



**Determinación del contenido en ecdisterona
en varios productos mediante
HPLC-ESI-QTOF-MS**

PROYECTO	CÓDIGO	EDICIÓN	FECHA
PS-011/2021	01	002	5-Mayo-2021



Tabla de contenido

1. Objetivo	4
2. Metodología	4
2.1 Reactivos	4
2.2 Preparación de la curva de calibrado.....	4
2.3 Muestras.....	4
2.4 Análisis mediante HPLC-ESI-QTOF-MS	5
3. Resultados	6
4. Certificación de calidad	8
ANEXO 1	9

1. Objetivo

El objetivo general del estudio descrito en el presente documento fue cuantificar el contenido en ecdisterona de 3 productos, dos de ellos en polvo y uno en cápsulas, proporcionados por HSN mediante HPLC-ESI-QTOF-MS.

2. Metodología

2.1 Reactivos

Todos los productos químicos usados en este estudio fueron de grado reactivo y el agua empleada fue de tipo Milli-Q obtenida de un equipo de purificación Millipore. El acetonitrilo y metanol de calidad LC-MS, así como el etanol absoluto y dimetilsulfóxido de grado analítico utilizados fueron adquiridos en Fisher Scientific. El ácido fórmico empleado fue de Fluka (Sigma–Aldrich). El patrón de ecdisterona del 98% de pureza fue adquirido en Toronto Research Chemicals y en el anexo a este informe se adjunta el certificado de análisis emitido por el proveedor para el lote del producto recibido (1-AGE-142-2).

2.2 Preparación de la curva de calibrado

Se preparó una disolución madre del patrón de ecdisterona a una concentración de 1 mg/mL en metanol que se filtró con un filtro de jeringa de celulosa regenerada de 0.45 µm de tamaño de poro y se almacenó a -20°C en un vial topacio. A partir de esta disolución madre se preparó la curva de calibrado de 7 puntos (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 y 10 µg/mL de ecdisterona). La curva de calibrado se analizó por triplicado inmediatamente después de su preparación.

2.3 Muestras

El 23 de abril se recibieron en las instalaciones de CIDAF las muestras que se especifican en la tabla 1.

Tabla 1. Muestras recibidas.

Nombre muestra	Lote	Forma de presentación
RM 00444, proveedor 1	20201001	Sólido pulverulento contenido en una bolsa
RM 00444, proveedor 2	RCE-210304	Sólido pulverulento contenido en una bolsa
Producto final MARCA 2	44413/21	Bote de cápsulas

Las 3 muestras se conservaron a temperatura ambiente, en lugar fresco y seco protegidas de la luz directa hasta su análisis.

Para llevar a cabo el análisis de las dos muestras en polvo, se prepararon por triplicado disoluciones de ambas en metanol a una concentración de 1 mg/mL que se filtraron con filtros de jeringa de celulosa regenerada de 0.45 μm de tamaño de poro. A partir de estas disoluciones, se prepararon diluciones 1:200 (v/v) para su análisis directo.

En el caso de la muestra de producto final 2 encapsulada, se pesó el contenido de 10 cápsulas que se homogenizó para llevar a cabo su posterior tratamiento. Esta muestra se trató por triplicado siguiendo el protocolo optimizado por Ambrosio et al. para el análisis de ecdisterona en suplementos alimenticios¹. Brevemente, se pesaron aproximadamente 500 mg del contenido homogenizado de las cápsulas y se añadió 40 mL de una mezcla DMSO/EtOH/H₂O (50:30:20, v/v/v). La extracción se realizó durante 30 min a 35°C con agitación continua y posteriormente se centrifugó la mezcla a 10000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se filtraron con filtros de jeringa de celulosa regenerada de 0.45 μm de tamaño de poro y se prepararon diluciones 1:100 (v/v) para su análisis directo.

Todas las réplicas de las muestras se analizaron por triplicado inmediatamente tras su preparación.

2.4 Análisis mediante HPLC-ESI-QTOF-MS

La curva de calibración y las muestras se analizaron por triplicado empleando un cromatógrafo de líquidos Agilent de la serie 1260 equipado con un desgasificador de microvacío, una bomba binaria, un automuestreador y un compartimento de columna termostatizados y un detector de diodos en fila. Para la separación de los componentes de las muestras se utilizó una columna Agilent Poroshell 120 EC-C18 con unas dimensiones de 2.1 \times 100 mm y un tamaño de partícula de 2.7 μm . Las fases móviles empleadas fueron agua con 0.1% de ácido fórmico como fase A y acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico como fase B, con el siguiente gradiente: 2 min de condiciones isocráticas con 10% de fase B, seguido de un aumento lineal hasta 90% de fase B durante 4 min, manteniendo estas condiciones durante 1 min más y finalmente volviendo a condiciones iniciales en 0.5 min y dejando 2.5 min en condiciones iniciales de análisis para equilibrar el sistema. El flujo empleado fue 0.5 mL/min, la temperatura de la columna se mantuvo a 25°C, se inyectó 5 μL de muestra conservada a 4°C en el compartimento de muestras termostatizado.

La detección de los compuestos se realizó con un detector Agilent 6540 Ultra High Definition (UHD) Accurate Mass Q-TOF equipado con una interfase ESI Jet Stream dual. La detección por QTOF se realizó en modo de ionización positivo, en un rango de masas de 50-1700 m/z. Se utilizó como gas de ionización y secado nitrógeno ultrapuro a una temperatura de 325°C y 375°C, respectivamente, y flujos de 15 y 12 L/min, respectivamente. Otros parámetros empleados fueron: voltaje del capilar, 3500 V; nebulizador, 25 psig; fragmentor, 130 V; voltaje del nozzle, 500 V; skimmer, 45 V y octopolo 1 RF, 750 V.

El análisis se realizó con la continua ionización de los siguientes dos iones de referencia: purina (121.050873 m/z) y un aducto de hexakis (1H,1H,3H-tetrafluoropropoxi) fosfazina (922.009798

¹ Ambrosio, G., Wirth, D., Joseph, J.F., Mazzarino, M., de la Torre, X., Botrè, F., Parr, M.K. How reliable is dietary supplement labelling?-Experiences from the analysis of ecdysterone supplements. *J Pharm Biomed Anal.* (2020) 177:112877.

m/z); con el objetivo de recalibrar cada espectro de masas adquirido durante el análisis para lograr mediciones de masa exacta con una precisión de 2 ppm.

Todas las operaciones de adquisición de datos se controlaron con el software Masshunter workstation versión B.06.00 (Agilent Technologies).

3. Resultados

En la figura 1 se muestran los cromatogramas de ión total (TIC) obtenidos al analizar las diluciones de las muestras preparadas tal y como se ha descrito en el apartado correspondiente donde se señala el pico correspondiente a la ecdisterona.

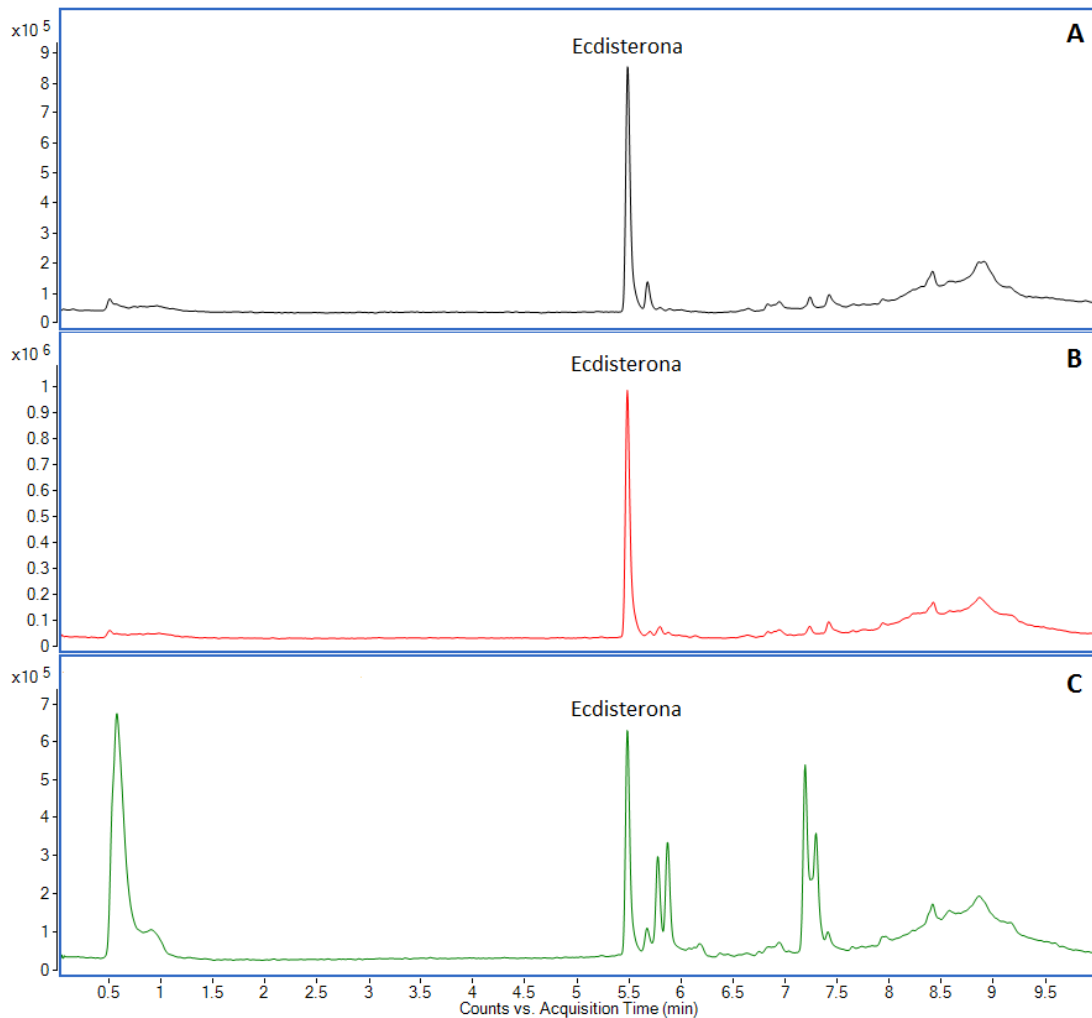


Figura 1. TIC representativos de las diluciones 1:200 de las muestras proveedor 1 (A) y proveedor 2 (B), y de la dilución 1:100 del producto final 2 (C).

Los pesos de las 10 cápsulas de producto final 2 empleados para preparar la muestra homogenizada que se analizó se muestran en la tabla 2 junto con su valor medio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Tabla 2. Pesos de las 10 cápsulas de producto final 2 homogenizadas.

Peso cápsulas (mg)	Media (mg)	s (mg)	CV (%)
464.3	469.23	21.5467	4.6
485.9			
434.1			
464			
483.9			
435.1			
495.2			
466.5			
470.6			
492.7			

Para llevar a cabo la cuantificación de ecdisterona se analizó por triplicado la curva de calibración del patrón utilizando siete niveles de concentración preparada tal y como se detalla en la sección 2.2. En la tabla 3 se recogen los principales parámetros analíticos del método de cuantificación.

Tabla 3. Principales parámetros analíticos del método de cuantificación de ecdisterona.

Ecdisterona	
TR (min)	5.49 ± 0.01
Rango de calibración (µg/mL)	0.1 - 10
Ecuación de calibración	y = 209914.5x + 49491.4
R ²	0.9997
RSD% intraday (n=9)	1.6

La concentración de ecdisterona en las 3 muestras se determinó analizando por triplicado cada una de las tres réplicas de cada muestra preparadas e interpolando el área del pico de ecdisterona obtenida en la curva de calibración. Los resultados de cuantificación se muestran en la tabla 4 expresados como concentración media ± desviación estándar en porcentaje en el caso de las dos muestras en polvo y en mg ecdisterona/cápsula en el caso de la muestra producto final 2, considerando como peso de cápsula la media calculada de las 10 cápsulas homogenizadas.

Tabla 4. Concentración de ecdisterona cuantificada en cada una de las muestras.

Muestra	Contenido en ecdisterona
Proveedor 1 (lote 20201001)	96 ± 3 %
Proveedor 2 (lote RCE-210304)	99 ± 2 %
Producto final MARCA 2 (lote 44413/21)	12.5 ± 0.2 mg/cápsula

4. Certificación de calidad

Centro acreditado con Norma de Calidad EN-UNE 9001:2015, Medio Ambiente: ISO 14001:2015 e I+D+i UNE 166002:2014.



Certificado ES15/18941


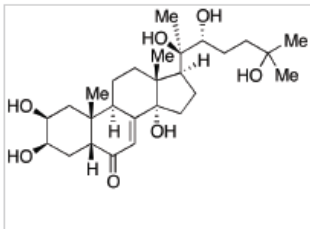


Certificado ES15/18940



Certificado ES15/18942

ANEXO 1

		CERTIFICATE OF ANALYSIS 20 Martin Ross Avenue, North York, ON, M3J 2K8, CANADA Tel: (416) 665-9696, Fax: (416) 665-4439 Email: orders@trc-canada.com Website: www.trc-canada.com		
		1. Identification		
Catalogue Number: H918750	CAS Number: 5289-74-7	Synonym: (+)-Ecdysterone; 20-Hydroxy- α -ecdysone; 20-Hydroxyecdysone; 20R-Hydroxyecdysone; 2 β ,3 β ,14 α ,20 β ,22 α ,25-Hexahydroxycholest-7-en-6-one; Commisterone; Crustecdysone; Crustecdysone; Ecdysone; Ecdysten; Ecdysterone; \square Ecdysterone; Ekdisten; Isoinokosterone; Polypodin A; Polypodin C; Polypodine A; \square Polypodine C; THE 7; Viticosterone; β -Ecdysone; β -Ecdysterone; β -Ecdysone	Molecular Formula: $C_{27}H_{44}O_7$ Molecular weight: 480.63 Source of Product: N/A Solubility: DMSO (Slightly), Methanol (Slightly)	
Product: (+)-20-Hydroxyecdysone		Lot Number: 1-AGE-142-1 Shipping Condition: This Product Is Stable To Be Shipped At Room Temperature	Purity: 98% Storage Condition: -20°C Freezer	
2. Warning				
Warning 1: Not Determined	Warning 2:	Warning 3:		
3. Analytical Information				
Tests: Appearance NMR MS HPLC Purity	Specifications: White to Off-White Solid Conforms to Structure Conforms to Structure >95%	Results: White to Off-White Solid Conforms Conforms 95.02%	Additional Information: TLC Conditions: SiO ₂ ; Dichloromethane : Methanol = 8 : 2; Visualized with UV, AMCS, and KMnO ₄ ; R _f = 0.45.	
Purity is based on the analytical results of the tests performed. NMR and Elemental Analysis (if available) may have an accuracy of $\pm 2\%$. Isotopic purity is based on mass distribution observed.				
4. Signatures				
Reviewed By Neha Khanna	Reviewed By Xhoana Gjergji	C of A Approved By Clarissa Santos	Test Date 12/18/2018	Retest Date 12/16/2022