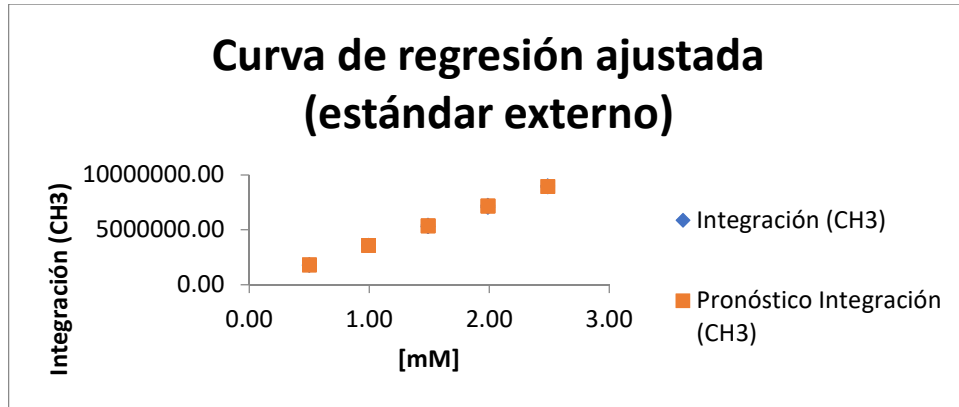


Figura 36. Curva de regresión ajustada de calibración por estándar externo.

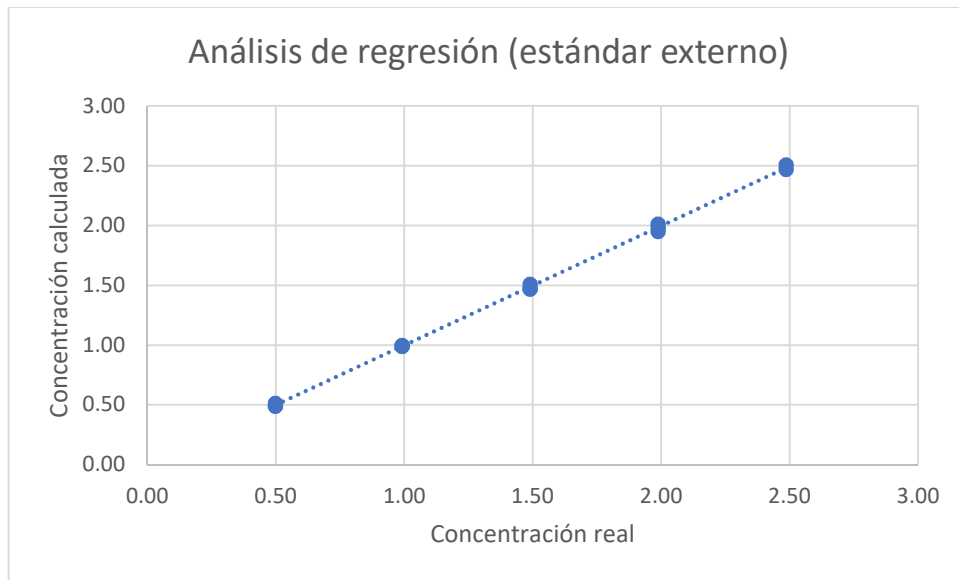


Figura 37. Gráfico de regresión para evaluar exactitud (estándar externo)

Tabla 33. Análisis de regresión para evaluar exactitud (estándar externo)

	<i>Coefficientes</i>
Intercepto en y	0.000933094
Pendiente	0.999060895
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.999349072

Tabla 34. % de error relativo (estándar externo)

Concentración [mM]	0.50	0.99	1.49	1.99	2.49
% error relativo	-0.20	-0.37	0.39	0.17	-0.18

Tabla 35. %DER (intradía e interdía, estándar externo)

Concentración [mM]	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50
% DER (intradía)	2.65	0.39	1.50	1.54	0.75
% DER (interdía)	1.31		1.00		0.68

Tabla 36. Resultados de la evaluación de robustez (estándar externo).

Parámetro	F calculado	F crítico	p	Acepta/Rechaza Ho	Es robusto
Temperatura	61.64	5.14	9.9E-5	Se rechaza	No
Número de incrementos	1.9E6	5.14	3.88E-18	Se rechaza	No
<i>d1</i>	12.11	5.14	0.008	Se rechaza	No

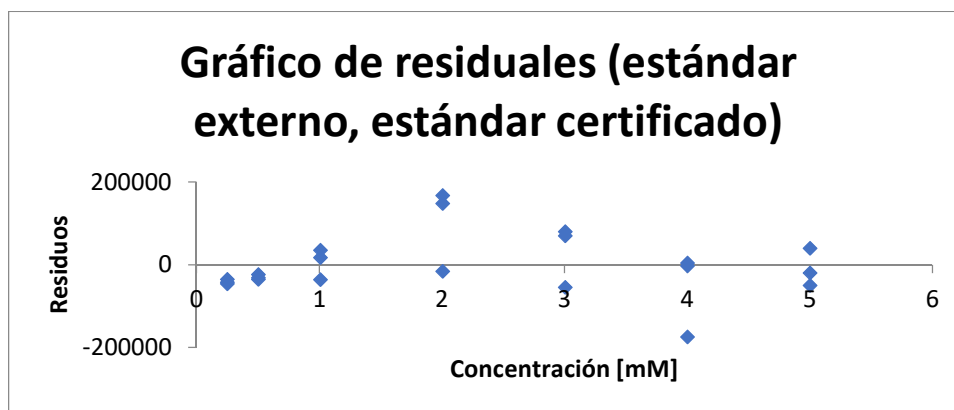


Figura 38. Gráfico de residuales de calibración por estándar externo (estándar certificado).

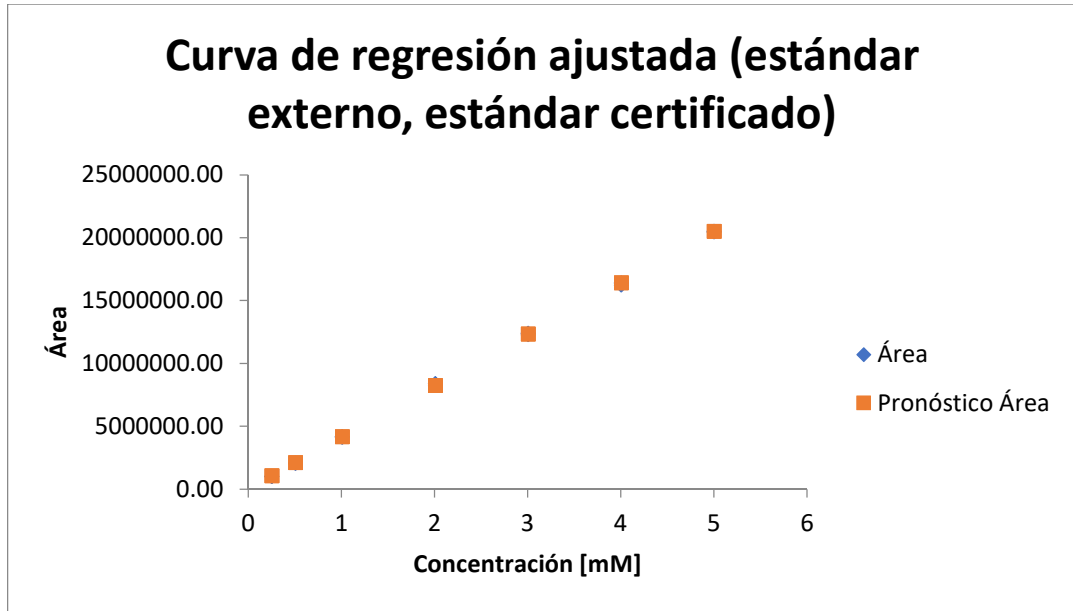


Figura 39. Curva de regresión ajustada de calibración por estándar externo (estándar certificado).

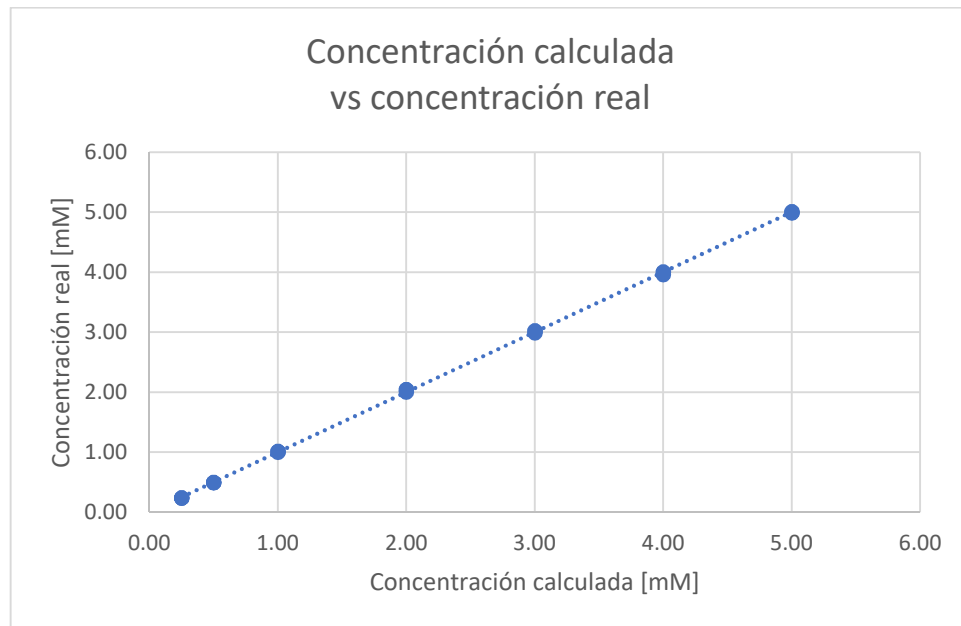


Figura 40. Gráfico de regresión para evaluar exactitud (estándar externo, estándar certificado).

Tabla 37. Resultados del análisis de regresión para evaluar exactitud (estándar externo, estándar certificado).

	<i>Coefficientes</i>
Intercepto en y	0.00494207
Pendiente	0.99935147
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.99987338

### Anexo III: Datos de área

Tabla 38. Área de CH<sub>3</sub>-6''' de rutina y CH-p de piridina (modalidad de estándar interno).

Réplica	Concentración (mM)									
	0.50		1.00		1.50		2.00		2.50	
	Área rutina	Área piridina	Área rutina	Área piridina	Área rutina	Área piridina	Área rutina	Área piridina	Área rutina	Área piridina
1	1854326.59	3267845.28	3570895.97	3257135.69	5294381.84	3187516.75	7149282.58	3212794.86	9031170.62	3286094.23
2	1768276.00	3225615.62	3582720.62	3255664.06	5435453.47	3223636.50	7253486.00	3281899.75	8897578.12	3200441.53
3	1775487.38	3256765.00	3599067.38	3260052.19	5299646.94	3099646.94	7033365.75	3139734.66	8970404.69	
Promedio	1799363.32	3250075.30	3584227.99	3257617.31	5343160.75	3170266.73	7145378.11	3211476.42	8966384.48	3243267.88
DE	47735.96	21895.21	14146.07	2233.36	79971.18	63769.31	110112.06	71091.71	66886.92	60565.60
%DER	2.65	0.67	0.39	0.07	1.50	2.01	1.54	2.21	0.75	1.87

Tabla 39. Área de CH<sub>3</sub>-6''' de rutina y CH-p de piridina (modalidad de estándar interno, valores de precisión interdía).

Concentración (mM)								
	0.50			1.50			2.50	
Día	Área rutina	Área piridina	Día	Área rutina	Área piridina	Día	Área rutina	Área piridina
1	1757998.12	3172067	1	5421848.31	3230592.19	1	8909181.25	3227111.19
	1767698.62	3174203.94		5396909.31	3227152.5		8896662.19	3177651.06
	1757787.88	3183764.12		5393158.56	3230722.56		8921975.38	3205802.94
2	1814684.88	3293949.75	2	5487996.75	3269809.62	2	8963531.12	3247051.44
	1795282.44	3289536.88		5505432	3291473.38		9007570.19	3241889.06
	1815267.44	3286983.69		5508246.84	3281775.31		9017545.81	3250191.5
3	1785998.88	3183693.75	3	5393581.69	3189915.88	3	8864684.25	3173703.44
	1787029.88	3199672.38		5371293.44	3186675.19		8848745.88	3189014.12
	1757293.12	3180203.12		5397932.75	3189862.69		8875434.12	3171033.75
Promedio	1782115.70	3218230.51		5430711.07	3233108.81		8922814.47	3209272.06
DE	23371.71	54527.08		54188.82	40406.13		61028.77	32850.77
%DER	1.31	1.69		1.00	1.25		0.68	1.02

Tabla 40. Área de CH<sub>3</sub>-6''' de rutina (modalidad de estándar externo).

Réplica	Concentración (mM)						
	0.25	0.50	1.00	2.00	3.00	4.00	5.00
1	1021397.31	2061788.52	4125257.42	8394948.39	12278354.95	16244311.16	20485507.73
2	1014019.75	2065569.59	4178116.81	8230804.09	12413415.91	16423005.33	20544728.89
3	1010076.00	2073148.06	4195957.91	8414608.83	12402883.95	16416344.11	20455395.00
Promedio	1015164.35	2066835.39	4166444.05	8346787.10	12364884.94	16361220.20	20495210.54
DE	5746.79	5784.59	36767.24	100924.12	75121.96	101300.97	45450.46
%DER	0.57	0.28	0.88	1.21	0.61	0.62	0.22



Tabla 41. Área de CH<sub>3</sub>-6''' de rutina (modalidad de estándar externo, valores de precisión interdía).

Día	Concentración (mM)		
	0.50	2.00	5.00
1	2061788.52	8394948.39	20485507.73
	2065569.59	8230804.09	20544728.89
	2073148.06	8414608.83	20455395.00
2	2025667.16	8256481.61	20013628.56
	2018844.12	8046930.97	20304098.92
	2017329.88	8260714.84	20102910.56
3	2055694.91	8387193.36	20285050.7
	2025886.31	8132869.66	20543910.44
	2057261.25	8317775.94	20293338.78
Promedio	2044576.64	8271369.74	20336507.73
DE	22218.35	123942.30	189435.82
%DER	1.09	1.50	0.93

Tabla 42. Área de CH<sub>3</sub>-6''' de hepatodamianol en los extractos estandarizados de *T. diffusa* analizados.

Réplica	MH 3	MH4	MH 5	MH 7
1	6465664.96	7542393.88	5031196.98	6125785.27
2	6102107.79	7253985.50	5169677.61	6361830.00
3	6444272.45	7624888.39	5100906.46	6389176.17
Promedio	6337348.40	7473755.92	5100593.68	6292263.81
DE	204004.95	194745.00	69240.84	144821.55
%DER	3.22	2.61	1.36	2.30

## BIBLIOGRAFÍA

1. Tilburt, J. C.; Kaptchuk, T. J. Herbal medicine research and global health: An ethical analysis. *Bull. World Health Organ.* 2008, 86, 594–599, doi:10.2471/BLT.07.042820.
2. World Health Organization (WHO); World Health Organization *WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005*; 2002;
3. Wachtel-Galor, S.; Benzie, I. Herbal Medicine: An Introduction to Its History, Usage, Regulation, Current Trends, and Research Needs. In *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects.*; Benzie IFF, W.-G. S., Ed.; CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, FL, 2011.
4. Robinson, M. M.; Zhang, X. The World Medicines Situation 2011. *Traditional Medicines: Global Situation , Issues and Challenges. World Heal. Organ.* 2011, 1–14.
5. (INEGI), I. N. de E. y G. “Estadísticas a Propósito De... Día Mundial De La Salud(7 De Abril)” Available online: <http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2014/salud0.pdf>.

6. Organización mundial de la Salud Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. 2014.
7. Sendker, J.; Sheridan, H. Composition and Quality Control of Herbal Medicines. In *Toxicology of Herbal Products*; Pelkonen, O., Ed.; Springer International Publishing: Switzerland, 2017; pp. 29–65 ISBN 9783319438061.
8. Waksman de Torres, N. El Control de Calidad de Productos Herbolarios en la Salud Pública. *Rev. Salud Pública y Nutr.* 2012, 13.
9. Perrone, A.; Piacente, S.; Rastrelli, L.; Dugo, G. Sample Preparation, Analytical Methods, and Chemical Standardization of Medicinal Plants. In *Herbal Medicines: Development and Validation of Plant-derived Medicines for Human Health*; CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, FL, 2016; pp. 94–136.
10. U.S. Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research Botanical Drug Development Guidance for Industry. 2016.
11. Solórzano Gallaga, J. C.; Sánchez Cerón, A.; Espinosa Jaime, S. P. Uso de Productos Herbolarios en México Available online: <http://revistacofepris.salud.gob.mx/inter/2016/1/bienestar.html>.
12. Características que debe cumplir un Medicamento para obtener el Registro Sanitario Available online: [www.cofepris.gob.mx/MarcoJuridico/.../caractmedicamreg.pdf](http://www.cofepris.gob.mx/MarcoJuridico/.../caractmedicamreg.pdf).

13. NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios.
14. NORMA Oficial Mexicana NOM-072-SSA1-2012, Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios.
15. Gómez Castellanos, J. R. El ambiente regulatorio de los medicamentos herbolarios en México. Antecedentes, situación actual y perspectivas al año 2025. *Bol. Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromat.* 2009, 8, 33–40.
16. World Health Organization General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. *WHO-Geneva* 2000, 1, 1–74, doi:WHO/EDM/TRM/2000.1.
17. Liang, Y. Z.; Xie, P.; Chan, K. Quality control of herbal medicines. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2004, 812, 53–70, doi:10.1016/j.jchromb.2004.08.041.
18. Singh, S. K.; Jha, S. K.; Chaudhary, A.; Yadava, R. D. S.; Rai, S. B. Quality control of herbal medicines by using spectroscopic techniques and multivariate statistical analysis. *Pharm. Biol.* 2010, 48, 134–141, doi:10.3109/13880200903059388.
19. Mao, J.; Xu, J. Discrimination of herbal medicines by molecular spectroscopy and chemical pattern recognition. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2006, 65, 497–500,

doi:10.1016/j.saa.2005.11.030.

20. Chen, D. D.; Xie, X. F.; Ao, H.; Liu, J. L.; Peng, C. Raman spectroscopy in quality control of Chinese herbal medicine. *J. Chinese Med. Assoc.* 2017, *80*, 288–296, doi:10.1016/j.jcma.2016.11.009.
21. Gilard, V.; Balayssac, S.; Malet-Martino, M.; Martino, R. Quality Control of Herbal Medicines Assessed by NMR. *Curr. Pharm. Anal.* 2010, *6*, 234–245, doi:10.2174/157341210793292365.
22. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; Bryce, D. L. Proton (<sup>1</sup>H) Magnetic Resonance Spectroscopy. In *Spectrometric Identification of Organic Compounds*; 2015; pp. 126–190.
23. Holzgrabe, U.; Deubner, R.; Schollmayer, C.; Waibel, B. Quantitative NMR spectroscopy - Applications in drug analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, *38*, 806–812, doi:10.1016/j.jpba.2005.01.050.
24. Bharti, S. K.; Roy, R. Quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2012, *35*, 5–26, doi:10.1016/j.trac.2012.02.007.
25. Simmler, C.; Napolitano, J. G.; McAlpine, J. B.; Chen, S.-N.; Pauli, G. F. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2014, *25*, 51–9, doi:10.1016/j.copbio.2013.08.004.
26. Pauli, G. F.; Gödecke, T.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C. Quantitative <sup>1</sup>H NMR. Development and potential of an analytical method: An update. *J. Nat. Prod.* 2012, *75*, 834–851, doi:10.1021/np200993k.

27. Gödecke, T.; Napolitano, J. G.; Rodríguez-Brasco, M. F.; Chen, S. N.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C.; Pauli, G. F. Validation of a generic quantitative <sup>1</sup>H NMR method for natural products analysis. *Phytochem. Anal.* 2013, *24*, 581–597, doi:10.1002/pca.2436.
28. Pauli, G. F.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C. Quantitative <sup>1</sup>H NMR: Development and potential of a method for natural products analysis. *J. Nat. Prod.* 2005, *68*, 133–149, doi:10.1021/np0497301.
29. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana Available online: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Damiana&id=7387> (accessed on Jan 29, 2017).
30. No Title Available online: <https://www.naturalista.mx/taxa/170054-Turnera-diffusa>.
31. Camargo, E. E. S.; Vilegas, W. Controle de qualidade dos extratos polares de turnera diffusa Willd. ex Schult., Turneraceae. *Brazilian J. Pharmacogn.* 2010, *20*, 228–232, doi:10.1590/S0102-695X2010000200015.
32. Schäffer, M.; Gröger, T.; Pütz, M.; Zimmermann, R. Assessment of the presence of damiana in herbal blends of forensic interest based on comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Forensic Toxicol.* 2013, *31*, 251–262, doi:10.1007/s11419-013-0186-5.
33. Godoi, A. F. L.; Vilegas, W.; Godoi, R. H. M.; Van Vaeck, L.; Van Grieken,

- R. Application of low-pressure gas chromatography-ion-trap mass spectrometry to the analysis of the essential oil of *Turnera diffusa* (Ward.) Urb. *J. Chromatogr. A* 2004, 1027, 127–30.
34. Ramírez-Durón, R.; Ceniceros-Almaguer, L.; Salazar-Aranda, R.; Salazar-Cavazos, M. de la L.; Waksman de Torres, N. Evaluation of thin-layer chromatography methods for quality control of commercial products containing *Aesculus hippocastanum*, *Turnera diffusa*, *Matricaria recutita*, *Passiflora incarnata*, and *Tilia occidentalis*. *J. AOAC Int.* 90, 920–4.
35. Pérez-Meseguer, J.; Garza-Juárez, A.; Salazar-Aranda, R.; Salazar-Cavazos, M. L.; de la Torre Rodríguez, Y. C.; Rivas-Galindo, V.; Waksman de Torres, N. Development and validation of an HPLC-DAD analytical procedure for quality control of damiana (*Turnera diffusa*), using an antioxidant marker isolated from the plant. *J. AOAC Int.* 2010, 93, 1161–8.
36. Garza-Juárez, A.; Salazar-Cavazos, M. de la L.; Salazar-Aranda, R.; Pérez-Meseguer, J.; de Torres, N. W. Correlation between chromatographic fingerprint and antioxidant activity of *Turnera diffusa* (Damiana). *Planta Med.* 2011, 77, 958–63, doi:10.1055/s-0030-1250684.
37. Lucio-Gutiérrez, J. R.; Garza-Juárez, A.; Coello, J.; MasPOCH, S.; Salazar-Cavazos, M. L.; Salazar-Aranda, R.; Waksman de Torres, N. Multi-wavelength high-performance liquid chromatographic fingerprints and chemometrics to predict the antioxidant activity of *Turnera diffusa* as part

- of its quality control. *J. Chromatogr. A* 2012, 1235, 68–76,  
doi:10.1016/j.chroma.2012.02.042.
38. Parra-Naranjo, A.; Delgado-Montemayor, C.; Fraga-López, A.; Castañeda-Corral, G.; Salazar-Aranda, R.; Acevedo-Fernández, J. J.; Waksman, N. Acute hypoglycemic and antidiabetic effect of teuhetenone a isolated from *Turnera diffusa*. *Molecules* 2017, 22, 1–13,  
doi:10.3390/molecules22040599.
39. Delgado-Montemayor, C.; Pérez-Meseguer, J.; Salazar-Aranda, R.; Cordero-Pérez, P.; Waksman, N. Hepatodamianol as the hepatoprotective constituent of *Turnera diffusa*. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2017.
40. Delgado Montemayor, C. Desarrollo de un medicamento herbolario con actividad hepatoprotectora a partir de *Turnera diffusa*, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2017.
41. Akoka, S.; Barantin, L.; Trierweiler, M.; Cnrs, L. U. Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method. *Anal. Chem.* 1999, 71, 2554–2557, doi:10.1021/ac981422i.
42. Schönberger, T.; Monakhova, Y. B.; Lachenmeier, D. W.; Kuballa, T. *Guide to NMR Method development and validation. Part I: Identification and Quantification*; Germany, 2014;
43. Eurachem *Métodos y Temas Relacionados*; 2005; ISBN 0948926120.
44. Lucio-Gutiérrez, J. R.; Delgado-Montemayor, C.; Coello-Bonilla, J.;



- Waksman-Minsky, N.; Saucedo, A. L. Selective 1D-TOCSY and chemometrics to evaluate authenticity of *Turnera diffusa* and related botanical extracts. *Phytochem. Lett.* 2019, 30, 62–68, doi:10.1016/J.PHYTOL.2019.01.011.
45. WHO Annex 1 WHO guidelines for selecting marker substances of herbal origin for quality control of herbal medicines. 71–86.
46. Ma, K.; Wang, H.; Zhao, M.; Xing, J. Purity determination and uncertainty evaluation of theophylline by mass balance method, high performance liquid chromatography and differential scanning calorimetry. *Anal. Chim. Acta* 2009, 650, 227–233, doi:10.1016/j.aca.2009.07.046.
47. Vial, J.; Jardy, A.; Menet, J.-M. Validation of Internal Normalization for Impurity Assays. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2001, 24, 2067–2085.
48. Douša, M.; Gibala, P.; Pekárek, T. New approach of validation using internal normalization technique for quantification of related substances in raw material, intermediates and pharmaceutical substances by HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, 114, 133–138.
49. Quattrocchi, O. A.; Andrizzi, S. A. de; Laba, R. F. *Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica*; Buenos Aires, 1992;
50. Wider, G.; Dreier, L. Measuring Protein Concentrations by NMR Spectroscopy. *J. Anal. Chem. Soc.* 2006, 128, 2571–2576.

51. Frank, O.; Kreissl, J. K.; Daschner, A.; Hofmann, T. Accurate determination of reference materials and natural isolates by means of quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2014, *62*, 2506–2515, doi:10.1021/jf405529b.
52. Watanabe, R.; Sugai, C.; Yamazaki, T.; Matsushima, R.; Uchida, H.; Matsumiya, M.; Takatsu, A.; Suzuki, T. Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy based on PULCON methodology: Application to quantification of invaluable marine toxin, okadaic acid. *Toxins (Basel)*. 2016, *8*, 1–9, doi:10.3390/toxins8100294.
53. Benedito, L. E. C.; Maldaner, A. O.; Oliveira, A. L. An external reference <sup>1</sup>H qNMR method (PULCON) for characterization of high purity cocaine seizures. *Anal. Methods* 2018, *10*, 489–495, doi:10.1039/c7ay02343j.
54. Paniagua-Vega, D.; Cavazos-Rocha, N.; Huerta-Heredia, A. A.; Parra-Naranjo, A.; Rivas-Galindo, V. M.; Waksman, N.; Saucedo, A. L. A validated NMR method for the quantitative determination of rebaudioside A in commercial sweeteners. *J. Food Compos. Anal.* 2019, doi:10.1016/J.JFCA.2019.02.009.
55. Pauli, G. F.; Chen, S. N.; Simmler, C.; Lankin, D. C.; Gödecke, T.; Jaki, B. U.; Friesen, J. B.; McAlpine, J. B.; Napolitano, J. G. Importance of purity evaluation and the potential of quantitative <sup>1</sup>H NMR as a purity assay. *J. Med. Chem.* 2014, *57*, 9220–9231, doi:10.1021/jm500734a.

56. Huang, B.; Xiao, S.; Chen, T.; Xie, Y.; Luo, P. Purity assessment of ginsenoside Rg1 using quantitative <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017, 139, 193–204, doi:10.1016/j.jpba.2017.02.055.
57. Gödecke, T.; Yao, P.; Napolitano, J. G.; Nikolić, D.; Dietz, B. M.; Bolton, J. L.; Van Breemen, R. B.; Farnsworth, N. R.; Chen, S. N.; Lankin, D. C.; Pauli, G. F. Integrated standardization concept for Angelica botanicals using quantitative NMR. *Fitoterapia* 2012, 83, 18–32, doi:10.1016/j.fitote.2011.08.017.
58. Burton, I. W.; Quilliam, M. A.; Walter, J. A. Quantitative <sup>1</sup>H NMR with external standards: Use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. *Anal. Chem.* 2005, 77, 3123–3131, doi:10.1021/ac048385h.
59. Liu, Y.; Chen, S. N.; McAlpine, J. B.; Klein, L. L.; Friesen, J. B.; Lankin, D. C.; Pauli, G. F. Quantification of a botanical negative marker without an identical standard: Ginkgotoxin in Ginkgo biloba. *J. Nat. Prod.* 2014, 77, 611–617, doi:10.1021/np400874z.
60. Pierens, G. K.; Carroll, A. R.; Davis, R. A.; Palframan, M. E.; Quinn, R. J. Determination of Analyte Concentration Using the Residual Solvent Resonance in <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy. 2008, 810–813.
61. Yu, X.; Cai, S.; Chen, Z. Spectroscopic studies on the interactions

between a bioactive diperoxovanadate complex and pyridine.

*Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2004, 60, 391–396,  
doi:10.1016/S1386-1425(03)00236-1.

62. Rundlöf, T.; Mathiasson, M.; Bekiroglu, S.; Hakkarainen, B.; Bowden, T.; Arvidsson, T. Survey and qualification of internal standards for quantification by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 52, 645–651, doi:10.1016/j.jpba.2010.02.007.
63. Kato, T.; Yasumoto, T. Quantification of representative ciguatoxins in the pacific using quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Mar. Drugs* 2017, 15, doi:10.3390/md15100309.
64. KATO, T.; Saito, M.; Nagae, M.; Fujita, K.; Watai, M.; IGARASHI, T.; YASUMOTO, T.; INAGAKI, M. Absolute Quantification of Lipophilic Shellfish Toxins by Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Using Removable Internal Reference Substance with SI Traceability. *Anal. Sci.* 2016, 32, 729–34, doi:10.2116/analsci.32.729.
65. Pieri, V.; Belancic, A.; Morales, S.; Stuppner, H. Identification and quantification of major steviol glycosides in stevia rebaudiana purified extracts by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 4378–4384, doi:10.1021/jf104922q.
66. Chen, X.; Guo, Y.; Hu, Y.; Yu, B.; Qi, J. Quantitative analysis of highly similar salvianolic acids with <sup>1</sup>H qNMR for quality control of traditional

- Chinese medicinal preparation Salvianolate Lyophilized Injection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, 124, 281–287, doi:10.1016/j.jpba.2016.02.016.
67. Cheilari, A.; Sturm, S.; Intelmann, D.; Seger, C.; Stuppner, H. Head-to-Head Comparison of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection versus Quantitative Nuclear Magnetic Resonance for the Quantitative Analysis of the Silymarin Complex in *Silybum marianum* Fruit Extracts. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64, 1618–1626, doi:10.1021/acs.jafc.5b05494.
68. Karkoula, E.; Skantzari, A.; Melliou, E.; Magiatis, P. Direct measurement of oleocanthal and oleacein levels in olive oil by quantitative  $^1\text{H}$  NMR. Establishment of a new index for the characterization of extra virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 11696–11703, doi:10.1021/jf3032765.
69. Pauli, G. F.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C. A routine experimental protocol for qHNMR illustrated with taxol. *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 589–595, doi:10.1021/np060535r.
70. Malz, F.; Jancke, H. Validation of quantitative NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 38, 813–823, doi:10.1016/j.jpba.2005.01.043.
71. Zhao, J.; Pawar, R. S.; Ali, Z.; Khan, I. A. Phytochemical investigation of *Turnera diffusa*. *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 289–292, doi:10.1021/np060253r.

72. Montemayor, C. D. Aislamiento biodirigido de compuesto(s) con actividad hepatoprotectora a partir de *Turnera diffusa*, Universidad Autónoma de Nuevo León, 2013.
73. MacKinnon, N.; While, P. T.; Korvink, J. G. Novel selective TOCSY method enables NMR spectral elucidation of metabolomic mixtures. *J. Magn. Reson.* 2016, 272, 147–157, doi:10.1016/j.jmr.2016.09.011.
74. Willer, J.; Jöhrer, K.; Greil, R.; Zidorn, C.; Çiçek, S. S. Cytotoxic Properties of Damiana (*Turnera diffusa*) Extracts and Constituents and A Validated Quantitative UHPLC-DAD Assay. *Molecules* 2019, doi:10.3390/molecules24050855.
75. ICH VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES 2005.
76. Miller, J. N.; Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*; 6th ed.; Pearson, 2010; ISBN 9780273730422.
77. Armbruster, D. A.; Tillman, M. D.; Hubbs, L. M. Limit of detection (LOD)/limit of quantitation (LOQ): Comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. *Clin. Chem.* 1994, 40, 1233–1238.
78. Şengül, Ü. Comparing determination methods of detection and quantification limits for aflatoxin analysis in hazelnut. *J. Food Drug Anal.* 2016, 24, 56–62, doi:10.1016/j.jfda.2015.04.009.
79. Uhrovčík, J. Strategy for determination of LOD and LOQ values - Some

basic aspects. *Talanta* 2014, 119, 178–180,  
doi:10.1016/j.talanta.2013.10.061.

80. Bekiroglu, S.; Myrberg, O.; Östman, K.; Ek, M.; Arvidsson, T.; Rundlöf, T.; Hakkarainen, B. Validation of a quantitative NMR method for suspected counterfeit products exemplified on determination of benzethonium chloride in grapefruit seed extracts. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 47, 958–961, doi:10.1016/j.jpba.2008.03.021.
81. Monakhova, Y. B.; Diehl, B. W. K. Practical guide for selection of <sup>1</sup>H qNMR acquisition and processing parameters confirmed by automated spectra evaluation. *Magn. Reson. Chem.* 2017, 55, 996–1005, doi:10.1002/mrc.4622.
82. Li, Z. Y.; Welbeck, E.; Wang, R. F.; Liu, Q.; Yang, Y. B.; Chou, G. X.; Bi, K. S.; Wang, Z. T. A universal quantitative <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (qNMR) method for assessing the purity of dammarane-type ginsenosides. *Phytochem. Anal.* 2015, 26, 8–14, doi:10.1002/pca.2527.
83. Napolitano, J. G.; Gödecke, T.; Lankin, D. C.; Jaki, B. U.; Mcalpine, J. B.; Chen, S.; Pauli, G. F. Orthogonal analytical methods for botanical standardization : Determination of green tea catechins by qNMR and LC – MS / MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014, 93, 59–67, doi:10.1016/j.jpba.2013.06.017.