



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SEPARACION DE FLAVONOLES DE CALENDULA OFFICINALIS POR CROMATOGRAFIA DE PARTICION CENTRIFUGA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C O

P R E S E N T A :

ALEX ARIAS MARTINEZ





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. ERNESTINA CERVERA FLORES
Secretario	Prof. EVANGELINA CAMACHO FRIAS
1er. Suplente	Prof. ELBA ROJAS ESCUDERO
2o. Suplente	Prof. LUCIA HERNANDEZ GARCIADIEGO

Sitio donde se desarrolló el tema:

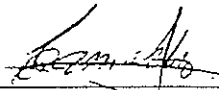
Laboratorio 1-3

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM.

Laboratorio 201

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE QUIMICA,
UNAM.

Asesor



Dra. Evangelina Camacho Frías

Sustentante



Alex Arias Martínez

Agradecimientos.

A la Dra. Evangelina Camacho Frías por el apoyo recibido durante la última etapa de mi formación profesional y por los buenos consejos en los momentos difíciles.

A la Maestra Margarita Romero por todos los consejos necesarios para terminar este trabajo.

Al Maestro Blas Flores por dejarme trabajar en su laboratorio y por todos aquellos buenos consejos sobre las mujeres, que espero llevar a cabo.

A las Maestras Georgina Duarte y Alejandrina Acosta por su ayuda en la obtención de los espectros.

A la Facultad de Química y a todos sus profesores por darme su tiempo y conocimientos que me serán muy útiles en mi vida profesional.

DEDICATORIAS

A mi mamá María Eduarda Martínez Pérez por darme la vida, por ser el pilar de todo mi ser y porque gracias a su trabajo he llegado a cumplir una de mis más grandes metas.

A mi papá Eduardo Martínez Pérez por ser mi ejemplo a seguir en todos los ámbitos, y espero ser aunque sea una pequeña parte de todo lo que él ha logrado.

A mis hermanas Concepción y Alma Guadalupe por su apoyo incondicional.

A mis sobrinos Jair, Jaciel, Joselin, Pamela, Josuel y Samara por los ratos de alegría.

A los incondicionales Raúl Martínez Y José Luis González espero nunca cambien.

A las familias Cigarroa Zavala y Mora Martínez por el apoyo moral y económico.

A los buenos amigos de los laboratorios. 201 y 1-3: Roberto Carlos (mini - Robert), Chucho, Rafa, Martín, David, Ivette, Paco, Roberto, Raúl, Lore, Cristina, Javier, Isela, Diana, Fidel, Héctor, Elizabeth, Rosario y Lorena por las parrandas inolvidables..

A mis compañeros de carrera: Oscar, Sergio, Alfredo, Angel, Jorge, Emilio, Francisco, Marina, Greys, Blanca, Gabriela, Adriana, Liliana, Raúl, Juan Carlos, Olivia y Patricia por hacer que todo fuese más fácil y alegre.

A mis nuevos compañeros y amigos: Andrés, Mara, Karla, Flora E., Minerva Jaqueline, Enrique, Rubén, Norma y Fabis por presionarme para llegar a terminar esto.

CONTENIDO

ANTECEDENTES.....	5
Flavonoides	6
Flavonoles de la <i>Caléndula officinalis</i>	10
Cromatografía de Partición Centrífuga.	12
Cromatografía a Contracorriente de Goteo.....	12
Cromatografía a Contracorriente de Rotación Locular	13
Cromatografía a Contracorriente de Alta Velocidad	13
Cromatografía de Partición Centrífuga de Alta Eficiencia.	14
CPC y CLAE.	20
Resolución Cromatográfica	21
Eficiencia	22
Resolución	22
Separación de flavonoles.	24
Separaciones por Cromatografía de Partición Centrífuga.....	28
PARTE EXPERIMENTAL	30
Material y equipo	30
Preparación de extracto.	31
Análisis por CPC.....	31
Análisis por CLAE.....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33

Preparación del extracto.....	33
Análisis por CLAE.....	35
Separación por CPC.....	38
Sistema Acetato de Etilo – Etanol – Agua.....	39
Sistema THF – DMSO –Agua.....	41
CONCLUSIONES.....	51
BIBLIOGRAFIA	53

INTRODUCCION

En México, el uso de productos naturales para fines curativos se conoce desde hace tiempo y una de las plantas que se utiliza con frecuencia es la *Caléndula officinalis*, la cual presenta una gran actividad antiinflamatoria y analgésica principalmente, además, investigaciones recientes han determinado que el extracto de las flores puede presentar actividad contra el virus del SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida).

Las propiedades terapéuticas de esta planta se deben principalmente a compuestos tales como los Terpenoides, Flavonoides y Cumarinas.

Por otro lado, las flores de la *Caléndula officinalis* se emplean también para la obtención de un colorante amarillo formado principalmente por carotenos y es muy utilizado en la industria agroalimentaria.

Debido a estas propiedades, se han efectuado numerosos estudios sobre la extracción, separación e identificación de los principios activos presentes en la planta de *Caléndula officinalis*, esto utilizando diferentes técnicas. Sin embargo y a pesar de los grandes avances que se han logrado, los tiempos necesarios para su aislamiento siguen siendo muy largos y su cantidad obtenida es generalmente muy pequeña.

La Cromatografía de Partición Centrífuga (CPC), es una técnica preparativa relativamente nueva, en la cual no se requiere de un soporte sólido, sino que la separación se efectúa en un medio líquido. Efectivamente, por CPC tanto la fase móvil como la fase estacionaria son dos líquidos inmiscibles entre sí y una de las fases permanece "fija" gracias a la acción de una fuerza centrífuga constante, mientras que la otra la atraviesa. La separación de los solutos presentes en la

ANTECEDENTES

La *Caléndula officinalis* es una planta herbácea de origen europeo, principalmente de la región del mediterráneo. En México, se puede encontrar en toda la República como planta ornamental bajo los nombres de Mercadela, Maravilla o Reinita.

El tallo y las hojas son verdes, de tamaño relativamente grande y de consistencia gruesa. Las flores, presentes en cualquier estación del año, son de color naranja y están formadas por pétalos delgados y largos, como las margaritas¹.

Las flores frescas se han empleado en infusiones como antiinflamatorias (anginas, várices) y cicatrizantes (sangrado de encías, hemorroides, úlceras crónicas, etc.). Algunas veces, el agua se sustituye por leche y el líquido resultante se emplea para disminuir los dolores causados por úlcera o cáncer estomacal. Los extractos etanólicos de las flores secas se utilizan en la preparación de ungüentos que se aplican para regenerar tejidos (quemaduras, productos de belleza)^{2, 3}. Al extracto etanólico de las flores también se le atribuyen propiedades bactericidas y antisépticas⁴; es precisamente por esta propiedad que actualmente se estudia su posible actividad contra el virus del SIDA⁵.

No se sabe que esta planta cause alguna reacción alérgica, aunque los bebés suelen ser sensibles a la misma. Por otro lado, se ha determinado en ratones la toxicidad del extracto etanol-agua (1:1) de las flores secas, encontrándose un LD₅₀ de 375.0 mg/Kg, es decir, que la toxicidad es muy baja³.

La naturaleza de los principios activos no está muy definida. Aunque se sabe que las saponinas⁶ y polisacáridos⁷ presentes en el extracto presentan una

actividad antiinflamatoria, se ha demostrado que la actividad de un extracto libre de estos compuestos es prácticamente la misma de un extracto original.

A partir de numerosos estudios hechos a la *Caléndula officinalis*, se sabe que los compuestos a los que se les atribuye la actividad biológica pertenecen a las familias de los terpenoides, principalmente faradiol y taraxasterol⁸, las cumarinas y los flavonoides y generalmente están unidos a azúcares. Estos se concentran principalmente en las partes aéreas de la planta y los flavonoides en particular, se encuentran mayoritariamente en los pétalos de las flores^{9, 10}.

Estos estudios también revelaron que los flavonoides son los causantes de las propiedades analgésica, antiinflamatoria y antitumoral que presenta la planta^{9, 10, 11}

Pero ¿Qué son y cómo son los flavonoides?

Flavonoides

Los flavonoides¹¹ son una familia de metabolitos secundarios producidos por las plantas y se caracterizan por tener tres anillos con un esqueleto de 15 átomos de carbono que proviene biogénicamente de tres unidades de acetato (C₆) y una unidad de fenilpropano (C₆-C₃), por lo que se representa como (C₆-C₃-C₆).

El anillo B proviene de la condensación de las unidades de acetato con la unidad de fenilpropano. Cuando el enlace se hace con el carbono α del fenilpropano, se obtienen los flavonoides propiamente dichos (flavanos), si el enlace es con el carbono β , entonces se tienen los isoflavonoides y el enlace con el carbono γ da origen a los neoflavonoides (figura 1).

Los flavonoides propiamente dichos se clasifican según el grado de oxidación del anillo C, el tipo de O- y C-sustitución de los anillos A y B y el tipo de glicosidación. De esta manera, se pueden distinguir las antocianidinas, las

flavonas, las flavanonas, las auronas, las chalconas, las isoflavonas y los flavonoles, siendo precisamente estos últimos los que se encuentran presentes en la planta de *Caléndula officinalis*. En la figura 2 se presenta la estructura de los compuestos representativos de cada familia.

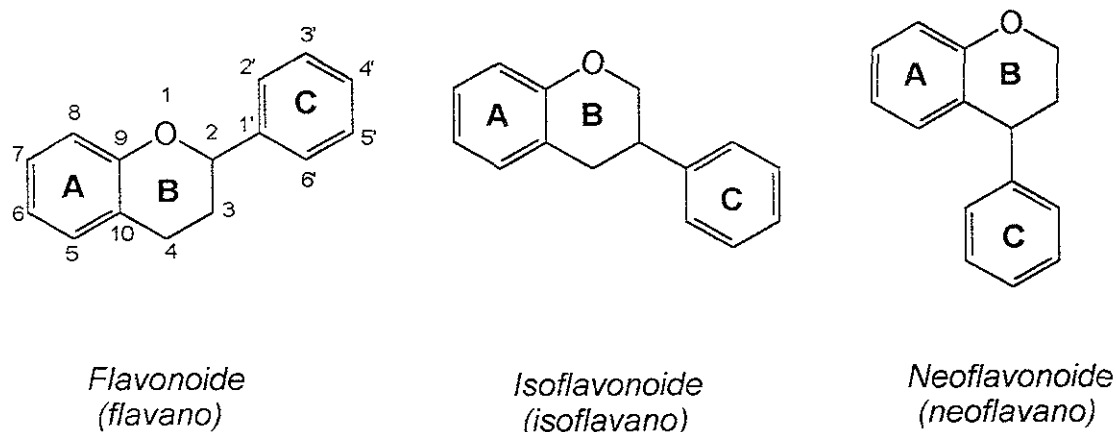
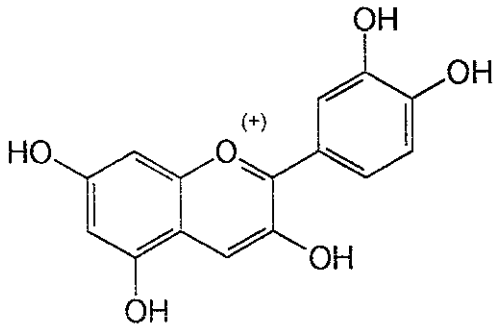


Figura 1. Esqueletos de los diferentes flavonoides.

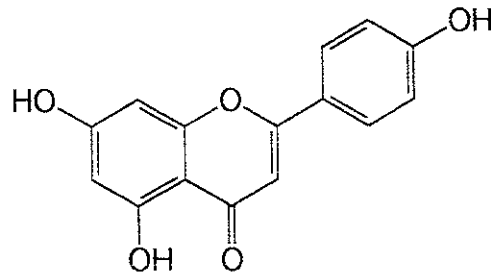
Estos compuestos se originan por condensación de tres acetilos con la cinamoil-CoA, o con la malonil-CoA para formar la chalcona, que se cicla a flavanona y por deshidrogenación, a flavona. Los flavonoles se forman a partir de la chalcona a través del flavanonol. En la figura 3 se representa la formación de algunos de estos flavonoides¹¹.

Los flavonoles, que son los compuestos que nos interesan en este estudio, son de color amarillo (del latín *flavus* = amarillo) y pueden presentarse como C- u O-glicósidos por la unión de monósidos o biósidos preferentemente en las posiciones C-3, C-7 y C-4'. Los monósidos y disacáridos más frecuentes son: D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, rutinosa (6-O-ramnoglucósido), neohesperosa (2-O-ramnoglucósido) y soforosa (2-O-glucoglucósido).

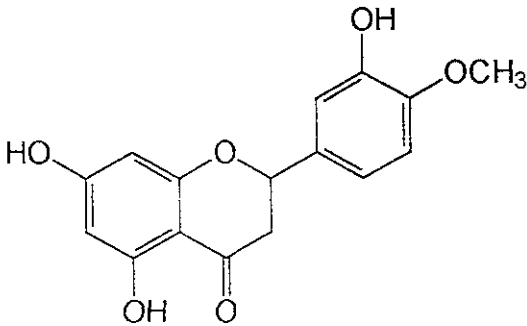
a) ANTOCIANIDINAS

*Cianidina*

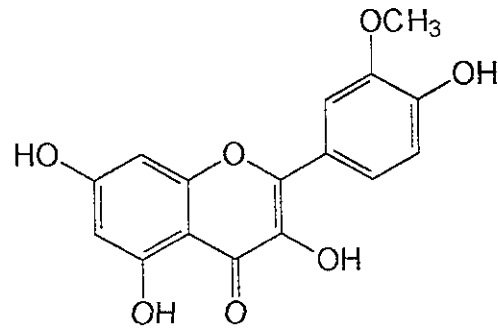
b) FLAVONAS

*Apigenina*

c) FLAVANONAS

*Hesperetina*

d) FLAVONOLES

*Isoramnetina***Figura 2.** Clasificación de los flavonoides.

Tanto los glicósidos de los flavonoles como las agliconas (moléculas libres de los azúcares) muy hidroxiladas son solubles en el líquido de las vacuolas. En cambio, las agliconas lipofílicas (como son los compuestos muy metoxilados) se encuentran en tejidos muertos, en idioblastos¹¹, en cutículas de hojas y en líquidos de excreción acompañando a los terpenos.

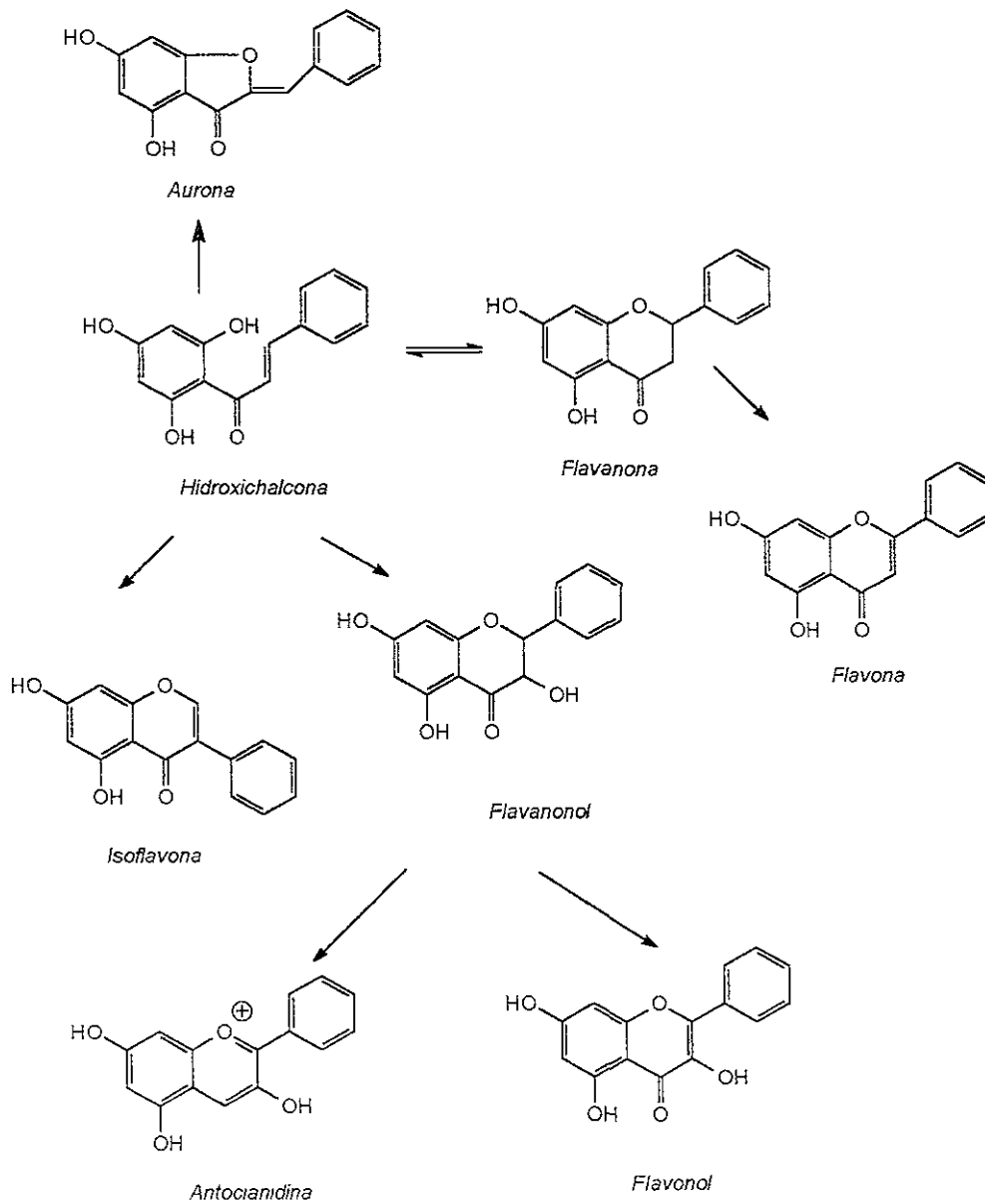


Figura 3. Formación de algunos flavonoides.

En general, la función biológica de los flavonoles en las plantas es la de atraer ciertos insectos para favorecer la polinización, proteger contra el ataque de virus u hongos, controlar el proceso de crecimiento, inhibir algunas acciones enzimáticas y participar en los sistemas de oxido - reducción de las células.

Cromatografía de Partición Centrífuga.

Las extracciones sucesivas líquido - líquido se conocen desde hace mucho tiempo y han sido ampliamente estudiadas principalmente por L. Craig¹⁵.

Con el desarrollo de nuevos equipos (principios de los años 70's), el proceso de Craig dio origen a la Cromatografía a Contracorriente, la cual fue desarrollada por Y. Ito y K. Nunogaki¹⁶ en Japón.

Posteriormente, se diseñaron varios aparatos utilizando este principio y desafortunadamente cada uno de ellos llevó a una técnica diferente, pero todas ellas basadas en extracciones sucesivas líquido - líquido. Posiblemente esta multiplicidad de nombres impidió que este tipo de cromatografía se desarrollara rápidamente.

A continuación se da una breve descripción de las principales técnicas que surgieron.

Cromatografía a Contracorriente de Goteo

La Cromatografía a Contracorriente de Goteo (CCCG) fue una de las primeras técnicas en donde se usó el concepto de contracorriente y fue introducida por L. Rikakai¹⁷ a fines de los años 70's. El equipo está formado por una serie de tubos de vidrio verticales unidos en los extremos por pequeños tubos capilares de teflón. El proceso de separación consiste en bombear los solutos disueltos en la fase móvil (FM), la cual atraviesa en forma de gotas una fase estacionaria (FE) que se encuentra en los tubos de vidrio y por afinidad de los solutos ya sea por la FE o por la FM, se logra la separación.

Por esta técnica, los tiempos de análisis son muy largos debido a que los flujos que se utilizan son muy pequeños, ya que de otra manera la FM desplazaría a la FE en lugar de atravesarla, impidiendo así la separación.

Esta técnica no tuvo mucho auge debido precisamente a los tiempos de análisis tan largos.

Cromatografía a Contracorriente de Rotación Locular

La Cromatografía a Contracorriente de Rotación Locular (CCCRL) tampoco tuvo mucho auge debido a que el aparato que se utilizaba era muy complejo. En este caso, se siguió usando el mismo principio de extracciones sucesivas líquido - líquido, pero como en CCCG se tenían problemas de retención de la FE, se decidió introducir una fuerza centrífuga. Así, el aparato se formó con una serie de cilindros colocados sobre un eje en posición horizontal, el cual se hacía girar al mismo tiempo que los cilindros que contenían a la FE¹⁸. Desafortunadamente, en este sistema no se generaba una fuerza centrífuga muy grande, lo que provocaba que no se pudiera trabajar con flujos muy grandes (mayores de 1 mL/min) y que los tiempos de análisis siguieran siendo muy grandes¹⁸.

Cromatografía a Contracorriente de Alta Velocidad

La Cromatografía a Contracorriente, fue desarrollada en la década de los 80's por Y. Ito y colaboradores en E. U. A. En este caso, la FE es retenida en la columna por un campo centrífugo variable, generado por tres ejes de rotación, los cuales se comportan como un sistema planetario. La columna está formada por un tubo de teflón enrollado en uno de los ejes formando una bobina y es en ella donde se encuentra la FE. La fuerza centrífuga variable generada es la que permite que la FE permanezca "fija" en la columna, mientras que la FM la atraviesa a gran velocidad (flujos altos, hasta 20 mL/min). De esta manera, los tiempos de análisis son más cortos y las separaciones más eficientes. Esto es posible porque en este caso se pueden usar velocidades de rotación elevadas (hasta 1500 rpm). Por estas características, esta técnica se conoce actualmente como Cromatografía a Contracorriente de Alta Velocidad (CCCAV)¹⁹.

Cromatografía de Partición Centrífuga de Alta Eficiencia.

K. Nunogaki desarrolló en Japón la Cromatografía de Partición Centrífuga de Alta Eficiencia (CPCAE). Esta se basa en la formación de un campo centrífugo constante producido por un mecanismo de rotación de un solo eje²⁰.

En este caso, el aparato está formado por una columna de 31 x 47 x 50 cm, con un peso aproximado de 43 Kg, en el interior se tiene un rotor (que es la columna misma), que está formado por seis pares de discos de teflón y acero inoxidable, en donde se encuentran grabados a ambos lados canales conectados entre sí por conductos. Cada disco contiene 178 canales, dando un total de 2136 canales. Estos miden 15 x 2.5 x 2.1 mm y los conductos 15 x 1 x 1 mm, dando como resultado un volumen interno de $\approx 88 \mu\text{L}$ por canal, es decir, el correspondiente al 85 % de un volumen total de 220 mL.

Estos discos se encuentran sobre un eje que gira sobre sí mismo. La FE es retenida en la columna por la fuerza centrífuga constante generada al hacer girar el rotor, mientras que la FM la atraviesa.

Los conductos contienen únicamente FM, mientras que en cada canal hay FM y FE, pudiendo ajustarse la relación de ambas dentro de la columna.

La FM que se encuentra en el interior de la columna es remplazada por FM nueva que se introduce al sistema de manera continua, realizándose de esta forma la separación cromatográfica. La figura 5 representa un esquema de una columna de este tipo.

La CPC presenta un gran número de ventajas con respecto a otras técnicas cromatográficas, principalmente al compararla con las que utilizan una FE sólida. La ausencia de un soporte estacionario permite que se tenga un mayor volumen de FE, lo que permite que la capacidad de muestra sea grande, reflejándose esto en la posibilidad de separar grandes cantidades de soluto en un solo análisis (de

miligramos hasta gramos). Por otro lado, permite aislar compuestos inestables o altamente degradables al entrar en contacto con el soporte sólido.

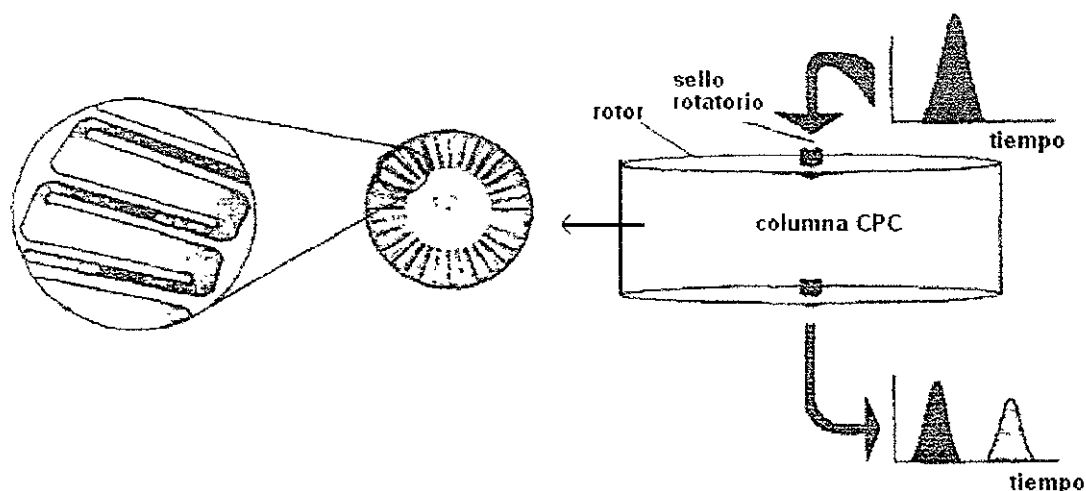


Figura 5. Esquema de la columna para Cromatografía de Partición Centrífuga.

Otra de las ventajas que presenta la CPC con respecto a otras técnicas cromatográficas es la de eliminar costos por reemplazos periódicos de la columna, ya que es más económico utilizar un sistema de disolventes, sobre todo cuando se analizan grandes cantidades de muestra.

Además, la CPC permite tener una recuperación casi total de la muestra, aún cuando no haya separación, ya que cualquiera de las dos fases líquidas pueden usarse como FM o FE, aún en un mismo análisis.

Estas características hacen que la CPC se use más en separaciones preparativas, sin descartar el interés analítico.

Equipo

En CPC se utiliza el mismo equipo que se emplea en CLAE, es decir, un sistema de bombas que permiten introducir la FE y la FM. Puesto que las dos fases son líquidas, se necesitan por lo menos dos vías de introducción. Por otro lado, cuando se analizan grandes cantidades de muestra, ésta se introduce al sistema por medio de una tercer vía; cuando se analizan pequeñas cantidades, la introducción de la muestra se puede hacer por medio de un inyector de válvula tipo "Rheodyne". Los detectores pueden ser UV-Visible, Fluorescencia, etc., dependiendo de las características físicas de la muestra. Sin embargo, cuando se trabaja con cantidades importantes, estos detectores se saturan, siendo necesario coleccionar fracciones de eluyente para su posterior detección fuera de línea.

Al igual que en CLAE, el flujo de trabajo va a depender de la presión generada durante el análisis, pero en el caso de la CPC, esta presión también dependerá de la velocidad de rotación (ω) de la columna con la que se controla la fuerza centrífuga (0-2000 rpm). En general, se trabaja con flujos comprendidos entre 1 y 10 mL/min. En la figura 6 se muestra un esquema del equipo cromatográfico utilizado.

La FM y la FE pasan a la columna por medio de dos sellos rotatorios que se encuentran, uno en la parte superior y el otro en la parte inferior del rotor y es a través de ellos que la columna se une directamente al inyector y al detector.

En CPC, cualquiera de las dos fases puede ser usada como FE, por ejemplo, si ésta es la fase más densa y la FM la más ligera, la elución se hace en "Modo Ascendente", lo que quiere decir que la FM atraviesa a la FE de la parte inferior del canal hacia la parte superior. También se puede utilizar al revés y entonces se trabajará en "Modo Descendente", es decir la FM es la más densa y va a atravesar a la FE (más ligera) de la parte superior del canal, a la parte inferior

pasando a la parte superior de otro canal, así hasta salir del sistema cromatográfico (figura 7).

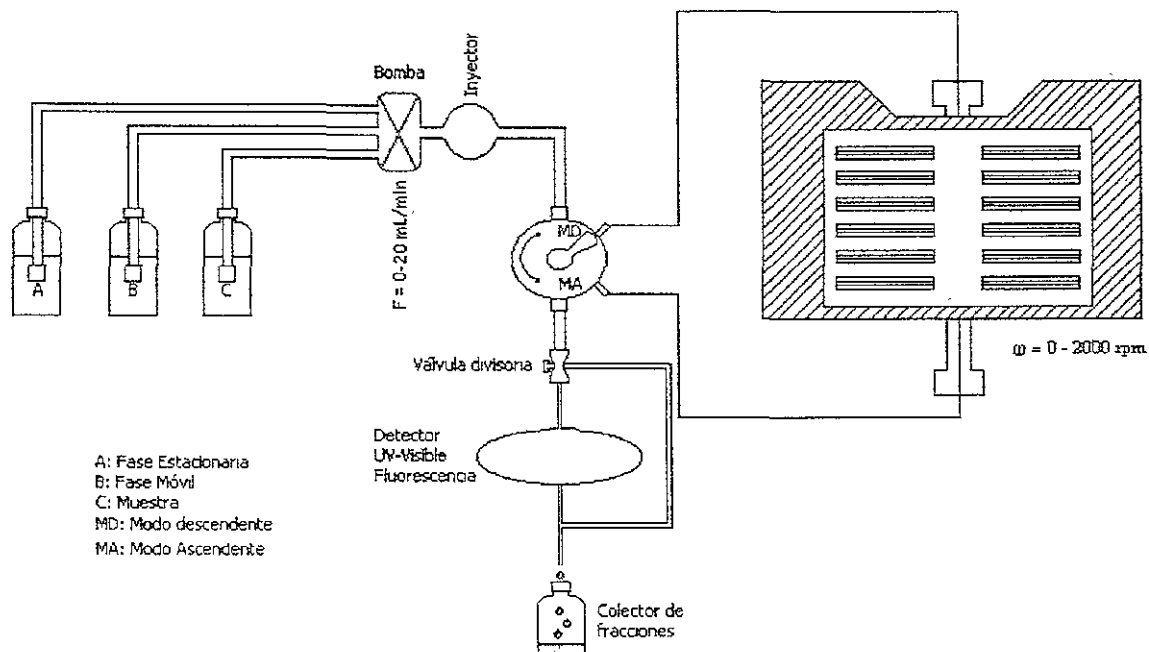


Figura 6. Equipo empleado en CPC.

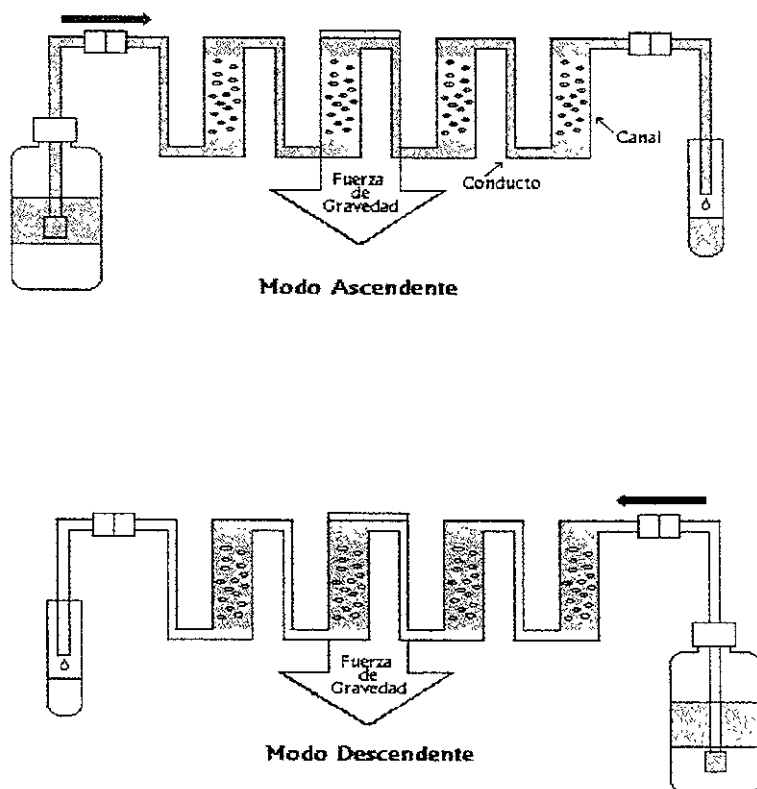


Figura 7. Modos de elución ascendente y descendente en CPC.

Modos de elución.

Al igual que en CLAE, por cromatografía de partición centrífuga se puede eluir en fase normal (cuando la fase más polar es la FE y la fase menos polar la FM), en fase inversa (cuando la fase más polar es la FM y la fase menos polar la FE). Además, por CPC también se puede hacer el análisis en modo dual de elución. En este caso se comienza la elución, por ejemplo en fase normal y después de un tiempo de análisis, la fase móvil será ahora la estacionaria para trabajar en fase inversa. En la figura 8 se explica mejor este modo de elución.

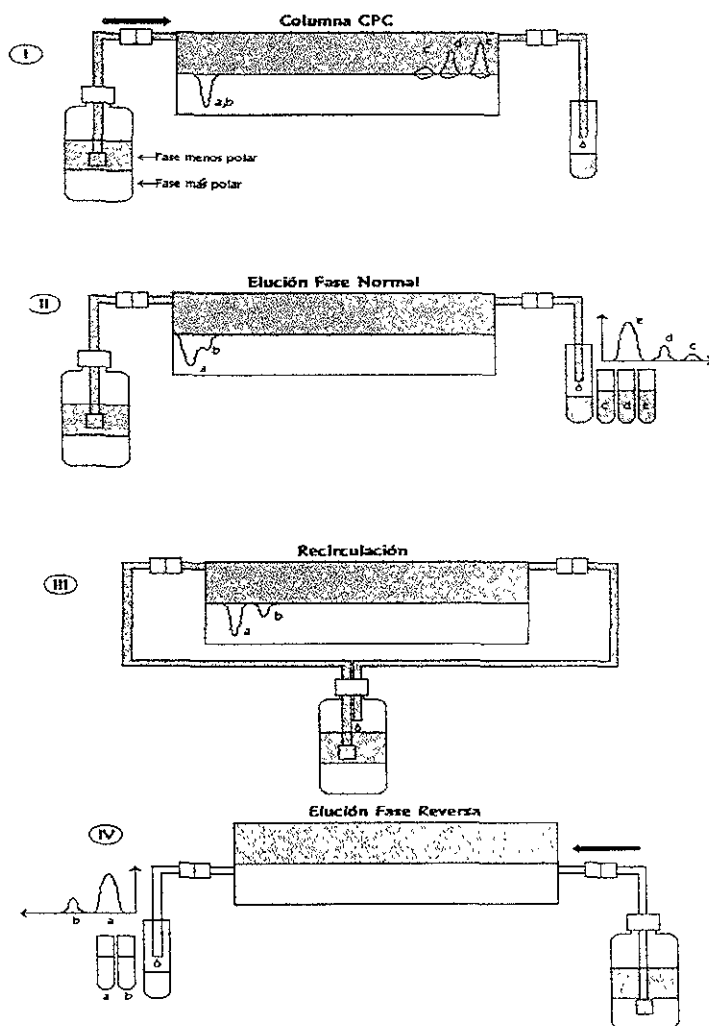


Figura 8. Modo Dual de elución. Si se tiene una muestra que contiene 5 componentes a, b, c, d y e, donde la afinidad de estos compuestos hacia la fase no polar incrementa de a hacia e, los componentes menos polares c, d y e eluyen a distintos tiempos cuando se usa como FM la menos polar, es decir, se trabaja en fase normal. En este caso los componentes a y b, quedan retenidos en la FE (I y II). Se sigue pasando la fase móvil apolar para que los componentes a y b migren lentamente (III). Después de un tiempo, la dirección del flujo se invierte y ahora la FM es la más polar y la FE es la menos polar. De esta manera eluyen los compuestos a y b separados (IV).

CPC y CLAE.

La CPC y CLAE son técnicas similares en varios aspectos, mismo principio (reparto de solutos) y mismo equipo de trabajo (bombas, inyectoros, detectores).

Sin embargo, existen grandes diferencias entre ellas, algunas de las cuales se enumeran a continuación²⁰.

Tomando como base la cromatografía en fase inversa, en CLAE se tiene una fase estacionaria formada por una cadena lineal orgánica unida a un soporte de sílice, en donde la FE propiamente dicha solo ocupa del 5 al 7% del volumen total de la columna y no tiene cambios significativos con la variación de la composición de la FM. Este porcentaje es poco, pero a cambio, se tiene un sistema cromatográfico muy eficiente.

En CPC, la sílice es "reemplazada" por un campo gravitacional que permite utilizar un disolvente orgánico (n-hexano por ejemplo) como FE y éste ocupa entre el 50 y 80 % del volumen total de la columna (figura 9).

Estas diferencias en el porcentaje de FE tienen como consecuencia:

- Los coeficientes de reparto utilizados para la purificación de una muestra por CPC son cercanos a la unidad, mientras que para CLAE son generalmente mayores de 15.
- La capacidad de una columna CPC es mucho más importante que para una columna CLAE del mismo volumen total. Es posible entonces analizar grandes cantidades de muestra por CPC sin saturar la columna.

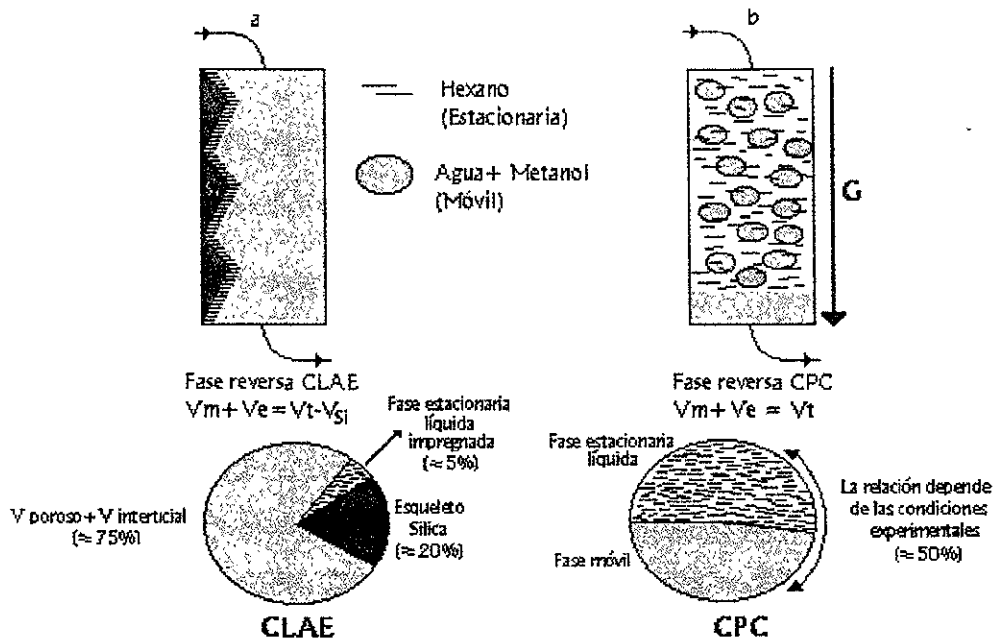


Figura 9. Fases estacionarias utilizadas (a) CLAE y (b) CPC

Resolución Cromatográfica

La ecuación fundamental de la cromatografía de reparto es:

$$V_r = V_M + K + V_E$$

Donde V_r es el volumen de retención del soluto, V_M y V_E son respectivamente los volúmenes de fase móvil y estacionaria dentro de la columna, y K es la constante de reparto.

En CLAE, los volúmenes de FM y FE dentro de la columna no se conocen, mientras que en CPC sí es posible conocerlos, por lo que es posible calcular la constante de reparto de un compuesto dado, si se conoce el volumen de retención.

Eficiencia

En cromatografía, la eficiencia se representa por el número de platos teóricos (N), que se calcula a partir de la siguiente ecuación:

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

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

En CPC se puede aplicar la misma ecuación, aunque por esta técnica no se tiene una columna real, sino una serie de canales conectados entre sí y parece ser que a lo más hay un plato teórico por canal²⁰. En la mayoría de los casos, se necesitan varios canales para formar un plato teórico.

Resolución

Para dos compuestos vecinos 1 y 2, la resolución (R_s) está en función del factor de selectividad (α), del número de platos teóricos (N) y del factor de retención (k'), siendo este último función de la constante de reparto K y de los volúmenes de FE y FM dentro de la columna V_E y V_M .

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{k'_2 + 1} \right)$$

El factor de selectividad es la relación de los coeficientes de reparto de dos solutos vecinos. En CLAE, K se reemplaza por el factor de retención k' .

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

y

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} = K \frac{V_E}{V_M}$$

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

Es posible entonces calcular la resolución a partir de la ecuación anterior:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{K}{K_2 + \frac{V_M}{V_E}} \right)$$

El valor de la relación de V_M/V_E es grande para CLAE (entre 13 y 20) y no es importante en CPC (entre 0.25 a 1 para un volumen de FE entre 50 y 80% del volumen total de la columna). Esto significa que con el mismo factor de separación y constantes de reparto idénticas, la resolución es mucho más grande en CPC que en CLAE para un número de platos teóricos dado, es decir, el número de platos teóricos necesarios para tener una resolución determinada es menor en CPC que en CLAE.

La figura 10 muestra que para $\alpha=1.2$, $K=1$ y $N=1000$, la resolución es de 0.1 en CLAE ($V_E \approx 7\%$ del volumen total) y 1 en CPC ($V_E \approx 65\%$ del volumen total). Entonces, para obtener una resolución de 1.5 se necesitan 190,000 platos teóricos en CLAE, mientras que 2,200 son suficientes en CPC.

Vemos así que el volumen de fase estacionaria en la columna CPC hace variar fuertemente la resolución, por lo que esta variable debe estar perfectamente controlada durante la optimización de las condiciones experimentales.

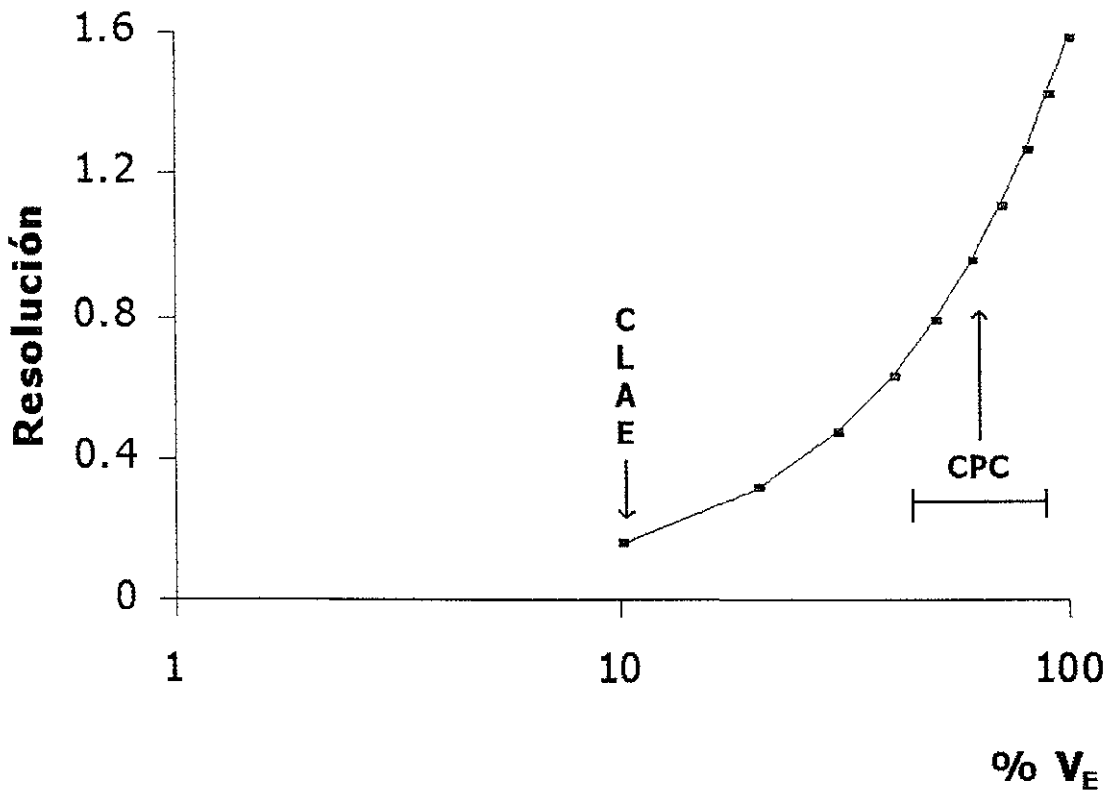


Figura 10. Resolución en función del porcentaje de fase estacionaria para CLAE y para CPC. $\alpha = 1.2$, $N = 1000$, $K = 1$.

Separación de flavonoles.

Desde hace aproximadamente 10 años y hasta la fecha, la mayoría de los análisis de los diferentes componentes de productos naturales se hacen por CLAE y los flavonoles no son la excepción.

Utilizando esta técnica, se han analizado diferentes plantas, alimentos y frutas.

A. Crozier y colaboradores²¹ hicieron un estudio comparativo de varias columnas cromatográficas y encontraron que para la separación de flavonoles los mejores resultados se obtenían con una columna Novapak C₁₈.

La detección generalmente se hace por UV, pero cada vez se reportan más trabajos de CLAE acoplada a Resonancia Magnética Nuclear (RMN), o a Espectrometría de Masas (EM) para la identificación de los compuestos.

En las Tablas I y II se describen algunos de los trabajos que se encontraron sobre la separación de flavonoles por CLAE.

Tabla I. Separación de flavonoles reportadas por CLAE.

Muestra	Tratamiento	Columna	FM	Detección	Identificación (Estándar)
<i>Cistus laurifolus</i> (Hojas) ²²	Extracción con CHCl ₃ e hidrólisis.	Hypersil, MOS RP-8	H ₂ O (0.5% de TFA)-MeOH-ACN-THF (68:6:6:20)	U.V. a 350 nm CCF (Poliamida)	Quercetina, Kaempferol, Apigenina
<i>Ginkgo biloba</i> (Hojas) ²³	Extracción con EtOH 80% e hidrólisis.	Nucleosil 100-C ₁₈	A: Gradiente con H ₂ O (0.5% ácido ortofosfórico), MeOH y THF B: Gradiente con H ₂ O (0.5% ácido ortofosfórico), ACN e Isopropanol - THF	U.V. a 370 nm Complejación con Al ³⁺	Quercetina, Kaempferol Isoramnetina.
<i>Caléndula officinalis</i> (flores) ¹⁰	Extracto con MeOH acuoso al 50%	Aquapore C ₈	H ₂ O – Isopropanol – THF (10:5:85)	U.V. a 340 nm	Quercetina, Isoramnetina.
<i>Sambucus nigra</i> (Flores) ¹⁰	Extracto con MeOH acuoso al 50%	Aquapore C ₈	H ₂ O – Isopropanol – THF (12:4:84)	U.V. a 340 nm	Quercetina, Isoramnetina Rutina
<i>Crataegus</i> (Hojas y Flores) ²⁴	Extracto con MeOH acuoso al 80%	Hypersil ODS	Gradiente con H ₂ O (0.5% ácido ortofosfórico), MeOH – THF- ACN	U.V. a 260, 336 y 370 nm.	Quercetina, Vitexina Isovitexina.
Jugo de naranja y concentrado de frutas comercial ²⁵	Alícuotas de jugo diluidas en MeOH	Altima C ₁₈	H ₂ O - (ácido fórmico 0.2) - ACN – Isopropanol (19:23: 58)	U.V. a 283 nm y 335 nm.	Hesperidina, Naringina Narirutina Roifolina
Tabletas de <i>Changyanning</i> ²⁶	Extracto con MeOH acuoso al 50%	Shim-Pack CLC-ODSC	H ₂ O (H ₃ PO ₄ 0.4 %) MeOH- (45:55)	U.V a 254 nm	Quercetina
Cartamus Linctorius (Flores) ²⁷	Extracto con MeOH acuoso al 70%	YWG-C ₁₈	H ₂ O (H ₃ PO ₄ 0.25 %) MeOH (51.5:48.5)	U.V. a 360nm	Quercetina, Kaempferol Rutina
<i>Ginkgo biloba</i> (Hojas) ²⁸	Extracto con MeOH acuoso al 70%	YWG-C ₁₈	H ₂ O (H ₃ PO ₄ 0.2 %) MeOH 50:50)	U.V. a 360 nm	Quercetina Kaempferol

Tabla II. Separación de flavonoles reportadas por CLAE con detección por EM.

Muestra	Columna	Eluyente	Detección	Estándares	Fragmentos de detección
<i>Cistus Ladanifer</i> (Hojas) ²⁹	Lichrosorb C ₁₈	H ₂ O (acetato de amonio 0.1 M) MeOH - ACN - THF (56:16:6:22)	U.V. a 350 nm Espectrometría de masas (Impacto electrónico)(EM-IE)	Apigenina.	M ⁺ , [M - 1] ⁺ , [M - H ₂ O] ⁺ , [M - CO] ⁺ , [M - CHO] ⁺ , [M - OCH ₃] ⁺ , [M - CH ₃ CO] ⁺ .
<i>Betula pubescens</i> y <i>Betula pendula</i> (Hojas) ³⁰	Spherisorb ODS-2 (Analítica) μ Bondapak C ₁₈ (Preparativa)	Gradiente de H ₂ O (5% ácido fórmico) a Acetonitrilo (Analítico) Gradiente H ₂ O (2.5% ácido acético) a EtOH 96% (Preparativa)	U.V. (arreglo de diodos) RMN ¹ H y ¹³ C EM	Quercetina, Kaempferol, Naringenina Miricetina	M ⁺ .
<i>Trifolium pratense</i> (trébol rojo) ³¹	ODS Hypersil	Gradiente de H ₂ O(0.25%HOAc) a MeOH	U.V. (arreglo de diodos) EM	Daidzina, Daidzeina, Genistina, genisteina, Quercetina, Biochanina e Isoquercetrina	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺
Manzana, naranja y peras (Pulpa) ³²	Phenomenex RP C ₁₈	Gradiente con H ₂ O (ácido fórmico1%) - MeOH.	U.V. (arreglo de diodos) EM	Miricetina, Quercetina, Naringenina, Luteolina, Hesperetina, Kaempferol, Apigenina Isoramnetina	[M - H] ⁻ o M ⁻

Separaciones por Cromatografía de Partición Centrífuga.

Usando estas técnicas tanto en sus versiones antiguas como en sus versiones modernas, se han separado algunos flavonoles. Enseguida se resumirán estos trabajos.

Usando la cromatografía a contracorriente de goteo (DCCC) y el sistema bifásico cloroformo / propanol / metanol / agua (5:1:6.4 % v/v/v/v) en modo descendente con un flujo de 14 mL/hora (300 tubos) se separaron kaempferol y de quercetina en forma glicosídica partir de extractos purificados de Ginkgo Biloba³³.

Este mismo extracto también se ha analizado por CCC³⁴ usando el sistema bifásico cloroformo–metanol-agua (4:3:2 % v/v/v); usando una columna de 240 mL de volumen total, se lograron separar la isoramnetina, kaempferol y quercetina, en un volumen de análisis total de 200 mL.

Este sistema bifásico fue empleado por los mismos autores para separar los componentes de un extracto de espino, de donde se identificaron a la isoramnetina y a la quercetina³⁵.

Del extracto de Ginkgo Biloba se separó por CCC un glicósido de kaempferol y de quercetina usando gradiente de elución con agua como FE y acetato de etilo y 2-butanol como FM³⁶.

Los estándares de quercetina y rutina se separaron por CCC con el sistema bifásico acetato de etilo – etanol - solución acuosa de NaOH 0.007M (2:1:2 % v/v/v), usando la fase orgánica como FM (modo ascendente). En estas condiciones, la quercetina eluye primero y después la rutina³⁷.

Usando el sistema bifásico metiletilcetona (MEK) - agua, se separaron 6 estándares de flavonoles, entre ellos el kaempferol y la quercetina, así como sus derivados glucosídicos³⁸.

Usando la Cromatografía de Partición Centrífuga, sólo se ha reportado la separación de estándares de hesperetina, kaempferol y quercetina, con el sistema bifásico cloroformo - metanol - agua. Cabe destacar que en este artículo hacen la comparación de la separación de estos estándares usando la Cromatografía de Partición Centrífuga, la Cromatografía a Contracorriente de Goteo y la Cromatografía a Contracorriente de Rotación Locular³⁹.

Recientemente, en nuestro laboratorio se separaron algunos flavonoles glicosídicos de kaempferol y quercetina presentes en extractos de *Ginkgo biloba*. En este caso se usaron dos sistemas bifásicos: acetato de etilo - etanol - agua (2:1:2 % v/v/v) y gradiente de elución con agua como fase estacionaria y n-hexano, acetato de etilo, isobutanol como fases móviles⁴⁰.

Como puede observarse, son muy pocos los trabajos donde se reporta la separación de flavonoles empleando CPC y hasta donde se hizo la revisión para este estudio, no se encontró ningún trabajo acerca de la *Caléndula officinalis*.

Por otro lado, como puede observarse, en varios de los sistemas bifásicos se utilizan disolventes clorados. Puesto que estos dañan la tubería de teflón, es conveniente sustituir este disolvente por algún otro³⁸.

Es por eso que en este trabajo proponemos la separación de quercetina e isoramnetina de un extracto hidrolizado de *Caléndula officinalis* por Cromatografía de Partición Centrífuga.

PARTE EXPERIMENTAL

Material y equipo

Todos los disolventes utilizados fueron grado cromatográfico o grado reactivo de Baxter (E. U. A.), Prolabo (Francia), EM Science e INDEQ. Algunas veces se utilizaron disolventes grado técnico y en este caso se destilaron previamente.

Los estándares de Kaempferol y Quercetina fueron de Sigma-Aldrich (E. U. A.).

Las flores de *Caléndula officinalis* se obtuvieron en el mercado Martínez de la Torre en la Ciudad de México.

Para la cromatografía en capa fina, se usaron cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄ con un espesor de capa de 0.2 mm de Merck (Alemania).

Para el análisis por CLAE se utilizó un cromatógrafo de líquidos marca Waters (E. U. A.) 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.

Para la separación por CPC se utilizó el mismo equipo, con una columna fue de partición centrífuga de Sanki Engineering LTD (Kioto, Japón), con un volumen total de 230 mL. El bucle de inyección fue de 0.7 mL.

Equipo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) marca Varian modelo Unity 300 (E.U.A.) de 300 MHz. Se utilizó CDCl₃ para los espectros de ¹H .

Espectrómetro de Masas (EM) marca JEOL, modelo JM5-505 HA (Japón). La muestra se introdujo directamente usando la técnica de bombardeo rápido de átomos (FAB).

Preparación del extracto.

En un matraz erlenmeyer provisto de agitación magnética se pusieron 2 g de pétalos secos y pulverizados de las flores de *Caléndula officinalis* en 50 mL de etanol acuoso al 70%. La mezcla se dejó en agitación durante 4 horas y después se filtró y el filtrado se sometió a una hidrólisis ácida durante 3 horas, agregando 10 mL de una disolución de H₂SO₄ al 30% en EtOH. Al término de la hidrólisis, se evaporó la mayor cantidad de EtOH y el residuo se neutralizó a pH 6-7 con una solución saturada de KOH, el precipitado obtenido se filtró y se redisolvió en AcOEt, se volvió a filtrar y se evaporó a sequedad.

Para su análisis, el extracto se disolvió en la fase móvil (10 mL para CPC y 100 mL para CLAE).

Análisis por CPC

En este estudio se utilizaron dos sistemas bifásicos diferentes AcOEt – EtOH – H₂O 2:1:2 (% v/v/v) y THF – DMSO – H₂O 59.2:16.2:25.6 (% v/v/v).

Con el rotor apagado, la columna se llenó con 50% de cada una de las fases a un flujo de 10 mL/min, dejando eluir 100 mL de la mezcla para verificar que la relación de fases fuera la misma. Después, se paró el flujo y se encendió el rotor a una velocidad (ω) de 1400 rpm. Después, se ajustó el flujo de fase móvil (FM) a 5 mL/min en modo descendente. Para un volumen de inyección de 0.7 mL, ésta se hizo a través del inyector. Cuando se inyectaron 10 mL, éstos se introdujeron al sistema cromatográfico 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 fase móvil, manteniéndose el mismo flujo por cinco minutos más (tiempo de inyección). Pasado ese tiempo, se aumentó el flujo a 5 mL/min y éste se mantuvo durante todo el análisis. Después de cierto tiempo de análisis, la elución se cambió a modo ascendente siendo ahora la fase móvil la fase acuosa.

Para la detección por UV-Vis (300 nm), se colocó una válvula divisoria (1:10) entre la salida de la columna y la entrada del detector. Por otro lado, se colectaron fracciones de 25 mL de eluyente para posterior análisis por CLAE.

Análisis por CLAE.

Se utilizó una columna Hypersil Elite C₁₈ (150 X 4.6 mm d. i.) con un tamaño de partícula de 5 µm. El flujo fue de 1 mL/ min y la detección UV a 300 nm. El gradiente de elución utilizado se describe en la Tabla III.

Tabla III. Gradiente de elución utilizado.

Tiempo (minutos)	Agua (%) (0.1% TFA)	Acetonitrilo (%)
0	95	5
5	95	5
10	95	5
15	70	30
20	70	30
25	60	40
30	0	100
35	0	100

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Preparación del extracto.

Antes de determinar las mejores condiciones de separación, fue necesario obtener el extracto de las flores de *Caléndula officinalis*. En la bibliografía se reporta el uso de disolventes clorados para obtener estos extractos. Sin embargo, en nuestro caso no es conveniente usar este tipo de disolventes porque se podría dañar la columna de cromatografía de partición centrífuga.

Es por eso que se estudió la extracción de los principios activos de nuestro interés usando diferentes disolventes no clorados, tanto polares (agua y alcoholes) como apolares (n-hexano). Por otro lado, para saber en qué tiempo se extraía la mayor cantidad de componentes sin que hubiera descomposición de los mismos, se varió el tiempo de agitación desde cinco minutos hasta 24 horas. Todos los experimentos se hicieron a temperatura ambiente.

A todos los extractos obtenidos se les hizo cromatografía en capa fina (CCF) sobre placas de sílica gel usando diferentes eluyentes y diferentes reveladores, siendo éstos universales (yodo y H_2SO_4 disuelto en etanol) y específicos como vainillina (para terpenos), ácido pícrico (para glicósidos), ácido p-toluensulfónico (para esteroides y flavonoles), cloruro de aluminio (para flavonoles), p-anisaldehído (para fenilhidrazonas y glicósidos) y ácido tricloroacético (para glicósidos).

Los resultados se resumen en la Tabla IV, en donde únicamente se muestra el mejor tiempo de agitación para cada disolvente y se indica el o los tipos

de compuestos extraídos, de acuerdo al revelador con el que se obtuvieron más intensas las manchas (mayor respuesta).

Tabla IV. Obtención del extracto de flores de *Caléndula officinalis*.

Disolvente de extracción	Tiempo de agitación	Eluyente (CCF)	Principales compuestos
n-Hexano	4 horas	n-Hexano / AcOEt (70-30 % v/v)	---
Tolueno	5 horas	n-Hexano / AcOEt (70-30 % v/v)	Terpenos
AcOEt	2 horas	n-Hexano / AcOEt (70-30 % v/v)	Terpeno
THF	7 horas	n-Hexano / AcOEt (70-30 % v/v)	Terpenos
Acetona	2 horas	n-Hexano / AcOEt (70-30 % v/v)	Terpenos Glicósidos
Etanol	4 horas	n-Hexano / AcOEt (50-50 % v/v)	Terpenos, Flavonoles Glicósidos
Metanol	8 horas	n-Hexano / AcOEt (30-70 % v/v)	Terpenos Flavonoles Glicósidos
Etanol / Agua (70-30 % v/v)	4 horas	AcOEt / EtOH (70-30 % v/v)	Terpenos Flavonoles Glicósidos

Como puede observarse, los flavonoles glicosídicos se obtienen con disolventes polares (desde acetona hasta mezcla etanol / agua) y es con esta última mezcla con la que se obtiene una mayor cantidad (las manchas obtenidas son más intensas).

Es por eso que el extracto se hizo con la mezcla Etanol - Agua 70-30 (% v/v) agitando durante cuatro horas a temperatura ambiente. En estas

también se extraen los terpenos, pero al ser de diferente polaridad, se pueden separar cromatográficamente.

Como se mencionó anteriormente, los principales flavonoles se presentan unidos a diferentes azúcares. Es por eso que para obtener los flavonoles libres (aglicones) se hizo una hidrólisis ácida. Esta se hizo en presencia de ácido sulfúrico con calentamiento a reflujo durante 3 horas. Después, la solución se neutralizó y se eliminó el etanol por evaporación. Al residuo se le añadió agua (para solubilizar los azúcares) y el precipitado formado (aglicones) se separó por filtración y después se redisolvió en acetato de etilo, el cual se eliminó antes de su análisis.

Inicialmente se pensó redissolver el precipitado directamente con la fase móvil, pero se observó que al disolverlo en la mezcla acetonitrilo – agua y en la fase móvil para la CPC, los resultados eran diferentes (diferente composición del extracto). Es por eso que el filtrado obtenido por hidrólisis se disolvió primero en AcOEt (que fue el mejor disolvente para nuestros compuestos de interés), y después de eliminar éste, redissolverlo ahora sí en la FM a utilizar, en este caso, mezcla acetonitrilo agua 50-50(% v/v).

Es importante hacer notar la importancia de controlar el pH al momento de neutralizar, ya que pequeñas variaciones del mismo modifican la composición del extracto.

Análisis por CLAE

Para saber si se obtenía o no una buena separación por CPC, era necesario contar con un control. Como se mencionó anteriormente, una de las técnicas de separación más utilizadas para este tipo de compuestos es la CLAE.

En nuestro laboratorio, se contaba con un método de separación para flavonoles glicosídicos⁴⁰. Este se modificó un poco, tomando en cuenta que en

este caso se trataba de los flavonoles libres. En la figura 11a se muestra el cromatograma para el extracto obtenido.

Sobre el cromatograma se observa un pico mayoritario, que se supuso era la Isoramnetina (pico 8), ya que es el aglicón más abundante en las flores de *Caléndula officinalis*. Desafortunadamente no se contaba con este estándar para poder confirmarlo, por lo que se tuvo que identificar por otras técnicas como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y Espectrometría de Masas.

Los terpenos coextraídos con los flavonoles, al ser de naturaleza más apolar, deberían eluir después. Efectivamente, estos compuestos eluyeron a partir de los 28 minutos, como se observa en la figura.

De acuerdo a su estructura, la Quercetina (segundo flavonol más abundante) debería salir antes que la Isoramnetina. Se inyectó un estándar de Quercetina en las mismas condiciones que el extracto y se observó que este corresponde al pico número 6 del extracto con tiempo de retención de 19.9 min (figura 11b).

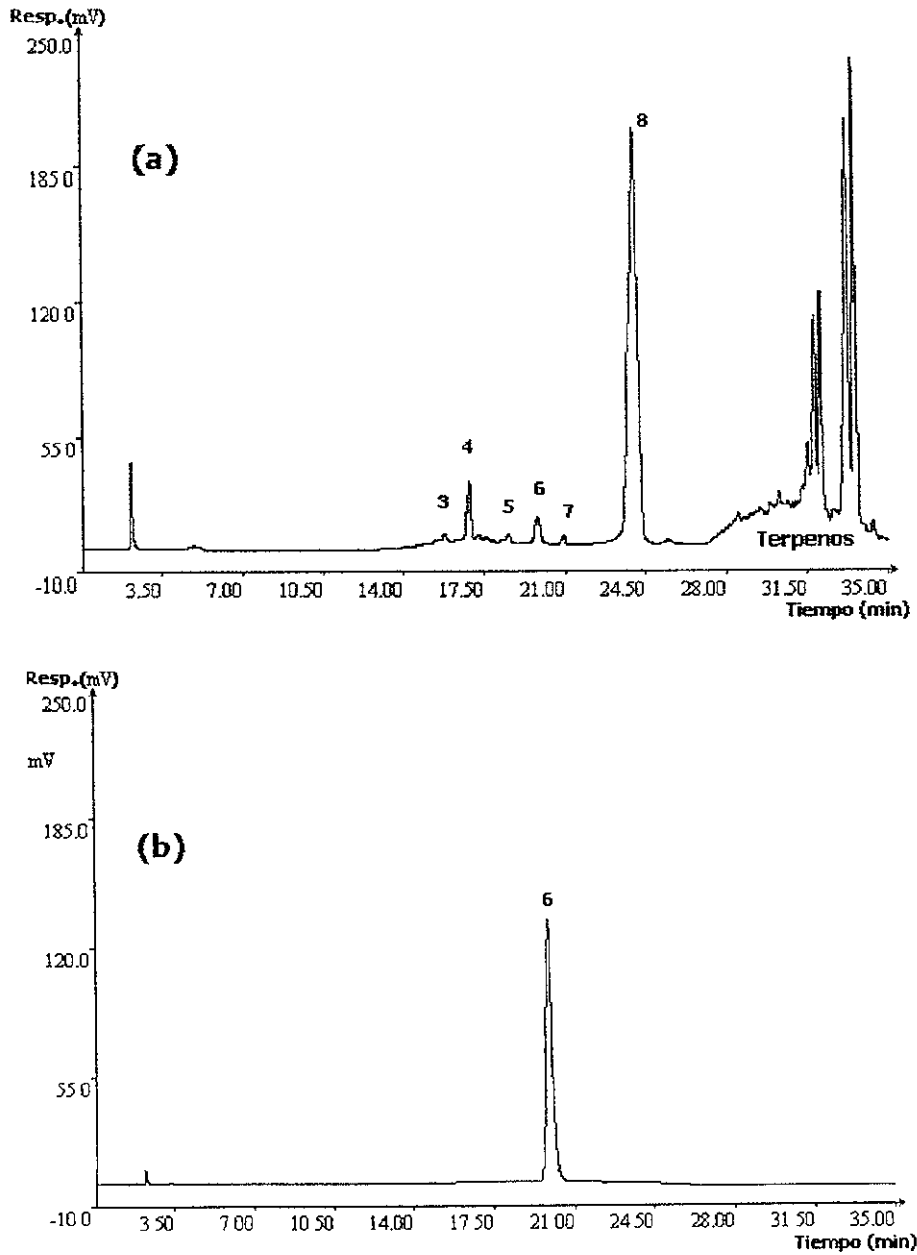


Figura 11. Separación por CLAE. (a) Extracto hidrolizado de las flores de *Caléndula officinalis*. (b) Estándar de Quercetina, ($t_r = 19.9$ min). Condiciones de separación descritas en la parte experimental.

Separación por CPC.

Una vez establecidas las condiciones para el análisis por CLAE, se buscaron las condiciones de separación por CPC para el mismo extracto. El primer sistema bifásico estudiado fue n-Hexano – AcOEt – MeOH – H₂O 1:1:1:1(% v/v/v/v). Cuando se utilizó la fase orgánica como FM (modo ascendente), los compuestos eluyeron prácticamente en el tiempo muerto es decir, no hubo retención. Al contrario, cuando la FM fue la fase acuosa (modo descendente), los solutos eluyeron inmediatamente después de la inversión es decir, éstos presentaban una gran preferencia por la fase orgánica y casi no había interacción con la fase acuosa.

Tratando de hacer menos polar la fase inferior y menos apolar la superior, se añadió THF al medio, ya que éste se distribuye de la misma manera entre las 2 fases (sistema n-Hexano - AcOEt – THF – MeOH – Agua 1:1:1:1:1 (% v/v/v/v/v)). Sin embargo, los resultados siguieron siendo los mismos.

Tratando de hacer más homogénea la polaridad de las fases, se probó el sistema AcOEt – BuOH – MeOH – Agua 1:1:1:2 (% v/v/v/v) sin resultado alguno, además este sistema bifásico fue muy inestable en el sistema cromatográfico.

Con todos los sistemas anteriores, se observó preferencia de los componentes del extracto por la fase orgánica.

Sistema Acetato de Etilo – Etanol – Agua.

En estudios hechos anteriormente en nuestro laboratorio⁴⁰ se utilizó el sistema bifásico formado por AcOEt, EtOH y Agua en proporciones 2:1:2 (% v/v/v).

Este sistema se usó para analizar el extracto hidrolizado. Se inyectaron 0.7 mL de la muestra disuelta en la fase superior del sistema (fase rica en AcOEt y

EtOH). En este caso se empleó un modo dual de elución, empezando en modo descendente (FM inferior, rica en Agua y EtOH) y después de 120 min, en modo ascendente (FM superior).

Puesto que en el mismo análisis ambas fases se iban a usar como estacionaria y móvil, la columna se llenó con 50% de cada una de las fases.

El cromatograma obtenido se presenta en la figura 12.

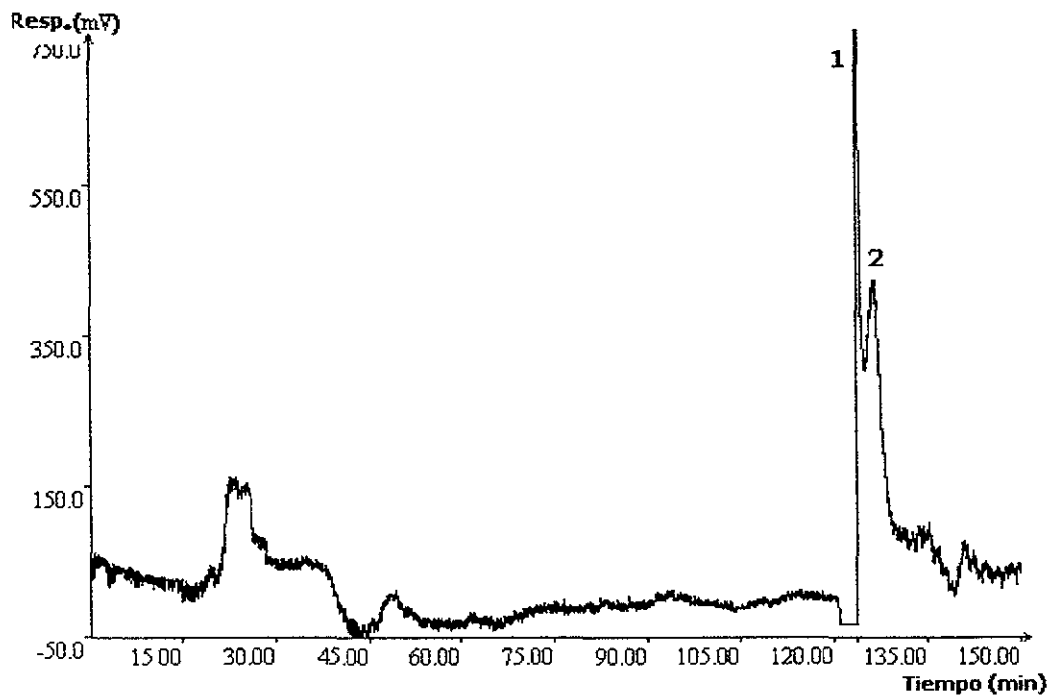


Figura 12. Análisis por CPC del extracto hidrolizado de flores de *Caléndula officinalis*. Sistema bifásico AcOEt – EtOH – Agua 2:1:2 (% v/v/v) Modo de elución descendente con inversión a los 120 min. $\omega = 1200$ rpm, flujo = 5 mL/min, inyección = 0.7 mL y detección de UV a 300 nm.

En este caso se observa que prácticamente todo eluye después de la inversión, obteniéndose 2 picos. El eluyente de cada pico se colectó y se analizó por CLAE.

La figura 13 representa el cromatograma correspondiente al segundo pico y como puede observarse, este corresponde a la Quercetina y a la Isoramnetina, es decir, no hubo separación.

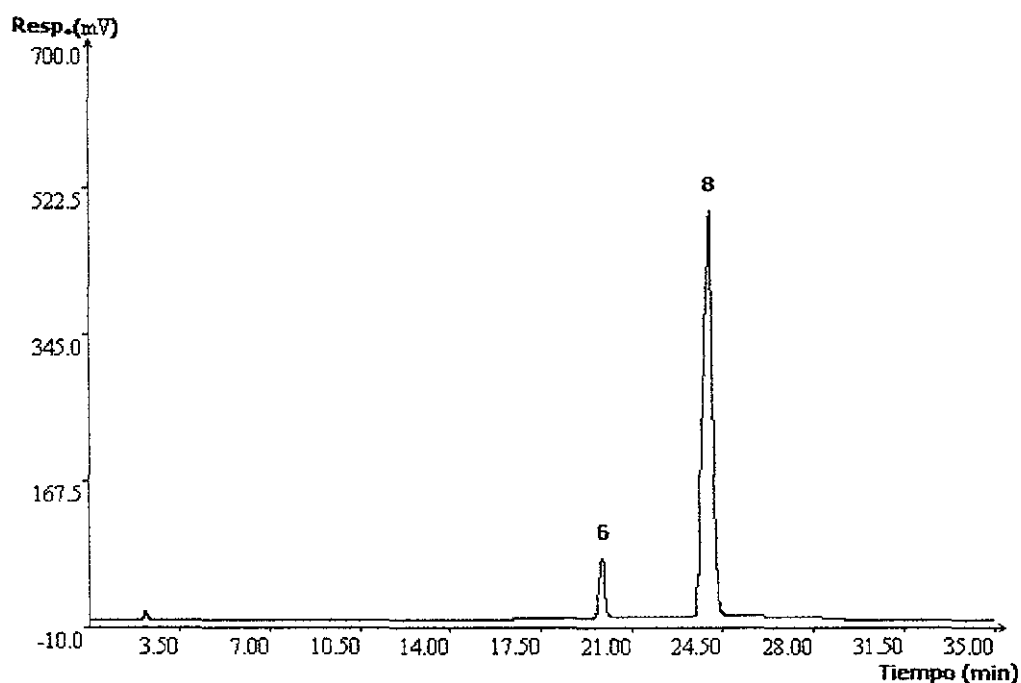


Figura 13. Análisis por CLAE del eluyente del segundo pico del análisis por CPC. Condiciones cromatográficas descritas en la parte experimental.

Con este sistema bifásico sólo se pudieron separar los flavonoles de nuestro interés de los demás componentes del extracto, pero no se separaron estos flavonoles entre ellos, ni aún cuando se aumentó el tiempo de elución antes de invertir.

Sistema THF – DMSO – Agua.

De los resultados anteriores, supimos que para llevar a cabo la separación se debería utilizar un sistema en donde las dos fases tuvieran poca diferencia en polaridad entre sí.

Por otro lado, se sabía que el THF, el DMSO y el agua mezclados en ciertas proporciones forman 2 fases y que en ambas se encuentra los 3 disolventes en diferentes proporciones, es decir la diferencia de polaridades entre las 2 fases no es muy grande.

Como el problema era separar los dos flavonoles, estas pruebas se hicieron con estándares de Quercetina y Kaempferol. Este último se utilizó en vez de la Isoramnetina, ya que no se contaba con ella. De acuerdo a su estructura (figura 4), el Kaempferol debería eluir entre la Quercetina y la Isoramnetina si se separaban los dos estándares, se separarían los flavonoles presentes en el extracto.

Se utilizaron diferentes cantidades de los disolventes y los mejores resultados se obtuvieron cuando se mezclaron 59.2% de THF, 16.4% de DMSO y 24.3% de Agua.

Este sistema bifásico se usó para el análisis por CPC, la elución fue en modo dual empezando en modo descendente (FM rica en Agua y DMSO) y después de 100 minutos, inversión a modo ascendente (fase móvil rica en THF).

En la figura 14 se representan los análisis de Kaempferol, Quercetina y la mezcla de estos 2 analitos.

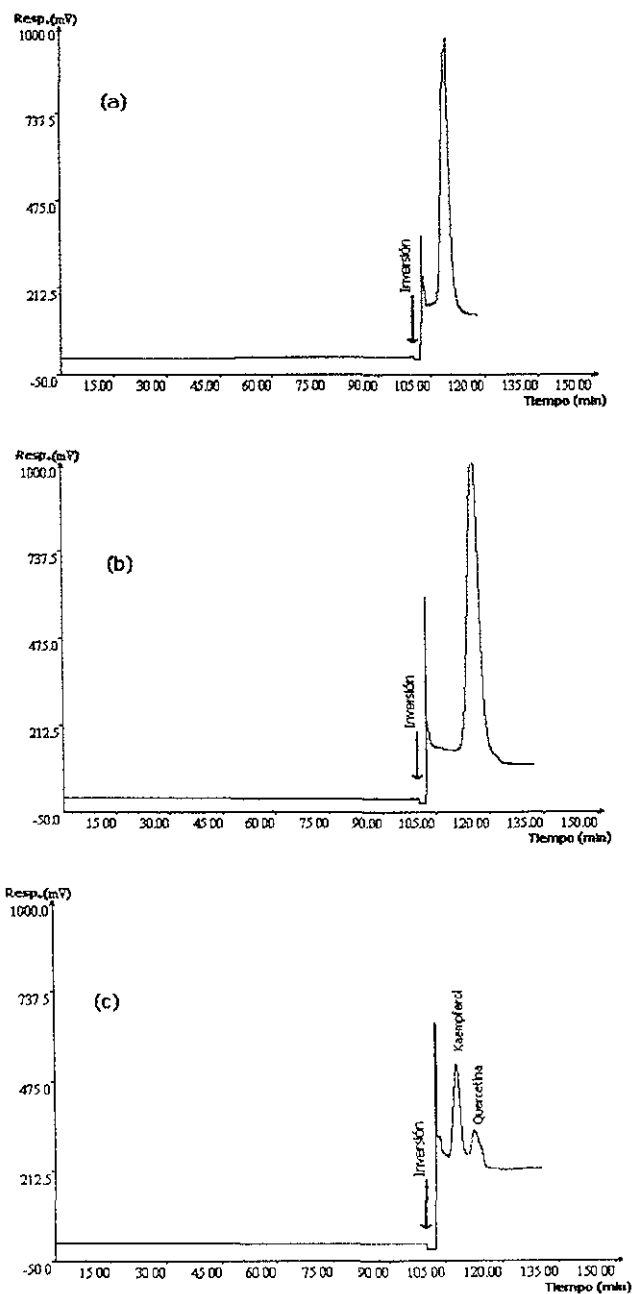


Figura 14. Separación por CPC de los estándares (a) Kaempferol, (b) Quercetina, (c) mezcla de Kaempferol y Quercetina. Sistema bifásico, THF – DMSO – Agua 59.2:16.4:24.3(% v/v/v). Modo de elución descendente, inversión a los 100 minutos. $\omega = 1400$ rpm. Flujo = 5 mL/min. Detección UV a 300 nm. V. de inyección = 0.7 mL (concentración aproximada de cada estándar 2 mg/mL).

Como se observa, con este sistema bifásico se logran separar la Quercetina y el Kaempferol.

Con estos resultados alentadores, decidimos analizar el extracto hidrolizado usando las mismas condiciones.

Así, primero se inyectaron 0.7 mL de una solución del extracto en concentración aproximada de 3 mg/mL. El cromatograma obtenido se presenta en la figura 15.

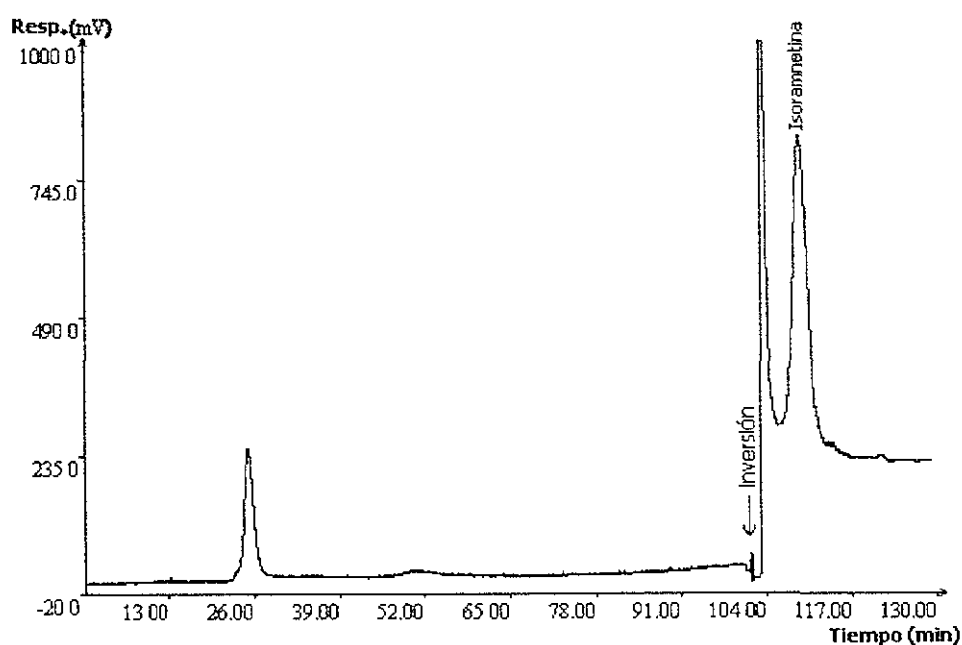


Figura 15. Análisis por CPC del extracto de *Caléndula officinalis*. Sistema bifásico, THF – DMSO – Agua 59.2:16.4:24.3(% v/v/v). Modo de elución descendente, inversión a los 100 minutos. $\omega = 1400$ rpm. Flujo = 5 mL/min. Detección UV a 300 nm. V. de inyección = 0.7 mL (concentración aproximada de extracto 3 mg/mL).

En este caso se observa únicamente un pico después de la inversión. Se colectó este pico y se analizó por CLAE, éste correspondió a la Isoramnetina (figura 16).

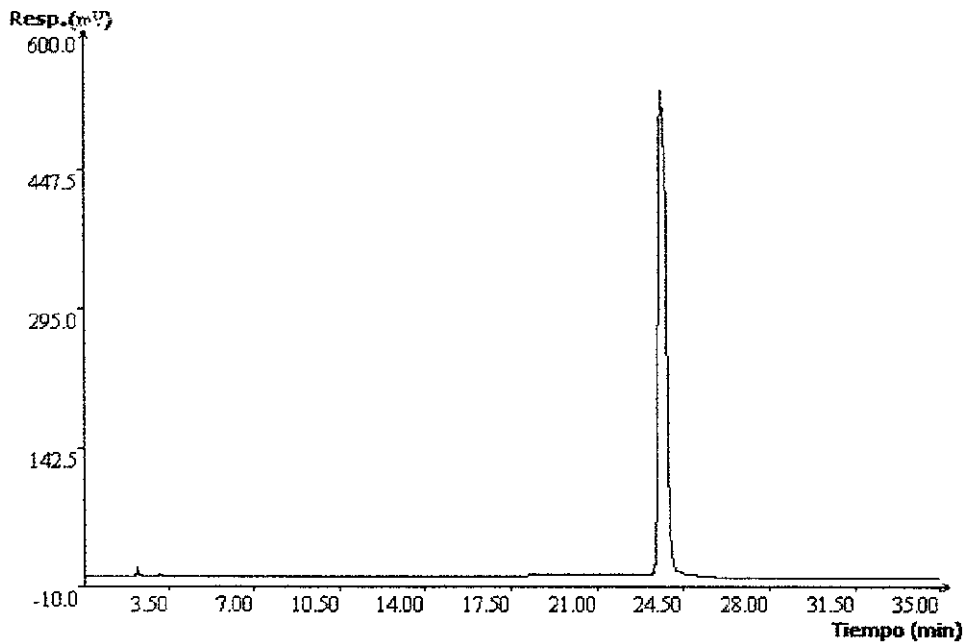


Figura 16. Análisis por CLAE de la fracción de Isoramnetina obtenida del análisis por CPC. (Condiciones descritas en la parte experimental.)

Se hicieron varias inyecciones en las mismas condiciones y los resultados fueron los mismos.

Suponemos que a los niveles de concentración con que se trabajaron, la Quercetina no es detectable.

Por este motivo y porque el objetivo era inyectar grandes cantidades, se inyectaron 160 mg de extracto hidrolizado disuelto en 10 mL de la fase superior del sistema bifásico.

En este caso la inyección se hizo a través de la bomba a un flujo de 1 mL/min y la inversión se hizo hasta que eluyó el pico mayoritario. En estas condiciones se obtuvieron 5 picos siendo el último el mayoritario que terminó de eluir a los 220 min, tiempo en que se hizo la inversión, obteniéndose un pico más (figura 17).

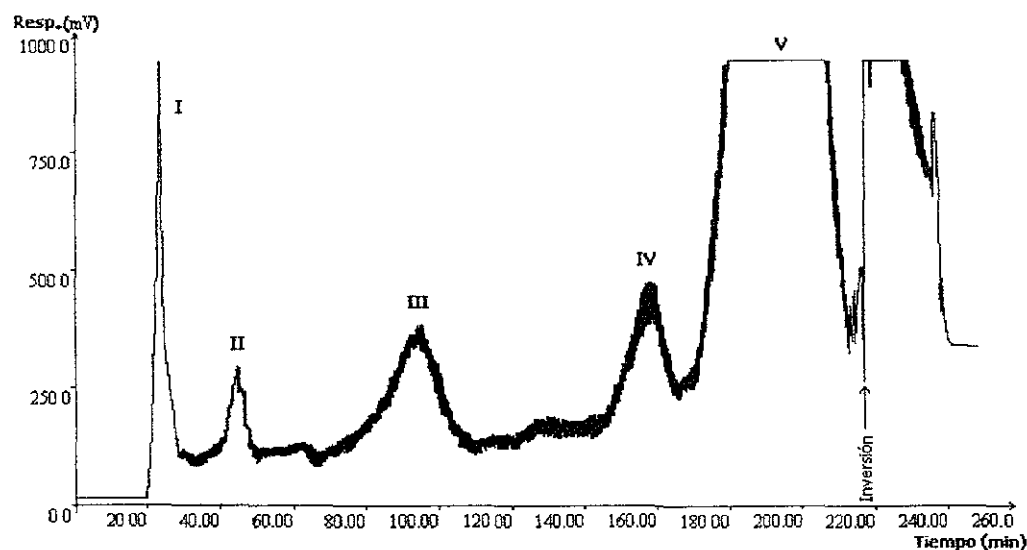


Figura 17. Análisis por CPC del extracto de *Caléndula officinalis*. Sistema bifásico, THF – DMSO – Agua 59.2:16.4:24.3(% v/v/v). Modo de elución descendente, inversión a los 100 minutos. $\omega = 1400$ rpm. Flujo = 5 mL/min. Detección UV a 300 nm. V. de inyección = 10 mL (concentración aproximada 16 mg/mL).

Si en modo descendente eluye primero la Isoramnetina, en modo descendente debe eluir primero la Quercetina.

Se colectaron fracciones de los últimos 2 picos antes de la inversión y se analizaron por CLAE. Efectivamente, el pico IV corresponde a la Quercetina y el pico mayoritario V a la Isoramnetina (figura 18).

Se volvió a inyectar otra muestra del extracto en las mismas condiciones y en este caso también se obtuvieron 5 picos, pero la proporción de los primeros picos cambió (figura 19).

Se hicieron varias inyecciones, cuidando todas las variables y se observó que el valor final de pH de la solución resultante de la hidrólisis influye mucho sobre la composición del extracto obtenido, sobre todo de los compuestos que eluyen primero (más polares). Sin embargo este hecho no influyó mucho en la cantidad obtenida de los flavonoles de nuestro interés, ya que el tamaño de los picos correspondientes a nuestros compuestos casi no varió.

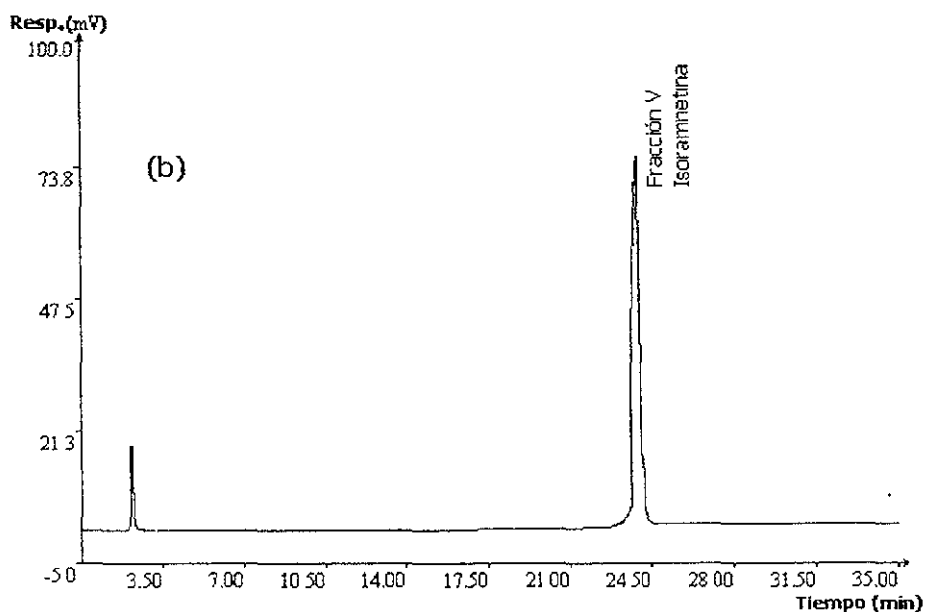
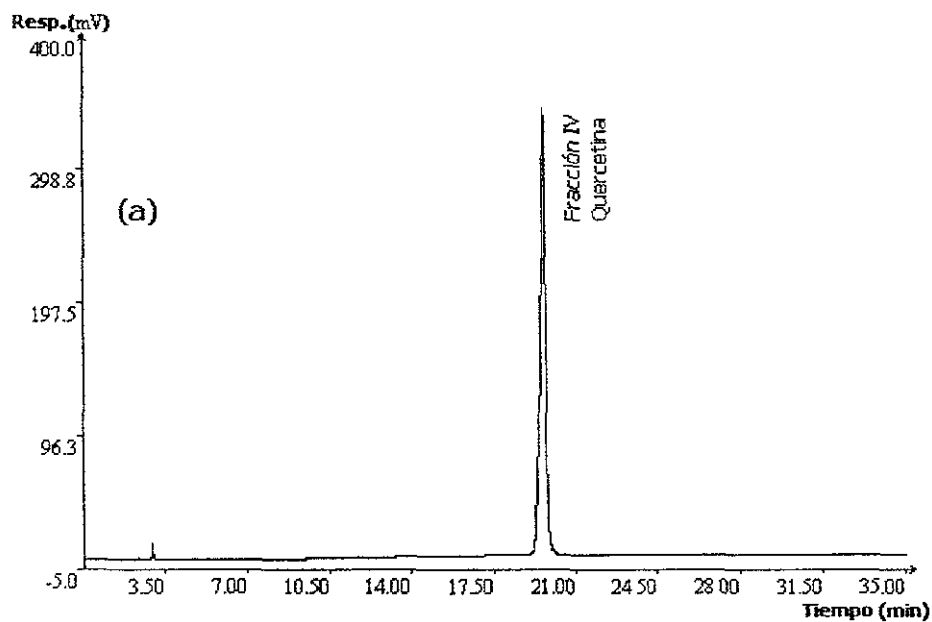


Figura 18. Análisis por CLAE de las fracciones obtenidas por CPC. La fracción IV corresponde a la Quercetina y la fracción V a la Isoramnetina. (Condiciones descritas en la parte experimental).

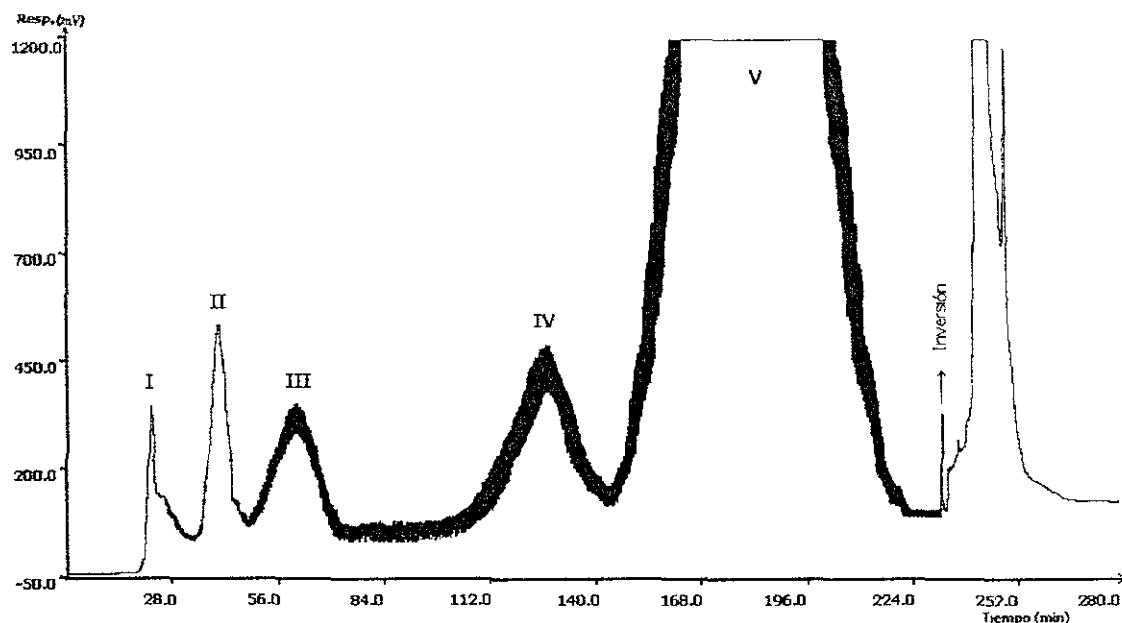


Figura 19. Análisis por CPC del extracto de *Caléndula officinalis*. Sistema bifásico, THF – DMSO – Agua (59.2:16.4:24.3). Modo de elución descendente, inversión a los 100 minutos. $\omega = 1400$ rpm. Flujo = 5 mL/min. Detección UV a 300 nm. V. de inyección = 10 mL (concentración aproximada 16 mg/mL).

Con las condiciones experimentales encontradas, se analizó por CPC una mayor cantidad del extracto, 600 mg de extracto disuelto en 10 mL de fase superior del sistema bifásico.

Como se observa en la figura 20, el perfil obtenido fue el mismo para los compuestos de interés.

Cabe señalar que entre la salida de la columna y el detector hay una válvula de división de flujo y esta se abrió completamente para este análisis, por lo que muy poca cantidad pasó al detector, debido a la gran cantidad de muestra.

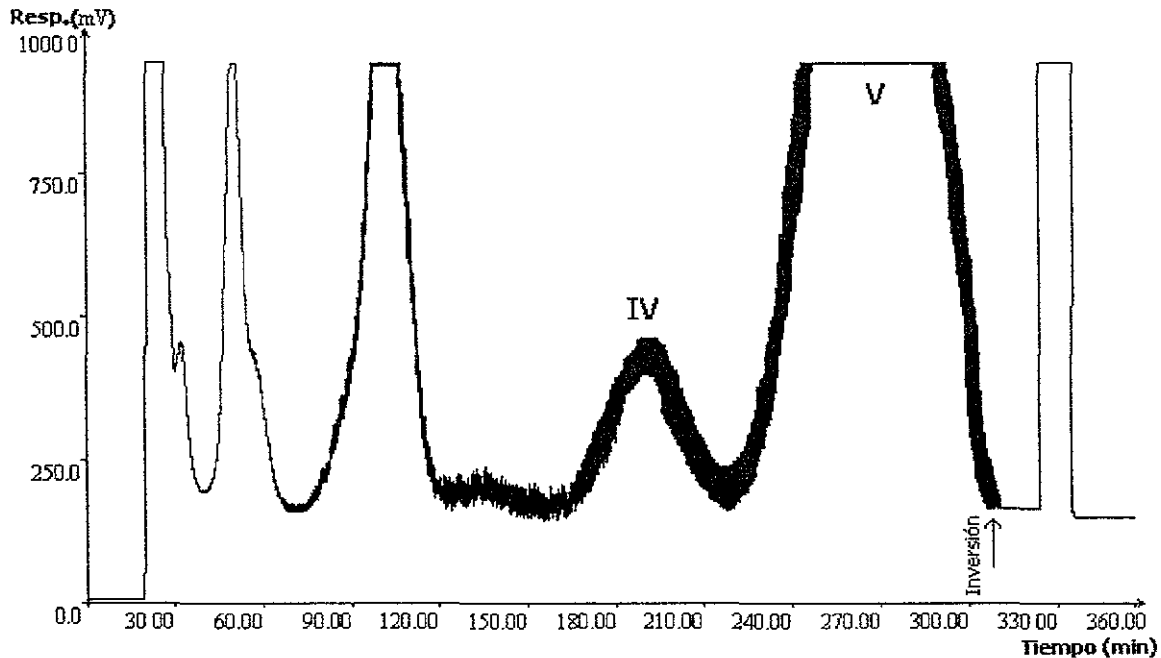


Figura 20. Análisis por CPC del extracto de *Caléndula officinalis*. Sistema bifásico, THF – DMSO – Agua 59.2:16.4:24. 3(% v/v/v). Modo de elución descendente, inversión a los 100 minutos. $\omega = 1400$ rpm. Flujo = 5 mL/min. Detección UV a 300 nm. V. de inyección = 10 mL (concentración aproximada 600 mg en 10 mL).

Con el sistema bifásico THF – DMSO – Agua (59.2:16.4:24.3) se logró establecer un método de separación preparativa para la Isoramnetina y la Quercetina presentes en el extracto hidrolizado de flores de *Caléndula officinalis*.

Sin embargo, hasta ahora se ha dicho que se trata de la Isoramnetina basándonos en que es el compuesto que debe encontrarse en mayor porcentaje. Sin embargo para comprobar que efectivamente se trata de este compuesto, se colectó la fracción correspondiente a este pico mayoritario del análisis por CPC y se evaporó el disolvente.

A partir de 600 mg de muestra se obtuvieron 2 mg de cristales amarillos (con residuos de DMSO) que se analizaron por RMN ^1H y Espectrometría de masas (figuras 21 y 22).

La diferencia entre la Quercetina y la Isoramnetina es la presencia de un grupo OCH_3 en lugar de un OH (figura 4).

Si la molécula tiene un grupo metoxi, en RMN ^1H debe aparecer una señal correspondiente al metilo unido a O-fenilo. Esta señal la tenemos a 3.82 ppm. También se tienen 4 señales que desaparecen al añadir agua deuterada a la muestra y que corresponden a los grupos OH .

En el análisis por Espectrometría de Masas, se tiene el ion $\text{M}+1$ de 317, que coincide con la masa molecular de la Isoramnetina (316).

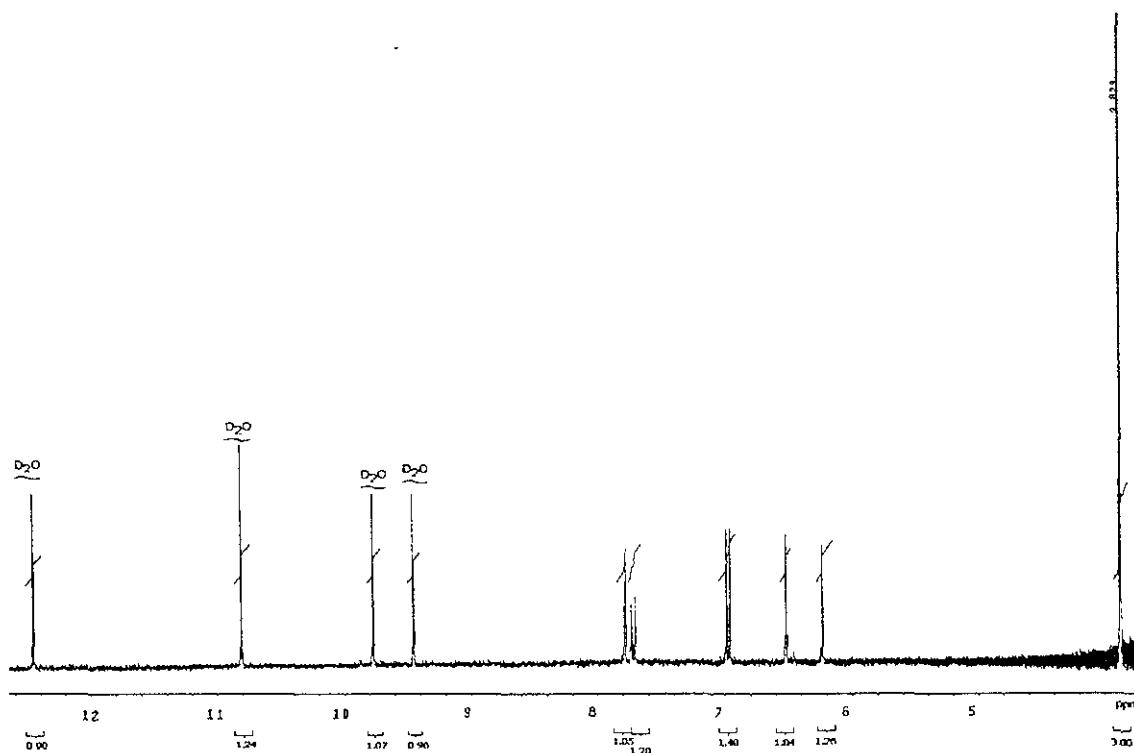


Figura 21. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H del pico mayoritario obtenido del análisis por CPC.

ESTADÍSTICO SALT
 2011

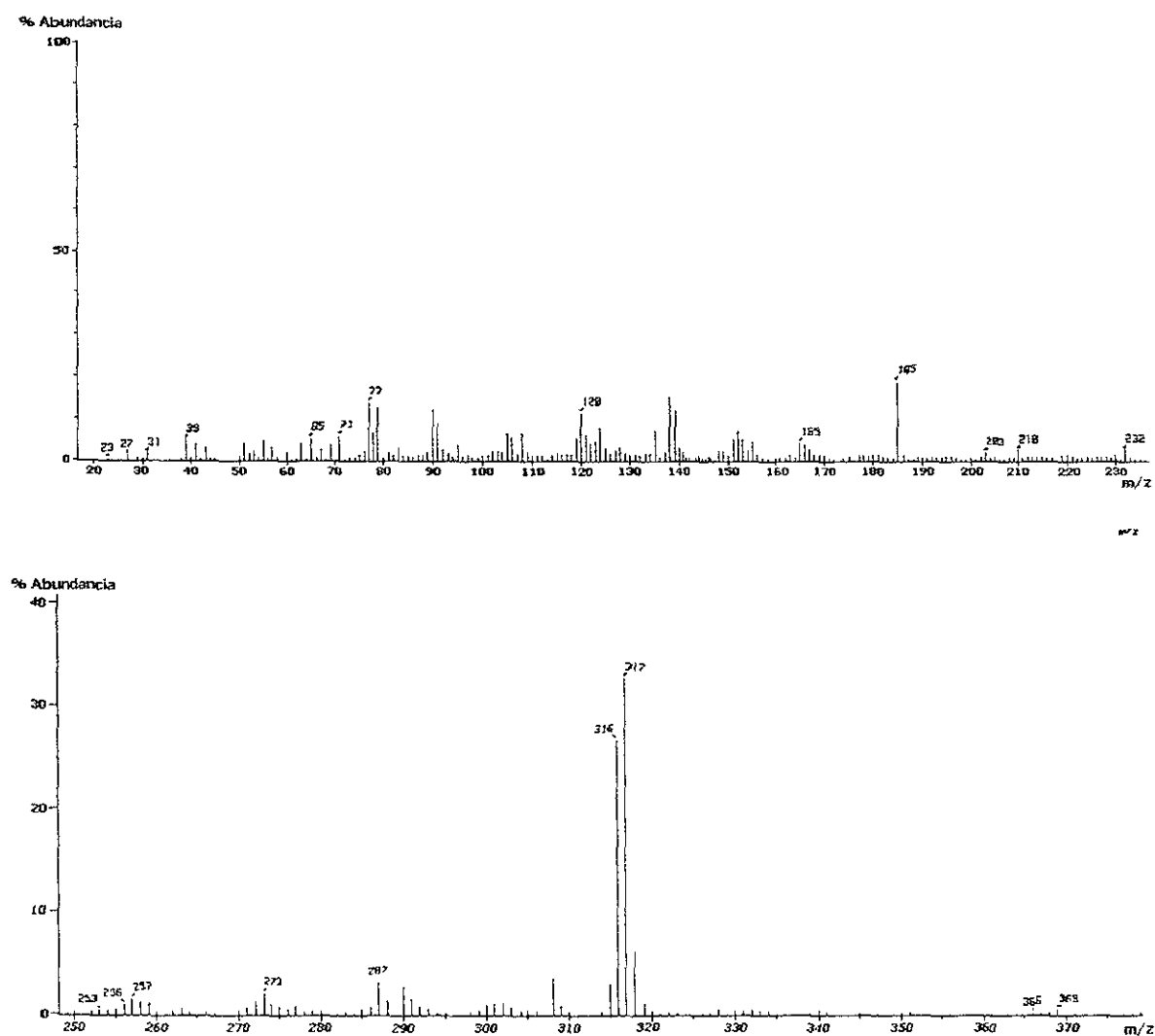


Figura 22. Espectro de Masas del pico mayoritario obtenido del análisis por CPC.

Con estos resultados se confirma que el pico mayoritario corresponde efectivamente a la Isoramnetina.

De esta manera se desarrolló un método de separación de los flavonoles que se encuentran en un mayor porcentaje en un extracto hidrolizado de las flores de *Caléndula officinalis*. La separación se hizo con 600 mg de muestra, sin ser las condiciones de saturación de la columna, por lo que podría analizarse una mayor cantidad de muestra.

CONCLUSIONES

Utilizando la Cromatografía de Partición Centrífuga, se desarrolló un método de separación a escala preparativa de la Isoramnetina y de la Quercetina, flavonoles de mayor contenido en un extracto hidrolizado de flores de *Caléndula officinalis*.

Usando el sistema bifásico THF – DMSO – Agua 59.2:16.4:24.3 (% v/v/v), se analizaron 600 mg de extracto obteniéndose 2 mg de Isoramnetina. La separación se llevó a cabo en 5 horas utilizando un volumen de aproximadamente 1.5 Litros. Comparado con otras técnicas cromatográficas, se tienen un tiempo y volumen de análisis grandes. Sin embargo, cuando se compara con las técnicas normalmente utilizadas en la obtención de productos naturales (extracciones líquido-líquido y cromatografía en columna abierta), estos valores resultan pequeños, ya que en las técnicas antes mencionadas, para obtener la misma cantidad de compuesto, se necesitan más de 10 litros de disolventes y al menos 2 días de análisis cromatográfico.

La identificación de la Quercetina se hizo con estándar y la de la Isoramnetina por Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y por Espectrometría de Masas.

En las condiciones que se utilizaron en este trabajo, no se llegó a la saturación de la columna, por lo que es posible aumentar la cantidad de muestra por analizar.

Para completar este trabajo, será necesario determinar la concentración límite de análisis y si el método funciona para un extracto sin hidrolizar, tomando

en cuenta que estos flavonoles se presentará el inconveniente de que se encontraron unidos a diferentes azúcares.

BIBLIOGRAFIA

1. Scheffer, J. J. C. *Pharmaceutisch Weekblad*, **1979**, 114: 1149-1157.
2. Peyroux, J.; Rossignol, P. and Delaveau, P. *Plantes Médicinales et phytothérapie*, **1981**, Tomo XV (4): 210-216.
3. Duke, J. A. *Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press Inc. U. S. A. **1989**, 87-88.
4. List, P. H. *Handbuch der Pharmazeutischen, Praxis*, Springer-Verlag Ed. **1969-1979**. Vol. 2 - 6.
5. Alarcón de la Lastra, C.; Martin, M. J.; Casa, C. L.; Matilua, V. *Pharmacol.* **1994**, 1251: 149-158.
6. Vatzuro, K. V.; Mishchenko, G. L. *Russian Pharmacol and Toxicol*, **1978**, 41: 193-198.
7. Wagner, H.; Blatt, S.; Zgainski, E. M. *Arzneimittelforsch*, **1985**, 35: 1069-1075.
8. Della Loggia, R., Tubaro, A. and Susan, D. *Planta Med.*, **1994**, 60: 516-520.
9. Vidal Olliver, E.; Elias, R.; Faure, F.; Babadjamian, A.; Crespin, F.; Balansard, G.; Boudon, G. *Planta Med.*, **1989**, 55: 73-74.
10. Pietta, P. and Bruno, A. *J. Chromatogr.* **1992**, 593: 165-170.
11. Gros, E. G.; Pomillo, A. B.; Seldes, A. M. y Burton, G.: "*Introducción al Estudio de los Productos Naturales*". OEA, 1a. Ed, Washington, D. C. **1985**, pp 69-76.
12. Anton, R. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II. Biochemical, Cellular and Medicinal Properties*. V. Cody, E. Middleton, J. B. Harbourne and A. Beretz (Editors). Alan R. Liss, New York, N. Y. **1988** p. 423.
13. Vidal-Ollivier, Babadjamian, A.; Elias, R.; Balansard, G.; Millard, C. *Pharm. Acta Helv.*, **1991**, 66: 318
14. Grainger, N. *Bisset & Maxwicht Herbal Drugs & Phesto Pharmaceuticals. Med. Pharm.* Scientific Publisher Press. **1994**, pp. 118-120.

15. Craig, L. *J. Chromatogr.* **1973**, 83: 67.
16. Varcacel, M. "Técnicas Analíticas de Separación". Ed. Reverté, España, **1990**, pp. 333-378.
17. Hostettman, K. "Advances in Chromatography". Marcel Dekker Inc. New York. **1993**, Vol. 221, pp. 165-185.
18. Knight, M. "Advances in Chromatography". Marcel Dekker Inc. New York. **1987**, Vol. 31. pp. 253-268.
19. Conway, W. D. in "Modern Countercurrent Chromatography". ACS Symposium Series, **1995**, 593: pp. 1-14.
20. Foucault, A. P. "Centrifugal Partititon Chromatography". Chromatographic Science Series, Vol. 68, Marcel Dekker, Inc. New York, **1995**, pp. 1-53.
21. Crozier, A.; Jensen, E.; Lean, M. E. J. and McDonald M. S. *J. Chromatogr. A.* **1997**, 761: 315-21.
22. Vogt, T. and Güiz, P. *J. Chromatogr. A.* **1991**, 537: 453-54.
23. Hasler, A.; Stecher, O. And Meier, B. *J. Chromatogr.* **1992**, 605:41-48.
24. Rewhold, A.; Meier, B and Stecher, O. *J. Chromatogr. A.* **1994**, 677: 25-33.
25. Bronner, W. E. and Beecher, G. R. *J. Chromatogr. A.* **1995**, 705: 247-56.
26. Hu, Y.; Wang, Ch.; Qian, J. *Zhonggue Zhongyae Zazhi.* **1998**, 123: 283-84.
27. Yu, H. and Xu, L. *Xaoxue Xuebae.* **1997**, 32: 120-22.
28. Zhou, X.; Zhong, S.; Chen, S. *Zhongguo Zhongyae Zazhi* **1997**, 22, 616-17.
29. Chaves, N.; Ríos, J. J.; Gutiérrez, C.; Escudero, J. C. and Olías, J. M. *J. Chromatogr. A.* **1998**, 799: 111-15.
30. Ossipov, V. Normi, K.; Noponen, J. and Haukioja, E. and Pihlaja, K. *J. Chromatogr. A.* **1996**, 721: 59-68.
31. Xian-Guo. H.; Lin, L.-Z. and Lian, L. Z. *J. Chromatogr.* **1996**, 755: 127-32.
32. Justesen, U.; Knuthsen, P. and Leth, T. *J. Chromatogr. A.*, **1998**, 799: 101-10
33. Verotta, L.; Lolla, E. and Moggi, E. *Fitoterapia*, **1991**, 62 (4): 339-341.
34. Yang, F.-Q.; Zhang, T.-Y.; Mo, B.-X.; Yang, L.-J; Gao, Y.-Q. and Ito, Y. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **1998**, 21 (1 - 2): 209-216.

35. Oka, H. and Ito, Y. *J. Chromatogr.*, **1989**, 475: 229-235.
36. Vanhaelen, M. and Vanhaelen-Fastré, R. *Planta Med.*, **1989**, 55: 202.
37. Zhang T.-Y. *J. Chromatogr.* **1985**, 126: 17-27.
38. Berthod, A.; Talabardon, K.; De la Poype, F. and Erdelmeier, C. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **1998**, 21 (19): 3003-3019.
39. Marston, A.; Borel, C.; and Hostettmann, K. *J. Chromatogr.*, **1988**, 450: 91-99.
40. Cortés Hernández, D. "Separación de flavonas de *Ginkgo biloba* L. por Cromatografía de Partición Centrífuga". Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. 2000.