



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“SEPARACION DE FLAVONAS DE *Ginkgo Biloba L.*
POR CROMATOGRAFIA DE PARTICION
CENTRIFUGA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

DIANA CORTES HERNANDEZ

283906



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



MEXICO, D.F.

OCTUBRE DEL 2000



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.

Jurado Asignado:

Presidente	Prof. SANTIAGO CAPELLA VIZCAINO
Vocal	Prof. FRANCISCO ROJO CALLEJAS
Secretario	Prof. EVANGELINA CAMACHO FRIAS
1er. Suplente	Prof. JOSE ALEJANDRO BAEZA REYES
2o. Suplente	Prof. JUAN RAMIREZ BALDERAS

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 1-3
INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM.



Evangelina Camacho Frías
Asesora del Tema



Diana Cortés Hernández
Sustentante

Agradezco a Conacyt
por el apoyo otorgado mediante el proyecto 3910P-N9607.

AGRADECIMIENTOS:

- Dra. Evangelina Camacho Frías por su enseñanza, paciencia, interés y tiempo dedicado a este trabajo.

- A mi madre por su cariño, confianza y gran apoyo incondicional en todo lo que necesite para alcanzar este momento.

- A mis compañeros del Lab 1-3 por su amistad y ayuda recibida durante este tiempo.

- A Guillermo Gómez Colín por su ayuda a poner la última pieza del rompecabezas de esta etapa de mi vida.

- A mi familia y amigos por sus palabras de aliento y confianza depositada en mí.

CONTENIDO

OBJETIVO.....	1
INTRODUCCION.....	2
ANTECEDENTES.....	3
Cromatografía de Partición Centrífuga.....	3
Características.....	3
Instrumentación.....	5
Selección del Sistema Bifásico.....	9
Gradiente de Elución.....	12
Resolución Cromatográfica.....	12
<i>Ginkgo biloba</i> L.....	16
Actividad biológica.....	16
Extractos normalizados de <i>Ginkgo biloba</i> L.....	17
Constituyentes químicos.....	17
PARTE EXPERIMENTAL.....	24
Material y equipo.....	24
Preparación del extracto.....	25
Análisis por CLAE.....	25
Análisis por CPC.....	25
Modo isocrático.....	26
Gradiente de elución.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
Preparación del Extracto.....	28
Análisis por CPC.....	29

Gradiente de elución.....	33
Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.....	36
Extracto de Tanakan, separación por CPC.....	41
Identificación de los componentes del extracto.....	45
CONCLUSIONES.....	51
BIBLIOGRAFIA	53

OBJETIVO

Desarrollar un método de separación por Cromatografía de Partición Centrífuga de los flavonoles mayoritarios presentes en comprimidos de *Ginkgo biloba L.*

- * Extraer los principios activos de los comprimidos de *Ginkgo biloba L.*
- * Desarrollar un método de separación por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia para los flavonoles mayoritarios presentes en el extracto obtenido (Quercetina y Kaempferol glucosídicas).
- * Desarrollar un método de separación y purificación por Cromatografía de Partición Centrífuga para estos componentes.

INTRODUCCION

En México es muy común el uso de infusiones y tés a base de productos naturales para el tratamiento de diversos malestares: dolor de cabeza, de estómago, tos, etc.

Algunas veces, estas preparaciones no sólo no "curan" el mal, sino que pueden contener compuestos nocivos para la persona que lo ingiere.

Es por eso que es importante el estudio de los componentes presentes en diferentes productos naturales y para ello se necesita contar con técnicas de separación tanto analíticas como preparativas. Generalmente, sobre todo a nivel preparativo, los métodos empleados requieren de mucho tiempo y no solamente se necesita una técnica sino varias.

La Cromatografía de Partición Centrífuga (CPC) es una técnica de separación más que analítica preparativa, que se puede aplicar al análisis tanto de moléculas orgánicas como inorgánicas y es prácticamente desconocida en México.

En nuestro laboratorio, estamos interesados en desarrollar esta técnica y aplicarla al análisis de productos naturales, principalmente de los flavonoles glicosídicos de Quercetina y Kaempferol. Desgraciadamente, el montar una metodología con un extracto de productos naturales cuya composición se desconoce es bastante difícil.

Por otro lado, el *Ginkgo biloba L.* es un árbol milenario de origen chino, cuyas hojas son ricas en flavonoles glicosídicos, principalmente Quercetina y Kaempferol, que son los que nos interesan y su extracto ha sido tan estudiado que incluso se encuentra normalizado, conociéndose comercialmente como EGb 761. Este extracto es el que se utiliza en la elaboración de comprimidos, cápsulas y complementos alimenticios.

En este trabajo se propone un método de separación preparativa de los flavonoles Quercetina y Kaempferol glicosídicos presentes en comprimidos de *Ginkgo biloba L.* por Cromatografía de Partición Centrífuga.

ANTECEDENTES

Cromatografía de Partición Centrífuga.

A principios de 1980, K. Nunogaki y sus colaboradores¹ desarrollaron en Japón la Cromatografía de Partición Centrífuga (CPC).

La CPC es una técnica de separación y/o purificación de un soluto que se distribuye entre dos fases líquidas inmiscibles entre sí, una estacionaria (FE) y la otra móvil (FM) y la fase estacionaria permanece "fija" en la columna cromatográfica gracias a la acción de una fuerza centrífuga mientras la FM la atraviesa. El campo centrífugo es producido por un mecanismo de rotación de un solo eje y dos sellos giratorios unidos a la entrada y salida de la FM². Debido a que la fuerza centrífuga formada es constante en cualquier punto de la columna cromatográfica, a este principio se le conoce como hidrostático.

El sistema bifásico que servirá para formar las fases móvil y estacionaria, puede estar constituido por dos o más disolventes y en cualquier proporción.

Características.

En CPC, no se necesita utilizar un soporte sólido. Esto hace que el volumen de la columna sea ocupado únicamente por las fases móvil y estacionaria y la relación entre ellas puede variarse. Generalmente, el volumen de FE varía entre el 50 y 80 % del total de la columna, dependiendo del sistema bifásico que se maneje. Este volumen total de la columna puede ser desde 100 mL hasta 5 litros. Esto hace que la capacidad de la columna sea muy grande, por lo que se pueden inyectar desde algunos miligramos de muestra hasta gramos. Así, la CPC se usa principalmente con fines preparativos, aunque también puede utilizarse con fines analíticos.

Al no haber necesidad de soporte sólido, con esta técnica no se tienen problemas de descomposición o adsorción irreversible del soluto con el soporte.

La separación se basa en las diferencias de reparto de los solutos entre las dos fases líquidas inmiscibles y pueden tratarse como extracciones líquido-líquido

sucesivas (proceso Craig³). De esta manera, se puede predecir exactamente el volumen de retención (o tiempo de retención) de un analito dado si se conoce su coeficiente de distribución entre los dos líquidos que forman el sistema bifásico. Además, a partir del volumen de retención se pueden calcular constantes de reparto de diversos solutos en un sistema bifásico específico.

Si la constante de reparto (K) es muy grande, el soluto quedará muy retenido en la fase estacionaria y si es muy pequeño, entonces prácticamente saldrá en el volumen muerto, es por eso que se prefiere que los compuestos a analizar tengan una K con valor cercano a uno.

Como la separación depende de la constante de reparto y de la relación de volúmenes de fases estacionaria y móvil, si estas variables se mantienen constantes, entonces el comportamiento cromatográfico de los solutos es siempre el mismo.

Para un sistema bifásico dado, cualquiera de las dos fases puede ser la fase móvil o estacionaria. Esto hace que también se tengan diferentes tipos de elución:

- * *Fase normal.* Cuando se utiliza como fase móvil la menos polar, por ejemplo n-hexano en el sistema bifásico n-Hexano / Metanol.
- * *Fase Inversa.* Cuando se utiliza como fase móvil la más polar, por ejemplo Metanol en el mismo sistema bifásico.
- * *Elución dual.* Esto es cuando inicialmente se usa una FM (por ejemplo n-Hexano) y después de un tiempo ésta pasa a ser FE y la nueva FM es la otra fase (Metanol en nuestro ejemplo). Esto es muy usado cuando se trabaja con muestras en donde unos solutos se logran separar, pero otros quedan muy retenidos en la fase estacionaria (figura 1).

Así, es posible recuperar casi el 100 % de la muestra inyectada aunque no se obtenga una buena separación.

Todas estas características hacen que la CPC tenga gran aplicación en las áreas farmacéutica y de productos naturales, entre otros campos de la química.

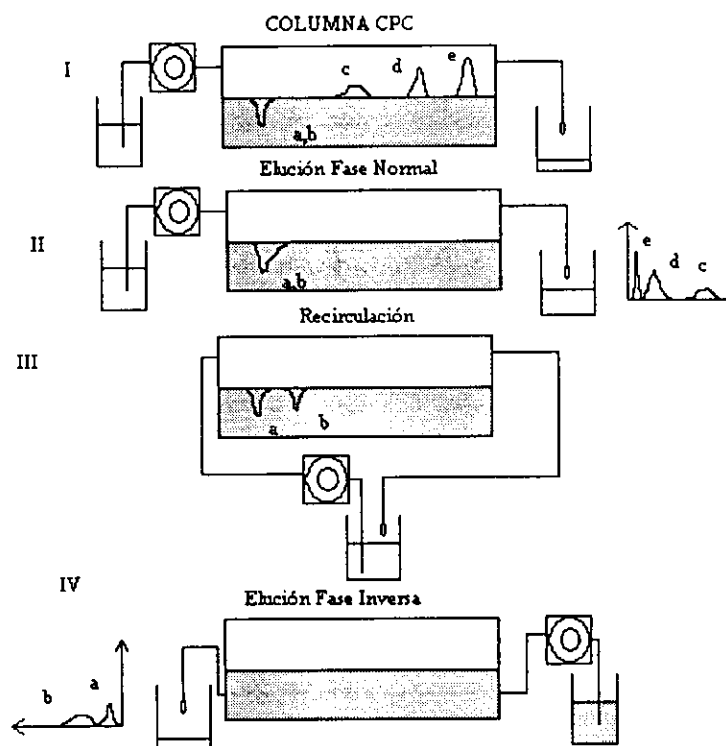


Figura 1. Modo dual de elución. I. Al eluir una muestra conteniendo cinco solutos en modo normal (FM menos polar), se separan los compuestos *e*, *d* y *c*. II. Una vez separados los tres solutos, la migración de *a* y *b* no es mucha. III. Se recircula el disolvente hasta lograr la separación de *a* y *b*. Una vez separados dentro de la columna, la FE pasa a ser fase móvil (más polar) y como es más afín a estos solutos que ya están separados, eluye primero el compuesto *a* y después el *b*, lográndose así la separación de los cinco solutos en un sólo análisis.

Instrumentación.

El equipo necesario en CPC es muy similar al que se utiliza en la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).

Se necesitan al menos dos bombas, una para enviar la FE y otra para enviar a la FM. Los flujos utilizados pueden variar de 0.5 hasta 20 mL/min, siendo el más común de 7 mL/min y esto depende de la presión generada, que no debe ser superior a

6 MPa. En este caso, la presión va a depender del sistema bifásico (características fisicoquímicas de cada una de las fases), del flujo de elución, de la cantidad de fase estacionaria en la columna y de la velocidad de rotación empleada para generar la fuerza centrífuga.

Cuando se inyectan pequeñas cantidades (0.1 a 1 mL), la muestra se puede introducir al sistema a través de inyectores tipo Rheodyne. Cuando son grandes cantidades de soluto, éste se introduce directamente al sistema a través de una tercer bomba (hasta 20 mL). La muestra debe estar disuelta en el mínimo volumen del sistema bifásico utilizado.

La FM conteniendo el soluto pasa a la columna en donde ocurre el proceso cromatográfico y como el eluyente es un líquido, todos los detectores utilizados en CLAE, se pueden utilizar: índice de refracción, difusión de la luz, UV-Visible, entre otros, siendo el más utilizado el UV-Visible. Cuando se trabaja con grandes concentraciones, el detector puede saturarse. En este caso se coloca una válvula divisoria a la salida de la columna para que sólo una parte pase al detector, o bien, se pueden coleccionar fracciones y utilizar otros métodos de detección.

La figura 2 muestra un esquema de esta instrumentación.

En nuestro caso, la columna para Cromatografía de Partición Centrífuga es un rotor de teflón y acero inoxidable formado por dos series de seis discos cada una. Estos discos están grabados de manera que al unirse forman "canales", siendo un total de 2146 por un volumen interno de 230 mL. Estos canales están unidos en serie por conductos capilares. En los canales hay fase móvil y fase estacionaria y es en donde se lleva a cabo el proceso cromatográfico, mientras que en los conductos únicamente hay fase móvil.

Para generar la fuerza centrífuga, el rotor gira con una velocidad que puede variar de 0 a 2000 revoluciones por minuto (rpm).

La columna se puede llenar completamente con la FE y después de generar el campo centrífugo, pasar la FM. Parte de la FE presente en los canales, así como la de los conductos es desplazada por la FM, quedando las dos fases en los canales y únicamente FM en los conductos (sistema discontinuo). Se dice que el sistema está en equilibrio cuando sólo eluye la fase móvil. El volumen de FE desplazado de la columna

se conoce como volumen mínimo (V_{min}) de FM y depende del sistema bifásico y del flujo únicamente. La relación de volúmenes estacionario y móvil dentro de la columna puede fijarse arbitrariamente y en ese caso la columna se llenará con el porcentaje deseado, tomando en cuenta que el máximo porcentaje de FE va a depender de V_{min} .

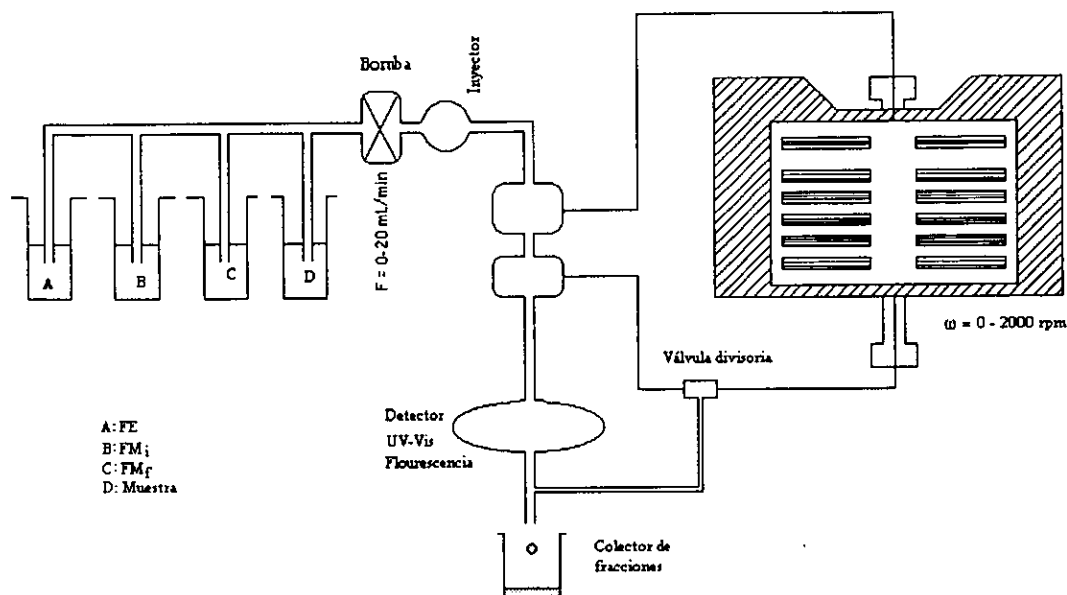


Figura 2. Esquema del equipo utilizado en Cromatografía de Partición Centrífuga.

En la columna se tiene una válvula de cuatro vías, lo que permite elegir cuál de las dos fases será la estacionaria y cuál la móvil. Cuando se escoge como FM la fase más ligera, ésta atraviesa la FE (más pesada) de abajo hacia arriba del canal pasando a la base del siguiente a través del conducto hasta su salida de la columna. Este modo de elución es ascendente (MA). Por el contrario, si la fase estacionaria es la fase superior, la fase móvil inferior atraviesa los canales de arriba hacia abajo y pasa a la parte superior del canal siguiente a través del conducto, y así hasta que sale de la columna. Este modo de elución se dice que es descendente (MD). En la figura 3 se representan estos modos de elución.

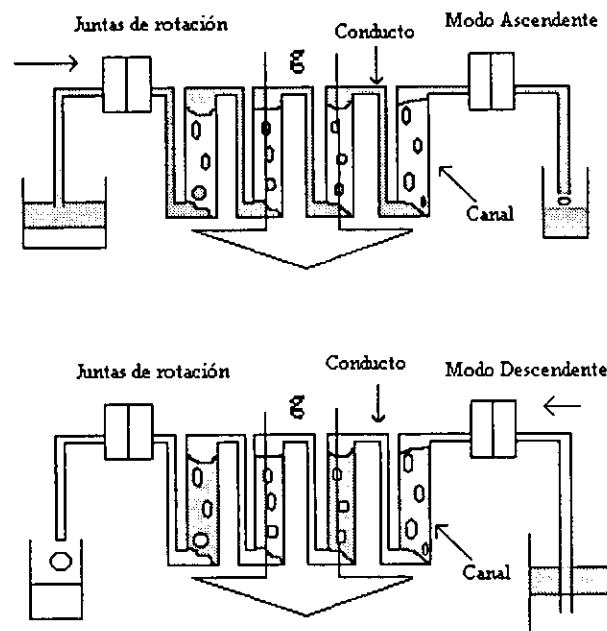


Figura 3. Modos de elución ascendente (la fase móvil es la más ligera y la fase estacionaria la más pesada) y descendente (la fase móvil es la más pesada y la fase estacionaria la más ligera).

La columna se conecta al inyector y al detector por medio de dos juntas de rotación formadas por una barra de zafiro perforado en el centro y de juntas toroidales semejantes a las utilizadas en las cabezas de las bombas de CLAE. Es necesario remarcar que estas juntas no son idénticas y consecuentemente, no pueden intercambiarse. Este diseño se hizo con el propósito de, en caso de fuga, minimizar una posible entrada de las fases móvil y/o estacionaria en las partes lubricadas de la junta de rotación.

Selección del Sistema Bifásico.

El éxito de una buena separación en CPC depende de la selección correcta del sistema de disolventes⁴. La selección de un sistema bifásico es similar a la que se realiza cuando se selecciona una columna y un eluyente en CLAE. Los principales factores a considerar son:

- * Polaridad de la muestra.
- * Solubilidad de la muestra en el medio.
- * Estado de carga de la muestra.
- * Capacidad del soluto para formar complejos.

Optimizar un sistema bifásico en CPC es encontrar una combinación de disolventes donde la muestra sea muy soluble y los coeficientes de reparto de las especies a separar difieran unos de otros. La mayor parte de estos sistemas bifásicos se forman por mezclas de tres disolventes y algunas veces hasta de cuatro o más.

Frecuentemente, la optimización de una separación por Cromatografía de Partición Centrífuga implica la optimización de la selectividad cromatográfica y es aquí donde esta técnica ofrece muchas ventajas, puesto que las dos fases pueden modificarse de manera lógica en su composición para obtener la resolución deseada.

La mayoría de los sistemas bifásicos se pueden clasificar en tres tipos:

- * *Tipo 1.* El sistema se forma con dos disolventes no miscibles entre sí mas un tercero miscible entre los dos, como por ejemplo cloroformo (CHCl_3) y agua a los que se les agrega metanol (MeOH).
- * *Tipo 2.* Se forma con dos disolventes miscibles entre si más un tercero inmiscible en ellos, como por ejemplo acetato de etilo (AcOEt) y butanol (BuOH) mas agua.
- * *Tipo 0.* Se forma con tres disolventes completamente miscibles entre si cuando se mezclan por pares, pero al mezclarse los tres en las proporciones adecuadas, se forman dos fases. El tetrahidrofurano (THF), dimetilsulfóxido (DMSO) y agua pertenecen a este tipo de sistemas bifásicos.

Los diagramas ternarios son muy útiles para comprender cómo hacer variar la composición de una mezcla dada y así cambiar las propiedades fisicoquímicas de un sistema bifásico y poder prever las consecuencias de la variación en la composición de una fase con respecto a la otra. En la figura 4 se representan los diagramas ternarios para cada uno de los tipos de sistemas bifásicos.

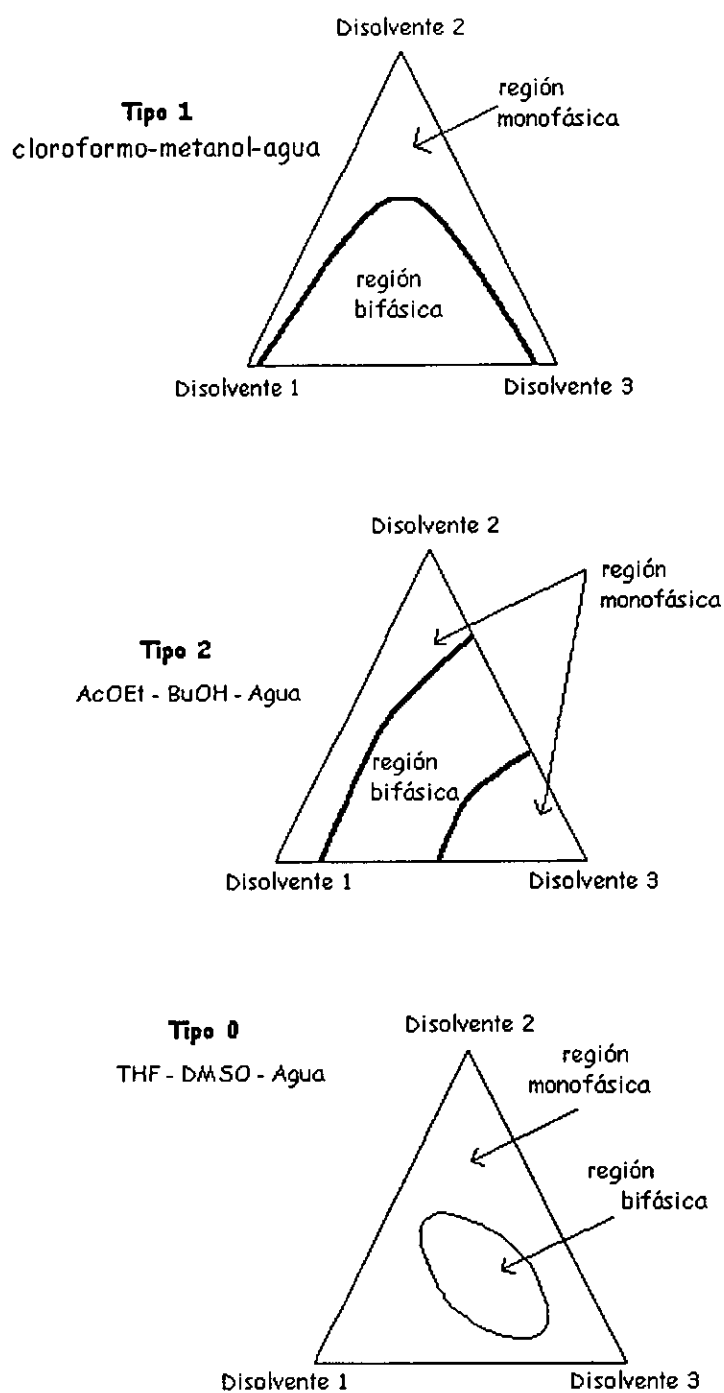


Figura 4. Diagramas ternarios para los diferentes tipos de sistemas bifásicos utilizados en Cromatografía de Partición Centrífuga.

Gradiente de Elución.

Al igual que en CLAE, el gradiente de elución hace que en CPC puedan separarse solutos con grandes diferencias de polaridad y de constantes de reparto, en un tiempo de análisis menor al que se tendría si se utilizara una elución isocrática. Para ello, es necesario encontrar un disolvente que al agregarlo al sistema bifásico inicial vaya preferencialmente hacia una de las fases, que será utilizada como FM. La otra fase del sistema, que será utilizada como FE, deberá permanecer prácticamente inalterable con la presencia de este disolvente.

Por ejemplo, al utilizar el n-Hexano (n-Hex) como fase estacionaria del sistema bifásico n-Hex / Agua, los solutos polares eluirán rápidamente, mientras que los solutos poco polares van a retenerse mucho. Si a este sistema se añade Etanol (EtOH), éste se irá hacia la fase acuosa aumentando su fuerza de elución, permaneciendo las propiedades del n-Hex prácticamente constantes y de esta forma los solutos menos polares, al cambiar su constante de distribución en el nuevo medio eluirán más rápido, reduciendo así el tiempo de análisis.

Resolución Cromatográfica.

Como se mencionó anteriormente, esta técnica se asemeja mucho al Proceso de Craig, por lo que los conceptos de las distribuciones líquido-líquido pueden aplicarse a la Cromatografía de Partición Centrífuga.

El reparto de cada soluto en un sistema cromatográfico está representado por un equilibrio, al cual se le asocia una constante característica denominada constante de reparto. El principio de la separación implica la repartición del soluto entre las dos fases líquidas inmiscibles, por lo que la migración a través de la columna es controlada sólo por el coeficiente de distribución (K).

La ley fundamental de la cromatografía de reparto es:

$$V_r = V_m + KV_s$$

donde V_r es el volumen de retención del soluto, V_m y V_s los volúmenes respectivos de fases móvil y estacionaria dentro de la columna.

A diferencia de la CLAE, en CPC sí se conocen los volúmenes de las fases móvil y estacionaria en la columna, por lo que es posible calcular el coeficiente de distribución de un compuesto a partir de su volumen de retención, que también se define como la relación de concentraciones del soluto entre las fases estacionaria y móvil.

$$K = \frac{[\text{Solute}]_{FE}}{[\text{Solute}]_{FM}}$$

Un compuesto con una K de cero tiende a irse hacia la fase móvil, por lo tanto eluye con V_0 (también conocido como volumen muerto). Por el contrario, los compuestos con coeficientes de distribución grandes se van hacia la fase estacionaria y por lo tanto son muy retenidos.

Eficiencia.

En CLAE, la eficiencia se representa por el número de platos teóricos (N), que puede calcularse por la ecuación:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2$$

donde t_r es el tiempo de retención y w_b el ancho del pico a la línea de base.

N representa el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases durante su recorrido a través de la columna. En CPC, la columna está formada por una serie de canales conectados entre ellos. El número de platos teóricos máximo (N_{max}) que se puede alcanzar entonces es el número de canales que se tiene en la columna (2146 en este caso).

Sin embargo, casi siempre el valor calculado de N es menor a N_{max} y esto depende fundamentalmente de las características fisicoquímicas del sistema bifásico (principalmente tensión interfacial, viscosidad y diferencia de densidades de las FM y FE) y de la velocidad de rotación de la columna (a mayor ω , mayor eficiencia). Se dice

entonces que el soluto debe recorrer algunos canales antes de llegar a un plato teórico⁵.

Resolución.

Para dos compuestos vecinos 1 y 2, la resolución R_s es función del factor de selectividad α , del número de platos teóricos N y del factor de retención k' , siendo éste último función del coeficiente de distribución K y de los volúmenes respectivos de las fases estacionaria y móvil en la columna, V_e y V_m :

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \frac{k'_1}{k'_1 + 1}$$

El factor de selectividad α , es la relación de los coeficientes de distribución de dos solutos vecinos. En CLAE, al no conocerse K , ésta se reemplaza por el factor de retención k' que puede obtenerse a partir del cromatograma obtenido.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{K_2}{K_1}$$

con

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} = K \frac{V_e}{V_m}$$

donde t_r es el tiempo de retención del soluto estudiado y t_0 el tiempo de elución de un soluto no retenido en la columna cromatográfica.

Así, es posible calcular la resolución a partir de la ecuación:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \frac{K_1}{K_1 + \frac{V_m}{V_e}}$$

Por esta técnica, el valor de la relación de volúmenes móvil y estacionario varía de 0.25 a 1 cuando se tiene la FE entre el 80 y el 50 % de la columna. Esto hace que para obtener una buena resolución no se necesita una eficiencia muy grande.

En general, en CPC se trabaja con aproximadamente 500 platos teóricos y se busca que los coeficientes de distribución sean cercanos a la unidad, es decir, que se encuentren distribuidos en proporciones similares entre las dos fases.

Ginkgo biloba L.

La familia de los árboles de *Ginkgo* se representa por la única especie sobreviviente, el *Ginkgo biloba* L. (Gb).

El Gb, originario de China, Japón y Corea, es un árbol conocido desde hace muchos años y pertenece a la línea más antigua de las coníferas y se considera el enlace entre éstas y los árboles de tipo helecho⁶.

Debido a su gran longevidad, el árbol ha sido objeto de numerosos estudios, tanto para caracterizar sus componentes como por sus propiedades genéticas^{7, 8}.

Actividad biológica.

En la medicina herbolaria de China, existen documentos muy antiguos, en donde se hace referencia al uso de preparados de *Ginkgo*, pero es hasta 1960 que empieza el uso del extracto de las hojas de Gb (EGb) dentro de la medicina alemana⁹. Desde entonces, los estudios referentes al árbol se han concentrado en determinar su eficiencia como medicamento, así como en identificar sus componentes activos.

Efectivamente, se han hecho numerosos estudios de la posible actividad de los compuestos presentes en el árbol y se ha encontrado que éstos se encuentran fundamentalmente en las hojas.

La principal actividad del EGb es como antioxidante y se sabe que actúa a nivel de las plaquetas, es decir, inhibe la acción del PAF (factor de agregación plaquetaria)^{10, 11}. El extracto se ha administrado como medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la circulación, principalmente cardiovascular¹² y cerebral¹³, además de enfermedades relacionadas con la edad como el mal de Alzheimer¹⁴ y el mal de Parkinson⁹.

Otras actividades que se le atribuyen al EGb son antinecrótica¹⁵, anticoagulante¹⁶, antiinflamatoria¹⁷ e insecticida¹⁸.

El extracto de *Ginkgo biloba* también es muy utilizado en la industria alimentaria como aditivo¹⁹ y en la industria cosmética para la preparación de cremas antiarrugas, para el tratamiento contra la dermatitis²⁰, eczema y como crema

limpiadora, así como para la preparación de lociones capilares. Al respecto, se han registrado numerosas patentes, principalmente de Japón y de China^{21, 22, 23, 24}.

Extractos normalizados de *Ginkgo biloba L.*

El extracto de hojas de *Ginkgo biloba L.* (EGb) es muy utilizado, principalmente en Europa y en Asia e incluso se ha normalizado y se conoce con el nombre de EGb 761^{25, 26}. En principio, todos los medicamentos y todos los productos conteniendo al Gb, deben hacerse con este extracto normalizado.

Para preparar el EGb 761, las hojas secas del árbol se extraen con etanol acuoso (70 - 90 %) y posteriormente se purifican sobre una resina macroporosa (AB-8, S-8, SIP-1400, etc.) para obtener un extracto conteniendo 26 - 35 % de flavonoles glicosídicos y 4 - 6 % de lactonas triterpénicas. Se han reportado numerosos trabajos, e incluso patentes que describen la metodología para la obtención de este extracto^{27, 28}.

Debido a su gran aplicación para consumo humano, también se ha estudiado la toxicidad del EGb²⁹, encontrándose que ésta es muy baja en el extracto normalizado. Por otro lado, se han hecho estudios sobre los posibles efectos nocivos en la administración crónica del extracto y los resultados han demostrado que éstos son prácticamente nulos³⁰.

Constituyentes químicos.

Los principales constituyentes del extracto de las hojas de *Ginkgo biloba L.*, son los flavonoles glicosídicos y las lactonas triterpénicas, siendo éstas últimas las que poseen mayor actividad antioxidante.

Las principales lactonas triterpénicas, también conocidas como ginkgolidos son ginkgolido A, ginkgolido B, ginkgolido C, ginkgolido J, ginkgolido M y bilobalido²⁵. De estos compuestos, el más activo es el bilobalido seguido del ginkgolido B³¹. Su estructura se representa en la figura 5.

Se han hecho numerosos análisis para la determinación y cuantificación de estos compuestos y las técnicas empleadas han sido principalmente las cromatográficas como cromatografía de gases³², cromatografía en capa fina³³,

extracción con fluidos supercríticos³⁴ y la más utilizada, la CLAE en fase inversa. En éste caso, las fases móviles generalmente están formadas por metanol / agua, o bien, acetonitrilo / agua^{35, 36}.

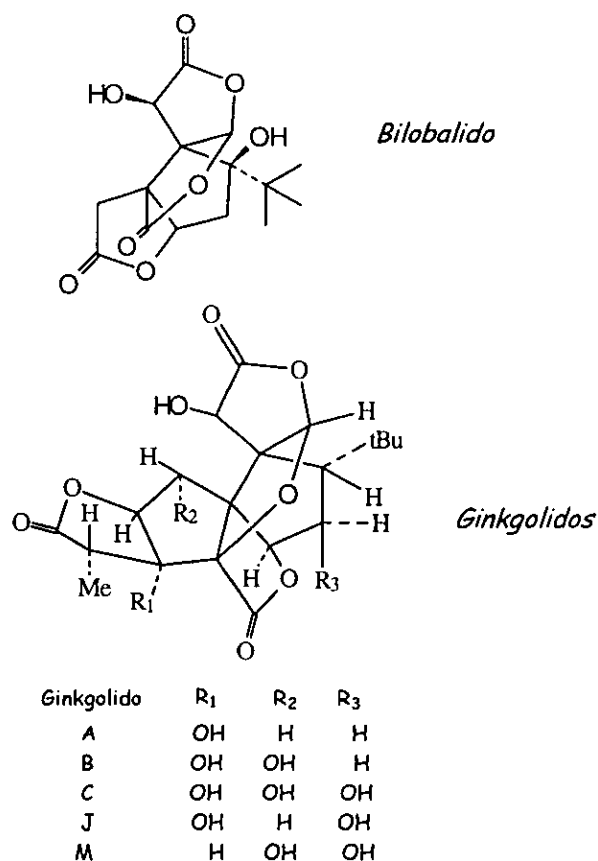


Figura 5. Estructura de las principales lactonas triterpénicas presentes en el extracto de hojas de *Ginkgo biloba L.*

Con respecto a los flavonoles, los compuestos mayoritarios son el Kaempferol y la Quercetina y se pueden encontrar como mono-, di- o tri-glicósidos de glucosa o de ramnosa³⁷. Otros flavonoles minoritarios son los derivados glicosídicos de la isoramnetina, miricetina y 3'-metilmiricetina. Estos compuestos pueden encontrarse también como ésteres del ácido cumárico. De todos ellos, los más activos son los derivados 3-O-glucósido del Kaempferol y de la Quercetina y presentan actividad

principalmente antiinflamatoria, aunque combinados con las lactonas triterpénicas presentan actividad antioxidante. La figura 6 muestra la estructura de los flavonoles mayoritarios.

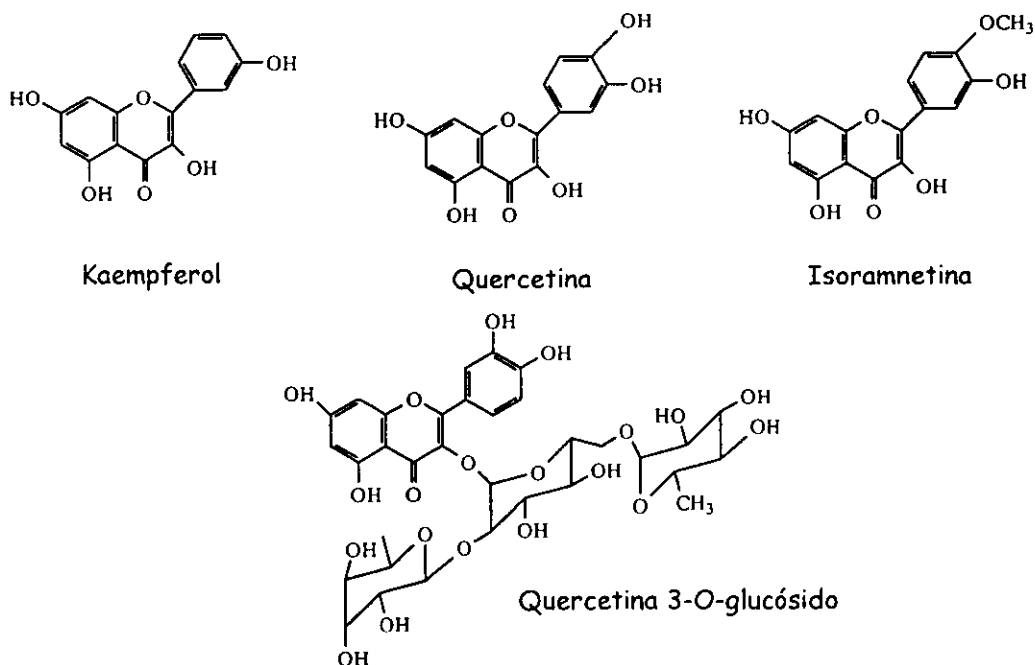


Figura 6. Estructura de los principales flavonoles presentes en el extracto de hojas de *Ginkgo biloba* L. Estos compuestos se encuentran mayoritariamente en forma glicosídica.

Dentro del grupo de los flavonoles, se encuentran en mucho menor proporción las biflavonas amentoflavona, bilobetina, ginkgetina, isoginkgetina, sciadopitisina y 5'-metoxibilobetina, siendo las más activas la amentoflavona y la bilobetina (figura 7). Actúan principalmente como antioxidantes, aunque su actividad es mucho menor que la de las lactonas triterpénicas.

Cabe mencionar que con la purificación descrita para la obtención del EGb 761 se eliminan las biflavonas del medio y los glicósidos obtenidos se consideran estables³⁸.

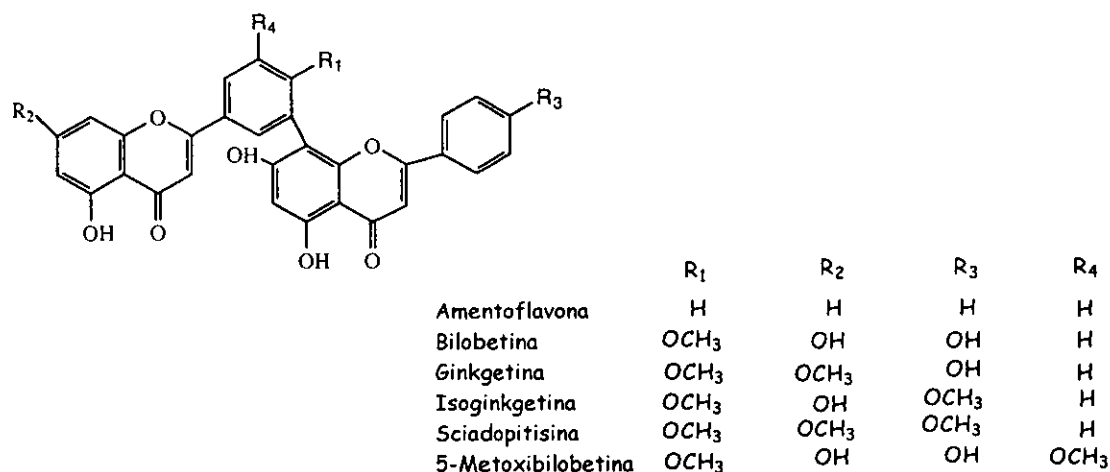


Figura 7. Estructura de las principales biflavonas presentes en el extracto de hojas de *Ginkgo biloba* L. También se encuentran en forma glicosídica principalmente.

La concentración total de los flavonoles glicosídicos se puede determinar por espectrometría ultravioleta. Sin embargo, con este método se ha encontrado una desviación relativa muy grande (más del 100 %), por lo que no se recomienda su uso³⁹. Este error tan grande se debe probablemente a la presencia de antocianidinas en el medio³⁸, lo que ocasiona que los compuestos se tengan que separar antes de poder cuantificarse.

Para separar y cuantificar a los flavonoles individuales del EGb, la técnica más utilizada ha sido la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).

Por CLAE, se han hecho estudios para elegir al mejor soporte a utilizar en la separación de estos compuestos. Por un lado, se han probado columnas de sílica gel, sílica ciano y sílica diol en fase normal, y por otro sílica C-8 y sílica C-18 en fase inversa. Los resultados indican que la separación se lleva a cabo satisfactoriamente con los soportes de sílica diol y sílica C-8 y C-18. Sin embargo, en fase normal únicamente se pueden separar los flavonoles libres (agliconas), mientras que en fase

inversa se pueden analizar tanto los flavonoles libres como los glicosídicos. Sobre soportes de sílica ciano no se logran separar estos compuestos⁴⁰.

En fase inversa, con columnas C-8, se usan mezclas de alcoholes de tres carbonos y éteres cíclicos como fases móviles. Por ejemplo, para separar algunos flavonoles libres, así como sus glicósidos, se ha utilizado una columna Aquapore C-8 RP 300 y fases móviles 2-propanol / agua (95-5 v/v, FMa) y THF / 2-propanol / agua (40-10-50 v/v/v FMb), con un gradiente de 20 % a 60 % de FMb en cuarenta minutos a un flujo de 2 mL/min⁴¹.

Con columnas C-18, que son las más comunes, las fases móviles generalmente son metanol / agua o acetonitrilo / agua en diferentes proporciones. Para mejorar la resolución, algunas veces se acidifica el medio; se ha reportado que se tiene una mejor separación si se usa ácido trifluoroacético (TFA) en lugar de ácido ortofosfórico o ácido acético⁴².

En la mayoría de los trabajos reportados, se ha utilizado gradiente de elución. Por ejemplo, todos los componentes presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Ginkgo biloba* se separaron sobre una columna Superspher 100 RP-18 utilizando un gradiente de elución acetonitrilo / solución acuosa de ácido ortofosfórico 0.01 N, partiendo de 10 % de acetonitrilo y llegando hasta 100 % en cincuenta minutos. En estas condiciones, se obtuvieron 16 compuestos que se clasificaron en: compuestos polares como ácidos fenólicos y kinurénicos, flavonoles glicosídicos, acilflavonoles glicosídicos y biflavonas⁴³.

El gradiente también se ha hecho utilizando tres disolventes, por ejemplo partiendo de 55 % de agua acidulada con 0.5 % de ácido ortofosfórico y partes iguales de una mezcla metanol-tetrahidrofurano (THF) y llegar hasta 30 % de la mezcla metanol-THF en 20 minutos, o bien, partiendo de 83 % de agua acidulada con 0.5 % de ácido ortofosfórico, 1.5 % de acetonitrilo y 15% de mezcla isopropanol-THF (25:65 v/v) y finalizando con 22 % de agua y 78 % de acetonitrilo en 30 minutos. El primer gradiente es principalmente para la separación de los flavonoles libres y el segundo para determinar los glicósidos de los flavonoles y de las biflavonas, así como de algunas de sus agliconas³⁸.

En cuanto a la detección, ésta es por Ultravioleta-visible a longitudes de onda de 330 a 370 nm en general, aunque es cada vez más usado el arreglo de diodos de 230 a 430 nm. Por otro lado, la espectrometría de masas por vaporización térmica "termospray" acoplado a la CLAE también se ha utilizado, sobre todo para la identificación de los compuestos separados⁴⁴.

Usando la cromatografía de partición centrífuga en sus versiones más antiguas⁴⁵ se han separado y/o purificado algunos flavonoles glicosídicos presentes en las hojas de *Gb*.

Como se había mencionado anteriormente, la CPC tiene su origen en el proceso de Craig. Usando este proceso, se han separado algunos flavonoles glicosídicos del extracto metanólico de las hojas de *Gb*, con el sistema bifásico agua / n-butanol. Sin embargo, en este caso la separación total de los compuestos se hizo por cromatografía en columna⁴⁶.

A partir del extracto purificado de hojas de *Gb*, se separaron los glicósidos 3-O-(6'''-*p* cumaroilglucopiranosil- β -1,4-ramnopiranosido) del kaempferol y de la quercetina por cromatografía a contracorriente de goteo (DCCC)[†], utilizando el sistema de disolventes cloroformo / propanol / metanol / agua (5:1:6:4 v/v/v/v) en modo ascendente, flujo de 14 mL/hora (300 tubos) y detección por análisis de 120 fracciones de 2 mL cada una⁴⁷.

Utilizando la Cromatografía a Contracorriente (CCC)[‡], se separaron los glicósidos 3-O-rutinósido del kaempferol y de la quercetina, usando agua como FE y gradiente de elución con AcOEt / 2-butanol. Ambos glicósidos eluyeron cuando la

[†] En DCCC se tiene una serie de tubos de vidrio unidos por un capilar de teflón. En los tubos se tiene la fase estacionaria, mientras que la fase móvil la va a atravesar. Como no existe fuerza de gravedad, los flujos que se manejan son muy pequeños (gota a gota) y por lo tanto, los tiempos de análisis son muy largos (de días).

[‡] La cromatografía a contracorriente (CCC), es una técnica muy parecida a la CPC y la diferencia radica en que la formación del campo gravitacional es por medio de dos bobinas, una de las cuales gira sobre ella misma, mientras que la otra gira alrededor de la primera y sobre sí misma, siguiendo el modelo del sistema planetario solar. En este caso, la fuerza gravitacional generada no es constante y adquirirá un valor diferente en cada punto del sistema.

proporción de cada disolvente de FM fue 6:4 (v/v). La detección se hizo por cromatografía en capa fina en fase inversa de las fracciones colectadas, utilizando como eluyente agua /acetonitrilo / ácido acético (7:3:1 v/v/v) y revelando con luz UV a 254 nm⁴⁸.

Con esta misma técnica, se separaron el Kaempferol, Isoramnetina y Quercetina del extracto de hojas de Gb, usando el sistema bifásico cloroformo/metanol/agua (4:3:2 v/v/v) y detección por CLAE en fase inversa. Los tres flavonoles en forma libre se obtuvieron con una pureza superior al 99%. La identificación de los compuestos se hizo por espectrometría de masas. El tiempo de análisis fue de cuatro horas^{49, 50}.

Como se puede observar, la CLAE es muy usada en el estudio de determinación de los flavonoles glicosídicos. Sin embargo, únicamente se tienen cuatro trabajos en donde se reporta el uso de técnicas similares a la CPC y hasta donde se hizo esta revisión, no se encontró ningún trabajo en donde se utilice la Cromatografía de Partición Centrífuga propiamente dicha para la separación de estos compuestos.

PARTE EXPERIMENTAL

Material y equipo.

Todos los disolventes utilizados fueron grado HPLC o bien grado reactivo de Baxter, Prolabo, EM Science e INDEQ.

Algunas veces se utilizaron disolventes grado técnico y en ese caso se destilaron previamente.

El estándar de Kaempferol fue de Sigma-Aldrich (E. U.).

Las tabletas utilizadas fueron Tanakan (Química Knoll de México, S.A. de C. V.). Cada tableta contiene 40 mg de extracto de hojas de *Ginkgo biloba L.* (Gb) equivalente a 9.6 mg de flavonoles glicosídicos calculados como Quercetina y Kaempferol.

Las cápsulas utilizadas fueron Ginko Yang (Salud Natural Mexicana S. A de C. V.). Cada cápsula contiene 40 mg de extracto de *Ginkgo biloba L.* (Gb) equivalentes al 24 % de flavonoles glicosídicos y 6 % de lactonas triterpénicas.

Para la Cromatografía en Capa Fina, se usaron cromatofolios de silica gel 60 F₂₅₄ con un espesor de capa de 0.2 mm de Merck (Alemania).

Para la separación por CLAE se utilizó un cromatógrafo de líquidos Waters (E. U.) Modelo 2487, equipado con dos bombas Modelo 515, inyector de válvula Rheodine con bucle de inyección de 20 µL y detector UV-Visible Modelo 2487.

En la separación por CPC se utilizó el mismo equipo, solo que la columna fue un cromatógrafo de partición centrífuga de Sanki Engineering, LTD (Kioto Japón), con un volumen total de 230 mL. El bucle de inyección en este caso fue de 0.3 mL.

Preparación del extracto.

El extracto se preparó añadiendo 50 mL de una mezcla de etanol (EtOH) y H₂O (70-30 v/v) a 5 tabletas de Tanakan previamente pulverizadas, o bien, 5 cápsulas de Ginkgo Yang. La mezcla se dejó 12 horas en agitación, al término de este tiempo el extracto se filtró y se evaporó a temperatura ambiente a sequedad, para después disolverlo en un volumen de 2 mL de la fase móvil (FM) utilizada para CPC, o bien 25 mL de mezcla Acetonitrilo - Agua 1:1 para CLAE.

Análisis por CLAE

Para la separación, se usó una columna C₁₈ Hypersil Elite (150 x 4.6 mm d. i.) con tamaño de partícula de 5 µm. El flujo fue de 1 mL/min y la detección UV a 300 nm.

La elución se hizo por gradiente de agua y acetonitrilo, el cual se detalla en la Tabla I. En algunos casos, a cada uno de los disolventes se les agregó ácido trifluoroacético (TFA) 0.05 %.

TABLA I. Gradiente de elución para el análisis por CLAE del extracto de Gb.

Tiempo (minutos)	Agua (%)	Acetonitrilo (%)
0	95	5
5	95	5
15	80	20
20	70	30
25	20	80
27	10	90
30	0	100

Análisis por CPC

Por CPC se hicieron dos análisis diferentes, uno isocrático y otro con gradiente de elución.

Modo isocrático

En modo isocrático se utilizó el sistema bifásico acetato de etilo (AcOEt) / EtOH / H₂O 2:1:2 (v/v/v).

Para preparar el sistema, la columna se llenó con 50 % de cada una de las fases formadas a un flujo de 10 mL/min, con el rotor apagado y se dejó que eluyeran 100 mL para verificar que la relación de fases fuera la misma. Posteriormente, el flujo se paró y el rotor se puso a una velocidad (ω) de 1200 rpm. Una vez alcanzada esta velocidad, se hizo pasar la FM (fase acuosa) en modo descendente a un flujo de 5 mL/min y se inyectaron a través de de la válvula Rheodine 0.3 mL de muestra.

Para la detección, se colocó una válvula divisoria (1:10) entre la salida de la columna y la entrada del detector UV-Vis. Este se mantuvo a 300 nm durante el análisis. Por otro lado, se colectaron fracciones de 15 mL de eluyente para posterior análisis por CLAE.

En algunos casos la detección se hizo fuera de línea por Cromatografía en Capa Fina (CCF) sobre placas de Silica Gel usando como eluyente AcOEt / EtOH (70:30 v/v).

Gradiente de elución.

En este caso se utilizaron las siguientes fases:

- * Fase estacionaria (FE): Agua saturada con n-Hexano (n-Hex), AcOEt e isobutanol (i-BuOH).
- * Fase móvil inicial (FMi): Mezcla Hex / AcOEt (50:50 v/v), conteniendo i-BuOH (20 mL/litro de mezcla) y saturada con agua.
- * Fase móvil final (FMf): i-BuOH conteniendo n-Hex y AcOEt (10 mL de cada disolvente por litro de alcohol) y saturado con agua.

Todas las fases contenían 0.5 % de TFA.

El gradiente de elución se detalla en la Tabla II.

TABLA II. Gradiente de elución para el análisis por CPC del extracto de Gb

Tiempo (minutos)	Flujo (mL/min)	% FMi	% FMf
0	4	98	2
30	4	98	2
60	4	70	30
90	4	50	50
120	4	30	70
150	4	20	80

Para preparar el sistema, la columna se llenó con 80 % de FE y 20 % de FMi a un flujo de 10 mL/min, con el rotor apagado y se dejó que eluyeran 100 mL para verificar que la relación de fases fuera la misma. Posteriormente, el flujo se paró y el rotor se puso a una velocidad de 1200 rpm. Una vez alcanzada esta velocidad, se hizo pasar la FMi en modo ascendente a un flujo de 4 mL/min y se procedió a inyectar la muestra.

Cuando el volumen de muestra fue pequeño (0.3 mL), la inyección se hizo a través de la válvula Rheodine. Cuando el volumen fue mayor (5 mL), la muestra se introdujo directamente a través de la bomba, utilizando otra vía (vía C). En este caso, una vez equilibrada la columna el flujo se puso a 1 mL/min y se hizo pasar la muestra seguida de la FMi manteniéndose el mismo flujo por cinco minutos más (tiempo de inyección). Pasado ese tiempo se inició el gradiente de elución.

Para la detección, se colocó una válvula divisoria (1:10) entre la salida de la columna y la entrada del detector UV-Vis. Este se mantuvo a 300 nm durante el análisis. Por otro lado, se colectaron fracciones de 15 mL de eluyente para posterior análisis por CLAE.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Para establecer las condiciones de separación, era necesario obtener primero el extracto de *Ginkgo biloba L.* Es por eso que este estudio se empezó determinando las mejores condiciones de extracción de los flavonoles presentes en los comprimidos de Ginko Yang.

Preparación del Extracto.

La primer mezcla de disolventes a estudiar fue AcOEt / EtOH / H₂O 2:1:2 (v/v/v), ya que éste es uno de los sistemas bifásicos que se recomiendan en la literatura⁵¹ para la separación de flavonoles. El contenido de dos cápsulas de Ginko Yang se puso en agitación con 15 mL de esta mezcla durante 20 horas. Después, cada una de las fases se analizó por CCF utilizando como revelador Iodo (revelador universal, manchas cafés), o una disolución etanólica de AlF₃ al 1 % y posterior detección UV a 365 nm (revelador específico de flavonoles, manchas amarillas o anaranjadas fluorescentes). Con ambos reveladores se obtuvieron resultados idénticos y mientras en la fase inferior se vieron cinco manchas, en la fase superior únicamente se vieron las tres últimas (valores promedio de R_f de 0.03, 0.08, 0.15, 0.74 y 0.78 usando como eluyente n-Hex / AcOEt (30:70)). Posiblemente, los compuestos con valores de R_f mayores eran los flavonoles en forma libre y los de R_f menores sus glicósidos. De esta manera, supimos que en el extracto había por lo menos cinco flavonoles diferentes. Cabe mencionar que las lactonas triterpénicas no se observan con los reveladores utilizados.

Como en la literatura se menciona que el EGb se obtiene a partir de una mezcla de EtOH / H₂O, se preparó un extracto en las mismas condiciones que en el caso anterior sólo que esta vez con etanol - agua en proporciones 70:30 (v/v). Los resultados obtenidos fueron muy parecidos en ambos casos. De esta forma, nos aseguramos de que con el sistema bifásico anterior, se extraían los mismo componentes que con la mezcla EtOH / H₂O.

Por desgracia, la determinación del tiempo ideal de agitación para la obtención del extracto no se pudo seguir por CCF, ya que se necesitaba tener una idea

más cuantitativa de la extracción. No obstante, agitando a diferentes tiempos (1, 2, 6, 12 y 24 horas), el número de componentes detectados siempre fue el mismo.

Análisis por CPC.

Una vez sabiendo que los compuestos presentes en el extracto de *Ginkgo biloba* se podían extraer en el sistema bifásico utilizado, se procedió a intentar su separación por CPC.

Pensando que los flavonoles glicosídicos eran polares y suponiendo que éstos permanecerían únicamente en la fase inferior (en base a los resultados obtenidos en CCF), se eligió usar primero a la fase orgánica como fase móvil (modo de elución ascendente) para permitir que los compuestos de nuestro interés pudieran separarse adentro de la columna cromatográfica y después de determinado tiempo, invertir las condiciones de elución (FM acuosa, modo de elución descendente) para poderlos sacar del sistema cromatográfico. Puesto que en un sólo análisis las dos fases iban a ser utilizadas como FM, se decidió que el volumen de cada una de ellas fuera igual en el interior de la columna cromatográfica (115 mL). Se inyectaron 0.3 mL del extracto obtenido en las condiciones descritas anteriormente y en la figura 8 se presenta el cromatograma obtenido.

Se observó que en la muestra inyectada había por lo menos seis compuestos, uno más que los observados por CCF. Sin embargo, para nuestra sorpresa, cuatro de ellos (incluido el compuesto mayoritario) eluyeron en MA y no en MD, como habíamos supuesto.

Así pues, decidimos cambiar el modo de elución, empezando en modo descendente (FM acuosa) y después de 90 minutos invertir a modo ascendente (FM orgánica). Se inyectaron 0.3 mL de extracto y en este caso observamos que en él había más de seis componentes (figura 9). Los valores de k' calculados para cada modo se resumen en la Tabla III.

Puesto que los componentes del extracto se separaron mejor en MD, se decidió utilizar este modo.

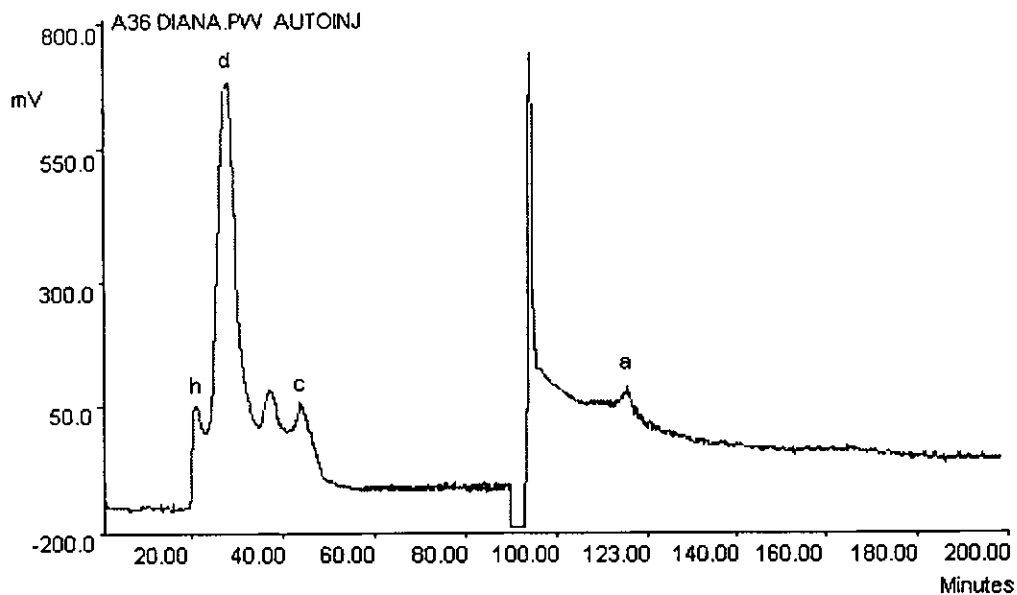


Figura 8. Separación cromatográfica del extracto de Ginko Yang (0.3 mL). Sistema bifásico AcOEt/EtOH/Agua (2:1:2). Detección UV-Vis a 300 nm, flujo de 5 mL/min, volúmenes de FE y de FM de 115 mL c/u. Modo de elución ascendente ($\omega = 1800$ rpm, $P = 725$ lb/plg²), inversión a los 90 minutos ($\omega = 1500$ rpm y $P = 802$ lb/plg²).

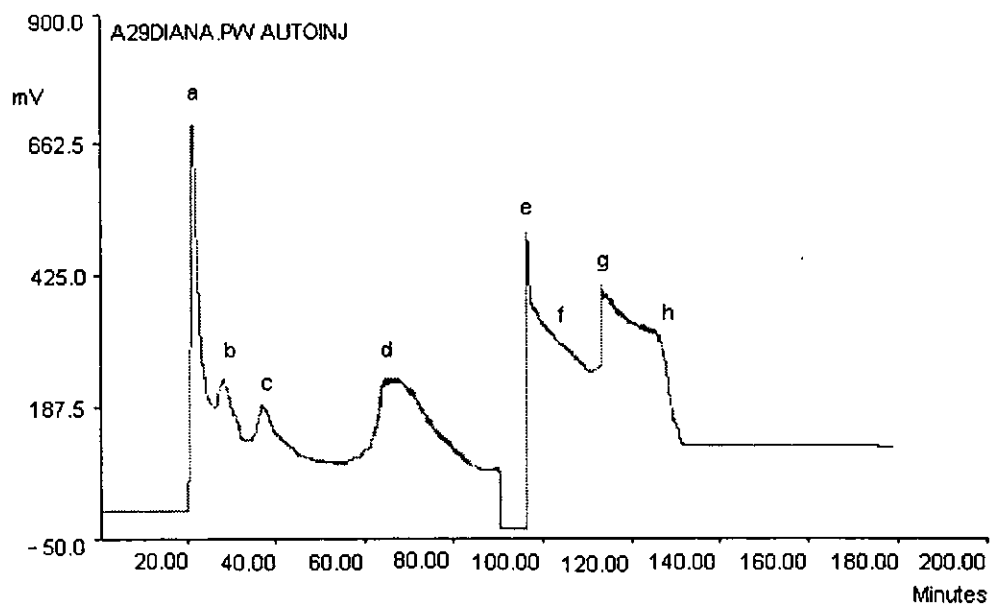


Figura 9. Separación cromatográfica del extracto de Ginko Yang (0.3 mL). Sistema bifásico AcOEt/EtOH/Agua (2:1:2). Detección UV-Vis a 300 nm, flujo de 5 mL/min, volúmenes de FE y de FM de 115 mL c/u. Modo de elución descendente ($\omega = 1500$ rpm, $P = 1085$ lb/plg²), inversión a los 90 minutos ($\omega = 1800$ rpm y $P = 924$ lb/plg²).

TABLA III. Tiempos de retención de las separación del extracto en modo descendente y en modo ascendente.

<i>Modo Descendente</i>			<i>Modo Ascendente</i>		
<i>Pico</i>	t_R (min)	k'	t_R (min)	k'	$1/k'$
1	20.5	0.0	20.2	0.0	119.0
2	27.4	0.4	26.9	0.3	2.9
3	37.6	0.9	37.0	0.8	1.2
4	66.7	2.3	42.9	1.1	0.9
5	94.0		93.3		
6	104		114		
7	113				
8	127				

Con el fin de permitir que los compuestos más apolares se separaran mejor, se dejó más tiempo la elución en modo descendente antes de invertirla. Sin embargo, los resultados no mejoraron mucho, por lo que se decidió fijar este tiempo en noventa minutos.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo, se procedió a estudiar la estabilidad del extracto en solución. Para ello, una misma muestra se inyectó durante varios días y el perfil cromatográfico fue muy parecido en todos los casos, es decir, siempre se obtuvo el mismo número de componentes y las variaciones en tiempo de retención y área de cada pico no fueron muy grandes (figura 10), significando esto que los compuestos presentes en el extracto son estables en el medio por varios días (0 a 6 días). Cabe destacar que el extracto se guardó al abrigo de la luz y en refrigeración

El siguiente paso fue determinar si el tiempo de agitación para la obtención del extracto influía sobre el número y cantidad de los componentes presentes en él. Se procedió a obtener los extractos con diferentes tiempos de agitación (2 a 24 horas), manteniendo las demás variables constantes. En este caso, cada muestra analizada presentó resultados diferentes. Al principio se creyó que verdaderamente influía el tiempo de agitación en la obtención del extracto y en este caso lo que se esperaba sería que el área de los picos fuera mayor o bien, que hubiera aparición de

unos componentes a la vez que desaparecían otros, lo que indicaría descomposición de la muestra. Sin embargo, esto no fue lo que se observó, ya que para unas muestras aparecían más picos que para otras, pero los resultados siempre fueron al azar. Con respecto a las áreas, estas también cambiaron de muestra a muestra, aún cuando éstas tuvieran el mismo número de componentes.

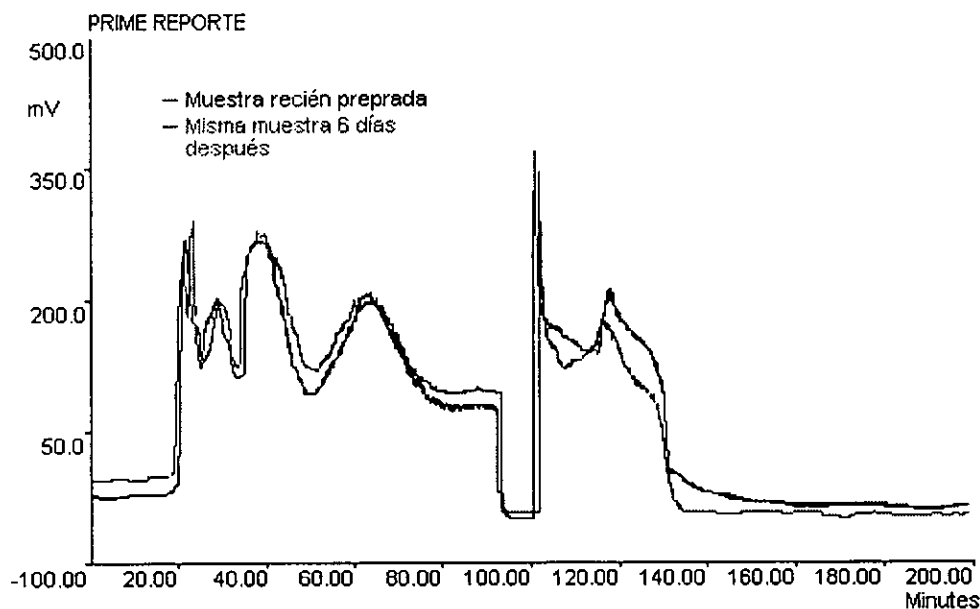


Figura 10. Separación de un extracto de Ginko Yang en diferentes días. Condiciones cromatográficas descritas en la figura 9.

Para ver si efectivamente la composición del extracto obtenido dependía del tiempo de agitación, se inyectaron varias muestras obtenidas exactamente en las mismas condiciones: 4 cápsulas se pusieron en agitación con 50 mL del sistema bifásico durante 11 horas a temperatura ambiente. Lamentablemente, los resultados obtenidos mostraron variaciones de muestra a muestra, aún cuando se puso especial atención en su preparación y análisis (figura 11).

La mayoría de los trabajos reportados en la literatura mencionan que trabajan en condiciones ácidas. Para ver si nuestros resultados se debían a que no trabajamos en estas condiciones, se decidió agregar ácido acético al sistema bifásico

(0.1 % a 10 %) y los resultados fueron los mismos: se tuvieron variaciones de muestra a muestra.

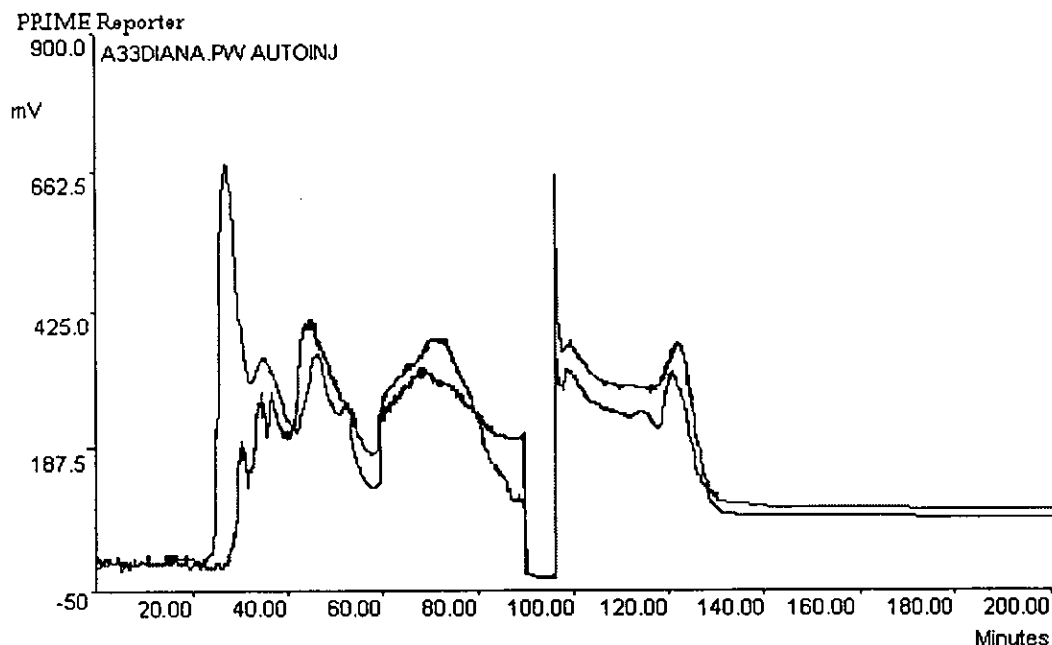


Figura 11. Separación de diferentes extractos de Ginkgo Yang. Condiciones cromatográficas descritas en la figura 9.

No obstante, bajo todas las condiciones que se trabajó, el perfil cromatográfico fue similar, lo que indicaba que los componentes presentes eran del mismo tipo, pero en diferente concentración.

La variación de los resultados podía deberse a dos cosas: a la degradación de los componentes en el sistema bifásico utilizado o bien, a que el contenido de extracto en cada cápsulas era diferente, siendo esto último lo más probable.

Gradiente de elución.

Para verificar que la variación de resultados no se debía al sistema bifásico, se utilizó otro sistema de disolventes. Puesto que en el extracto hay compuestos tanto de naturaleza polar como apolar, se decidió hacer un gradiente de elución. Para ello, las fases utilizadas fueron las siguientes:

- * Fase estacionaria (FE): Agua saturada con n-hexano (n-hex), AcOEt e isobutanol (i-BuOH).
- * Fase móvil inicial (FM_i): Mezcla n-Hex / AcOEt (50-50) conteniendo unas gotas de i-BuOH y saturada con agua.
- * Fase móvil final (FM_f): i-BuOH conteniendo unas gotas de n-hex, AcOEt y saturado con agua.

Todas las fases contenían TFA al 0.5 % con el fin de mantener el medio ácido.

Puesto que únicamente se iba a usar un modo de elución (modo ascendente), nos convenía tener la mayor cantidad de FE al interior de la columna. Se decidió entonces empacarla con 80% de esta fase (180 mL) y trabajar a una velocidad de rotación (ω) de 1200 rpm. Para evitar problemas de presión, principalmente causadas por el i-BuOH, se decidió disminuir el flujo a 4 mL/min.

En un principio se hicieron diversos gradientes con estos disolventes en ausencia de n-hexano, pero los compuestos salían muy rápido aún con AcOEt solo. Es por eso que se decidió agregar un disolvente más apolar al medio para mejorar la separación y los mejores resultados se obtuvieron con el gradiente que se detalla en la Tabla IV. Las condiciones de separación se buscaron utilizando siempre el mismo extracto. Los resultados se muestran en la figura 12, en donde se observan nueve componentes. El análisis se hizo varias veces con el mismo extracto y los resultados fueron muy parecidos. Sin embargo, al inyectar otro extracto obtenido en las mismas condiciones, se siguieron teniendo variaciones, significando esto que dichas variaciones provenían de las cápsulas mismas.

Se decidió entonces cambiar la muestra por pastillas de Tanakan, que al ser de origen alemán pensamos podían ser más homogéneas en su contenido y para determinar esto usamos la CLAE, que es la técnica más reportada en el estudio de los flavonoles presentes en los extractos de *Ginkgo biloba L.*

TABLA IV. Gradiente de elución para el análisis por CPC del extracto de Ginko Yang. La composición de las fases estacionaria y móviles se describe en el texto.

Tiempo (minutos)	% FM _r
0	2
30	2
60	30
90	50
120	70
150	80

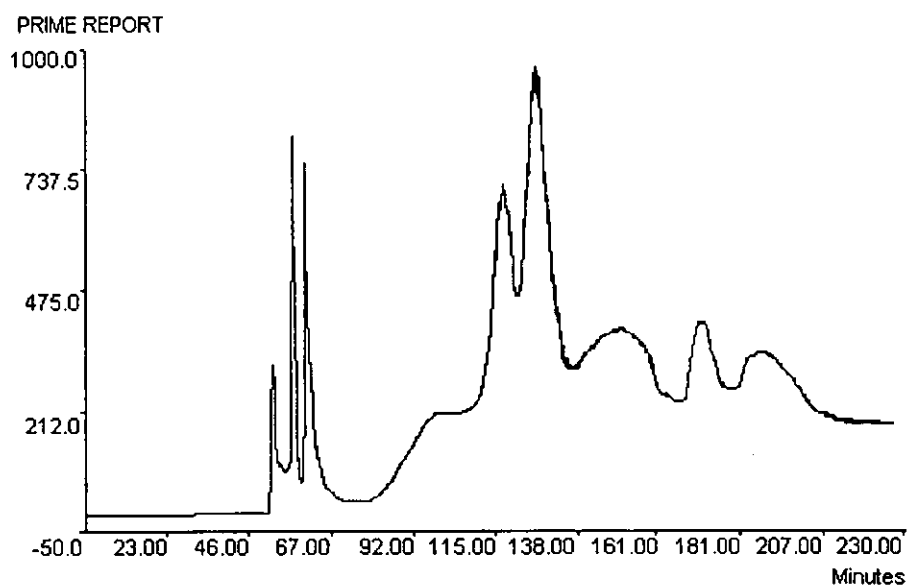


Figura 12. Separación por CPC del extracto de Ginko Yang con gradiente de elución. Detección UV-Vis a 300 nm, F = 4 mL/min, ω = 1200 rpm. V_s = 180 mL, V. de inyección = 0.3 mL. Para obtener el extracto, 15 cápsulas se agitaron con 150 mL del sistema bifásico AcOEt/ EtOH / H₂O durante 20 horas. Después, se evaporó el disolvente a sequedad a temperatura ambiente y presión reducida. El residuo se dividió en varias fracciones que se guardaron en refrigeración y antes de ser analizadas se disolvieron en las fases móviles utilizadas.

Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.

Como se mencionó anteriormente, la CLAE es una de las técnicas de separación más reportadas para este tipo de compuestos. En la mayoría de los casos, el análisis se hace sobre fase inversa y gradiente de elución agua - acetonitrilo.

Para este trabajo, se eligió una columna C-18 con gradiente de elución agua / acetonitrilo (ACN) en condiciones ácidas.

Para obtener el extracto, 2 pastillas de Tanakan se pusieron en 15 mL de la mezcla AcOEt/EtOH/H₂O 2:1:2 (v/v/v) y se agitaron durante 20 horas a temperatura ambiente. Después de filtrar y evaporar el disolvente a temperatura ambiente y presión reducida, el residuo se disolvió en 5 mL de acetonitrilo y esta muestra se estudió por CLAE.

Con el fin de encontrar las mejores condiciones de separación se realizaron diferentes gradientes de elución. En la figura 13 se muestran algunos de los cromatogramas obtenidos y en la Tabla V los correspondientes tiempos de retención. Se observó que la mejor separación se obtuvo con el gradiente C, sobre todo para los compuestos mayoritarios que supusimos eran los glicósidos de Quercetina y Kaempferol.

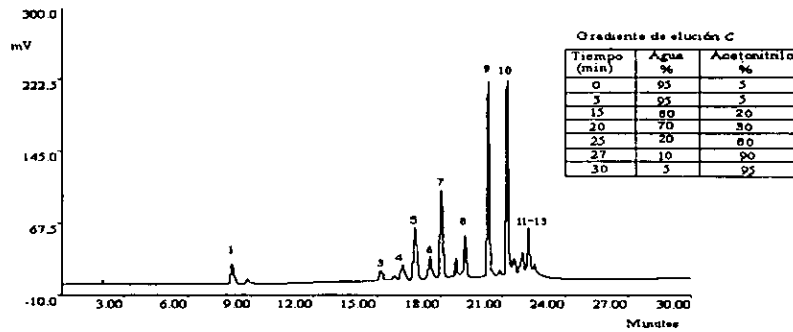
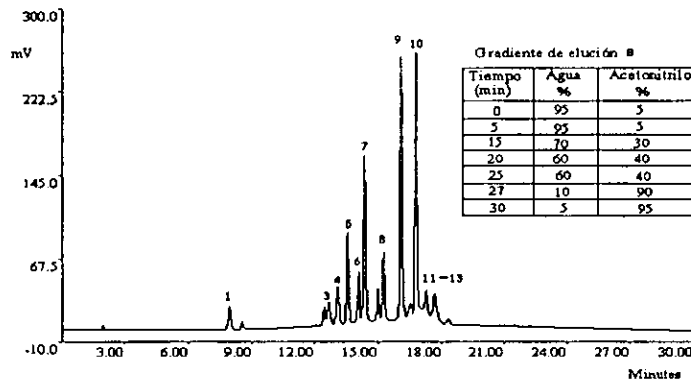
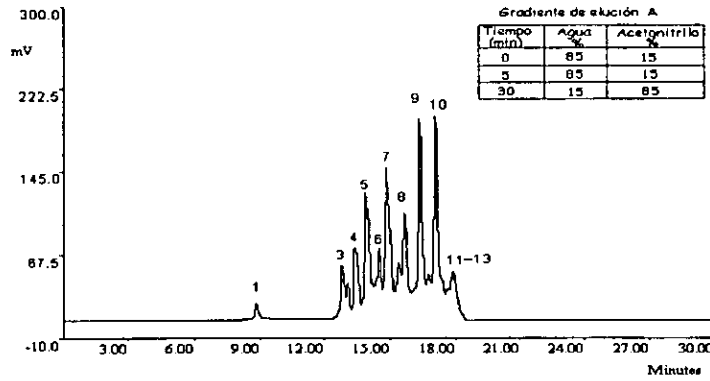


Figura 13. Separación por CLAE del extracto de Tanakan utilizando diferentes gradientes de elución. Tanto el agua como el acetonitrilo se acidularon con 0.05 % de ácido trifluoroacético. Flujo de 1 mL/min, detección UV-Vis a 300 nm, volumen de inyección de 20 µL. Los picos 9 y 10 representan a los flavonoles glicosídicos mayoritarios.

TABLA V. Tiempos de retención de los picos obtenidos con los diferentes gradientes de elución (figura 13) para el extracto de Ginko Yang, (* representa a los flavonoles mayoritarios).

Pico	Gradiente A t_R (min)	Gradiente B t_R (min)	Gradiente C t_R (min)
1	8.90	7.90	7.90
3	12.89	12.60	15.23
4	13.59	13.12	16.40
5	14.00	13.68	16.88
6	14.53	14.00	17.57
7	14.76	14.53	18.04
8	15.70	15.23	19.21
9*	16.40	16.17	20.39
10*	17.10	16.88	21.32
11	18.04	17.34	21.56
12		17.57	22.03
13			22.26

Una vez determinadas la condiciones de separación y para asegurarnos que los compuestos de interés se extraían con el sistema bifásico utilizado hasta ahora, se hicieron varios extractos con una mezcla de EtOH / Agua 70-30 (v/v), que es la más recomendada en la literatura. Por otro lado, las extracciones también se hicieron con AcOEt / EtOH 70:30 (v/v) que tiene un carácter menos polar. En la figura 14 se presentan los cromatogramas obtenidos para cada uno de los extractos estudiados. Sobre esta figura se observa que efectivamente, la mejor extracción se obtiene con la mezcla EtOH / Agua, mientras que con la mezcla AcOEt / EtOH la extracción de los componentes es mucho menor (figura 14 a). Estos resultados se pueden explicar porque el acetato de etilo hace que la mezcla de disolventes tenga carácter apolar y los compuestos de nuestro interés son polares, por lo que el rendimiento de extracción disminuye o bien, los compuestos no se extraen.

Con respecto a los resultados obtenidos con el extracto de EtOH / Agua y con el del sistema bifásico AcOEt / EtOH / Agua, se observa que la extracción es mejor para la primer mezcla. Sin embargo, la diferencia observada con los compuestos mayoritarios no es mucha (figura 14 b).

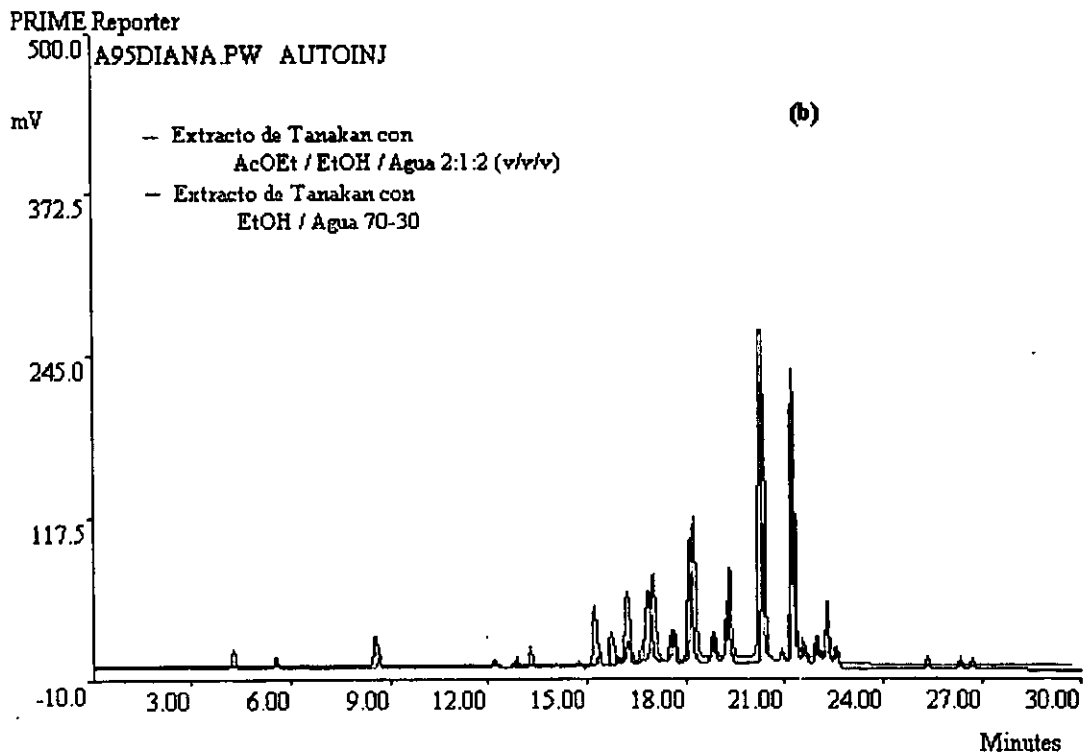
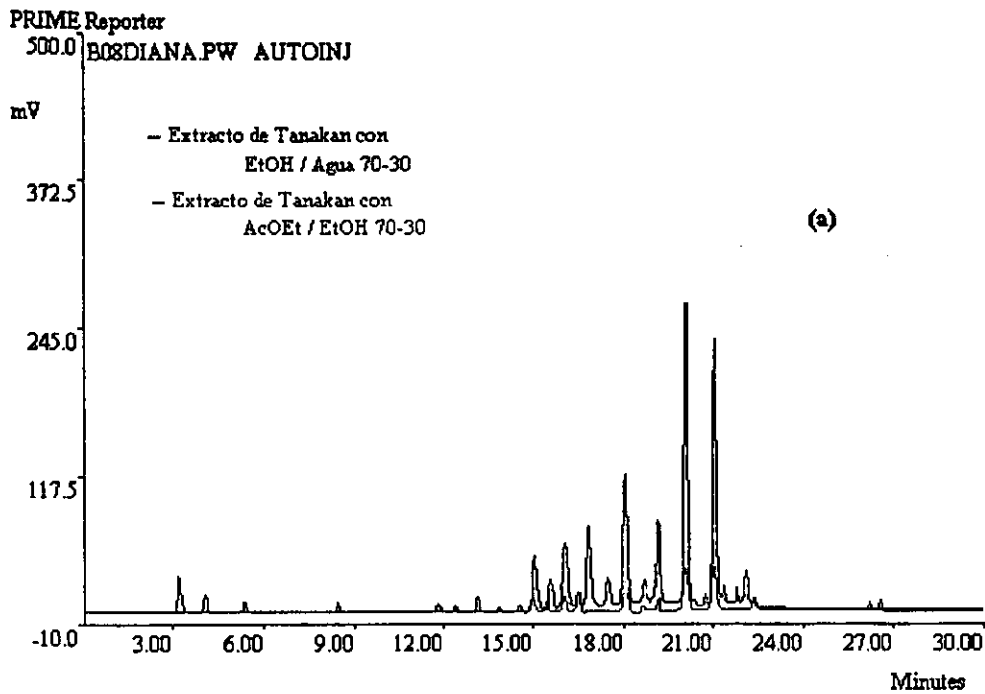


Figura 14. Separación por CLAE de extractos de *Ginkgo biloba*. Los extractos se obtuvieron agitando 2 pastillas de Tanakan en 30 mL de la mezcla de disolventes estudiada por una hora. Condiciones cromatográficas descritas en la parte experimental.

Por otro lado, para comprobar que el extracto no se hidrolizaba durante el estudio y que no se tenían los flavonoles en forma libre (agliconas), se procedió a inyectar un estándar de Kaempferol con el gradiente C. En estas condiciones el compuesto tuvo un tiempo de retención de 23.6 minutos que, como se observa en la figura 15, no corresponde a ningún componente presente en el extracto estudiado. La muestra se guardó en refrigeración por 6 días y después se volvió a inyectar y los resultados fueron similares, con lo que se concluyó que los glicósidos efectivamente no se hidrolizan en las condiciones de trabajo.

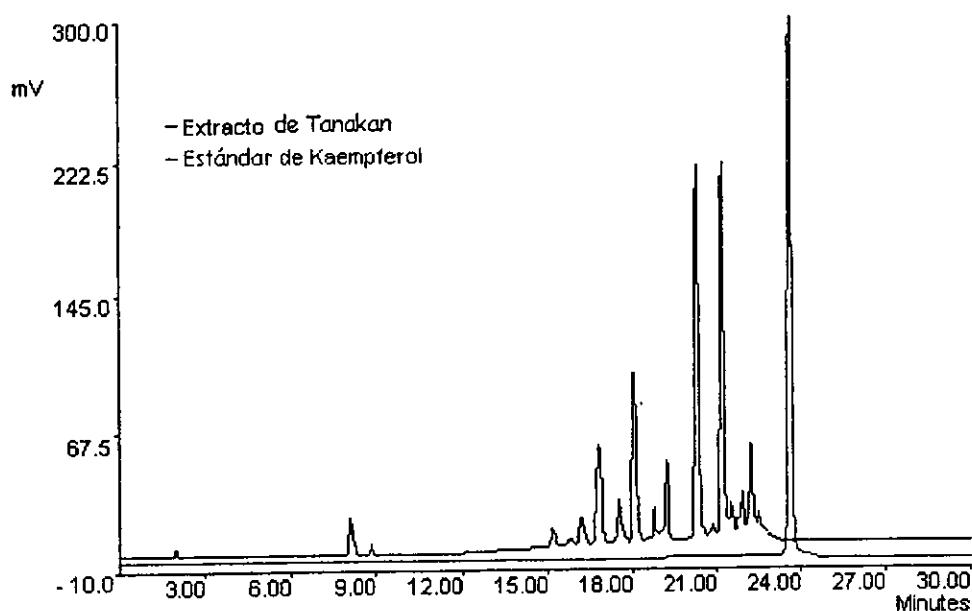
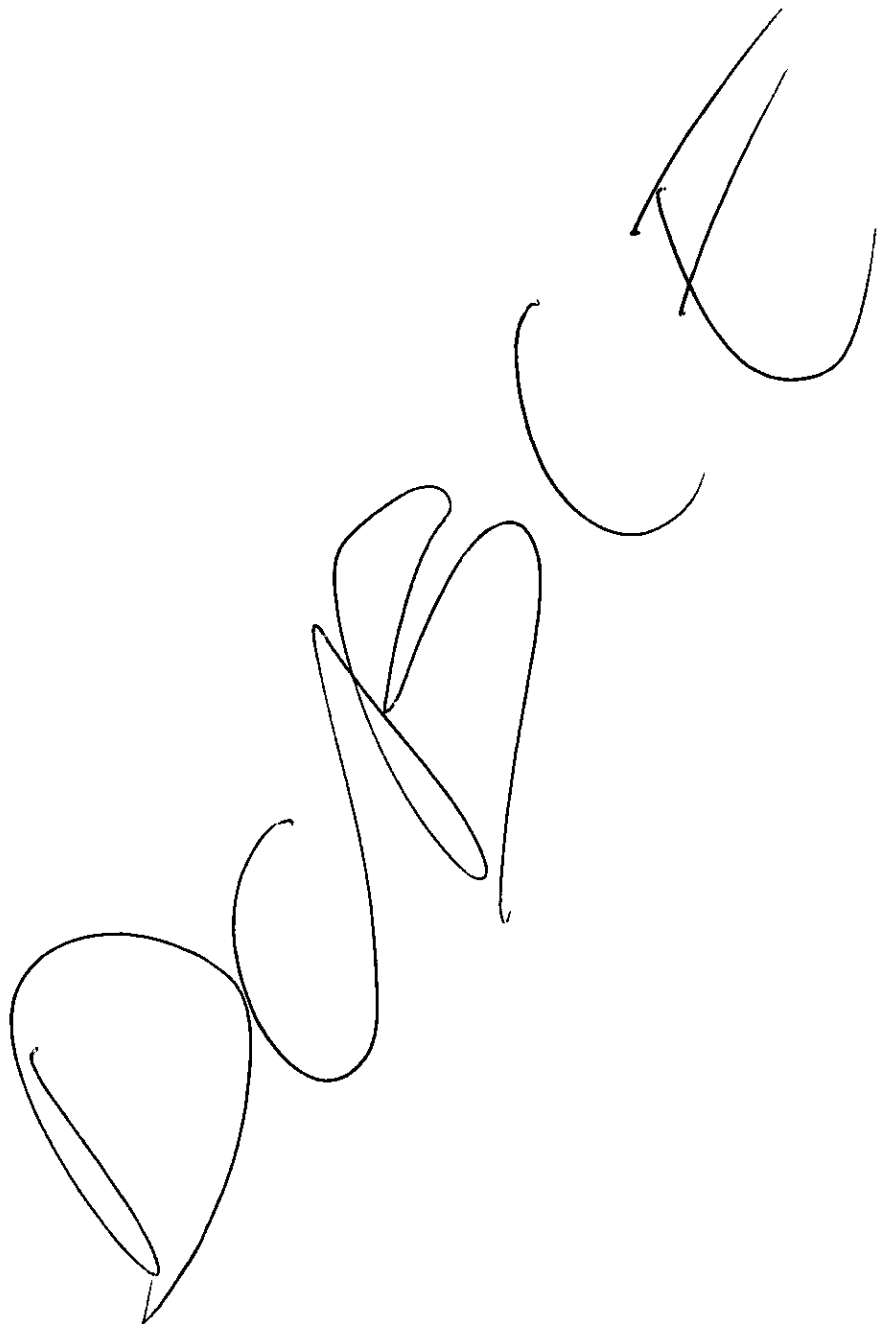


Figura 15. Cromatogramas del extracto de pastillas de Tanakan y del estándar de Kaempferol disueltos en mezcla agua - acetonitrilo 1:1. Condiciones cromatográficas descritas en la parte experimental (gradiente C).

Cabe señalar que los extractos obtenidos a partir de cápsulas de Ginko Yang si contuvieron la aglicona libre y que el porcentaje de éste variaba de extracto a extracto.

Para cada parámetro estudiado, se analizaron muestras obtenidas con pastillas de diferentes lotes de Tanakan y en ningún caso vimos variación de los resultados al emplear las mismas condiciones.



Entonces concluimos que no se trata de las condiciones experimentales, sino de las cápsulas de Ginko Yang.

Es por eso que el estudio por CPC finalmente se hizo utilizando pastillas de Tanakan.

Extracto de Tanakan, separación por CPC

A partir de los resultados obtenidos por CLAE, se supo que en el extracto de las cápsulas de Ginko Yang se tenían los flavonoles libres y en forma glicosídica. Esto puede explicar que al separarlos por CPC se tuviera que trabajar en modo dual de elución. Sin embargo, con los extractos de pastillas de tanakan únicamente se tenían los glicósidos y usando el sistema bifásico AcOEt / EtOH / H₂O 2:1:2 los resultados no fueron satisfactorios. Es por eso que se decidió que la separación se hiciera con gradiente de elución, utilizando las mismas condiciones que para el extracto de Ginko Yang (Tabla V).

Puesto que la finalidad de este trabajo era obtener un método de separación de los flavonoles mayoritarios a nivel preparativo, se decidió preparar un extracto con 15 pastillas de Tanakan en 150 mL de disolvente. Después de evaporar el disolvente, el residuo se redisolvió en 10 mL de mezcla de AcOEt / i-BuOH 50-50 y la disolución resultante se introdujo al sistema cromatográfico.

Puesto que el volumen inyectado era muy grande, éste se introdujo a través de una vía de las bombas. Para ello, una vez estabilizado el sistema cromatográfico (condiciones descritas en la figura 12), se bajó el flujo a 1 mL/min y se introdujo la muestra (5 minutos), pasándose después la FMI a este mismo flujo durante 5 minutos más, lo que hizo que el volumen inyectado fuera de 5 mL. Después de este tiempo, se inició el gradiente de elución en las condiciones descritas anteriormente. Lo anterior fue necesario, porque de haberlo hecho al flujo de 4 mL/min, la FE hubiera eluido junto con la FM y consecuentemente la separación no se hubiera llevado a cabo.

Como se trabajó con grandes cantidades de muestra, el detector UV-Vis se saturó, no obstante, se lograron distinguir por lo menos cuatro compuestos diferentes sobre el cromatograma (figura 16). Se decidió entonces colectar diferentes fracciones (fracciones I a VI) y después de evaporar el disolvente a presión reducida

y temperatura ambiente, el residuo analizarlo por CLAE bajo las condiciones anteriormente descritas.

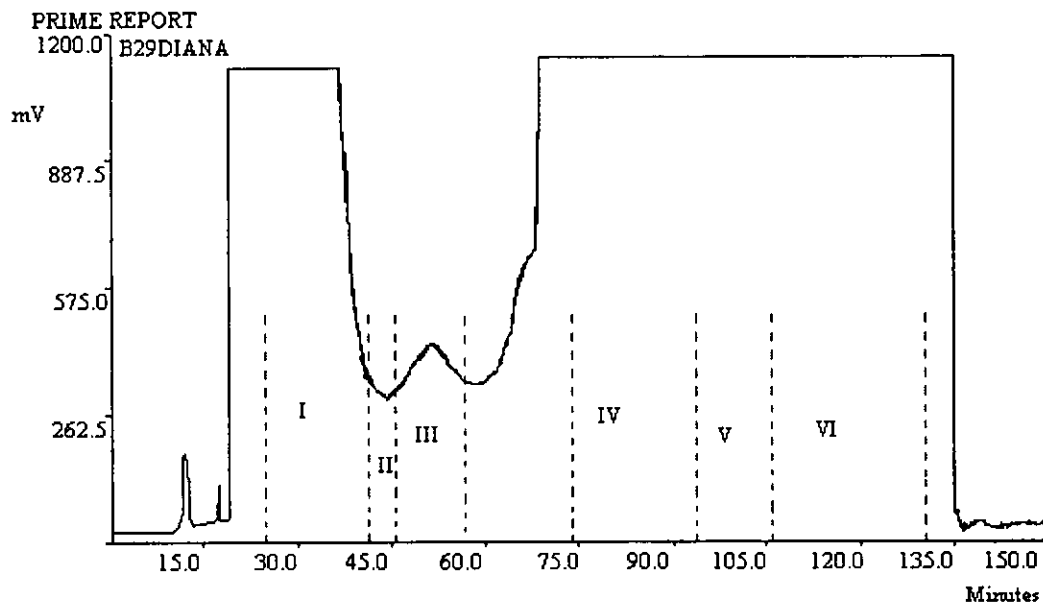


Figura 16. Separación por CPC del extracto de Tanakan con gradiente de elución. Detección a 300 nm, $F = 4$ mL/min, $\omega = 1200$ rpm. $V_s = 180$ mL, V_i de inyección = 5 mL. Sistema cromatográfico (todo en medio ácido con TFA al 0.5 %): FM_i Agua, FM_f mezcla n -Hex / AcOEt (50-50), FM_f i -BuOH. Gradiente descrito en la Tabla V.

En la Fracción I, se tuvieron varios compuestos correspondientes a los picos 11-13. En la fracción II se tuvo únicamente el disolvente. En la fracción III se tuvo sólo un compuesto con un tiempo de retención de 21.1 minutos correspondiente al pico mayoritario 10. La fracción IV correspondió únicamente a un compuesto con tiempo de retención de 20.0 minutos (pico mayoritario número 9). En la fracción V se encontró también el pico 9, acompañado por el pico 8 (tiempo de retención de 19.1 minutos) y otro pico con un tiempo de retención de 18.75. Finalmente, en la fracción VI se obtuvo nuevamente el pico 8 acompañado del pico con tiempo de retención de 18.75 minutos y del pico 7 (tiempo de retención de 18.04 minutos). Los resultados se resumen en la figura 17.

Como esperábamos, los primeros compuestos en eluir por CPC fueron los menos polares, obteniéndose al final del análisis los compuestos más polares. Las fracciones III y IV corresponden a los picos mayoritarios y su separación fue completa, aunque para los otros componentes no se pudo apreciar si la separación fue buena o no. Para comprobarlo, pudieron haberse hecho fracciones más pequeñas.

En el Cromatograma de CPC se observa también una buena separación para el pico de la fracción III. Desafortunadamente no se pudo observar lo mismo para el compuesto número 10 (fracción IV), debido a la saturación del detector, pero los resultados por CLAE nos confirman que fue una buena separación.

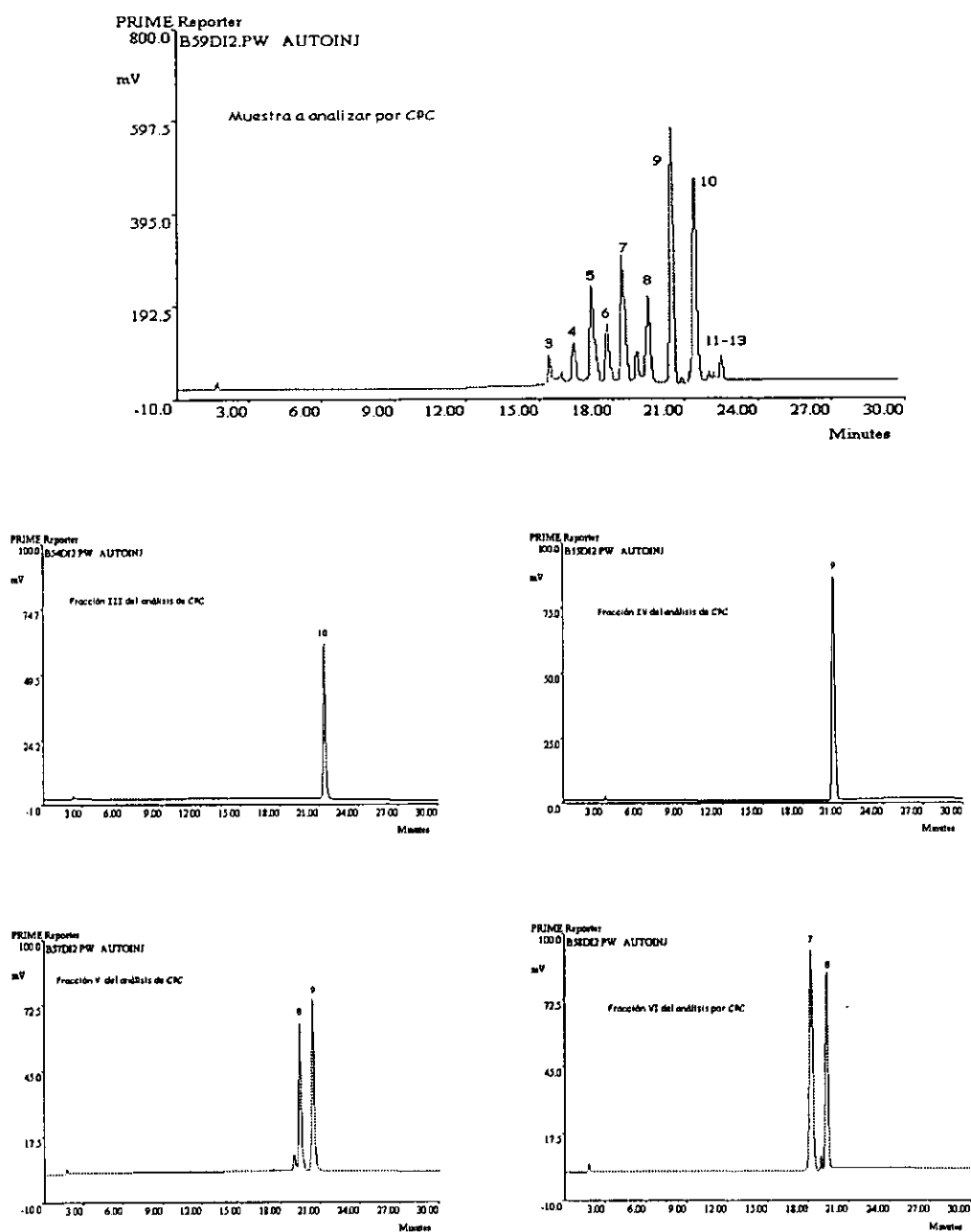


Figura 17. Detección por CLAE de las fracciones obtenidas del análisis por CPC del extracto de las pastillas de Tanakan. Condiciones cromatográficas descritas en la figura 13c. Las fracciones III y IV corresponden a los compuestos mayoritarios del extracto.

NOTA: La numeración de los picos es la misma que en la figura 13.

Identificación de los componentes del extracto.

En este punto del trabajo, se contaba con un método de separación por CPC de los componentes mayoritarios, pero aún no se sabía a qué compuestos correspondían. Por ser mayoritarios, se supuso que los picos 9 y 10 correspondían a los glicósidos de Quercetina y Kaempferol respectivamente.

En la literatura, se encontró reportado un trabajo en donde se identifican a los diferentes componentes del extracto etanólico de hojas de *Ginkgo biloba*⁴³ con la ayuda de estándares. Esta separación la realizaron por CLAE en fase inversa usando gradiente de elución de agua - acetonitrilo. Este gradiente lo hicieron en un tiempo mayor al utilizado por nosotros (50 minutos).

Decidimos entonces inyectar nuestro extracto en las mismas condiciones que estos autores (figura 18a) para tratar de identificar los componentes presentes. En la Tabla VI se detalla el gradiente utilizado y en la figura 18b se muestran los resultados obtenidos. La figura 18c representa la misma muestra analizada bajo las condiciones utilizadas en este trabajo.

TABLA VI. Gradiente de elución por CLAE usando las condiciones reportadas por A. Lobstein y sus colaboradores⁴³. Columna LiChroCART Superspher 100 RP-18, de 150 x 4.6 mm d. i. Fase móvil inicial Agua, fase móvil final Acetonitrilo. Flujo de 1 mL / mL, detección UV a 330 nm.

Tiempo (min)	% ACN
0	10
15	17
20	17
22	22
32	25
45	90
50	100

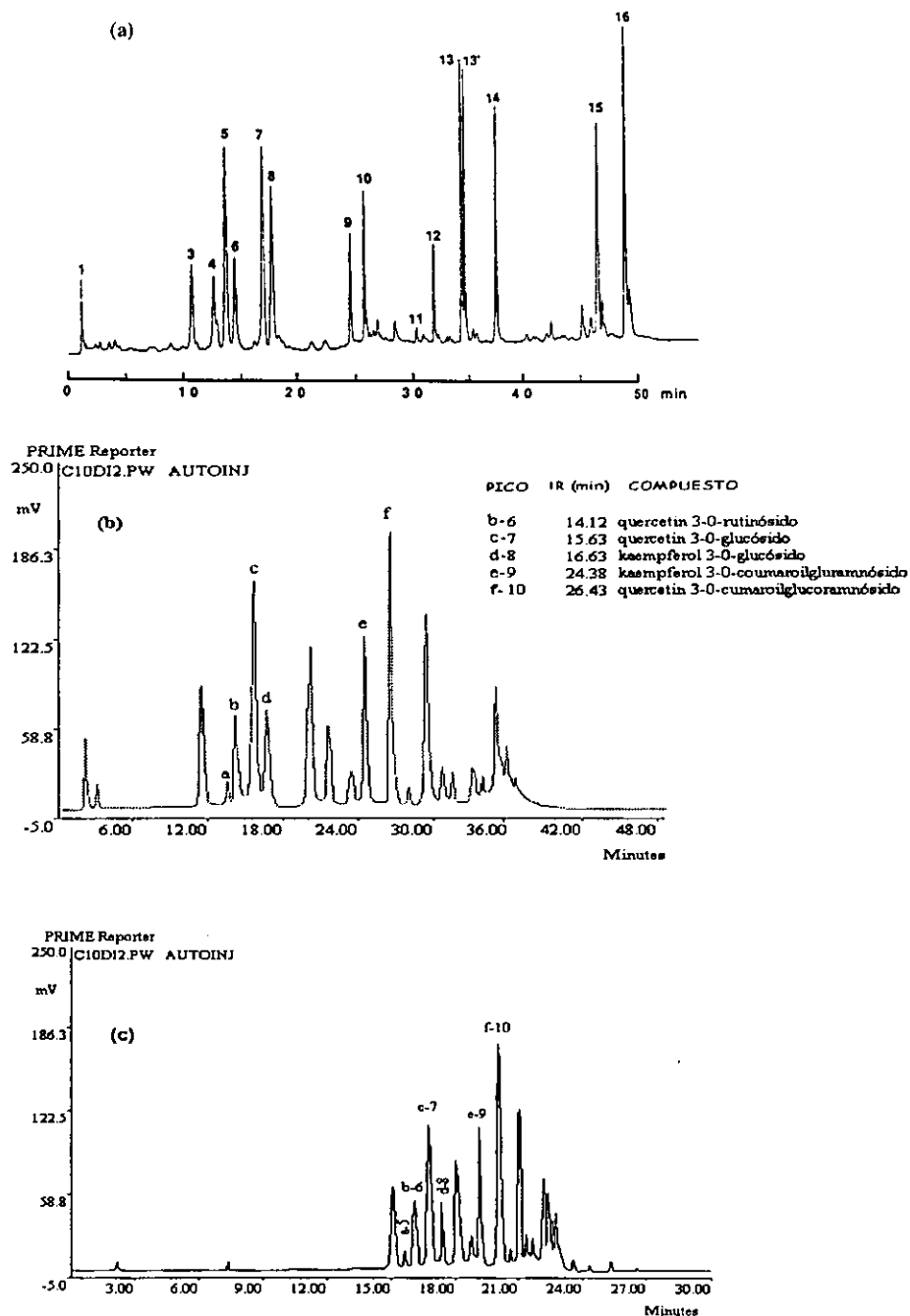


Figura 18. Separación por CLAE de un extracto etanólico de pastillas de Tanakan. (a) Cromatograma reportado por A. Lobstein y colaboradores. (b) Cromatograma obtenido con el gradiente descrito en la Tabla VI. (c) Cromatograma obtenido con el gradiente utilizado en este trabajo (Tabla IV).

NOTA: La numeración de los picos en este caso no corresponde a la utilizada en las figuras 13 y 17.

Comparando los resultados reportados con los nuestros; el pico a de la figura 18b corresponde al pico 5 de la figura 18a y es el marcado como a-5 sobre la figura 18c, que corresponde al cromatograma obtenido en las condiciones utilizadas en este trabajo.

Por otro lado, el pico b corresponde al pico 6 que los autores identificaron como Quercetin-3-O-rutinósido, sobre la figura 18c se marcó como b-6.

Al pico c se le correlacionó con el pico 7 que los autores identificaron como Quercetin-3-O-glucósido y es el pico c-7 en nuestras condiciones de trabajo.

El pico d corresponde al octavo pico y se trata del Kaempferol-3-O-glucósido, que en las condiciones utilizadas por nosotros corresponde al pico d-8.

El pico e corresponde al noveno pico de la figura 18a y se trata de Kaempferol-3-O-cumaroilglucoramnósido, que en las condiciones utilizadas por nosotros corresponde al pico e-9.

El pico f corresponde al décimo pico de la figura 18a y se trata de Quercetin-3-O-cumaroilglucoramnósido, que en las condiciones utilizadas por nosotros corresponde al pico f-10.

Los tiempos de retención obtenidos en cada caso se resumen en la tabla VII y sobre la figura 19 se puede observar que la diferencia entre los tiempos de retención (Δt_R) para cada componente no varía mucho, aunque no se sigue una tendencia bien definida. Esto indica que la asignación de los picos puede no corresponder a los compuestos mencionados.

Por otro lado, el tamaño de los picos varía mucho entre los cromatogramas 18a y 18b. Esto puede explicarse porque aunque se trata de la misma planta, el contenido de los flavonoles en las hojas depende de muchos factores, entre ellos la temporada de colecta y de su lugar de origen.

TABLA VII. Tiempos de retención del extracto de *Ginkgo biloba* obtenidos por CLAE usando diferentes gradientes: (a) valores reportados por A. Lobstein y colaboradores⁴³, (b) valores obtenidos por nosotros utilizando el gradiente reportado por estos autores y (c) valores obtenidos con el gradiente utilizado en este trabajo (gradiente 3).

(a)		(b)		Gradiente 3			
Pico	tr (min)	Pico	tr (min)	Δt_R (min)	Pico	tr (min)	Posible compuesto
5	13.45	5	13.47	0.02	4	15.59	
6	14.50	6	14.12	-0.38	5	16.05	quercetin-3-O-rutinósido
7	15.25	7	15.63	0.38	6	16.64	quercetin-3-O-glucósido
8	17.65	8	16.63	-1.02	7	17.34	kaempferol-3-O-glucósido
9	24.37	9	24.38	0.01	10	19.10	kaempferol-3-O-cumaroilglucoramnósido
10	25.42	10	26.43	1.01	11	19.92	Quercetin-3-O-cumaroilglucoramnósido

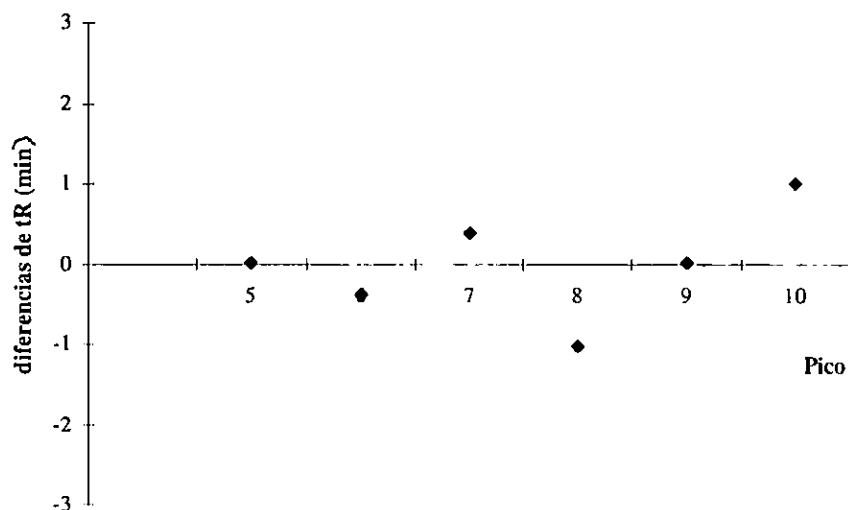
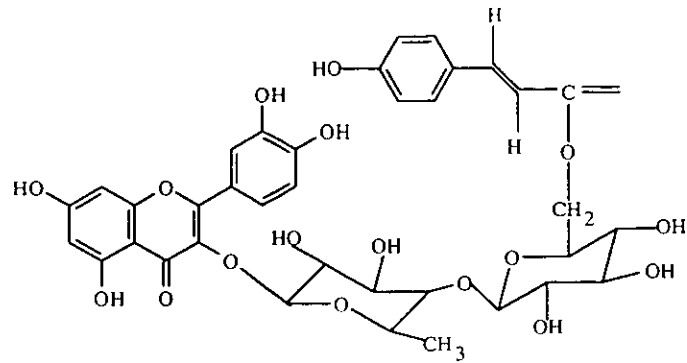


Figura 19. Diferencias entre los tiempos de retención obtenidos por A. Lobstein et al y por nosotros usando el mismo gradiente de elución por CLAE, con una muestra de extracto etanólico de *Ginkgo biloba*.

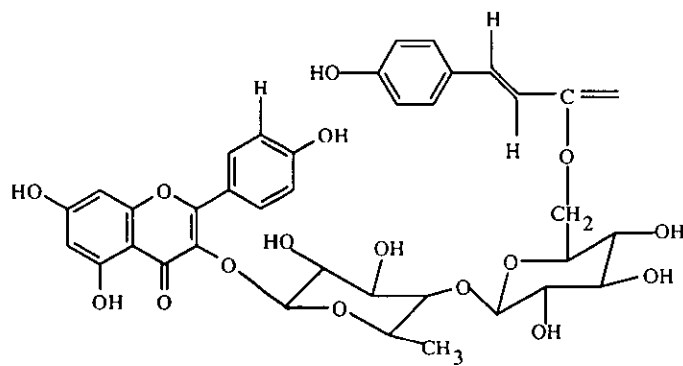
No obstante, con esta comparación podemos tener una idea más concreta del tipo de los componentes que se separaron. Si la asignación de picos es correcta, entonces podríamos decir que el compuesto obtenido en la fracción IV del análisis de CPC corresponde a la quercetin-3-O-cumaroilglucoramnósido y en la fracción V del análisis por CPC se tiene al Kaempferol-3-O-cumaroilglucoramnósido acompañado de otro compuesto. Por otro lado, el obtenido en la fracción III del análisis por CPC no logró identificarse.

Para determinar exactamente la estructura de los compuestos separados, deberá seguirse otro estudio, por ejemplo espectroscópico y aunque inicialmente este era uno de los objetivos de este trabajo, desafortunadamente no pudimos llevarlo a cabo.

En la figura 6 se representa la estructura de la Quercetina-3-O-glucósido y en la figura 20 las estructuras los dos cumaroilglucoramnósidos.



Quercetina-3-O-cumaroilglucoramnósido



Kaempferol-3-O-cumaroilglucoramnósido

Figura 20. Estructura de la Quercetin-3-O-cumaroilglucoramnósido y del Kaempferol-3-O-cumaroilglucoramnósido, compuestos identificados del extracto de pastillas de Tanakan.

CONCLUSIONES

Utilizando la Cromatografía de Partición Centrífuga se determinó un método de separación de algunos de los componentes presentes en extractos de productos comerciales de *Ginkgo biloba L.*

Para cápsulas de Ginko Yang se utilizó como sistema bifásico Acetato de Etilo / Etanol / Agua 2:1:2 (v/v/v) con modo dual de elución. Desgraciadamente, aunque la separación fue buena, los resultados variaron mucho debido a que el contenido de las cápsulas cambia mucho de muestra a muestra, aún trabajando con el mismo lote. Cabe destacar que estas cápsulas además contienen una gran cantidad de flavonoles libres.

La separación por CPC también se hizo con gradiente de elución. En este caso el extracto se hizo con pastillas de Tanakan, cuyo contenido fue más homogéneo. Se usó como fase estacionaria agua y el gradiente de elución se hizo con una fase móvil inicial de n-Hexano / Acetato de Etilo y fase móvil final isobutanol. Para este análisis se inyectaron 5 mL de muestra y para su preparación se utilizaron 15 pastillas (600 mg de extracto). Aún si la extracción no fuera completa, la cantidad inyectada fue mucho más grande que la que se puede trabajar usando otras técnicas cromatográficas. En estas condiciones se separaron completamente los compuestos mayoritarios en el extracto, uno de ellos identificado como Quercetin-3-O-cumaroilglucoramnósido. Con respecto al kaempferol-3-O-cumaroilglucoramnósido, éste no se obtuvo puro en las fracciones que se hicieron. Para determinar si hubo separación o no por CPC en estas condiciones, se deberían haber hecho fracciones más pequeñas para su posterior análisis por CLAE. Por otra parte, el gradiente puede hacerse aumentando más lentamente el porcentaje de FMf para mejorar la separación.

Por otro lado, la identificación de los componentes no se realizó con estándares debido a que no se contaba con ellos. Se pensaba hacer este estudio utilizando los métodos espectroscópicos (Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear) de las fracciones colectadas una vez evaporado el disolvente. Desafortunadamente, el tiempo que pasaba entre la obtención del compuesto y el análisis espectroscópico era

BIBLIOGRAFIA

1. W. Murayama, T. Kobayashi, Y. Kosuge, H. Yano, N. Nunogaki and K. Nunogaki. *J. Chromatogr.*, 239: 643 (1982).
2. A. P. Foulcault. "*Centrifugal Partition Chromatography*". Chromatographic Sciences Series, Vol 68, Marcel Dekker Inc. New York, (1995): 25-50.
3. L. C. Craig and D. Craig. "*Laboratory Extraction and Countercurrent Distribution*" en "*Technique of Organic Chemistry*". A. Weissberger Ed. Vol. 3, Part I. Interscience. New York (1956): 149-332.
4. E. Camacho-Frías and A. P. Foucault. *Analisis*, 24: 159-167 (1996).
5. D. W. Armstrong, G. L. Bertrand and A. Berthod. *Anal. Chem.*, 60: 2516-2519 (1988).
6. R. B. Fernández. *Anuario da Sociedade Broteniana*, 52: 45-65 (1986).
7. R. Rohr. "*Evolution en culture in vitro des prothalles femelles agés chez Ginkgo biloba L.*" René Rohr Ed. New Delhi: Amerind Publishing Co. Pvt. Ltd (1981), pp 13.
8. J. Tremouillaux-Guiller, D. Laurain and J. C. Chenieux. "*In Vitro Haploid Production in Higher Plants*". Dordrecht; Boston Ed. Kluwer Academic Publishers 23. Vol. 3 (Current plant science and biotechnology in agriculture) (1996): 277-295.
9. T. Hori. "*Ginkgo Biloba, a Global Treasure: From Biology To Medicine*". T. Hori, R. W. Ridge, W. Tulecke, [et al] Eds. Tokyo; New York. Springer, Vol. 17, (1997). pp. 427.
10. L. Packer, C. Saliou, M. T. Droy-Lefaix, et. al. "*Antioxidants in Health and Disease*", Edited by C. A. Rice-Evans and L. Packer, New York: Marcel Dekker. Vol. 7 (Flavonoids in Health and Disease) (1998): 303-341.
11. T. Miyajina, T. Yoshikawa and M. Kondo. "*Antioxidative effects of Ginkgo biloba extract (GBE)*". M. Hiramatsu, T. Yoshikawa, and M. Inoue Ed., Plenum, New York, N. Y. 1st (Food Free Radicals [Proc. Symp.]) (1994, Pub. 1997): 129-130.

12. S. Pietri, E. Maurelli, K. Drieu and M. Culcasi. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 29 (2): 733-742 (1997).
13. B. Ahlemeyer and J. Krieglstein. *ACS Symposium Series*, 691 (*Phytomedicines of Europe*): 210-220 (1998).
14. M. Steinberg. *Hospital Formulary*, 34: 32-34, 37-38, 41-44 (1999).
15. M. Joyeux, A. Lobstein, R. Anton and F. Mortier. *Planta Medica*, 61 (2): 126-129 (1995).
16. L. Gianni and W. B. Dreitlein. *U. S. Pharmacist*, 23: 80, 83-84, 86 (1998).
17. V. S. N. Rao, J. C. R. Silva and F. C. Medeiros. *Phytotherapy Research: Ptr.*, 9 (6): 458-459 (1995).
18. Y. J. Ahn, M. Kwon, H. M. Park and C. H. Han. *ACS Symposium Series*, 658: 90-105 (1997).
19. D. Schardt and S. Schmidt. *Nutrition Action Health*, 24 (4): 3-6 (1997).
20. D. Castelli, I. Colin, E. Camel and G. Ries. *Contact Dermatitis*, 38 (3): 123-126 (1998).
21. M. Hirama. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 08 19,374 [96 19,374] (July 6, 1994).
22. C. Lu. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu CN 1,141,182 (July 21, 1995).
23. A. Imahori. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 10 194,945 [98 194,945] (July 28, 1998).
24. C. Kondo, A. Takayama and E. Jo. Jpn. Kokkai Tokkyo Koho, JP 10 287,531 [98 287,531] (October 27, 1998).
25. O. Sticher. *Planta Medica*, 59 (1): 2-11 (1993).
26. G. M. Tarlach. *Drug Topics*, 142: 60 (1998).
27. C. Chen, W. Wang, and L. Sun. *Jingxi Huagong*, 14 (6): 19-21 (1997).
28. D. Xie, W. Ning, and Q. Gao. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu CN 1 145,230 (September 15, 1995).
29. M. L. Chávez, and P. I. Chavez. *Hospital Pharmacy*, 33: 1076-1078, 1083-1090, 1093-1095 (1998).

30. A. Marcilhac, N. Dakine, N. Bourhim, et. al. *Life Sciences*, 62 (25): 2329-2340 (1998).
31. Y. Song. *Chemistry & Industry Of Forest Products*, 6 (3): 42-45 (1986).
32. E. Lolla, A. Paletti and F. Peterlongo. *Fitoterapia*, 69 (6): 513-519 (1998).
33. Y. Yan, P. Xie, H. Qian and Q. Lin. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 22 (3): 159-162 (1997).
34. J. Thompson, B. III. Strode, L. T. Taylor and T. A. Van-Beek. *J. Chromatogr. A*, 738 (1): 115-122 (1996).
35. P. Chen, X. L. Su, L. H. Nie, S. Z. Yao and J. G. Zeng. *J. Chromatogr. Sci.*, 36 (4): 197-200 (1998).
36. D. Laurain, J. Tremouillaux-Guiller, J. C. Chenieux. and T.A. Van-Beek. *Phytochemistry*, 46 (1): 127-130 (1997).
37. J. D. Chi, X. He, A. Liu and L. X. Xu. *Yaoxue Xuebao*, 32 (8): 625-628 (1997).
38. A. Hasler, O. Sticher and B. Meier. *J. Chromatogr.*, 605 (1): 41-48 (1992).
39. M. Hu, F. Jiang, and S. Zhang. *Shipin Yu Fajiaa Gongye*, 23 (4): 40-43 (1997).
40. F. Briançon-Scheid, A. Guth and R. Anton. *J. Chromatogr.*, 245: 261-267 (1982).
41. P. Pietta, P. Mauri and A. Bruno. *J. Chromatogr.*, 553: 223-231 (1991).
42. A. Crozier, E. Jensen, M. E. J. Lean, M. S. McDonald. *J. Chromatogr. A*, 761: 315-321 (1997).
43. A. Lobstein, L. Rietsch-Jako, M. Haag-Berrurier and R. Anton. *Planta Med.*, 57 : 430-433 (1991)
44. P. Pietta, R. Maffei-Facino, M. Carini and P. Mauri. *J. Chromatogr. A*, 661: 121-126 (1994).
45. N. B. Mandava and Y. Ito. "Counter-current Chromatography, Theory and Practice". Marcel Dekker Ed., Vol. 44, Chromatographic Science, New York (1988).
46. H. Hasler, G. A. Gross, B. Meier and O. Sticher. *Phytochemistry*, 31 (4) : 1391-1394 (1992).

47. L. Verotta, E. Lolla and A. Moggi. *Fitoterapia*, 62 (4) : 339-341 (1991)
48. M. Vanhaelen and R. Vanhaelen-Fastré. *Planta Medica*, 55: 202 (1989).
49. F. Q. Yang, T. Y. Zhang, B. X. Mo, et. al. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Tech.*, 21 (1-2): 209-216 (1998).
50. F. Q. Yang, J. Quan, T. Y. Zhang, and Y. Ito. *J. Chromatogr A*, 803 (1/2): 298-301 (1998).
51. A. Marston, C. Borel and K. Hostettmann. *J. Chromatogr.*, 450: 91-99 (1988).