



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**ANALISIS CUANTITATIVO DE ASARONA POR CROMATOGRAFIA
EN CAPA FINA - ESPECTROFOTOMETRIA U. V.**

T E S I S

**Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

p r e s e n t a

MARTHA GODINEZ CEDILLO



México, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O .

- I.- INTRODUCCION.
- II.- ANTECEDENTES.
- III.- PARTE EXPERIMENTAL.
- IV.- RESULTADOS.
- V.- DISCUSION DE RESULTADOS.
- VI.- CONCLUSIONES.
- VII.- BIBLIOGRAFIA.

INTRODUCCION.

I N T R O D U C C I O N .

El objetivo de éste trabajo es determinar la cantidad de Asarona contenida en Raíz de Calamus y en Corteza de Elemuy por el método de Cromatografía en capa fina-Espectrofotometría U. V.

El motivo por el cual se decidió hacer el análisis cuantitativo de Asarona es debido a la acción farmacológica principal que presenta, ya que éste compuesto presenta actividad como hipocolesterolemiante - (1).

Estudios farmacológicos reportan que la Asarona obtenida a partir del extracto hexánico del Elemuy produce una reducción substancial de los niveles de colesterol en ratas y perros; recientemente se reportó que el extracto etanólico de ésta planta es efectivo para reducir el nivel de colesterol en el suero humano. En el Sureste de México el Elemuy es muy utilizado en la medicina popular para el tratamiento de cálculos biliares (2).

El aceite esencial de la raíz de Calamus se ha utilizado desde el punto de vista médico como un relajante y espasmolítico, además de poseer propiedades hipertensivas. También se ha utilizado como un insecticida, y en tiempos más recientes se utilizaba con mucha frecuencia para dar sabor a los licores; pero la FDA prohibió el uso de Calamus (bajo cualquiera de sus formas raíz, extracto, o aceite) en los alimentos, -

pues éste producto contiene β -Asarona y como resultado de un trabajo toxicológico se vió que ese compuesto produjo cancer en el intestino de las ratas sometidas a dicho estudio (4).

Cabe mencionar que el Elemuy no contiene β -Asarona por lo que no causa cancer como el Calamus (1).

La Asarona se extrajo de la raíz de Calamus y de la Corteza de Elemuy utilizando los métodos de extracción líquido-líquido, sólido-líquido y destilación por arrastre con vapor. Parte de la Asarona así obtenida se encontraba mezclada con otros compuestos y se procedió a su identificación cualitativa y análisis cuantitativo por cromatografía en capa fina-espectrofotometría U. V.; se eligió éste método cromatográfico, ya que es un método que permite detectar e identificar compuestos en mezclas complejas utilizando cantidades muy pequeñas.

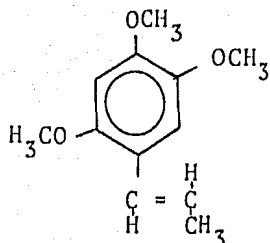
Dentro del análisis cuantitativo, uno de los métodos que en la actualidad se emplea con más frecuencia es la espectrofotometría U.V., que emplea las propiedades físicas y químicas de las sustancias para su determinación. Este método analítico fue elegido para la cuantificación de Asarona por ser un método sensible, fácil de desarrollar, reproducible y principalmente porque el tiempo en el que se realiza es corto.

De ésta forma se conjuntó la Cromatografía en Capa Fina con la Espectrofotometría U.V. para lograr el objetivo de la Tesis; utilizando además, la Cromatografía en Columna y la Cromatografía de Gases para verificar que los resultados obtenidos fueran los correctos.

ANTECEDENTES.

A S A R O N A .

(E) - 1, 2, 4-Trimetoxi-5-(1-propenil) benceno;
trans-2, 4, 5-Trimetoxi-1-propenil benceno;
 α -Asarona; Asarin; Asarum alcanfor; Asarabaca alcanfor.



Fórmula condensada: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3$.

P.M.: 208.25

% de C = 69.21; % de H = 7.74; % de O = 23.05

Se extrae de la raíz de *Asarum europaeum* L., Aristolochiaceae mediante destilación por arrastre con vapor; también se encuentra en el aceite esencial de *A. arifolium* L., Aristolochiaceae y *Acorus calamus* L. Es un sólido blanco cristalino con punto de fusión de -62 - 63°C., punto de ebullición de 296°C y $^{11}_n\text{D}=1.5719$.

Es prácticamente insoluble en agua; soluble en alcohol, éter, ácido acético glacial, tetracloruro de carbono, cloroformo, éter de petróleo (4).

La principal actividad farmacológica que presenta la Asarona es como hipocolesterolemianta, aunque también se le han atribuido otras actividades y usos a los extractos obtenidos de las plantas que la contie--nen, como se describe en los párrafos siguientes.

Guatteria gaumeri, Annonacea; llamado comunemente Yumel o Elemuy. Es una planta que no se ha estudiado a fondo, pero se sabe que crece en el Sureste de México, particularmente en Mérida, Yucatán; y que en la corteza de la planta es donde hay mayor cantidad de Asarona (1).

Se ha estudiado la fracción no polar de los extractos de corteza de Elemuy debido a la propiedad hipocolesterolemizante que presenta, encontrando que sus componentes químicos son: Asarona (en mayor cantidad), Asaraldehído, y dos propenilbencenos (en menor cantidad) identificados como trans-isoelemicina y trans-isomiristicina; concluyendo así, que la β -Asarona no se encuentra presente en el Elemuy (1,5).

El elemuy es muy utilizado en la medicina popular en el Sureste de México para el tratamiento de cálculos biliares. Recientemente se reportó que el extracto etanólico de ésta planta es efectivo para reducir el nivel de colesterol en el suero humano (2). Otros experimentos farmacológicos reportan que la Asarona obtenida a partir del extracto hexánico de Elemuy produce una reducción substancial de los niveles de colesterol en ratas y perros (1).

Acorus calamus L. Araceae; llamado comunmente Calamus o "sweet flag". Es una planta silvestre que crece por lo general a lo largo de los pantanos y en las orillas de los estanques de Norte América, Europa y Asia.

Su aceite esencial es de color amarillo paja, con olor parecido al alcanfor y sabor muy picante; es extraído de la raíz de Calamus mediante destilación por arrastre con vapor (6).

Estudios realizados sobre el aceite esencial de Calamus, reportan que su composición química varía de acuerdo al lugar de origen de la planta; pero en general se encontró que su principal componente es 2,4,5-trimetoxi-1-propenil benceno, que puede estar en dos formas isoméricas: cis (β -Asarona) y trans (Asarona). La Asarona es un sólido blanco cristalino y la β -Asarona es un líquido amarillo con densidad específica de 1.0933. Ambos isómeros son fácilmente soluble en etanol y disolvente no polares, y prácticamente insolubles en agua (7).

La β -Asarona es el componente que se encuentra en mayor cantidad en el Calamus (7), encontrándose también, aunque en menor cantidad otros hidrocarburos aromáticos semejantes a la Asarona como son: Eugenol, Metileugenol y Pinenos (6,7,8,9).

El aceite esencial de la raíz de Calamus se utilizó en la India y lejano Este como insecticida, vermicífugo y en la preparación de perfumes (6).

Se ha utilizado desde el punto de vista médico como relajante y espasmolítico, además de poseer por propiedades hipertensivas; también se llegó a utilizar en la preparación de drogas como carminativo y antiirritante de uso tópico (3, 10). En los últimos tiempos se utilizaba con mucha frecuencia para dar sabor a los alimentos y licores, debido a las propiedades organolépticas que presenta (3,6).

La FDA realizó un estudio durante dos años -- del comportamiento de ratas, a las cuales se les administró en sus alimentos aceite esencial de Calamus perteneciente a la variedad Jammu. La sustancia en estudio produjo un número significativo de tumores malignos en la superficie del intestino delgado de las ratas, lo cual se le atribuyó a la presencia de β -Asarona. Este estudio no es válido para otras variedades de aceite, - pero hasta que no se demuestre que la capacidad carcinogénica del aceite de Calamus Jammu está ausente en --- otras variedades, la FDA prohibió el uso de Calamus bajo cualquiera de sus formas (raíz, aceite o extracto) - en alimentos, medicamentos y cosméticos (3).

ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION.

Todos los átomos y moléculas son capaces de absorber energía, la cual se puede proporcionar en forma de radiación electromagnética (luz). El tipo y cantidad de radiación absorbida por una molécula guarda relación con la estructura de la molécula; asimismo, la cantidad de radiación absorbida está sujeta el número de moléculas que interaccionan con la radiación. El estudio de éstas dependencias se conoce como Espectroscopía de Absorción (12,13).

Toda radiación electromagnética es, de modo fundamental, similar, con independencia de su longitud de onda, pero se han designado distintos nombres a la radiación de diferentes márgenes de frecuencia. El intervalo completo de radiaciones de denomina "ESPECTRO ELECTROMAGNETICO", y se ha caracterizado convencionalmente como se indica en la tabla 1. (12,14).

LEY DE BEER.

El análisis espectroscópico cuantitativo se basa en la relación entre la cantidad de luz absorbida y la cantidad de sustancia absorbente (12).

El poder de una emisión radiante disminuye en relación a la distancia recorrida a través de un medio absorbente. También disminuye en relación a la concentración de moléculas absorbentes o de iones encontrados en ese medio. Esos dos factores determinan la proporción de la energía total incidente que emerge, en una relación conocida como LEY DE BEER; que es

TABLA 1

ESPECTRO ELECTROMAGNETICO.

Regiones de espectro	Longitudes de onda aproximadas Intervalos (cm)*
Rayos cósmicos	10^{-12} — 10^{-11}
Rayos gamma	10^{-11} — 10^{-8}
Rayos X	10^{-8} — 10^{-6}
Ultravioleta	10^{-6} — 10^{-5}
Visible	10^{-5} — 10^{-4}
Infrarrojo	10^{-4} — 10^{-2}
Microondas	10^{-2} — 10
Frecuencia de radio	10 — 10^8

* Redondeados los ordenes de magnitud.

la ley fundamental que rige a la espectroscopía de absorción, y se representa de la siguiente forma:

$$\log\left(\frac{1}{T}\right) = A = abc$$

en donde T, es transmitancia; A, absorbancia; a, absor^utividad; b, longitud de la celda y c, concentraci^on - (15, 16).

Por lo general la representaci^on de la ley de Beer (absorbancia en funci^on de la concentraci^on) es lineal y la recta pasa por el origen. Pero en algunas ocasiones se observa curvatura en dicha representaci^on; entonces se dice que hay una desviaci^on de la ley de Beer.

Existen desviaciones reales y aparentes de la ley de Beer; las desviaciones reales de la ley de Beer se presentan s^olo en sistemas en los que la concentraci^on de las especies absorbentes es tan alta que el índice de refracci^on de la radiaci^on varía.

Las desviaciones aparentes son más com^unes que las desviaciones reales; y pueden ser de origen quí^umico, físic^o o instrumental (12,17,18).

ESPECTROFOTOMETROS.

Los instrumentos utilizados en la medida de un espectro se denomina espectroscopio o espectrómetro; existen varios tipos de éstos instrumentos, como son: espectrógrafos, espectrofotómetros, colorímetros. La diferencia entre ellos es básicamente la forma de detec

tar o medir la intensidad de luz en cada uno; por ejemplo el espectrofotómetro (que fué el instrumento que se utilizó en éste trabajo), mide la intensidad de la luz con una célula fotoeléctrica (17).

Todos los espectrofotómetros se componen básicamente de los siguientes elementos: fuente de luz, selector de frecuencia, control de intensidad, portamuestra, detector y medidor o registrador. Los materiales y los detalles de construcción dependen del margen de longitud de onda que se va a estudiar -- (19, 20).

C R O M A T O G R A F I A .

La cromatografía es una técnica de separación basada en la diferente velocidad con que se mueven los solutos a través de un medio estacionario mediante el flujo de un disolvente llamado eluente (21).

Los mecanismos de separación que intervienen en la cromatografía son: partición, adsorción, intercambio iónico y exclusión molecular (12,21,22).

CROMATOGRAFIA DE GASES.

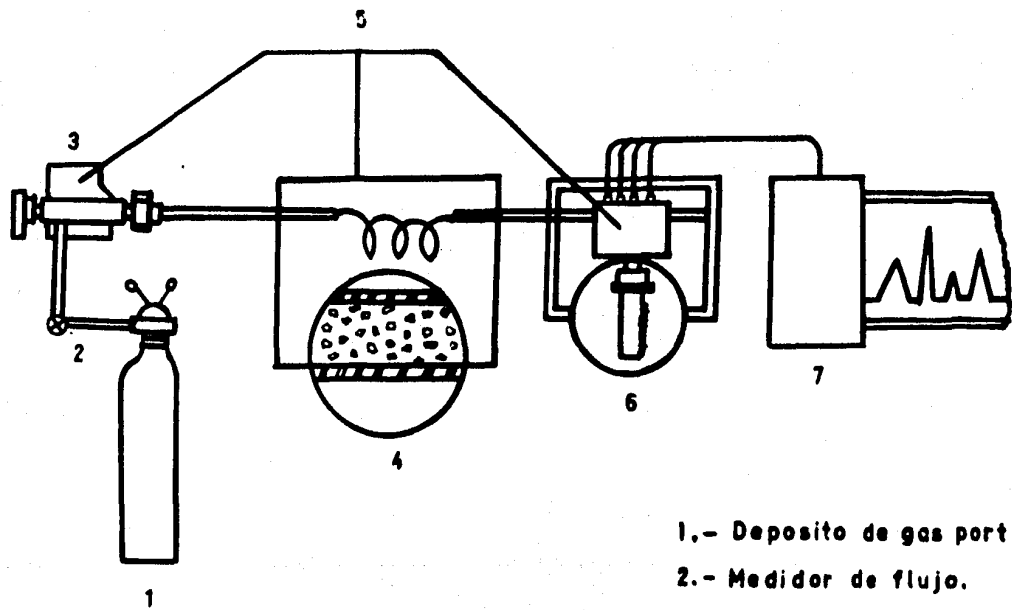
En la cromatografía de gases la fase móvil es un gas y la estacionaria puede ser un líquido o un sólido.

Cuando la fase estacionaria es un líquido, se le llama cromatografía gas-líquido (CGL); y el mecanismo de separación es por partición (23, 24).

La cromatografía de gases es una técnica para separar sustancias volátiles por medio del paso de una corriente de gas inerte sobre la fase estacionaria, así los componentes a separarse son llevados a través de la columna por el gas inerte, al que se le llama gas portador. En estas condiciones la muestra se reparte entre el gas portador y el disolvente no volátil, o sea la fase estacionaria. El disolvente no volátil selectivamente retiene los componentes de la muestra de acuerdo a su coeficiente de distribución hasta que éstos forman bandas separadas en el gas portador, las cuales salen de la columna en la corriente del gas y se registran como una función de tiempo por el detector; a la inscripción así obtenida, se le llama cromatograma (25, 26).

En condiciones establecidas en cada proceso analítico la determinación cuantitativa se lleva a cabo sobre el cromatograma obtenido, calculando el área bajo la curva de los picos; ya que para aspectos cuantitativos, el área bajo la curva del pico es directamente proporcional a la concentración de las moléculas que están proporcionando ese pico (27).

Las partes de un cromatógrafo de gases básicamente son las siguientes: 1) depósito de gas portador, 2) medidor de flujo, 3) entrada de la muestra, 4) columna, 5) horno, 6) detector, 7) registrador. En la figura 1, se muestra un diagrama de los componentes del cromatógrafo de gases (17, 26, 27).



- 1.- Deposito de gas portador.
- 2.- Medidor de flujo.
- 3.- Entrada de muestra.
- 4.- Columna.
- 5.- Horno.
- 6.- Detector.
- 7.- Registrador.

FIGURA 1.

PARTE EXPERIMENTAL.

M A T E R I A L E S .

Los espectros de Ultravioleta (U.V.) para el control del compuesto fueron determinados en un Espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 202, utilizando etanol como disolvente.

La cuantificación de Asarona se llevó a cabo en un Espectrofotómetro U.V. Varian Techtron modelo 634, empleando como disolvente etanol.

Los espectros de Infrarrojo (I.R.) se hicieron en un Espectrofotómetro Perkin-Elmer 599 B, en pastilla de bromuro de potasio.

Los espectros de RMP se hicieron en un Espectrofotómetro Varian EM 390 usando CDCl_3 como disolvente y tetrametilsilano como referencia.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato BUCHI-SMP 20.

Los cromatogramas se obtuvieron en un Cromatógrafo de Gases Varian modelo 3700; y las condiciones de trabajo se informan en la parte experimental correspondiente.

S U S T A N C I A S .

- Asarona estándar.
- Raíz de CALAMUS.
- Corteza de ELEMUY.
- Behenato de metilo (estándar interno).

R E A C T I V O S Y S O L V E N T E S .

- Hexano.
- Benceno.
- Cloroformo.-
- Acetato de etilo.
- Etanol.
- Agua.
- Para Cromatografía en Capa Fina:
 - Sílica gel GF₂₅₄ (MERCK).
- Para Cromatografía en Columna.
 - Sílica gel 60
 - tamaño de partícula 0.063-0.2 mm.
 - mallá 70-230 (MERCK).
- Para Cromatografía de Gases:
 - Soporte sólido: CHROMOSORB W A/W
80/100
 - Varian Aerograph.
 - Fase líquida: FFAP al 10% en cloroformo.

M E T O D O S .

Los procedimientos empleados para la extracción de Asarona fueron:

- Destilación por arrastre con vapor.
- Extracción sólido-líquido.
- Extracción líquido-líquido.

NOTA: El aparato utilizado para la destilación por arrastre con vapor es una modificación en macro del aparato Karlsruher, que diseñó E. STAHL, y que está -- aceptado por la Farmacopea Europea para la determinación cuantitativa de aceites esenciales u otros - compuestos posibles de destilar bajo éste principio.

Los métodos cromatográficos empleados para la cuantificación de Asarona fueron:

- Cromatografía en capa fina.
- Cromatografía en columna.
- Cromatografía de gases.

Las placas cromatograficas fueron de vidrio, de 20- x 20 cm, cubiertas con una capa de 0.25 mm de sílica gel-GF₂₅₄.

Para el control del compuesto se usó cromatografía en capa fina, los reveladores empleados fueron yodo y luz ultravioleta (28).

El sistema de disolventes para eluir las placas y - las columnas en todos los casos fue: Benceno-Acetoato de - etilo [9:1] .

P R O C E D I M I E N T O S .

I.- EXTRACCION DE ASARONA.

IA.- EXTRACCION DE ASARONA CONTENIDA EN RAIZ DE
C A L A M U S .

35 g. de raíz de Calamus fueron molidos y extraídos durante 72 hrs., mediante destilación por arrastre con vapor*, utilizando como disolvente hexano.

De la extracción se obtuvieron tres fracciones:

- 1.- Extracto Hexánico.
- 2.- Extracto Acuoso.
- 3.- Residuo Sólido.

1.- Extracto Hexánico. - Se concentró obteniendo 14.5 mg. de extracto total, el cual NO contiene Asarona.

2.- Extracto Acuoso. - Se extrajo con acetato de etilo mediante embudos de separación, y se concentró obteniendo 50 mg. de extracto total; el cual está formado por una mezcla de compuestos entre los cuales, la Asarona está en mínima cantidad.

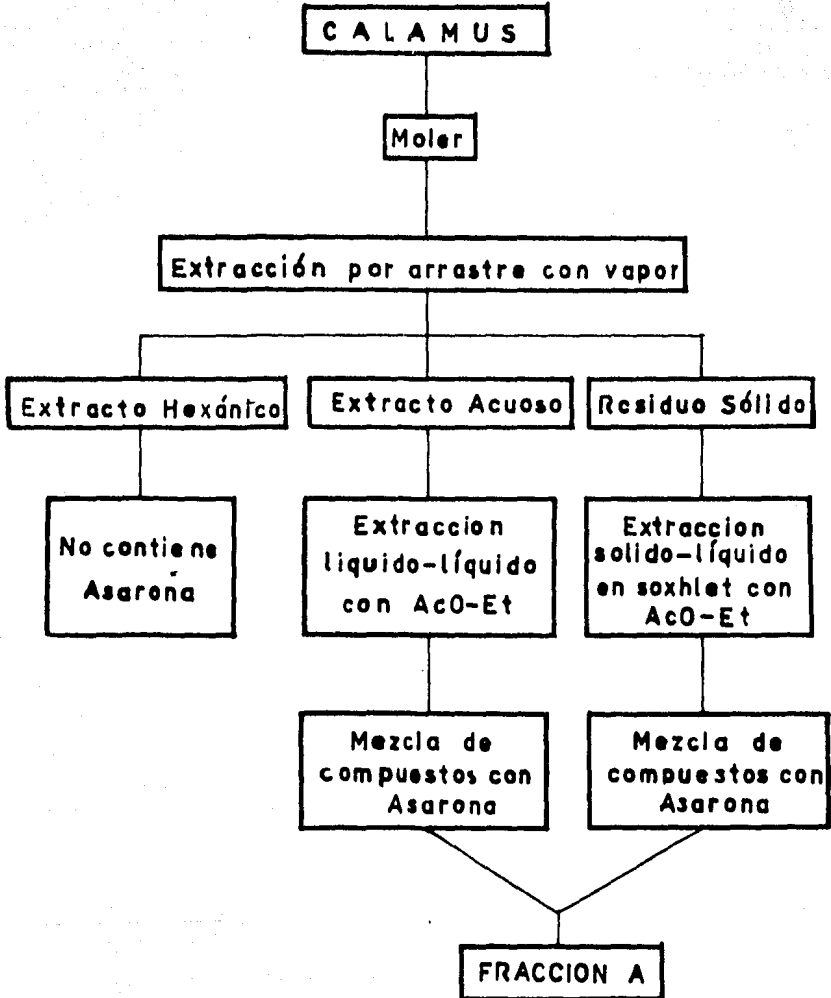
3.- Residuo Sólido. - 4.3 g de raíz de Calamus fueron extraídos durante 10 hrs. con acetato de etilo en Soxhlet; se concentró el producto obteniendo 826.3 mg. de extracto total, que contiene Asarona junto con una mezcla de compuestos.

* Ver página # 16 .

Mediante placas cromatográficas se vió que la fracción obtenida del Extracto Acuoso y el extracto obtenido del Residuo Sólido contenían los mismos compuestos, por lo que se reunieron y se les llamó F R A C C I O N A .

NOTA: El procedimiento de la extracción de Asarona -- contenida en raíz de Calamus está resumida en el diagrama No. 1 (página 19).

DIAGRAMA No. 1



I B.- EXTRACCION DE ASARONA CONTENIDA EN CORTEZA DE
E L E M U Y .

658.8 g de corteza de Elemuy fueron molidos y --
extraídos mediante destilación por arrastre con vapor*, ---
usando como disolvente hexano.

La destilación se realizó durante 20 hrs. al cabo de las --
cuales se cambió el hexano por acetato de etilo, y se con--
tinuó la destilación durante 48 hrs. más.

De la extracción se obtuvieron cuatro fraccio--
nes:

- 1.- Extracto Hexánico.
- 2.- Extracto AcO-Et.
- 3.- Extracto Acuoso.
- 4.- Residuo Sólido.

1.- Extracto Hexánico.- Después de eliminar el disol-
vente se obtiene un líquido de consistencia oleosa y olor -
característico, del cual cristalizó Asarona. El sólido ob-
tenido se recrystalizó con hexano, obteniendo un total de-
852.2 mg de Asarona pura a la que se le tomó punto de fu---
sión que fue de 57-58°C, y se le hizo Espectroscopía de --
U.V., I.R. y RMP: en espectroscopía de U.V. presenta tres -
máximos de absorción: uno a 225 nm, otro a 262 nm, y el ter-
cero a 318 nm. En espectroscopía de I.R. presenta las si--
guientes bandas principales: 2820 cm^{-1} (W) grupo metoxilo;-
1610 cm^{-1} (W) doble enlace unido a un benceno; 1590 cm^{-1} --
(W) anillo aromático (muy sustituido); 1200-1220 (S) enlace
carbóno-oxígeno; 1040-1080 (S) grupo éter.

* Ver página # 16.

En espectroscopía de RMP usando como referencia tetrametil silano $(\text{CH}_3)_4\text{-SiH}$ y como disolvente CDCl_3 se obtuvieron -- las siguientes bandas: un doblete con señal centrada a 1.9 ppm que integra para 3 hidrógenos del metilo vinílico (f); tres singuletes con señal centrada a 3.83 ppm que integra para 9 hidrógenos de los metóxidos (c); una señal a 6.48 ppm que integra para 1 hidrógeno aromático (b); una señal a 6.92 ppm que integra para 1 hidrógeno aromático (a); una señal centrada a 6.05 ppm que representa un cuadruplete -- por interacción de (e) con (f) y un doblete por interac -- ción de (c) con (d), que integra para un hidrógeno viníli -- co (e); un doblete con señal centrada a 6.64 ppm por inte -- racción de (d) con (e), que integra para un hidrógeno viní -- lico (d).

Los espectros antes descritos se compararon con los de Asa rona reportados en la literatura (29,30); viendo que son -- iguales a ellos. Los espectros obtenidos se reportan en -- las páginas 24,25 y 26.

2.- Extracto AcO-Et.-Se destiló el disolvente obte -- niendo un líquido con las mismas características del líqui -- do antes mencionado, del cual cristalizó Asarona. El sólido se recristalizó con acetato de etilo, obteniéndose 2.40 g de ASARONA pura a la que se le tomó punto de fusión que -- fué de 57-58°C., y se le hizo espectroscopía de U.V., I.R. y RMP; en donde presentó los mismos máximos de absorción -- y las mismas bandas que en los espectros descritos ante -- riormente para la Asarona obtenida del extracto hexánico.

3.- Extracto Acuoso.-Se sometió a una extracción lí -- quido-líquido con acetato de etilo durante 72 hrs. al cabo

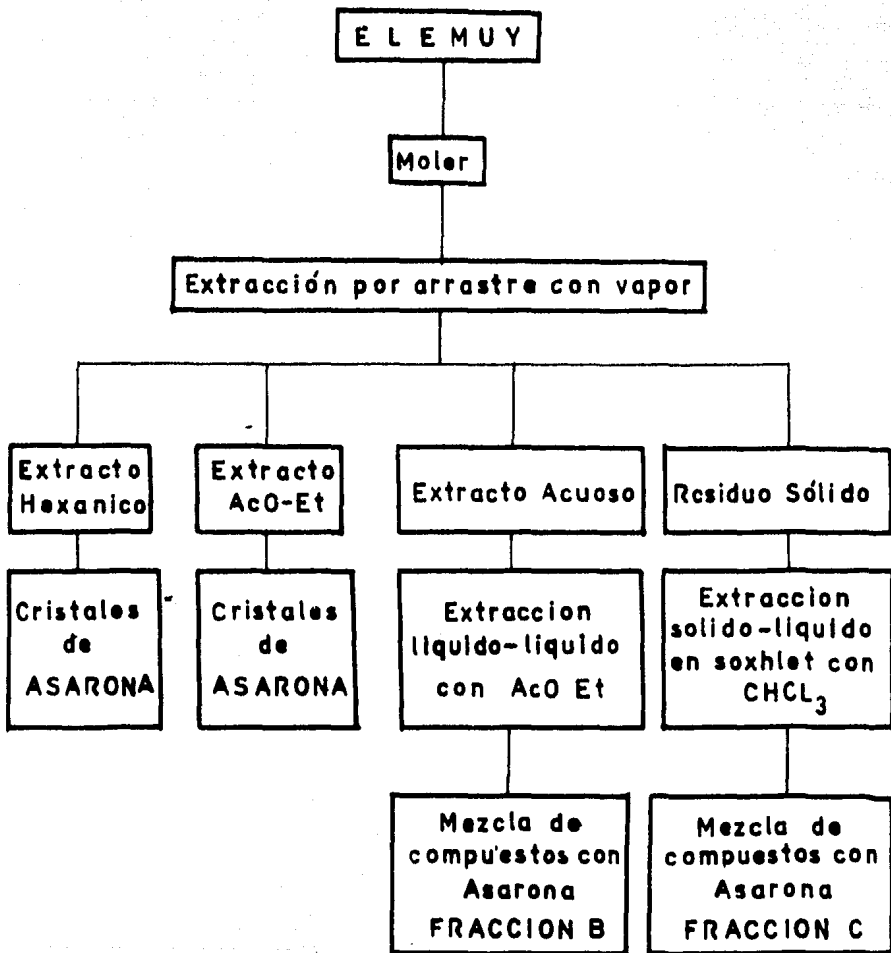
de éste tiempo se cambió el acetato de etilo y se continuó la extracción en las mismas condiciones por 19 hrs. más -- dando así por finalizada la extracción.

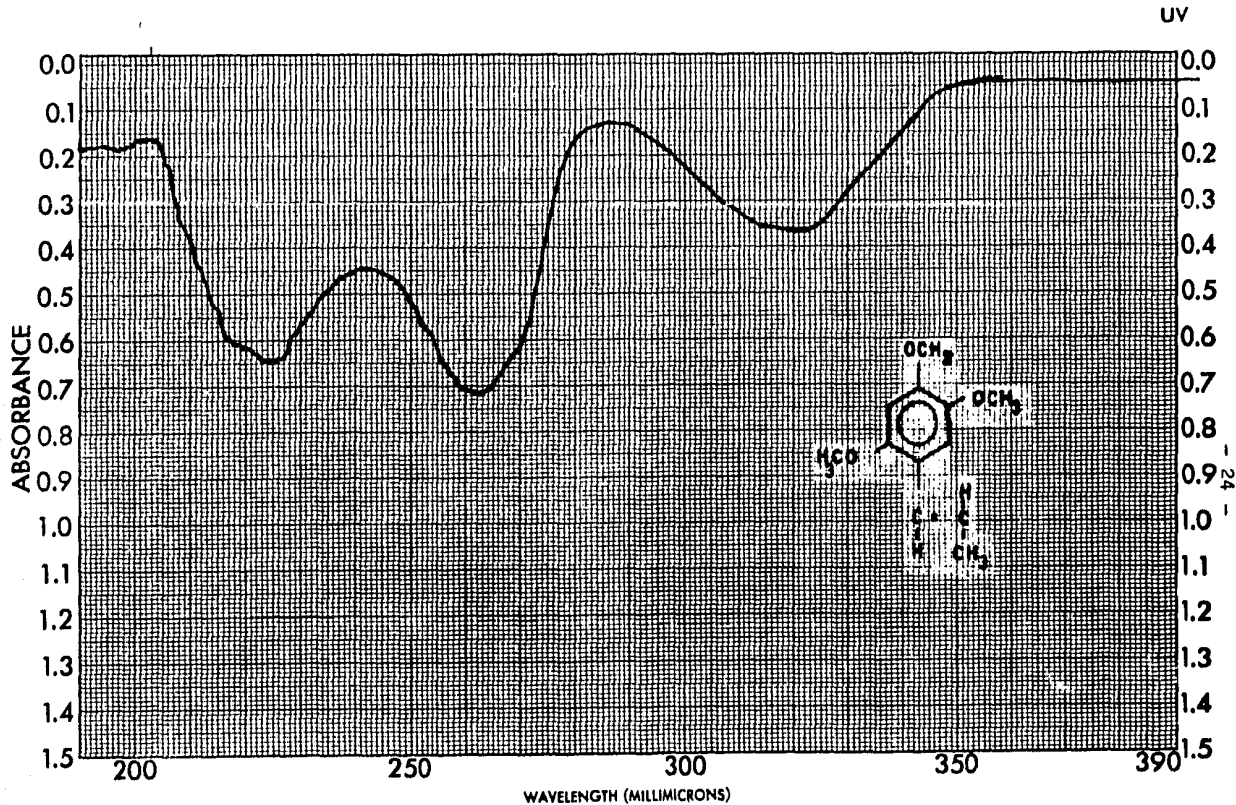
Se reunieron los dos extractos y se eliminó el disolvente-- obteniendo 928 mg de extracto total, que contiene Asarona-- mezclada con otros compuestos, a dicho extracto se le llamó F R A C C I O N B .

4.- Residuo Sólido .- 332.89 g de residuo sólido se-- extrajeron en Soxhlet con cloroformo durante 50 hrs. Se -- concentró el extracto obteniendo 3.374 g de extracto total el cual contiene Asarona con varios compuestos. A dicho -- extracto se le llamó F R A C C I O N C .

NOTA: El procedimiento de la extracción de Asarona -- contenida en corteza de Elemuy está resumida en el diagra-- ma No. 2 (página 23).

DIAGRAMA No. 2

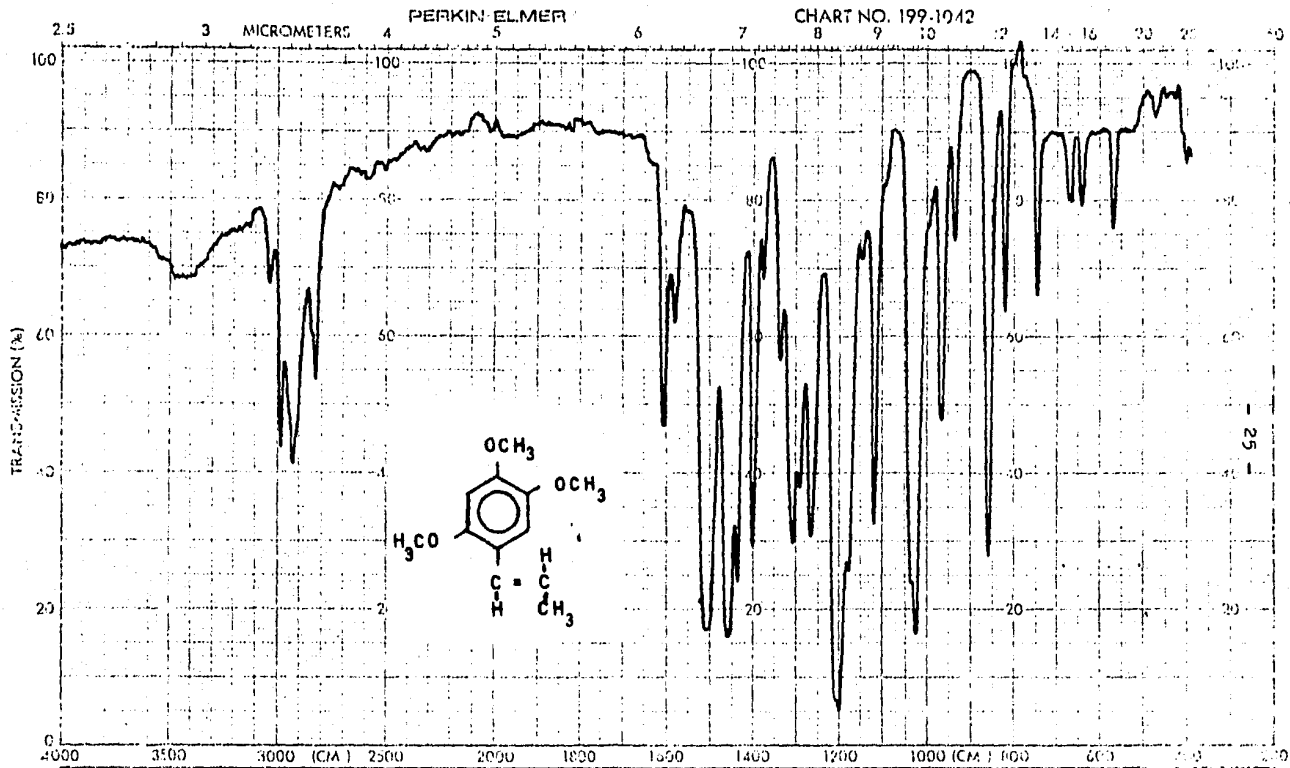




SAMPLE <i>Ascorbic</i>	CURVE NO. <i>5102</i>	SCAN SPEED <i>fast</i>	OPERATOR <i>Chela</i>
ORIGIN <i>Martha Godinez C.</i>	CONC.	SLIT <i>85</i>	DATE <i>9/11/83</i>
SOLVENT <i>H₂O/H</i>	CELL PATH <i>1cm</i>	REMARKS	
	REFERENCE <i>H₂O/H</i>		

PART NO. 202-1311

PERKIN-ELMER



ABSCISSA EXPANSION	ORDINATE EXPANSION ABS REMARKS <i>isolated</i>	SCAN TIME MULTIPLIER SPE PROGRAM SC VENT CONCENTRATION	REP SCAN TIME SCALE OPERATOR CELL PATH REFERENCE
<i>12</i> <i>N¹</i> <i>KBS</i>	<i>9/11/83</i>	<i>12</i> <i>N¹</i> <i>KBS</i>	<i>Clair</i> <i>air</i>

SAMPLE *Acryna No 1*
 OPERATOR *Colin*

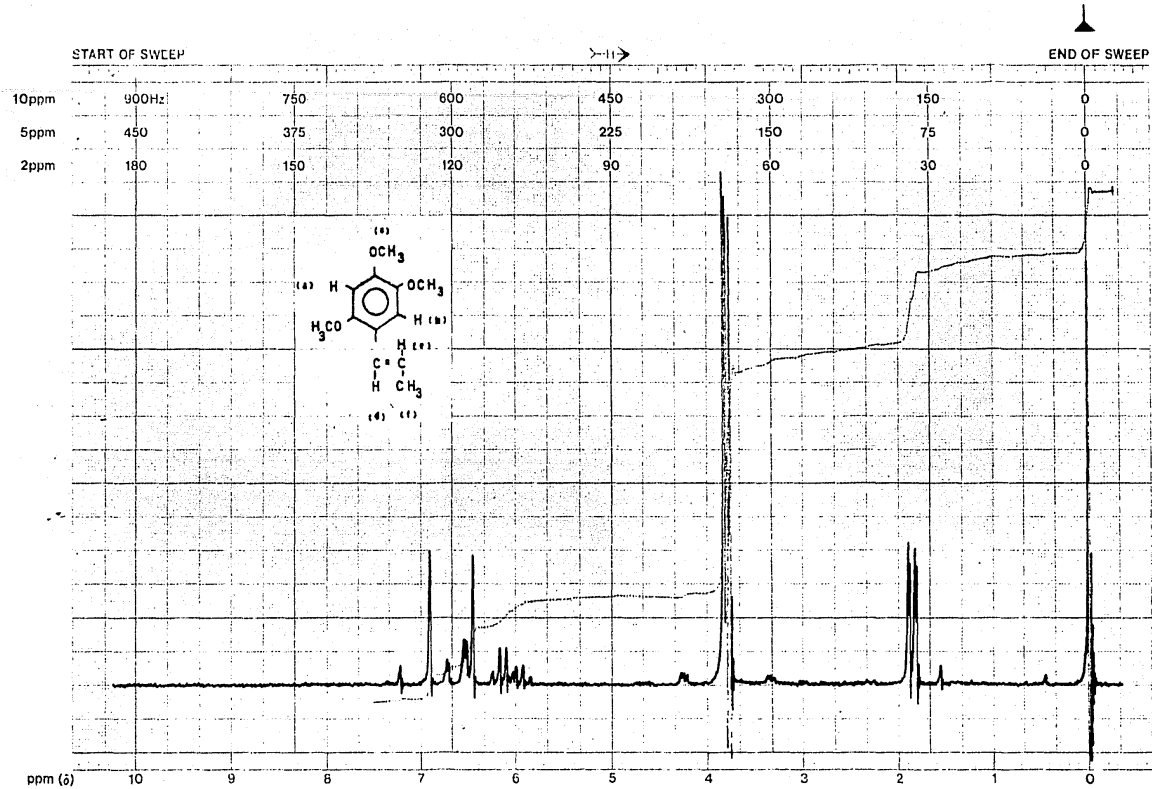
PART NO. 990203 02

PRINTED IN U.S.A.



varian instrument division

palo alto, california



LOCK POS. ppm SPECTRUM AMPL. 8 X 100 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS H SAMPLE: Dr Reyes OPERATOR Sanjiva
 LOCK POWER mG FILTER 0.05 sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. THS DATE 21-11-84
 DECOUPLE POS. ppm DECOUPLING POWER mG RF POWER 0.05 mG END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. A °C SOLVENT: CDCl3 SPECTRUM NO. 8114

EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER

II.- CUANTIFICACION DE ASARONA.

1.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA-ESPECTROFOTOMETRIA U.V.

a) CURVA ESTANDAR.- Se prepararon soluciones de 1,2,4,8, y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Asarona estándar para medir sus absorbancias a 260 nm usando etanol como disolvente (31, - 32); se repitió 5 veces la curva estándar y los resultados se trataron estadísticamente, obteniendo así una curva estándar corregida (concentración de Asarona Vs. Absorbancias).

Dicha gráfica se usó para determinar concentraciones de Asarona en soluciones problema. Los cálculos y resultados se reportan en las páginas 34, 35 y 36:

b) CUANTIFICACION DE ASARONA.- La fracción A que contiene Asarona se separó por cromatografía en capa fina, para separar 50 mg de mezcla se usaron placas de sílica gel (GF₂₅₄ MERCK), utilizando como fase móvil el sistema benceno-acetato de etilo [9:1] y como revelador luz U.V. La aplicación de la muestra se hizo en forma lineal y la banda correspondiente a Asarona se recuperó y se extrajo con cloroformo, después de eliminar el disolvente calentándolo a baño maría se obtuvo Asarona.

La Asarona así obtenida se llevó a un volumen de 10 ml, de aquí se tomó una alícuota de 0.5 ml y se llevó a 10 ml; ésta solución se usó para leer su absorbancia a 260 nm y fue de 0.780. Esta lectura se interpoló en la gráfica de la curva estándar antes descrita, obteniendo como resultado 11.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Asarona que multiplicada por el factor de dilución da como resultado 2.26 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Asarona contenida en los 50 mg de la Fracción A analizada.

El mismo procedimiento se siguió para la separación y cuantificación de Asarona en las Fracciones B y C; obteniendo como resultados en la Fracción B una absorbancia de 0.564, la cual corresponde a 8.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Asarona, que al multiplicar por el factor de dilución da 1.78 mg/ml de Asarona contenida en los 50 mg de la Fracción B analizada.

En la Fracción C, la Asarona separada por cromatografía en capa fina se llevó a 10 ml, de aquí se tomó -- una alícuota de 0.2 ml y se llevó a 10 ml, a ésta solución se le determinó su absorbancia a 260 nm y fué de 0.36 que corresponde a 5.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Asarona, que multiplicada por el factor de dilución da 2.75 mg/ml de Asarona contenida en los 50 mg de la Fracción C analizada.

Los resultados se reportan en la página 39.

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA-ESPECTROFOTOMETRIA U.V.

a) CURVA ESTANDAR.- Se utilizó la misma curva estándar que para la cuantificación de Asarona por Cromatografía en Capa fina-Espectrofotometría U.V.

b) CUANTIFICACION DE ASARONA.- Otro método que se utilizó para la separación de Asarona presente en las Fracciones A, B, y C fué el método de cromatografía en columna; en el cual 150 mg de FRACCION A se pasaron a través de una columna de cromatografía empacada con 15 g de sílica gel ---- (0.063-0.2 MERCK), usando una mezcla de benceno-acetato de etilo [9:1] como eluyente, obteniendo así Asarona.

La Asarona obtenida anteriormente se llevó a 10 ml, -- de aquí se tomó una alícuota de 0.1 ml y se llevó a 10 ml; -- a ésta solución se le determinó su absorbancia a 260 nm la cual fué de 0.390 y se interpoló en la curva estándar, obteniendo como resultado 6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Asarona que al ser --- multiplicada por el factor de dilución da 6 mg/ml de Asarona presente en los 150 mg de Fracción A separada por cromatografía en columna.

El procedimiento anterior se siguió para la separación y cuantificación de Asarona en las Fracciones B y C, obteniendo como resultados:

- FRACCION B, una absorbancia de 0.294 que interpolada en -- la curva estandar da 4.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Asarona y multiplicada -- por el factor de dilución da 4.4 mg/ml de Asarona en los -- 150 mg. de Fracción B.

FRACCION C.- Absorbancia igual a 0.450 que corresponde a 70.0 $\mu\text{g/ml}$ de Asarona, que multiplicada por el factor de dilución da 7.0 mg/ml de Asarona contenida en los 150 - mg de Fracción C.

Los resultados están resumidos en la tabla de la página -- 41.

2.- CROMATOGRAFIA DE GASES.

El trabajo se inició estableciendo las condiciones adecuadas para obtener los mejores resultados, en un cromatógrafo de gases Varian modelo 3700.

Teniendo como base los datos bibliográficos --- (7,8,9,10,11), y después de haber probado varias condiciones de trabajo, se procedió a proponer el método analítico en las siguientes condiciones:

- Columna: Vidrio
longitud: 5 pies.
diámetro 1/4 de pulgada.
- Soporte: Chromosorb W A/W
malla 80/100
- Fase estacionaria: FFAP
concentración: 10% en cloroformo.
- Gas acarreador: Nitrógeno.
flujo: 22 ml/min.
- Temperatura: Isotérmica.
Columna: 220°C
Inyector: 250°C
Detector: 250°C
- Detector: Ionización de flama.

Para la cuantificación de Asarona por cromatografía de gases se emplearon dos métodos:

- a) Método de la Curva Estándar.
- b) Método de Estandarización Interna.

a) METODO DE CURVA ESTANDAR.

Para la curva estándar se hicieron soluciones de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, y 1.0 mg/ml -- de Asarona estándar en cloroformo, se inyectó en el cromatógrafo de gases 1 μ l de cada una de ellas, en las condiciones antes mencionadas.

Para aspectos cuantitativos el área bajo la curva del pico es directamente proporcional a la concentración de las moléculas que están proporcionando ese pico, por lo que se construyó la curva graficando concentración de Asarona Vs. área bajo la curva; y se usará para determinar concentraciones de Asarona en las soluciones problema. Los resultados se reportan en la página 41.

Para la cuantificación de Asarona en la FRACCION A se preparó una solución de 1 mg/ml y se hizo el cromatograma con 2.5 μ l de ésta solución; por el tiempo de retención se identificó el pico correspondiente a Asarona; el valor del área bajo la curva de éste, se interpoló en la curva estándar determinando así la concentración de Asarona -- contenida en la Fracción A.

Para la cuantificación de Asarona en las fracciones B y C se siguió el mismo procedimiento que en la Fracción A. Los resultados se reportan en la página 43.

b) METODO DE ESTANDARIZACION INTERNA

Después de haber probado varios compuestos, se utilizó behenato de metilo como estándar interno (7).

El procedimiento que se siguió es el siguiente: a 100-mg de la FRACCION A se le añadieron 10 mg de behenato de metilo y se aforó a 100 ml con cloroformo obteniendo así, una solución "problema-patrón" (7). Se hizo el cromatograma inyectando 2 μ l de la solución en las condiciones de trabajo mencionadas. Se determinaron las áreas bajo la curva de cada pico, y se hicieron los cálculos correspondientes para obtener concentración de Asarona presente en la fracción A, en relación al estándar interno (33).

Las FRACCIONES B y C fueron tratadas de igual forma para determinar concentración de Asarona en cada una de ellas. Los cálculos y resultados se reportan en las páginas 48 y 49.

RESULTADOS .

1.- ESPECTROFOTOMETRIA U. V.

a) CURVA ESTANDAR.

Concentración Ag/ml	Absorbancia a 260 nm
1.0	0.115
2.0	0.162
4.0	0.248
8.0	0.529
10.0	0.681

Los datos de absorbancias que aquí se reportan, son el promedio de las 5 determinaciones que se hicieron para cada una de las concentraciones, estos datos fueron ajustados por mínimos cuadrados (34,35) como se indica a continuación obteniendo la siguiente ecuación:

$$Y = 0.06X + 0.03$$

$$m = \frac{\sum_{x=1}^n X_i Y_i - \left(\sum_{x=1}^n X_i \right) \left(\sum_{x=1}^n Y_i \right)}{\sum_{x=1}^n X_i^2 - \left(\sum_{x=1}^n X_i \right)^2}$$

donde:

$$n = 5; \quad \sum_{x=1}^n X_i Y_i = 12.478;$$

$$\sum_{x=1}^n Y_i = 1.735; \quad \sum_{x=1}^n X_i^2 = 185; \quad \sum_{x=1}^n X_i = 25$$

por lo que:

$$m = \frac{5(12.478) - (25)(1.735)}{5(185) - (25)^2} \quad m = 0.06$$

$$Y = mX + b$$

donde:

$$m = 0.06; \quad \bar{X} = 5; \quad \bar{Y} = 0.347$$

Por lo que:

$$0.347 = 0.06(5) + b$$

$$\underline{b = 0.03}$$

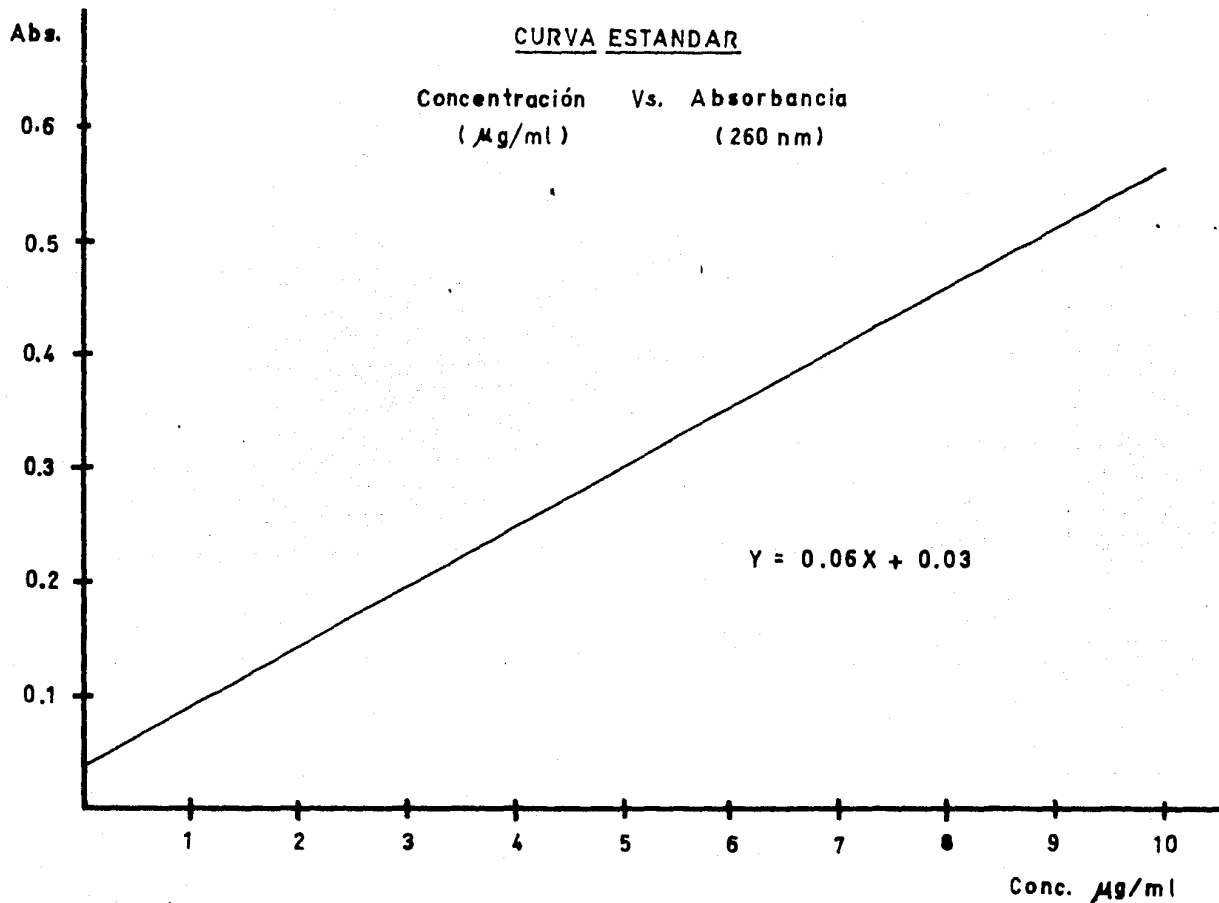
Obteniendo así la ecuación:

$$Y = 0.06X + 0.03$$

Con un coeficiente de correlación de 0.995

CURVA ESTANDAR

Concentración Vs. Absorbancia
($\mu\text{g/ml}$) (260 nm)



b) REPRODUCTIBILIDAD DE LA SEPARACION DE ASARONA POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Para demostrar que el método de separación de Asarona por cromatografía en capa fina tiene una buena reproductibilidad se hizo lo siguiente:

Se aplicaron linealmente 2 mg de Asarona estándar en una placa cromatográfica, se eluyó con una mezcla de benceno-acetato de etilo 9:1, y se reveló con luz UV; la banda correspondiente a Asarona se recuperó de la placa y se extrajo con cloroformo, el que se evaporó posteriormente calentando en baño maría. La Asarona así obtenida se llevó a un volumen de 10 ml del cual se tomó una alícuota de 0.5 ml y luego se llevó a 10 ml; a esta solución se le determinó su absorbancia a 260 nm e interpolándola en la curva estándar se calculó la concentración de Asarona en la solución; a esto se le llamó Concentración de Asarona obtenida ($\mu\text{g/ml}$).

La concentración de Asarona obtenida ($\mu\text{g/ml}$) se multiplicó por 200 que es el factor de dilución, obteniendo así Asarona total recuperada de la placa en mg/ml.

El procedimiento anterior se hizo 3 veces más en las mismas condiciones obteniendo los siguientes resultados:

Peso de Asarona estándar aplicada en cada placa mg	Absorbancia a 260 nm	Concen. de Asarona obtenida $\mu\text{g/ml}$	Factor de dilución	ASARONA total recuperada de cada placa. mg/ml
2	0.560	8.8	200	1.76
2	0.540	8.5	200	1.76
2	0.504	7.9	200	1.58
2	0.537	8.4	200	1.68

Los resultados se trataron estadísticamente --- (34, 35) como se muestra a continuación, encontrando que la reproductibilidad del método bajo las condiciones en que se trabajó, tiene un coeficiente de variación de 4.3%

$$\text{Coeficiente de variación} = \frac{S}{\bar{X}}$$

donde:

S = Desviación estándar.

\bar{X} = Media aritmética.

$$S = \sqrt{\frac{1}{n - 1} (\sum Xi - \bar{X})^2}$$

donde:

n = 4; Xi = absorbancia a 260 nm;

X = 0.535 = promedio de absorbancias a 260 nm.

Sustituyendo los datos obtenidos, en las fórmulas anteriores se tiene:

$$S = \sqrt{\frac{1}{4-1} (0.560-0.535)^2 + (0.540-0.535)^2 + (0.505-0.535)^2 + (0.537-0.535)^2}$$

$$S = 0.023202$$

$$\text{C.V.} = \frac{0.023202}{0.535} \times 100$$

$$\text{C.V.} = \underline{4.3 \%}$$

c) CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA-ESPECTROFOTOMETRIA U.V.

Las absorbancias que aquí se reportan corresponden a las de las soluciones hechas a partir de la Asarona separada por cromatografía en capa fina, estas absorbancias se interpolaron en la curva estándar obteniendo la concentración de Asarona en cada una de ellas; a ésta concentración se le llamó Concentración de Asarona obtenida $\mu\text{g/ml}$.

La Asarona contenida en los 50 mg de la muestra aplicada (mg/ml) para cada una de las fracciones, se calculó multiplicando la concentración de Asarona obtenida ($\mu\text{g/ml}$) por el factor de dilución.

FRACCION	Peso de muestra mg	Absorbancia a 260 nm	Concen. de Asarona obtenida $\mu\text{g/ml}$	Factor de dilución	Asarona contenida en los 50 mg de muestra aplicada mg/ml
A	50	0.708	11.3	200	2.26
B	50	0.564	8.9	200	1.78
C	50	0.360	5.5	500	2.75

NOTA: El procedimiento de cromatografía en capa fina-espectrofotometría U.V., se explicó detalladamente en las páginas 27 y 28; aquí sólo se reportan los resultados.

d) CROMATOGRAFIA EN COLUMNA-ESPECTROFOTOMETRIA U.V.

De la Asarona separada por cromatografía en columna se hicieron soluciones, a las que se les determinaron sus absorbancias a 260 nm interpolándolas en la curva estándar para determinar la concentración de Asarona en cada una de ellas; a ésta concentración se le llamó Concentración de Asarona obtenida ($\mu\text{g/ml}$).

La Asarona contenida en los 150 mg de muestra aplicada para cada una de las fracciones, se calculó multiplicando la concentración de Asarona obtenida ($\mu\text{g/ml}$) por el factor de dilución.

FRACCION	Peso de muestra mg	Absorbancia a 260 nm	Concen. de Asarona obtenida $\mu\text{g/ml}$	Factor de dilución	Asarona con tenida en los 150 mg de muestra aplicada mg/ml
A	150	0.390	6.0	1000	6.0
B	150	0.294	4.4	1000	4.4
C	150	0.450	7.0	1000	7.0

NOTA: El procedimiento de cromatografía en columna-Espectrofotometría U.V. se explicó detalladamente en las páginas 29 y 30, aquí sólo se reportan los resultados.

2.- C R O M A T O G R A F I A D E G A S E S .

METODO DE CURVA ESTANDAR

a) CURVA ESTANDAR:

Concentración mg/ml	Area cm ²
0.1	5.88
0.2	13.84
0.3	24.40
0.4	24.92
0.5	40.00
0.6	27.36
0.7	48.40
0.8	58.48
0.9	61.92
1.0	58.64

Estos datos fueron ajustados por mínimos cuadrados obteniendo la ecuación:

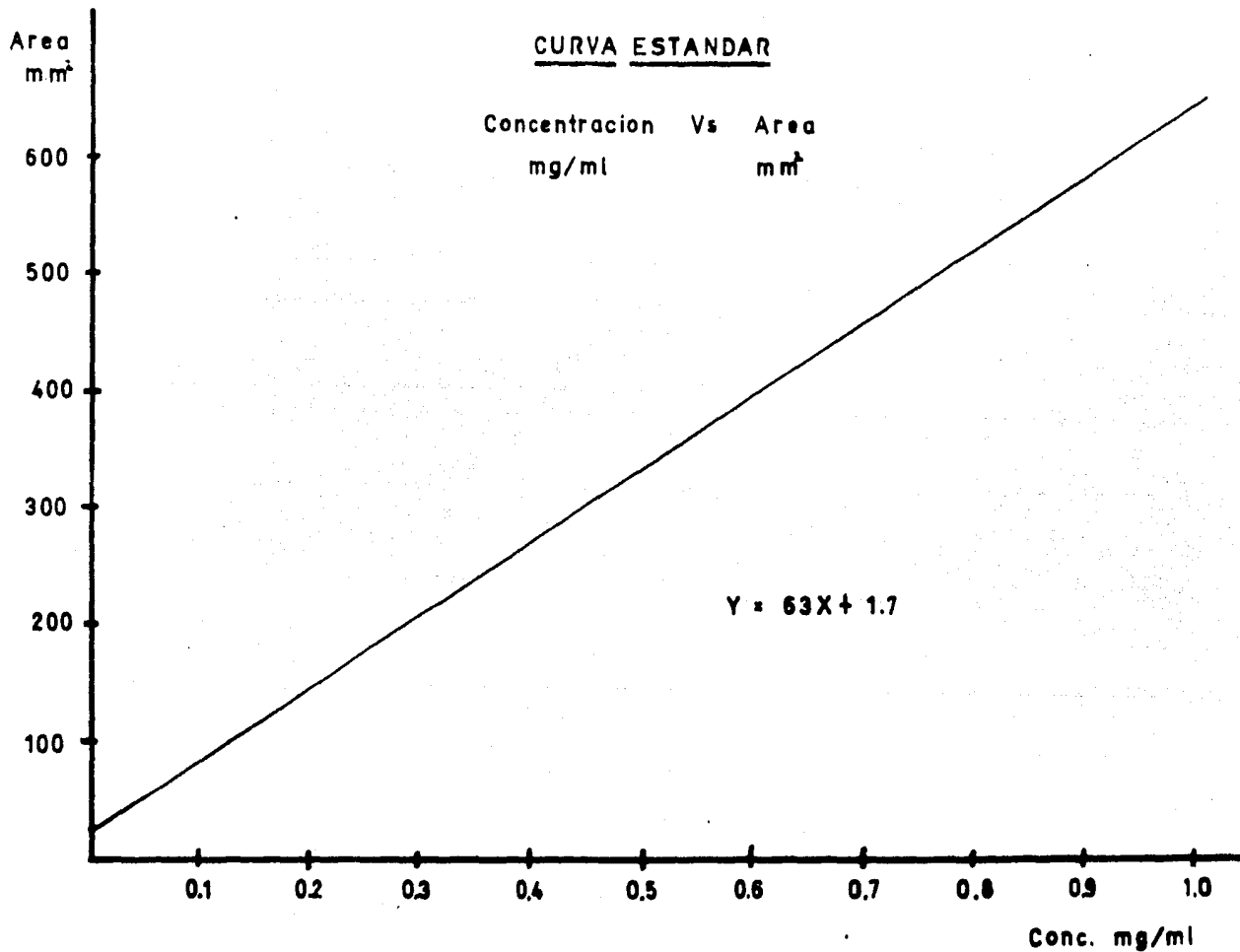
$$Y = 63X + 1.7$$

Con un coeficiente de correlación de 0.955.

Los cálculos para llegar a la ecuación anterior, son los mismos que se indicaron para el ajuste de la curva estándar de Espectrofotometría U.V. (página 32).

CURVA ESTANDAR

Concentracion Vs Area
mg/ml mm²

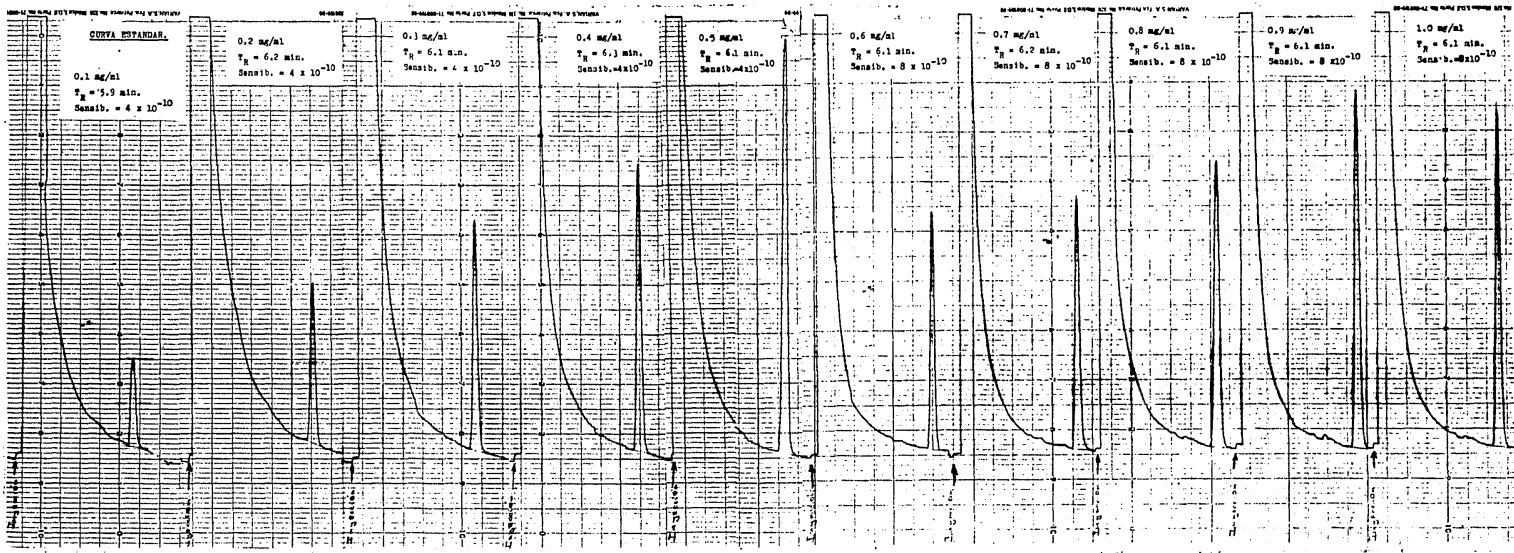


b). CUANTIFICACION DE ASARONA EN LAS FRACCIONES:

FRACCION	Concen. de muestra mg/ml	Volumen inyectado μ l	T_{R} de Asarona min.	Area cm^2	Concen. de Asarona mg/ml
A	1	2.5	6.8	10.20	0.134
B	1	2.5	5.5	7.8	0.096
C	1	2.5	6.1	12.90	0.177

Esta concentración de Asarona fué determinada median te la curva estándar en función del área bajo la curva del pico correspondiente a Asarona (27).

Los cromatogramas obtenidos para cada una de las --- fracciones y para la curva estándar, se reportan en las -- páginas siguientes.



CURVA ESTANDAR.

0.1 mg/ml
 $T_R = 5.9$ min.
Sensib. = 4×10^{-10}

0.2 mg/ml
 $T_R = 6.2$ min.
Sensib. = 4×10^{-10}

0.3 mg/ml
 $T_R = 6.1$ min.
Sensib. = 4×10^{-10}

0.4 mg/ml
 $T_R = 6.3$ min.
Sensib. = 4×10^{-10}

0.5 mg/ml
 $T_R = 6.1$ min.
Sensib. = 4×10^{-10}

0.6 mg/ml
 $T_R = 6.1$ min.
Sensib. = 6×10^{-10}

0.7 mg/ml
 $T_R = 6.2$ min.
Sensib. = 8×10^{-10}

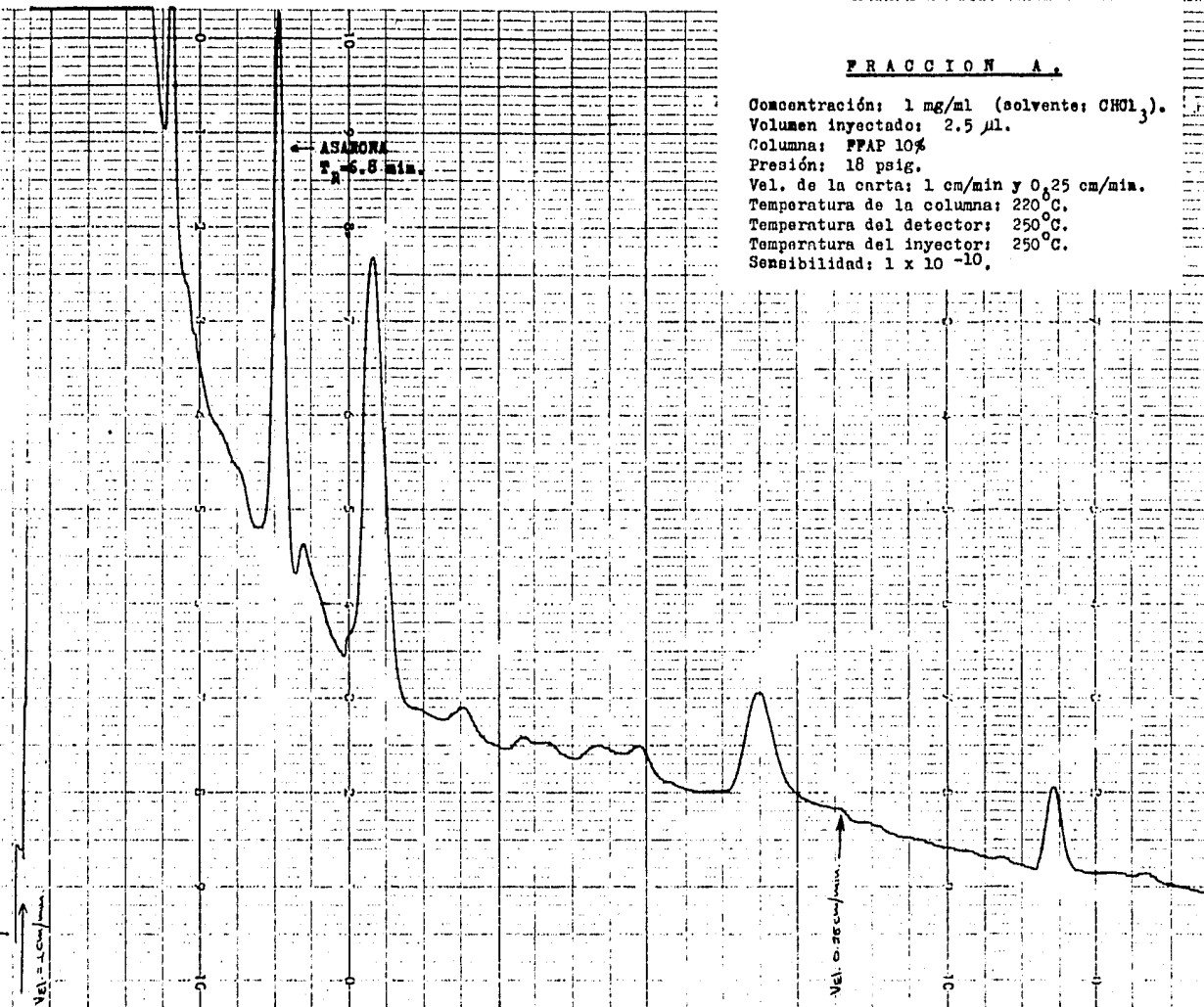
0.8 mg/ml
 $T_R = 6.1$ min.
Sensib. = 8×10^{-10}

0.9 mg/ml
 $T_R = 6.1$ min.
Sensib. = 8×10^{-10}

1.0 mg/ml
 $T_R = 6.1$ min.
Sensib. = 8×10^{-10}

F R A C C I O N A .

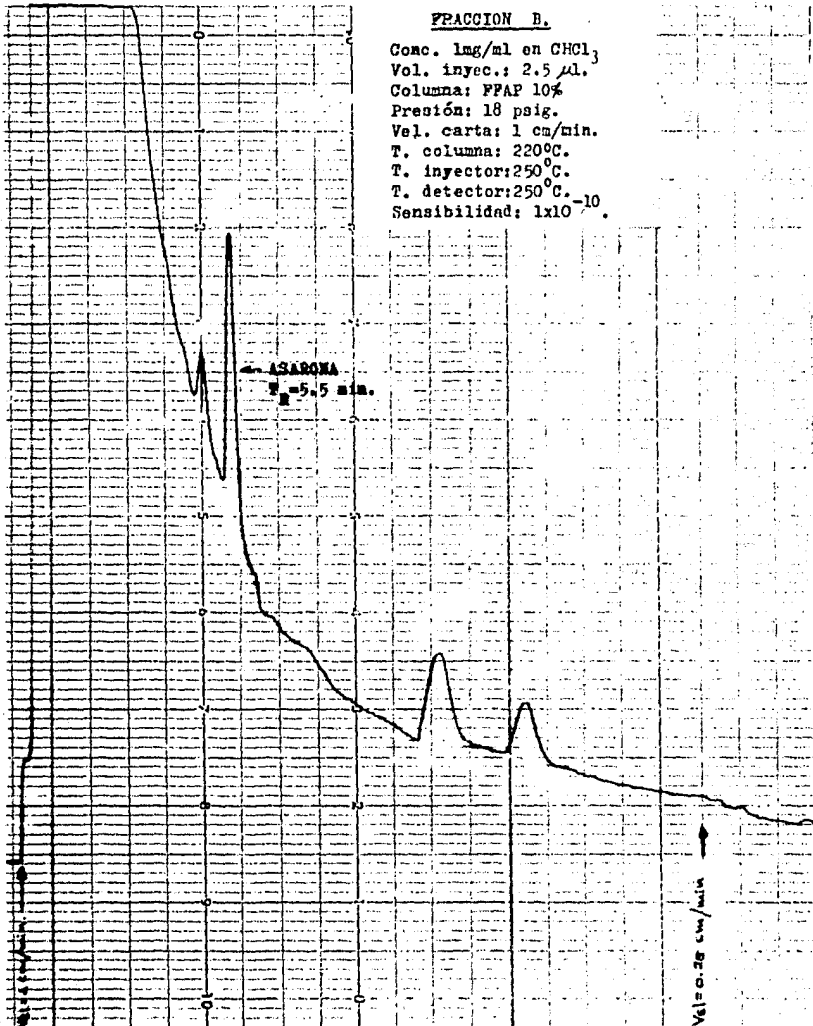
Concentración: 1 mg/ml (solvente; CHCl₃).
 Volumen inyectado: 2.5 µl.
 Columna: FFAP 10%
 Presión: 18 psig.
 Vel. de la carta: 1 cm/min y 0.25 cm/min.
 Temperatura de la columna: 220°C.
 Temperatura del detector: 250°C.
 Temperatura del inyector: 250°C.
 Sensibilidad: 1 x 10⁻¹⁰.



00-45800-00 PARTO No. 71-00099-00

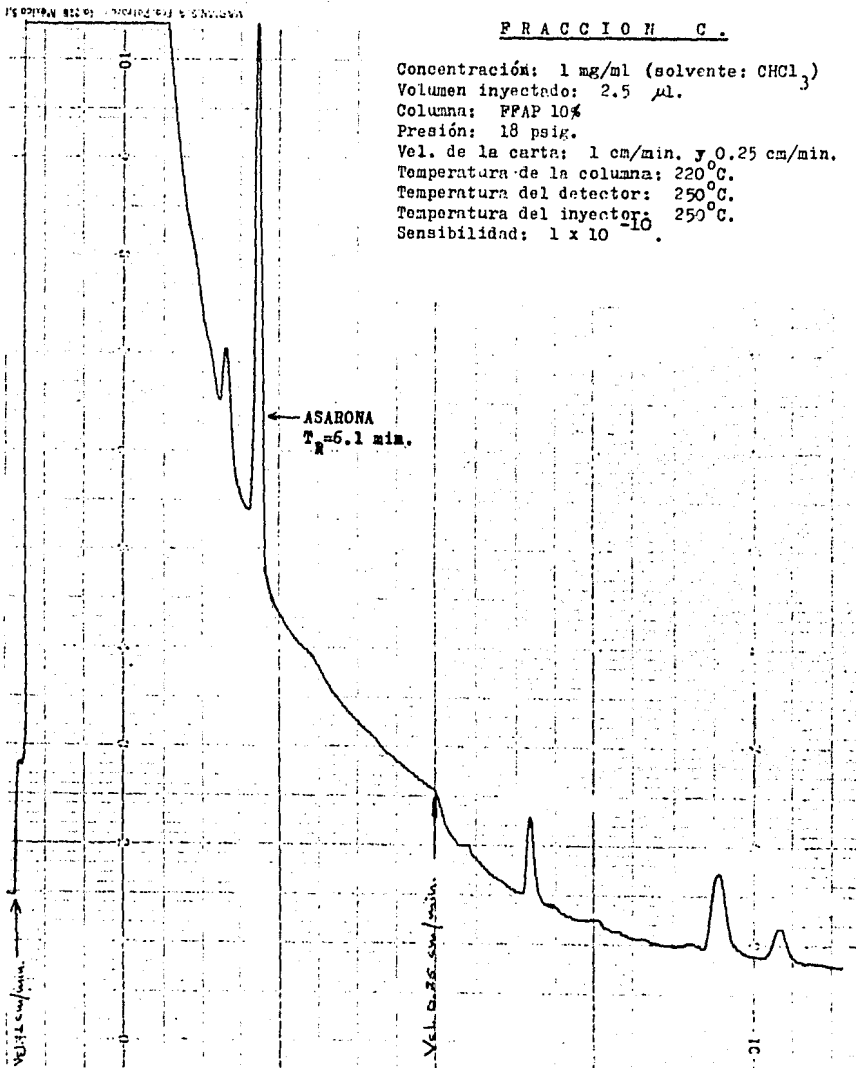
FRACCION B.

Conc. 1mg/ml en CHCl_3
Vol. inyec.: 2.5 μl .
Columna: PFAP 10%
Presión: 18 psig.
Vel. carta: 1 cm/min.
T. columna: 220°C.
T. inyector: 250°C.
T. detector: 250°C.
Sensibilidad: 1×10^{-10} .



F R A C C I O N C .

Concentración: 1 mg/ml (solvente: CHCl₃)
Volumen inyectado: 2.5 μ l.
Columna: FPAP 10%
Presión: 18 psig.
Vel. de la carta: 1 cm/min. y 0.25 cm/min.
Temperatura de la columna: 220°C.
Temperatura del detector: 250°C.
Temperatura del inyector: 250°C.
Sensibilidad: 1×10^{-10} .



METODO DE ESTANDARIZACION INTERNA.

FRACCION	Peso del extracto en 100 ml mg	Peso del St. int. en 100 ml mg	Volumen inyectado μ l	ASARONA		St. INTERNO		% Asarona.
				T _R min	Area cm ²	T _R min.	Area cm ²	
A	100	10	2	7.2	6.96	17.3	13.60	5.11
B	100	10	2	6.2	3.76	17.3	11.97	3.14
C	100	10	2	6.1	13.02	17.0	15.22	8.55

El % de Asarona reportado se calculó de la siguiente forma: (33)

$$W_x = W_s \frac{A_x}{A_s}$$

donde:

W_s = Peso en mg del estándar interno.

W_x = Peso en mg de Asarona contenida en la Fracción.

A_s = Area bajo la curva del estándar interno.

A_x = Area bajo la curva de Asarona.

$$\% \text{ de Asarona} = \frac{\text{Peso en gramos de Asarona}}{\text{Peso en gramos de la Fracción}} \times 100.$$

% de Asarona en la Fracción A:

$$W_x = W_s \frac{A_x}{A_s} = 10 \text{ mg} \frac{6.96 \text{ cm}^2}{13.6 \text{ cm}^2} = 5.11 \text{ mg.}$$

$$\% \text{ de Asarona} = \frac{0.005117 \text{ g.}}{0.1 \text{ g.}} \times 100 = \underline{5.11}$$

% de Asarona en la Fracción B:

$$W_x = W_s \frac{A_x}{A_s} = 10 \text{ mg} \frac{3.76 \text{ cm}^2}{11.97 \text{ cm}^2} = 3.14 \text{ mg}$$

$$\% \text{ de Asarona} = \frac{0.003141}{0.1 \text{ g}} \times 100 = 3.14 \%$$

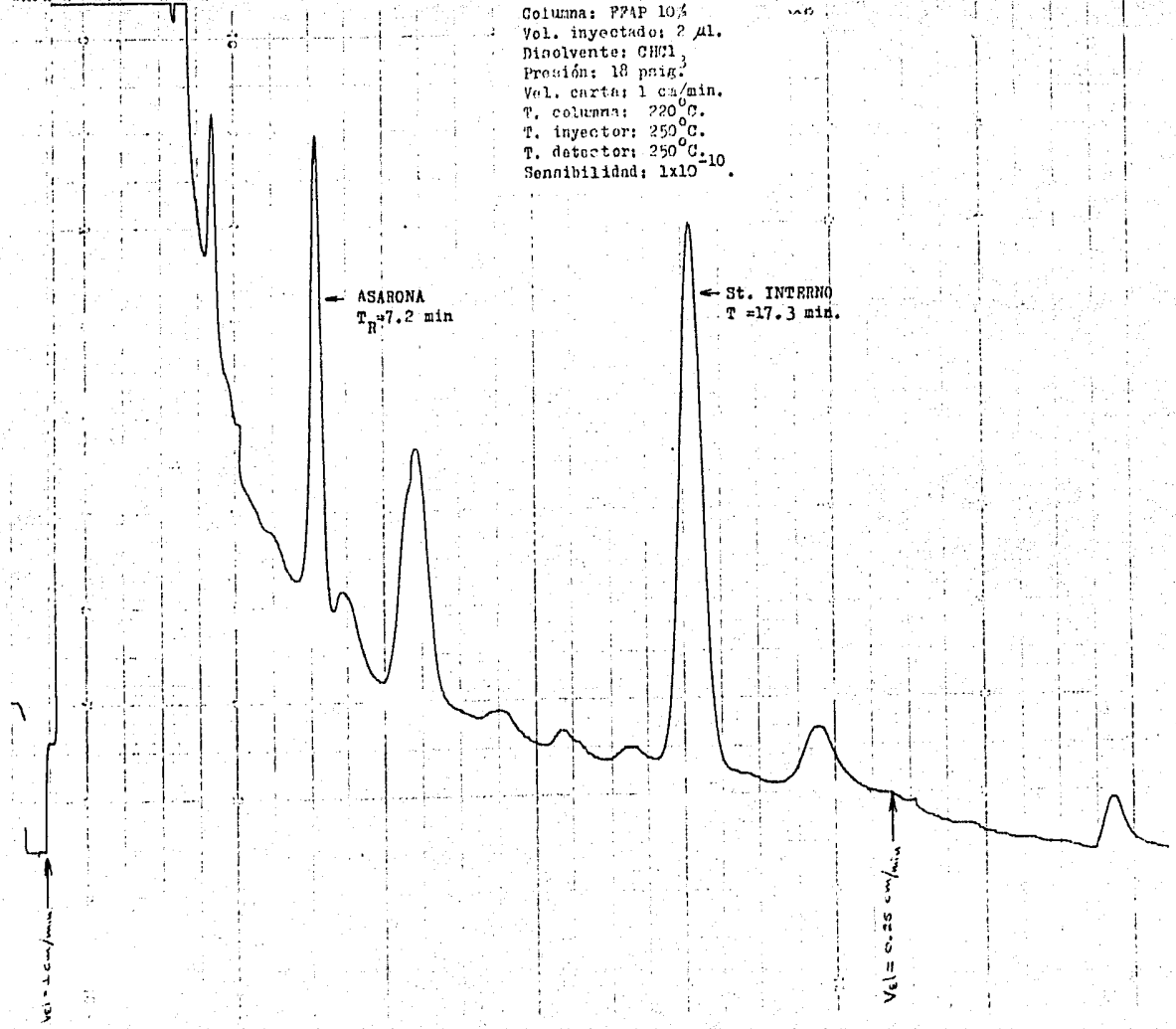
% de Asarona en la Fracción C:

$$W_x = W_s \frac{A_x}{A_s} = 10 \text{ mg} \frac{13.02 \text{ cm}^2}{15.22 \text{ cm}^2} = 8.55 \text{ mg}$$

$$\% \text{ de Asarona} = \frac{0.00855 \text{ g}}{0.1 \text{ g}} \times 100 = 8.55\%$$

Los cromatogramas obtenidos para cada una de las ---
fracciones se reportan en las páginas siguientes.

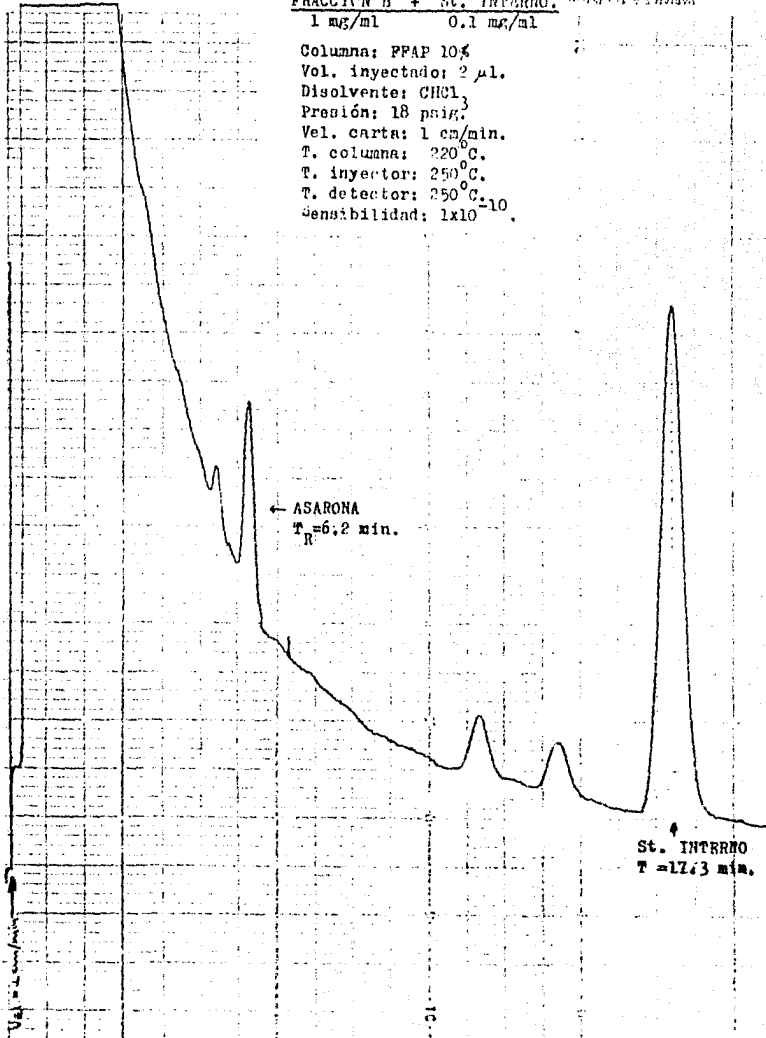
Columna: P7AP 10%
Vol. inyectado: 2 μ l.
Disolvente: CHCl₃
Presión: 18 psig.
Vel. carta: 1 cm/min.
T. columna: 220°C.
T. inyector: 250°C.
T. detector: 250°C.
Sensibilidad: 1×10^{-10} .



FRACCION B + St. INTERNO.

1 mg/ml 0.1 mg/ml

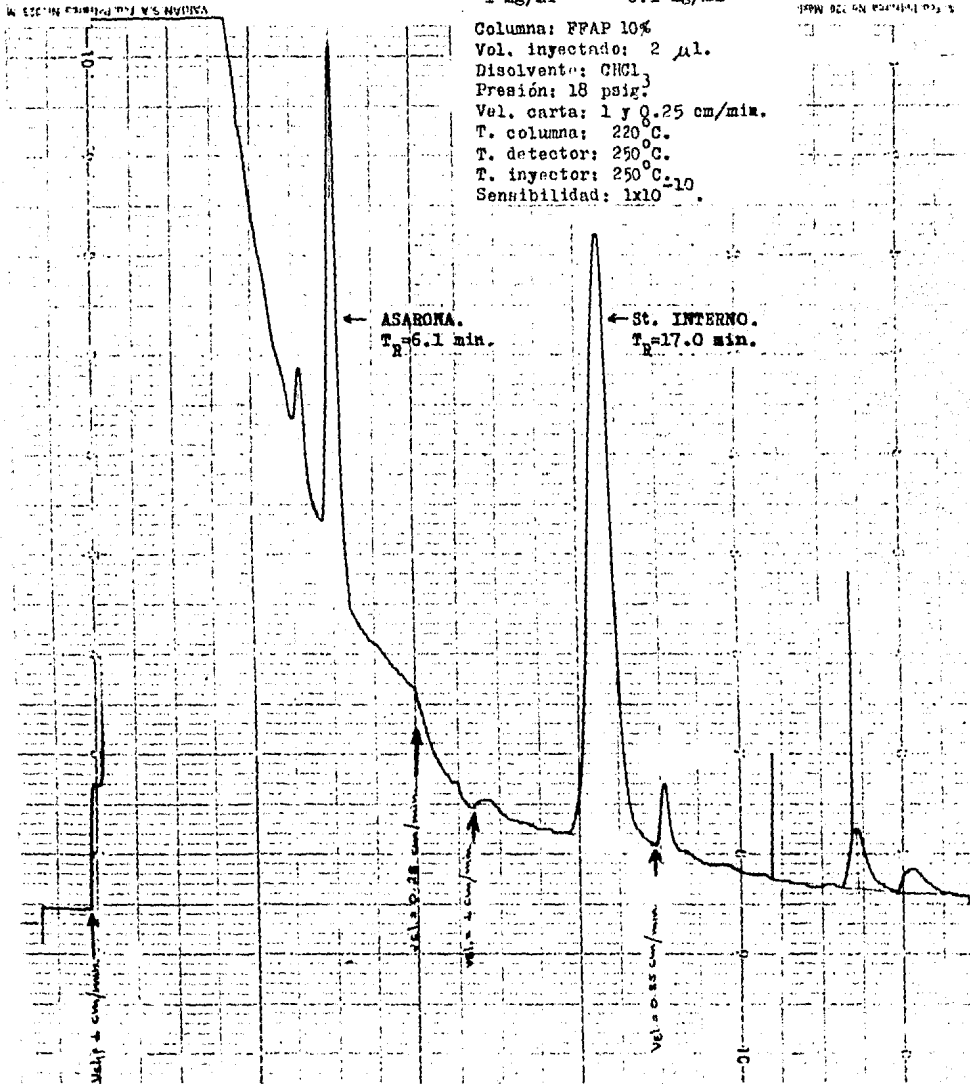
Columna: PPAP 10%
Vol. inyectado: 2 μ l.
Disolvente: CHCl₃
Presión: 18 psig.
Vel. carta: 1 cm/min.
T. columna: 220°C.
T. inyector: 250°C.
T. detector: 250°C.
Sensibilidad: 1×10^{-10} .



FRACCION C + St. INTERNO.

1 mg/ml 0.1 mg/ml

Columna: FPAP 10%
Vol. inyectado: 2 μ l.
Disolvente: CHCl₃
Presión: 18 psig.
Vel. carta: 1 y 0.25 cm/min.
T. columna: 220°C.
T. detector: 250°C.
T. inyector: 250°C.
Sensibilidad: 1×10^{-10} .



DISCUCION DE RESULTADOS .

DISCUSION DE RESULTADOS.

La destilación por arrastre con vapor que se utilizó para la extracción de Asarona de raíz de Calamus no dió -- resultado, lo cual pudo deberse a que la cantidad de raíz usada era pequeña en relación al tamaño del aparato, y debido a su construcción no permitió que los vapores al condensarse entraran en contacto con el hexano, por lo que no se obtuvo Asarona en el extracto hexánico.

En la destilación por arrastre con vapor de Elemuy - se tomó en cuenta este problema y se usó una cantidad considerable de corteza de Elemuy, y en éste caso al final -- de la extracción sí se logró obtener ASARONA pura:

Para tener una base de que los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo de Asarona por Cromatografía en capa fina-Espectrofotometría U.V. son reales, se hizo la cuantificación de Asarona por Cromatografía en columna-Espectrofotometría U.V. comparándose los resultados obtenidos por ámbos métodos viendo que existe una gran semejanza entre ellos; aunque en el primer método la cantidad de Asarona es ligeramente mayor que la cuantificada por el -- segundo método. Lo anterior puede deberse a varios factores de trabajo como por ejemplo, en el método de columna - hubo problemas al tratar de disolver la muestra en la mínima cantidad de disolvente para su aplicación, ya que no se disolvió totalmente quedando un residuo sólido en mínima cantidad; lo que no sucedió en cromatografía en capa -- fina, ya que para ello se hizo una solución de muestra en un volumen mayor de disolvente aplicando la alícuota que - corresponde a la cantidad de muestra deseada.

También pudo haber pérdida de producto al reunir las fracciones recolectadas de la columna donde se encuentra Asarona pura, ya que ésto implica un mayor manejo de material y por lo tanto del producto; lo que no pasa en el método de cromatografía en capa fina, puesto que todo el producto se recupera directamente de la placa y se transfiere a un matraz, para posteriormente hacer una extracción.

El tiempo en el que se lleva a cabo cada uno de los métodos puede ser otro factor, ya que en cromatografía en columna la Asarona esta por más tiempo en contacto con la sílica gel pudiendose retener en ella una cierta cantidad de Asarona, aunque ésta sea mínima; en cambio el método de cromatografía en capa fina se lleva a cabo en un tiempo menor que el anterior, evitando así que la Asarona esté en contacto con la sílica gel por más tiempo.

Se hizo también el análisis cuantitativo de Asarona por dos métodos de Cromatografía de Gases, el primero fué el método de Curva Estándar, y el segundo el método de Estandarización interna.

Los resultados obtenidos en el segundo método, concuerdan con los obtenidos en espectrofotometría; sin embargo, los resultados obtenidos por el primer método no concuerdan con los obtenidos en espectrofotometría ni con los obtenidos en el segundo método de cromatografía de gases.

Para lo anterior debe mencionarse que en las condiciones en que se realizó éste trabajo no es válido compa-

rar la Cromatografía de Gases con la Espectrofotometría--U.V.; pero a pesar de ésto, en los resultados finales al--calcular el porcentaje de Asarona en planta total existe--una relación muy estrecha. También es posible con los --datos obtenidos, indicar que la cromatografía de gases --presenta ventajas para elaborar un método analítico, ya --que su sensibilidad es mayor que la de U.V. y el tiempo --de análisis puede ser más corto. Sería recomendable di--señar y llevar a cabo el método de análisis cuantitativo--instrumental.

Como último punto de apoyo para confirmar que los da--tos obtenidos por el método de Cromatografía en Capa Fina--Espectrofotometría U.V. son reales, se recurrió a la li--teratura (1); en la cual se reporta que en 1250 g de Ele--muy el 0.42% corresponde a Asarona; y los datos obtenidos en ésta Tesis por el método mencionado, indican que en --658.8 g de corteza de Elemuy el 0.55% corresponde a Asa--rona.

El porcentaje de Asarona en raíz de Calamus no se --encuentra reportado en la literatura.

CONCLUSIONES .

CONCLUSIONES.

- 1.- De la destilación por arrastre con vapor no se obtuvo Asarona de la raíz de Calamus; sin embargo se obtuvieron 3.2552 g de Asarona de la corteza de Elemuy.
- 2.- La destilación por arrastre con vapor no fue suficiente para extraer toda la Asarona contenida en corteza de Elemuy, por lo que se recurrió a la extracción líquido-líquido y sólido-líquido; también se recurrió a dicho método para extraer Asarona de raíz de Calamus.
- 3.- En la Fracción C hay mayor cantidad de Asarona, siguiéndole la Fracción A, y por último la Fracción B.
- 4.- De acuerdo a los resultados obtenidos en Cromatografía en capa fina-Espectrofotometría U.V., el rendimiento de Asarona en 35 g de raíz de Calamus es de 0.86%; y el rendimiento de Asarona en 658.8 g de corteza de Elemuy es de 0.55%.
- 5.- El rendimiento de Asarona según los métodos analíticos empleados es:

	ELEMUY	CALAMUS
C. en capa fina:	0.55%	0.86%
C. en columna:	0.54%	0.76%
C. de gases: (curva estándar)	0.68%	2.57%
C. de gases: (St. interno)	0.58%	0.98%

- 6.- En la raíz de Calamus hay más Asarona que en la corteza de Elemuy.
- 7.- Con los resultados obtenidos se puede concluir que el método de Cromatografía en capa fina-Espectrofotometría U.V. es un método analítico adecuado y confiable para la cuantificación de ASARONA.

B I B L I O G R A F I A .

- 1.- Enriquez R., A. Cháves. and F. Jauregui; Phytochemistry 1980; 19; 2024-2025 .
- 2.- Sánchez, R. and V. Rufz; (1975) La Homeopatía en -- México; Vol. 32.
- 3.- 21 CFR 3.65 (a) (b) (c); F.R. Doc 68-5556; May 1, - 1968.
- 4.- Merck Index 9a ed. Merck & Co.
- 5.- Ross, M. and Dandiya; (1960) Nature 185, 466.
- 6.- Guenter E. and Dalthausen; The essential oils Vols. I y VI; D. Van Nostrand Co., INC., New York 1949.
- 7.- Dyer, Martin, Buscemi; Journal of the AOAC 1976; 59 (3); 675-677.
- 8.- Shulgin Alexander; J. Chromatography, 30 (1976); - 54-61.
- 9.- Baxter, Fan and Kandel; Canadian Journal of Chemistry; 60, 154 (1962).
- 10.- Damon L.; Journal of the AOAC, 1973; 56 (5).
- 11.- Shulgin, Nature 197 (1963) 379.
- 12.- Connors K.; Curso de Análisis Farmacéutico; Ed. Reverté, S.A. 2da. ed. 1980.
- 13.- Skoog, A; Fundamento de Química Analítica; Vol. II; Ed. Reverté, S.A.
- 14.- Watty, B.; Química Analítica; Ed. Alhambra; 1era. - ed. 1982.
- 15.- Morcillo, R.; Espectroscopía; Ed. Alhambra, S.A. -- 1era. ed. 1972.
- 16.- Pecsok, R.; Métodos modernos de Análisis Químicos - Ed. Limusa, México; 1era ed. 1973.

- 17.- Willard H., L. Merritt, J. Dean; Métodos Instrumentales de Análisis; Compañía Editorial Continental, - S.A. México; 1era ed. 1978.
- 18.- Charlot; Curso de Química Analítica General; Vol. - II; Ed. Toray-Masson, S.A.; 1era ed. 1975; España.
- 19.- Strobel, M.; Instrumentación Química; Ed. Limusa -- Wiley, S.A.; México, 1968.
- 20.- Galen, W.; Instrumental Methods of Chemical Analy - sis; Ed. McGraw Hill Company U.S.A. 1960.
- 21.- Bobbit, J. and Schwarting A.; Introducción to Chro - matography, N.Y., Reinhold Publising 1968.
- 22.- Zweig G. and Sherma J.; Handbook of Chromatography; Vols. I y II; CRC Press, Cleveland, 1972.
- 23.- Kirkland; J.; Modern Practice of Líquid Chromatogra - phy; Wiley-Interscience, N.Y. 1971.
- 24.- Storch de Gracia; Fundamentos de la Cromatografía - de Gases; Ed. Alhambra; 2da. ed. 1975.
- 25.- Dabrio, M.W.; Cromatografía de Gases Vol. I y II; - Ed. Alhambra; 1era ed. 1971.
- 26.- Littlewood, A.; Gas Chromatography; Ed. Academic -- Press N.Y. and London; 2da. ed. 1970.
- 27.- Mc Nair H., BoNelli; Basic Gas Chromatography; Va - rian Aerograph; 4th. printing-January 1968.
- 28.- Stahl, E.; Thin-Layer Chromatography; 2da. ed. N.Y. Springer-Verlag N.Y. INC., 1969.
- 29.- Sánchez Viesca F. (1968) Ciencia 26, 113-120.
- 30.- Shulgin, A. (1965) Can J. Chem.; 43, 34 37.
- 31.- Rao, C.N.; Ultra-Violet and Visible Spectroscopy; - Ed. Butter Worths; 3era ed.
- 32.- Silverstein, R.M.; Espectrometric Identificación of Organic Compound; Ed. John Wiley & Sons, INC. 1974.

- 33.- Supelco, Inc., 1974; 8 (6).
- 34.- Dixon, W.; Introducción al Análisis Estadístico; Ed. MacGraw-Hill; 2da. ed. 1979.
- 35.- Hubert, M.; Estadística Social; Ed. Fondo de Cultura Económica; 1era ed. 1981.