



Validación de un método analítico para la cuantificación de alcaloides totales

Validation of an analytical method for the quantification of total alkaloids

Milagritos Elizabeth Zavaleta Juárez¹ <https://orcid.org/0009-0005-4279-6478>

Ericson Felix Castillo Saavedra^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-9279-7189>

Anthony Daniel La Cunza Méndez¹ <https://orcid.org/0009-0002-5291-2717>

Julissa Marycarmen Noriega Oblitas¹ <https://orcid.org/0009-0002-3058-7925>

Cecilia Elizabeth Reyes Alfaro² <https://orcid.org/0000-0002-3528-546X>

¹Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.

²Universidad César Vallejo. Trujillo, Perú.

*Autor para la correspondencia. Correo electrónico: ecastillos@unitru.edu.pe

RESUMEN

Introducción: La validación de métodos analíticos asegura la reproducibilidad de datos cuando se desea realizar la cuantificación de un producto, mediante metodologías diferentes a las establecidas en documentos oficiales.

Objetivo: Validar un método analítico por espectrofotometría ultravioleta-visible para la cuantificación de alcaloides totales.

Métodos: Se utilizó un preparado galénico que contiene 0,1 % de extracto de belladona para determinar los parámetros de validación mediante un método espectrofotométrico ultravioleta-visible a 435 nm, a partir de la precipitación de alcaloides por la interacción con el reactivo de Dragendorff. La especificidad utilizó una concentración de 100 %, mientras, linealidad requirió muestras de 80 %, 90 %, 100 %, 110 % y 120 %; y, en el caso del rango, al 80 % y 120 %. La precisión evaluó la repetibilidad al 80 %, 100 % y 120 %, y, la precisión intermedia requirió una muestra al 100 % considerando condiciones interanalistas,

<http://scielo.sld.cu>

<https://revmedmilitar.sld.cu>



interequipos e interdías. Finalmente, en exactitud, concentraciones de 80 %, 100 % y 120 %; y, en robustez se analizó una muestra al 100 % para determinar variación de pH y velocidad de centrifugación.

Resultados: La selectividad obtuvo valores aceptables tanto en la matriz como el producto elaborado, la linealidad presentó coeficientes de correlación y determinación próximos a 1, y el rango de concentración se encontró entre 40 – 60 mg/L. Exactitud, precisión y robustez tuvieron una variabilidad menor al 2 %.

Conclusiones: El método espectrofotométrico ultravioleta-visible es selectivo, lineal, exacto, preciso y robusto; es confiable en la determinación de alcaloides precipitables.

Palabras clave: alcaloides de belladona; estudios de validación; industria farmacéutica.

ABSTRACT

Introduction: The validation of analytical methods ensures the reproducibility of data, when it is desired to perform the quantification of a product, using methodologies different from those established in official documents.

Objective: Validate an analytical method by UV Vis spectrophotometry for the quantification of total alkaloids.

Methods: A galenic preparation containing 0.1% of belladonna extract was used to determine the validation parameters using a UV-visible spectrophotometric method at 435 nm, based on the precipitation of alkaloids by interaction with the Dragendorff's reagent. Specificity used a concentration of 100%, while linearity required samples of 80%, 90%, 100%, 110% and 120%; and, in the case of the range, at 80% and 120%. Precision evaluated repeatability at 80%, 100% and 120%, and intermediate precision required a 100% sample considering inter-analyst, inter-team and inter-day conditions. Finally, in accuracy, concentrations of 80%, 100% and 120%; and, for robustness, a 100% sample was analyzed to determine pH variation and centrifugation speed.

Results: The selectivity obtained acceptable values in both the matrix and the elaborated product, the linearity presented correlation and determination coefficients close to 1, and the concentration range was between 40 - 60 mg/L. Accuracy, precision and robustness had a variability of less than 2%.

Conclusions: The UV Vis spectrophotometric method is selective, linear, exact, precise and robust; it is reliable in the determination of precipitable alkaloids.



Keywords: belladonna alkaloids; pharmaceutical industry; validation studies.

Recibido: 25/10/2023

Aprobado: 26/04/2024

INTRODUCCIÓN

Los vegetales presentan un metabolismo capaz de generar una extensa lista de productos bioquímicos conocidos como metabolitos.^(1,2,3) Los alcaloides representan una clase de metabolitos secundarios, que presentan un átomo de nitrógeno responsable de la singularidad de sus estructuras químicas; sin embargo, el ordenamiento de los átomos en la molécula, es la que determina la actividad biológica.^(1,4)

La carencia de metodologías analíticas limita la cuantificación; por lo que, en la actualidad se disponen de medicamentos con actividades biológicas, que dependen del tipo de alcaloides utilizado; entre estos, la vinblastina y vincristina, utilizados en el tratamiento del cáncer.^(5,6,7) Además, alcaloides de pirrolizina contenidos en miel, leche y huevo afectan al hígado, y provocan emesis, fiebre e ictericia.⁽⁸⁾

Diversas son las razones que motivan el estudio tanto cuantitativo como cualitativo de los alcaloides mediante metodologías analíticas sustentadas por diversos organismos reguladores internacionales. En la literatura existen procedimientos en el que interviene la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) en el análisis de especies de *Borago officinalis* y *Lupinus*.^(9,10) Asimismo, la espectrofotometría ultravioleta visible se utilizó en la cuantificación de la fracción alcaloide de las flores de *Mirabilis jalapa* Linn.⁽¹¹⁾ Además, otros métodos utilizan una combinación de técnicas para examinar alcaloides de pirrolizidina en muestras de té.⁽¹²⁾

En la industria farmacéutica, la validación de métodos analíticos se considera una de las exigencias de las buenas prácticas de manufactura (BPM) y también de las buenas prácticas de laboratorio (BPL), que garantizan la evaluación de la calidad de los productos dentro de un sistema de calidad confiable.^(13,14,15)

La validación de un método analítico demuestra que la forma procedimental de un ensayo realizado sea



confiable y cumpla para el propósito requerido; además, debe ser proporcional con los valores obtenidos.^(13,14,16)

Los estándares internacionales para la validación de métodos analíticos, como selectividad, precisión, linealidad, especificidad, límite de detección y cuantificación, recomendados por organizaciones como la Conferencia Internacional sobre Armonización (por sus siglas en inglés ICH),⁽¹³⁾ la Food and Drug Administration (por sus siglas en inglés FDA)⁽¹⁴⁾ y la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI),⁽¹⁶⁾ son reconocidos y aceptados en la comunidad científica, y se consideran estándares internacionales para validar procedimientos analíticos. Para garantizar la adecuada validez metodológica es esencial que todos los materiales o equipos utilizados estén calibrados.⁽¹⁵⁾

En relación con la estimación de alcaloides, el uso de la espectrofotometría ultravioleta- visible (UV-visible) se destaca como herramienta eficiente y con amplio uso, dado que estos compuestos tienen una característica de absorbancia máxima en una región de espectro visible, debido a la presencia de grupos funcionales específicos en su estructura molecular.^(17,18) Sin embargo, para garantizar resultados confiables, es fundamental contar con un método analítico validado.^(13,15) En este sentido, el estudio corresponde a la categoría I de acuerdo con la clasificación establecida por la United State Pharmacopeia (por sus siglas en inglés USP), que hace referencia a los métodos analíticos utilizados para determinar los principales componentes de medicamentos o principios activos contenidos en productos farmacéuticos terminados.⁽¹⁹⁾

El objetivo del estudio es validar un método analítico para cuantificar alcaloides totales precipitables mediante la espectrofotometría UV-visible en productos naturales.

MÉTODOS

Se realizó un estudio que empleó como muestra un preparado galénico que contiene 0,1 % de extracto de belladona. La metodología se sustenta en el reactivo de Dragendorff, que se utiliza para precipitar alcaloides presentes en extractos vegetales, se combina con bismuto para generar un complejo intermedio. Luego se agrega sulfuro de sodio 1 % para separar el bismuto de los alcaloides, se extrae posteriormente con ácido nítrico concentrado para formar un complejo amarillo con la adición de tiourea

<http://scielo.sld.cu>

<https://revmedmilitar.sld.cu>



al 3 %, que se puede cuantificar espectrofotométricamente en el rango visible con una longitud de onda de 435 nm.⁽¹⁷⁾

El desarrollo de la validación se inició con la preparación de la curva de calibración, que consistió en extraer alícuotas de 1 a 9 mL de solución madre de nitrato de bismuto pentahidratado (0,1 mg/mL) que se enrasaron a 10 mL con agua destilada, se extrajo 1 mL y se añadieron 5 mL de tiourea al 3 %.^(17,18)

Por otro lado, el reactivo de Dragendorff se preparó a partir de una solución de 0,8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 40 mL de agua destilada y 10 mL de ácido acético glacial; enseguida, se preparó otra solución de 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua purificada. Por último, se mezclaron ambas soluciones.⁽¹⁷⁾

El tratamiento de la muestra consistió en concentrar 300 mL de extracto de belladona hasta obtener 20 mL, se aciduló con una solución amortiguada de HCl hasta alcanzar un pH de 2,5. Se transfirieron 5 mL de esta solución a cada tubo de centrífuga (por triplicado); se agregaron 2 mL de reactivo de Dragendorff y se centrifugó a 3000 rpm/30 minutos. Luego se trató con 2 mL de sulfuro de sodio al 1 % y el precipitado resultante se centrifugó, se agregaron 2 mL de ácido nítrico concentrado; se dejó reposar durante 10 minutos, se transfirió a fiolas de 10 mL y se enrasó con agua destilada. Se extrajo 1 mL de la solución, se añadieron 5 mL de tiourea al 3 % (p/v) y se dejó en reposo por 5 minutos, para leer las absorbancias en espectrofotómetro UV/Vis, BIOBASE a 435 nm.^(17,18,19)

En la evaluación de los parámetros de validación, se realizaron 3 determinaciones tanto para el blanco como para la muestra que presentó el analito de interés a una concentración de 100 %. Para la linealidad, cuyo parámetro permite probar la capacidad del método para producir resultados proporcionales a la concentración, se realizaron 15 determinaciones, que fueron realizadas por el mismo analista.

Se prepararon muestras a 5 niveles de concentración (80 %, 90 %, 100 %, 110 %, y 120 %) y se analizaron por triplicado; mientras que, para desarrollar el rango, se seleccionaron las concentraciones máxima y mínima, que corresponden a 80 % y 120 % respectivamente. En la precisión se evaluaron la repetibilidad y la precisión intermedia. En el primer caso se seleccionaron 3 niveles de concentración (80 %, 100 % y 120 %), que representan concentraciones inferior, medio y superior, respectivamente; se evaluaron por triplicado y se consideró el mismo día de análisis, analista e instrumentos de laboratorio. Para la precisión intermedia se seleccionó la muestra al 100 % de concentración por triplicado, se tuvieron en cuenta 2



analistas, 2 equipos y 2 días diferentes, pero un mismo laboratorio. Asimismo, para determinar la exactitud se seleccionaron 3 niveles de concentración (80 %, 100 % y 120 %), que representan concentraciones inferior, medio y superior, respectivamente, se evaluó por triplicado y se consideraron las mismas condiciones y datos obtenidos en el parámetro de repetibilidad. Para culminar, la robustez del método se determinó en la muestra al 100 % de concentración, en la que se realizó variación de pH (2,3; 2,4 y 2,5) y velocidad de centrifugación (2400, 2700, 3000 rpm) a una absorbancia de 435 nm.^(13,14,16)

En la evaluación estadística de los parámetros de validación, para linealidad se realizó una curva de calibración relacionando la concentración con la absorbancia. Asimismo, se empleó el método de mínimos cuadrados para hallar el valor de la pendiente (b), el intercepto (a), coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r^2). Se consideraron como criterios de aceptación que el $r \geq 0,999$ y $r^2 \geq 0,998$. Se empleó un test de linealidad y un test de proporcionalidad para su verificación. Para el primero se consideró como criterio de aceptación $t_{exp}(b) > t_{tabla}$ y para el segundo caso $t_{exp}(a) > b t_{tabla}$. Estos criterios se aplican para n-2 grados de libertad, con un 95 % de probabilidad ($\alpha = 0,05$), en el que se cumple que tanto “a” como “b” son diferentes de cero.^(17,18)

Para el caso de la exactitud se calculó el porcentaje de recuperación del analito, considerando como criterio de aceptación el rango de un 98 %-102 %. Además, en la prueba t experimental se consideró $t_{exp}(r) < t_{tabla}$ para n-1 grados de libertad y una probabilidad del 95 % ($\alpha = 0,05$) de relación lineal entre x e y. Por otro lado, para evaluar repetibilidad del método y precisión intermedia se consideró un coeficiente de variación (CV) < 2 %.^(18,20)

En cuanto al rango, se analiza si los resultados presentan un adecuado grado de linealidad, precisión y exactitud. Finalmente, para la robustez, los promedios de la variación de pH y la velocidad de centrifugación se expresó como CV %, cuyo valor debe ser < 2 %.^(20,21)

RESULTADOS

En la tabla 1 se observa que, al evaluarse la selectividad por método espectrofotométrico, tanto en concentración como porcentaje de recuperación, los valores obtenidos en la matriz y en el producto



elaborado fueron aceptables. Por tanto, el método tendría la capacidad para detectar y medir de manera específica en presencia de otros componentes en la muestra, el analito de interés.

Tabla 1 - Selectividad por el método espectrofotométrico UV-visible

Concentración	Valor obtenido (mg/mL)	Valor aceptable (mg/mL)
Matriz	0,00	0,00
Producto	0,0499	0,0500
% Recuperación	Valor obtenido (%)	Valor aceptable (%)
Matriz	0,00	0,00
Producto	99,73	100,00 ± 2

Al mismo tiempo, el parámetro linealidad (tabla 2) se evaluó mediante la generación de una curva de calibración y se utilizaron diferentes concentraciones de estándares o soluciones para la obtención de la pendiente y el intercepto. En efecto, los coeficientes de correlación, determinación y variación presentaron valores aceptables, al igual que la prueba de linealidad de la pendiente y la prueba de proporcionalidad del intercepto, se encontraron dentro del rango establecido, tanto en límites como t_{exp} . Del mismo modo, la precisión (tabla 3) que evalúa la variabilidad aleatoria de los resultados mediante una serie de repeticiones analíticas de una muestra homogénea, el valor menor a 2 % en repetibilidad y precisión intermedia, indica que el método tiene la capacidad para producir datos coherentes y reproducibles al realizar el mismo análisis varias veces, bajo las mismas condiciones operativas. Por otra parte, respecto a exactitud (tabla 4) que se precisa como la capacidad de que un método analítico se acerca al valor verdadero de una sustancia determinada; el porcentaje de recuperación, CV % de recuperación total y t Student se encontraron dentro de los valores esperados ($\leq 2\%$), son indicadores de confiabilidad y utilidad de una metodología analítica.



Tabla 2 - Linealidad y rango por el método espectrofotométrico UV-visible

Parámetros	Valor obtenido	Valor aceptable
Rango	40 – 60 mg/L	-
Pendiente	b = 2,0578	-
Intercepto	α = -0,0009	-
Coefficiente de correlación (r)	0,9998	≥ 0,999
Coefficiente de determinación (r ²)	0,9997	≥ 0,998
Coefficiente de variación (CV% f)	0,31%	≤ 2%
Test estadístico para (r) ρ = 0,05; y n-2 grados de libertad	t _{exp} = 196,2225 t _{tabla} = 2,1604	t _{exp} > t _{tabla}
Prueba de linealidad de la pendiente (b)		
Límite de Confianza (LCb)	L.S. = 2,08050	L.C. no incluye a cero
	L.I. = 2,03518	
Test de t	t _{exp} = 196,2225	t _{exp} > t _{tabla}
	t _{tabla} = 2,1604	
Prueba de proporcionalidad del intercepto (a)		
Límite de Confianza (LCa)	L.S. = 0,00022	L.C. incluye a cero
	L.I. = -0,00205	
Test de t	t _{exp} = 1,7347	t _{exp} < t _{tabla}
	t _{tabla} = 2,1604	

Tabla 3 - Precisión por el método espectrofotométrico UV-visible

Parámetros	Valor obtenido (%)	Valor aceptable (%)
Repetibilidad: Coeficiente de Variación (CV%)	0,99	≤ 2
Precisión intermedia: Coeficiente de Variación (CV%)	0,88	≤ 2

Tabla 4 - Exactitud del método espectrofotométrico UV-visible

Parámetros	Valor obtenido (%)	Valor aceptable (%)
% recuperación	100,06	98 – 102
CV del % de recuperación total	0,99	≤ 2
Test t de Student (ρ = 0,05; n-1 grados de libertad)	t _{exp} = 0,197 t _{tabla} = 2,306	t _{exp} < t _{tabla}



De la misma forma, la tabla 5 presenta la evaluación de la robustez del método que midió la capacidad para brindar en el empleo de rutina una idea de su fiabilidad o estabilidad, manteniéndose inalterado con pequeñas variaciones deliberadas en ciertos parámetros. Por tanto; 0,78 % para pH y 0,54 % para velocidad de centrifugación, aseguran que, frente a pequeños cambios según las condiciones que se describen en el procedimiento, se obtengan resultados válidos, que pueden ocurrir durante su aplicabilidad.

Tabla 5 - Robustez por el método espectrofotométrico UV-visible variando pH y velocidad de centrifugación

Parámetros	Valor obtenido (%)	Valor aceptable (%)
pH Coeficiente de Variación (CV%)	0,78	≤ 2
Velocidad de centrifugación Coeficiente de Variación (CV%)	0,54	≤ 2

De esta manera, la validación de métodos analíticos forma parte del protocolo de las BPL, que permiten certificar aspectos procedimentales, así como también lo relacionado a registros, personal, equipos, control e instalaciones con la finalidad de obtener datos reproducibles.

DISCUSIÓN

El estudio se realizó de acuerdo a las especificaciones establecidas en directrices y normas reguladoras internacionales.^(13,14,16) De forma particular, los parámetros requeridos se definieron en función del flujo del método de estudio. En la selectividad se obtuvieron valores de 0 % para la matriz de la muestra, y mostraron conformidad entre las lecturas, no se obtuvo respuesta en el rango de interés, e indicó que los componentes de los excipientes incluidos en el producto no tienen efecto sobre la respuesta obtenida por este método analítico. De esta manera, se comprobó que la selectividad cumple con la especificación descrita en FDA y AEFI, donde establecen que este parámetro evalúa la respuesta del método para detectar el analito sin interferencia alguna.^(15,16)



La linealidad evalúa que el rango de estudio seleccionado es adecuado, y comprueba que el modelo de regresión se ajusta con precisión a los datos de los experimentos, para facilitar una predicción de su comportamiento. En la recta de regresión para la curva de calibración se observa que por cada mg/mL de la solución estándar se incrementa la absorbancia de manera proporcional, se obtiene un valor de r^2 de 0,9991, por tanto, indicaría que existe una elevada relación entre las variables consideradas, y que la recta se ajusta al comportamiento de los puntos en el segmento considerado.^(13,15)

De igual forma, se encontró que el método presenta un rango definido entre 80 – 120 % y produce valores equivalentes a la concentración del analito. El análisis estadístico de los datos revelaron un coeficiente de correlación ($r= 0,9998$) y coeficiente de determinación ($r^2= 0,9997$), en el que se establecería una fuerte relación entre las concentraciones (x) y sus respuestas (y), valores que cumplen con las especificaciones dadas por ICH y AEFI que refieren que el coeficiente de correlación debe ser mayor a 0,998, se evidencia una aceptable asociación de los datos con una probabilidad mayor a 99,90 % de que la concentración sea la causa del porcentaje de variación de la respuesta.^(13,16)

El CV del factor de respuesta fue 0,31 %, inferior al 2 %, que es el límite máximo permitido, se realizó un test de linealidad de la pendiente (b) para corroborar la regresión y se comparó el valor de prueba (t_{exp}) con el valor crítico de la tabla (t_{tabla}), se confirmó que, la concentración (x) y la absorbancia (y) tienen una correlación positiva que es proporcional entre sí, debido a que el resultado está relacionado con la sensibilidad del método, cuanto mayor sea la pendiente, mayor será la sensibilidad, por lo que, la pendiente b difiere de cero significativamente. Para este fin, se realizó un *test* de proporcionalidad del intercepto (a) y se comparó el resultado de la prueba estadística (t_{exp}) con el resultado crítico de la tabla (t_{tabla}), se encontró que no hay evidencia de una proporcionalidad significativa debido a la escasa variación entre concentración y respuesta, el intercepto no es considerablemente distinto de cero; pero es consistente con un modelo lineal.^(20,21)

La precisión del método fue evaluada como repetibilidad y precisión intermedia; para la primera, se consideró evaluar al menos 9 determinaciones que abarcan el intervalo establecido, específicamente 3 mediciones repetidas para cada concentración, evaluadas por un único operador, mismo equipo y dentro del mismo laboratorio. De este modo, para confirmar la reproducibilidad del método desarrollado, se analizaron 3 niveles de concentración que tuvieron un promedio de 0,99 %, se establece que, tanto el



método como el equipo presentan un grado de respuesta único y proporcional al analito. Se comprobó de manera individual la repetibilidad del método a partir de que los resultados del CV % se mantuvieron dentro de los límites aceptables con un valor máximo de 0,99 %, y un valor mínimo de 0,98 %; no superando el límite especificado de 2,0 %.⁽²¹⁾

Por otro lado, para la precisión intermedia que evalúa el grado de coincidencia o variación de los resultados entre estudios independientes, se aplica la misma metodología, pero en condiciones operativas diferentes dentro del mismo laboratorio, con diferentes analistas y en distintos días, se obtuvo un CV % de 0,88, y cumple con la especificación (menos de 2,0 %) de organismos reguladores.

La exactitud es otro de los criterios en la validación de un método analítico, dado que, ilustra claramente la concordancia que hay entre el valor medido y el valor verdadero que, por lo general, se expresa como % recuperación; y, hace referencia a una estimación del error sistemático, que puede presentar valores superiores (error positivo) o inferiores (error negativo) al 100 %. Se trabajó en 3 diferentes concentraciones y por triplicado, luego, se tomaron los datos obtenidos en repetibilidad, se obtuvo 100,06 % como porcentaje de recuperación promedio, que según el criterio de aceptación (98 % - 102 %) se encuentra dentro de las especificaciones correspondientes. Por otra parte, se obtuvo un CV % de 0,99 %, y al aplicar la prueba t de Student se determinó un $t_{exp} = 0,197$ menor al $t_{tabla} = 2,306$; se evidencia la no existencia de significación estadística entre la recuperación promedio y el valor de referencia de 100 %, se corrobora entonces, el método puede considerarse exacto.^(13,14)

Por último, la robustez mide la habilidad del procedimiento analítico para producir resultados exactos y precisos, incluso cuando se cambian las condiciones experimentales, como temperatura, pH, tiempo de reacción, velocidad de centrifugación, entre otras. Por ello, se observa que, con respecto a la variación de pH, se obtuvo un CV% de 0,78 %; menor al límite establecido para el método ($CV \leq 2$ %). Además, se observa que, no existe variación en los resultados para la velocidad de centrifugación, al obtener un CV % de 0,4 %; y cumple también con el límite establecido para el método ($CV \leq 2$ %).^(13,14,16,20)

La validación de métodos analíticos en la industria farmacéutica asegura la confiabilidad de los datos, al representar metodologías alternas a las establecidas en farmacopeas oficiales, que presentan como desventajas mayor costo y tiempo en su desarrollo. La Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas, organismo regulador en Perú, cuando ejecuta su protocolo de auditoría como parte del proceso



de aseguramiento de calidad; facilita la presentación del desarrollo de metodologías analíticas, cuando el medicamento no se ha cuantificado por un método oficial.

El estudio presenta como limitación, la extrapolación de la metodología validada para la cuantificación de otros metabolitos secundarios de interés farmacológico.

En suma, la metodología analítica mediante espectrofotometría UV-visible que se validó en productos naturales tuvo como propósito cuantificar alcaloides totales de manera reproducible y confiable, que se pueden incorporar a sustancias medicamentosas, y con esto, asegurar la recuperación del paciente, mediante un tratamiento terapéutico, eficaz y seguro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sharma M, Kaushik P. Vegetable phytochemicals: An update on extraction and analysis techniques. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2021; 36:102149. DOI: 10.1016/j.bcab.2021.102149
2. Bhambhani S, Kondhare KR, Giri AP. Diversity in chemical structures and biological properties of plant alkaloids. *Molecules*. 2021; 26(11): 3374. DOI: 10.3390/molecules26113374
3. Pott D, Osorio S, Vallarino JG. From central to specialized metabolism: An overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. *Front Plant Sci*. 2019; 10: 835. DOI: 10.3389/fpls.2019.00835
4. Banerjee A, Panda G. Total synthesis of selected bioactive alkaloids, their structure–function relationships and molecular target interactions: A comparative synthetic analysis of tryptophan originated chiral pool approaches vs other synthons. *Results Chem*. 2021; 3:100215. DOI: 10.1016/j.rechem.2021.100215
5. Zhang Z, Li Y, Sun Y, Wang W, Song X, Zhang D. Chemical diversity and biological activities of marine-derived sulphur containing alkaloids: A comprehensive update. *Arab J Chem*. 2023; 16(9):105011. DOI: 10.1016/j.arabjc.2023.105011
6. Rajput A, Sharma R, Bharti R. Pharmacological activities and toxicities of alkaloids on human health. *Mater Today Proc*. 2022; 48:1407–15. DOI: 10.1016/j.matpr.2021.09.189



7. Efferth T, Oesch F. Repurposing of plant alkaloids for cancer therapy: Pharmacology and toxicology. *Semin Cancer Biol.* 2021; 68:143–63. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.12.010
8. Yang M, Ma J, Ruan J, Zhang C, Ye Y, Pi-Cheng Fu P, et al. Absorption difference between hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids and their N-oxides – Mechanism and its potential toxic impact. *J Ethnopharmacol.* 2020; 249:112421. DOI: 10.1016/j.jep.2019.112421
9. Sattler M, Müller V, Bunzel D, Kulling SE, Soukup ST. Pyrrolizidine alkaloids in borage (*Borago officinalis*): Comprehensive profiling and development of a validated LC-MS/MS method for quantification. *Talanta.* 2023; 258:124425. DOI: 10.1016/j.talanta.2023.124425
10. Khedr T, Juhász A, Singh KB, Foley R, Nye-Wood MG, Colgrave ML. Development and validation of a rapid and sensitive LC-MS/MS approach for alkaloid testing in different *Lupinus* species. *J Food Compost Anal.* 2023; 121:105391. DOI: 10.1016/j.jfca.2023.105391
11. Suselo YH, Indarto D, Wasita B, Hartono H. Alkaloid fraction of *Mirabilis jalapa* Linn. flowers has low cytotoxicity and increases iron absorption through Erythropoietin-Matriptase-2-Hepcidin pathway in iron deficiency Hepatocarcinoma cell model. *Saudi J Biol Sci.* 2023; 30(1):103508. DOI: 10.1016/j.sjbs.2022.103508
12. Girard MFC, Knight P, Hopfgartner G. Vacuum differential mobility spectrometry combined with column-switching liquid chromatography- mass spectrometry for the analysis of pyrrolizidine alkaloids in tea samples. *J Chromatogr A.* 2023; 1705:464174. DOI: 10.1016/j.chroma.2023.464174
13. International Conference on Harmonisation. ICH harmonized tripartite guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). California: ICH; 2005 [acceso: 13/07/2023]. Disponible en: <https://somatek.com/wp-content/uploads/2014/06/sk140605h.pdf>
14. Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CMV). Rockville: FDA; 2018. [acceso: 14/08/2023]. Disponible en: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
15. Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug



Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Rockville: FDA; 2015. [acceso: 14/08/2023]. Disponible en:

<https://www.fda.gov/files/drugs/published/Analytical-Procedures-and-Methods-Validation-for-Drugs-and-Biologics.pdf>

16. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de métodos analíticos.

Barcelona: AEFI; 2001.

17. Sreevidya N, Mehrotra S. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. J AOAC Int 2003 [acceso: 25/06/2023]; 86(6): 1124-7.

Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14979692/>

18. Ajanal M, Gundkalle M, Nayak S. Estimation of total alkaloid in Chitrakadivati by UV-Spectrophotometer. Anc Sci Life. 2012; 31(4): 198-201. DOI: 10.4103/0257-7941.107361

19. The United States Convention. Farmacopea de los Estados Unidos de América: Formulario Nacional, Compendios de normas oficiales. Validación de procedimientos farmacopeicos. USP 44 – NF 39. EE. UU., Rockville: U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. 2022, pp: 8387-8393.

20. Versilovskis A, Mulder P, Pereboom D, Stoppelaar J, Nijs M. Simultaneous quantification of ergot and tropane alkaloids in bread in the Netherlands by LC-MS/MS. Food Addit Contam 2020; 13(3): 215-23. DOI: 10.1080/19393210.2020.1771777

21. Eugelio F, Palmieri S, Fanti f, Messuri L, Pepe A, Compagnone D, et al. Development of an HPLC-MS/MS method for the determination of alkaloids in lupins. Molecules 2023; 28(4): 1531. DOI: 10.3390/molecules28041531

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: *Milagritos Elizabeth Zavaleta Juárez.*

Curación de datos: *Milagritos Elizabeth Zavaleta Juárez.*

<http://scielo.sld.cu>

<https://revmedmilitar.sld.cu>

Bajo licencia Creative Commons 



Análisis formal: *Milagritos Elizabeth Zavaleta Juárez, Ericson Felix Castillo Saavedra.*

Investigación: *Milagritos Elizabeth Zavaleta Juárez, Ericson Felix Castillo Saavedra.*

Metodología: *Milagritos Elizabeth Zavaleta Juárez, Ericson Felix Castillo Saavedra.*

Administración del proyecto: *Milagritos Elizabeth Zavaleta Juárez, Ericson Felix Castillo Saavedra.*

Recursos: *Milagritos Elizabeth Zavaleta Juárez.*

Software: *Milagritos Elizabeth Zavaleta Juárez.*

Supervisión: *Milagritos Elizabeth Zavaleta Juárez, Ericson Felix Castillo Saavedra.*

Validación: *Milagritos Elizabeth Zavaleta Juárez, Ericson Felix Castillo Saavedra.*

Visualización: *Milagritos Elizabeth Zavaleta Juárez, Anthony Daniel La Cunza Méndez, Julissa Marycarmen Noriega Oblitas.*

Redacción – Elaboración del borrador original: *Ericson Felix Castillo Saavedra, Anthony Daniel La Cunza Méndez, Julissa Marycarmen Noriega Oblitas.*

Redacción – Revisión y edición: *Ericson Felix Castillo Saavedra, Cecilia Elizabeth Reyes Alfaro.*