

00577

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**CUANTIFICACIÓN DE ALCALOIDES PRESENTES EN *PEUMUS BOLDUS* POR CROMATOGRAFÍA DE GASES, MEDIANTE PURIFICACIÓN POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (INTERCAMBIO IÓNICO)**

292893

**I N F O R M E D E T R A B A J O**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS  
(QUÍMICA ANALÍTICA)  
P R E S E N T A  
I.Q. RAÚL FERNANDO CONDE CARRASCO**

**ASESOR: DR. RAÚL GUILLERMO ENRÍQUEZ HABIB**

**MÉXICO, D.F.**

**2001**



## **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 está 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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

2

**INFORME DE TRABAJO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS QUÍMICAS (QUÍMICA ANALÍTICA)**

**“Cuantificación de Alcaloides Presentes en *Peumus boldus*  
por Cromatografía de Gases, Mediante Purificación  
por Extracción en Fase Sólida (Intercambio Iónico)”**

**ASESOR:**

**Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib**

**Alumno:**

**I.Q. Raúl Fernando Conde Carrasco**

**REALIZADA EN:**

**Lab. 1-5 del Instituto de Química, UNAM**



# COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**BIÓL. FRANCISCO INCERA UGALDE**

Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.

Presente

Me es grato informar que el alumno RAÚL FERNANDO CONDE CARRASCO presentará próximamente su examen para optar por el grado de Maestro en Ciencias Químicas (Química Analítica), por Examen de Conocimientos Generales quien defenderá el Informe de trabajo titulado: "Cuantificación de alcaloides presentes en *Peumus boldus* por cromatografía de gases, mediante purificación por extracción en fase sólida (intercambio iónico)", ante el siguiente jurado:

Presidente	Dra. María Antonia Dosal Gómez	Facultad de Química, UNAM
Primer vocal	Dr. Alain Quéré Thorent	Facultad de Química, UNAM
Segundo vocal	Dr. Alberto Rojas Hernández	UAM-Iztapalapa
Tercer vocal	M. en C. Santiago Capella Vizcalno	Facultad de Química, UNAM
Secretario	M. en C. Francisco Rojo Callejas	Facultad de Química, UNAM
Primer suplente	M. en C. Ma. Guadalupe Pérez Caballero	FES-Cuautitlán, UNAM
Segundo suplente	M. en C. Humberto Gómez Ruiz	Facultad de Química, UNAM

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Ciudad Universitaria, D. F., 13 de octubre, 2000

**DR. RAYMUNDO CEA OLIVARES**

Coordinador del Programa de Maestría  
y Doctorado en Ciencias Químicas

c. c. p. Integrantes del Jurado  
Presidente del SAO  
Departamento de Control Escolar  
Interesado  
Expediente

Dr. Raymundo Cea Olivares  
Tel./Fax 55 50 91 98

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Raúl G. Enríquez Habib por el apoyo, académico, económico y moral durante el transcurso de mi trabajo.

A los Drs. Manuel Salmón, Benjamín Ortiz, Rubén Sánchez y Noé Zuñiga por la ayuda desinteresada que me brindaron.

A mis compañeros de laboratorio Julia, Claudia, Carlos, Virginia, Mario, Ismael y Enrique por crear un ambiente de amistad.

A los miembros de mi jurado por las sugerencias constructivas para el mejoramiento del informe.

A la DGAPA for la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A mi madre por su paciencia y apoyo invaluable.

A todos mis familiares y amigos que me alentaron.

## ÍNDICE GENERAL

TEMA	PÁGINA
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS	1
1.1 Introducción general	1
1.2 Objetivos	3
CAPÍTULO II. FUNDAMENTOS DEL INTERCAMBIO IÓNICO	4
2.1 Historia de los intercambiadores de iones	4
2.2 Propiedades físicas de los intercambiadores de iones	6
2.3 Propiedades químicas de los intercambiadores de iones	10
2.4 Características de resinas comerciales	16
2.5 Aplicaciones de los intercambiadores de iones en el estudio de alcaloides	18
CAPÍTULO III. CARACTERÍSTICAS DEL BOLDO Y LA BOLDINA	20
3.1 Generalidades del boldo	20
3.2 Constituyentes del boldo	22
3.3 Determinación de boldina	26
CAPÍTULO IV. ASPECTOS TEÓRICOS SOBRE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	28
4.1 Aspectos generales	28
4.2 Cromatografía en capa fina de intercambiador de iones	49

CAPÍTULO V. DESARROLLO EXPERIMENTAL	52
5.1 Preparación de las placas de capa fina de intercambiadores de iones	52
5.2 Dowex 1X4-400 (aniónica, fuertemente básica)	54
5.3 Amberlita IRP-64 (catiónica, débilmente ácida)	63
5.4 Celulosa microcristalina	64
5.5 Dowex 50WX4-400 (catiónica, fuertemente ácida)	70
5.6 Elección de la reacción de derivación para boldina	77
5.7 Extracción y tratamiento de la muestra de hoja de boldo	79
5.8 Construcción de la curva de calibración	83
5.9 Pruebas en una muestra de hoja de boldo comercial	88
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS	89
BIBLIOGRAFÍA	90
APÉNDICE 1. LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	93
APÉNDICE 2. PREPARACIÓN DE ELUYENTES	95
APÉNDICE 3. CUADRO METODOLÓGICO	96

## RESUMEN

En el presente trabajo se pretendió desarrollar una metodología química analítica basada en la extracción en fase sólida por intercambio iónico, aplicable a la detección y cuantificación de alcaloides presentes en *Peumus boldus*. Con el objeto de evaluar las mejores condiciones para la purificación de los alcaloides, se efectuó el estudio del comportamiento cromatográfico en capa fina de éstos con diferentes tipos de intercambiadores de iones, variando las condiciones de pH, así como la polaridad del eluyente. Sin embargo, la complejidad de la matriz elegida hizo que el proceso de purificación mediante una sola etapa de extracción en fase sólida fuera particularmente difícil, considerando además que en una resina se presentan mecanismos combinados de absorción e intercambio iónico. A fin de lograr la optimización de las condiciones de detección y cuantificación por Cromatografía de Gases de los alcaloides se sugiere el empleo de una técnica de extracción líquido-líquido o de extracción en fase sólida, en adición a la de intercambio iónico, a fin de lograr una efectiva purificación de la fracción de alcaloides.

## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS**

### ***1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL.***

En general, la extracción en fase sólida es un proceso en el que los analitos de interés contenidos en una muestra, ya sea líquida o que se encuentra disuelta en una fase líquida, tienen mayor afinidad por un material sólido con el cual entran en contacto. Mediante extracciones muy selectivas es posible obtener analitos altamente purificados y concentrados, si el material sólido los atrae de manera significativa, excluyendo a otros componentes de la muestra.

La extracción en fase sólida basada en el intercambio iónico ofrece alta selectividad, por lo que la aplicación de materiales intercambiadores de iones en el análisis fitoquímico, puede dar como resultado un tratamiento optimizado de extractos vegetales, en vistas a la obtención de mejores condiciones de detección y cuantificación de especies ionizables, particularmente de alcaloides.

Por otra parte, entre los métodos patentados más eficaces para el aislamiento de alcaloides de material vegetal se encuentra el registrado por Ciesielski, M.; Popiolek, S.; Kuczynski, J. y Jusiak, L. (1986), (aproximadamente 99% de los alcaloides presentes puede ser obtenido por

este procedimiento). En él se efectúa la extracción con una mezcla acuosa de ácido acético 0.01-5.0M y sus cloroderivados, e.g. ácido tricloroacético 0.01-0.1M. Este método involucra la extracción con hidrocarburos clorados, e.g. cloroformo, altamente tóxicos, por lo que el uso de un intercambiador de iones para la concentración de alcaloides, como etapa posterior a su extracción, puede resultar en una alternativa más segura.

La boldina es un alcaloide fenólico representativo, presente en el boldo (*P. boldus*), planta originaria de Chile cuyas hojas se usan contra algunas afecciones del hígado y de la vesícula, y como diurético. La importancia química y farmacológica del boldo fue motivo de una revisión publicada por Speisky, H. y Cassels, B.K. (1994), en donde se destaca la actividad antioxidante de la boldina tanto en sistemas biológicos como no biológicos, lo cual abre la perspectiva para su uso en una amplia gama de aplicaciones medicinales e industriales.

En el caso particular del análisis por cromatografía de gases de aporfina, grupo al que pertenece la boldina y la mayoría de los alcaloides presentes en el boldo (ibid, 1994), se ha informado el uso ventajoso de los derivados trifluoroacetilados, debido a tiempos de análisis relativamente cortos y menores riesgos de descomposición térmica, en comparación con los correspondientes derivados trimetilsililados (Green, J. F.; Jham, G. N.; Neumeyer, J. L.; Vouros, P., 1980).

## **1.2 OBJETIVOS.**

### **Objetivo general.**

Desarrollar una metodología químico analítica basada en la extracción en fase sólida por intercambio iónico, aplicable a la detección y cuantificación de alcaloides presentes en *Peumus boldus*, con posible extensión a otros materiales vegetales.

### **Objetivos específicos.**

Reconocer al proceso de intercambio iónico como una alternativa altamente eficiente para la purificación de alcaloides.

Reconocer que sólo mediante la comprensión de los mecanismos de reparto de analitos entre una fase líquida y una sólida, es posible hacer una elección apropiada de la técnica de extracción en fase sólida a emplear.

Optimizar las condiciones de detección y cuantificación por Cromatografía de Gases de alcaloides presentes en material vegetal.

## CAPÍTULO II. FUNDAMENTOS DEL INTERCAMBIO IÓNICO

### *2.1 HISTORIA DE LOS INTERCAMBIADORES DE IONES.*

El intercambio iónico, como proceso, es un fenómeno natural que ocurre en suelos, minerales, y tejidos tanto de plantas como animales. En cada caso hay sitios activos, o grupos de sitios, que toman parte en equilibrios de intercambio. El hombre ha utilizado históricamente este fenómeno natural sin comprender el mecanismo involucrado. No fue hasta 1850 que H. Thompson y J. T. Way (Simon, G. P., 1991), químicos agrónomos, reconocieron y describieron el proceso conocido como intercambio iónico.

En 1935, B. A. Adams y E. L. Holms (ibid, 1991) en Inglaterra, desarrollaron y patentaron polímeros condensados como sustratos estructurales para varios grupos funcionales, creando, así, los materiales intercambiadores de aniones y cationes. Los intercambiadores catiónicos fueron preparados uniendo grupos de ácido sulfónico ( $-\text{SO}_3\text{H}^+$ ) a una matriz de polímero de fenol formaldehído. Los intercambiadores aniónicos fueron preparados uniendo grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) a una matriz similar. De hecho, el material resultante no fue el intercambiador de aniones fuertemente básico actualmente disponible, sino que actuaba como un adsorbente capaz de remover sólo ácidos libres del flujo de proceso. Cuando estos dos productos (intercambiador catiónico en la forma de hidrógeno e intercambiador aniónico en la forma de base libre) fueron utilizados en series, la deionización del agua pudo ser realizada por primera vez. En consecuencia, el proceso de

intercambio iónico llegó a ser más versátil. Los materiales de intercambio de aniones (adsorbentes de ácidos) desarrollados por Adams y Holms, no removían sustancias débilmente disociadas, tales como los ácidos carbónico o silícico, del agua procesada. La síntesis de materiales de intercambio de aniones fuertemente básicos en 1940, hizo posible la remoción de especies débilmente disociadas. Así, se pudo realizar la completa desmineralización del agua.

En 1945, G. T. D'Alelio (ibid, 1991) desarrolló polímeros orgánicos sintéticos, usando estireno y divinilbenceno como monómeros. El divinilbenceno es un constituyente minoritario que cumple la función de entrecruzador en la matriz tridimensional del copolímero resultante. Materiales intercambiadores de cationes fuertemente ácidos y de aniones fuertemente básicos pudieron ser preparados sobre esta matriz polimérica de alta estabilidad.

En 1947, W. C. Bauman y colaboradores (Bauman, W. C.; Eichorn, J., 1947) tuvieron éxito en preparar estos polímeros en forma de esferas (hasta entonces, todos los intercambiadores de iones habían estado disponibles sólo en forma granular). Mientras que C. H. McBurney, R. M. Wheaton y otros (Simon, G. P., 1991) demostraron que el tamaño de las esferas podía ser controlado dentro de un rango estrecho. Además, McBurney y el equipo de Wheaton y Bauman (Wheaton, R. M.; Bauman, W. C., 1947) prepararon exitosamente intercambiadores de iones fuertemente básicos sobre estas estructuras poliméricas en forma de esferas.

En la actualidad hay varios fabricantes de intercambiadores de iones, que comercializan sus productos bajo diferentes marcas y nombres comerciales. Por tanto, es confuso tratar de encontrar intercambiadores de iones equivalentes entre tal diversidad de designaciones. Además, la literatura comercial con frecuencia guía hacia la creencia de que cierto producto del fabricante es, en cierto modo, mejor a cualquier otro. El desempeño de operación y, en general, las propiedades químicas de un intercambiador de iones, dependen principalmente del grupo funcional, y en menor medida de la naturaleza de la matriz que soporta dicho grupo.

## ***2.2 PROPIEDADES FISICAS DE LOS INTERCAMBIADORES DE IONES***

Debido a que los intercambiadores de iones son, en cierto modo, electrólitos sólidos, es casi imposible separar las discusiones sobre sus propiedades físicas y químicas. Hay, sin embargo, algunos fenómenos físicos que están directamente relacionados con la estructura del copolímero de estireno-divinilbenceno.

### **Porosidad.**

La mayoría de los iones comunes son relativamente pequeños ( $<10 \text{ \AA}$ ). Sin embargo, algunos ácidos orgánicos pueden llegar a tener pesos moleculares muy altos (100,000 ó más) y tamaños mayores a  $100 \text{ \AA}$ . Estos ácidos orgánicos se intercambian sobre resinas aniónicas y, debido a su gran

tamaño, con frecuencia son difíciles de remover por procesos normales de regeneración. Hay materiales de intercambio iónico que han sido desarrollados para operar en presencia de especies voluminosas. Algunos de estos productos tienen tamaños de poro superiores a 100,000 Å.

### **Grado de entrecruzamiento (Porcentaje de divinilbenceno).**

El porcentaje de entrecruzamiento puede variar en un amplio rango. En la actualidad, los intercambiadores de iones comerciales están limitados en el rango de 2-16% en peso de divinilbenceno. Abajo de 2%, el intercambiador carece de la fuerza mecánica para resistir los cambios de volumen que ocurren durante la operación normal. Arriba de 16%, la estructura del polímero se resiste a la hidratación, por lo que la producción de un intercambiador de iones se vuelve difícil y costosa.

El grado de entrecruzamiento se relaciona con la porosidad del intercambiador de iones, es decir, a mayor grado de entrecruzamiento, menor es la porosidad de la resina. Una resina X8 (8% de divinilbenceno) es considerada de mediana porosidad, las resinas X2 y X4 son de alta porosidad, mientras las resinas X10, X12 y X16 son de baja porosidad. Las resinas de mayor porosidad tienen mejores propiedades cinéticas pero menor capacidad de intercambio. Las resinas altamente porosas son útiles cuando se desea intercambiar iones orgánicos voluminosos. Las resinas X8 o X12 serán apropiadas en la mayoría de las aplicaciones con iones inorgánicos comunes (The Dow Chemical Company, 1971).

## **Hinchamiento.**

Los grupos activos unidos a la matriz del polímero se hidratan cuando éste es sumergido en agua. Por tanto, el intercambiador de iones absorbe agua al pasar del estado seco al húmedo. La cantidad de agua absorbida dependerá de la naturaleza del grupo activo, del ion intercambiable asociado al grupo, y del grado de entrecruzamiento. Al aumentar el grado de entrecruzamiento, la cantidad de agua que retiene el intercambiador disminuye. En consecuencia, los intercambiadores de iones con bajo grado de entrecruzamiento se hincharán en mayor medida que las resinas de la misma forma iónica, con alto grado de entrecruzamiento.

## **Rigidez.**

La rigidez de un intercambiador de iones se halla en razón directa con el grado de entrecruzamiento. Una resina con 2% de DVB será menos rígida y, por lo tanto, más susceptible de sufrir rupturas internas que una con mayor grado de entrecruzamiento. Un buen material de intercambio iónico debe ser uniformemente esférico, sin rupturas internas, resistente a la compresión mecánica, y no quebradizo. Además, debe ser lo suficientemente flexible para soportar miles de ciclos de operación que involucran hinchamiento y contracción, sin desarrollar presiones internas que tiendan a fracturar las esferas.

### **Tamaño de malla.**

Los materiales de malla fina tienen altas eficiencias de operación y regeneración, debido a sus mejores propiedades cinéticas. Las desventajas en el uso de resinas de malla muy fina son que tienen un costo relativamente alto y presentan una mayor caída de presión que los intercambiadores de malla más gruesa. La malla de 200-400 es la más empleada en aplicaciones de extracción en fase sólida.

### **Difusión.**

A fin de que un ion pueda intercambiarse con un contraion, el ion debe difundirse a través de la capa límite y de la fase sólida de la resina hasta un punto donde pueda reaccionar con el contraion. Además, el contraion, ahora libre, debe difundirse hacia la fase líquida de la solución externa para completar la reacción. En general, la velocidad a la que se lleva esta difusión está en relación inversa con el tamaño de partícula y el grado de entrecruzamiento del intercambiador.

## 2.3 PROPIEDADES QUIMICAS DE LOS INTERCAMBIADORES DE IONES

Las siguientes reglas del equilibrio químico son aplicables a los procesos de intercambio iónico:

- a) El incremento del área interfacial por unidad de masa de resina aumentará la velocidad de reacción, pero no las concentraciones o condiciones al final del equilibrio.
- b) A una temperatura dada, cada sistema tiene un estado de equilibrio único, el cual puede ser definido por una constante de equilibrio.
- c) Un incremento en la temperatura aumentará la velocidad de reacción, pudiendo alterar la constante de equilibrio. Cuando esto ocurre el cambio será en la dirección en que se absorba calor o energía.

Las principales propiedades químicas de un material de intercambio iónico, que afectan su aplicación y desempeño son la ionización y el equilibrio. Estas propiedades están relacionadas fundamentalmente con la naturaleza química del grupo activo unido a la matriz del polímero.

### **Ionización.**

A fin de que el proceso de intercambio iónico se lleve a cabo de manera efectiva, es importante trabajar en condiciones que favorezcan la ionización de los grupos activos en los materiales intercambiadores de iones. La

información mostrada en la Tabla 1 indica que, en términos generales:

- La ionización del intercambiador de cationes fuertemente ácido se favorece a valores de pH mayores que 1.
- La ionización del intercambiador de aniones fuertemente básico se favorece a valores de pH menores que 13.
- La ionización del intercambiador de cationes débilmente ácido se favorece a valores de pH mayores que el rango mostrado en la Tabla 1.
- La ionización del intercambiador débilmente básico se favorece a valores de pH menores que el rango mostrado en la Tabla 1.

Intercambiador de iones	Grupo funcional activo	pKa* aproximado
Catiónico fuertemente ácido	R-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<1
Catiónico débilmente ácido	R-COO <sup>-</sup>	4-6
Aniónico fuertemente básico		
Tipo 1	R-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	>13
Tipo 2	R-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OH	>13
Aniónico débilmente básico	R-NR <sub>2</sub>	7-9

Tabla 1 Valores de pKa de intercambiadores de iones

\* El valor de pKa de un grupo funcional ácido GH está definido como el logaritmo negativo de la constante Ka del equilibrio de disociación (R indica especie química en resina):

$$K_a = \frac{[G^-]_R [H^+]_R}{[GH]_R}$$

## Capacidad

La capacidad de un intercambiador y los datos relacionados se emplean para dos propósitos: en la caracterización de las resinas y para cálculos numéricos en operaciones de intercambio iónico. En el primer caso, la capacidad debe estar definida, si es posible, de modo que sea una característica constante del material y sea independiente de las condiciones experimentales. En el segundo caso, es más práctico usar otras definiciones o cantidades que reflejen el efecto de las condiciones de operación (Tabla 2).

Concepto	Definición	Observaciones
Capacidad (máxima capacidad, capacidad de intercambio iónico).	Cantidad de grupos ionógenos por cantidad especificada de intercambiador.	Constante usada para la caracterización de intercambiadores de iones.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacidad en peso.....</li> </ul>	meq/g de resina seca, en forma de $H^+$ o $Cl^-$ .	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacidad en volumen.....</li> </ul>	meq/ml de resina, en forma de $H^+$ o $Cl^-$ , completamente hinchada con agua.	

Tabla 2. Definiciones de capacidad (Helffferich, F., 1962).

Capacidad aparente (capacidad efectiva)	Cantidad de contraiones intercambiables por cantidad especificada de intercambiador. Al igual que la capacidad máxima, también puede expresarse en unidades referidas a masa o volumen.	Es menor que la capacidad máxima cuando los grupos ionógenos no están completamente ionizados. Depende de las condiciones experimentales (pH, concentración de la solución, etc.)
Capacidad útil	Capacidad utilizada cuando no se alcanza la condición de equilibrio. Las unidades pueden referirse a masa o volumen.	Depende de las condiciones experimentales (velocidad del intercambio iónico).

Tabla 2. Definiciones de capacidad (Helfferich, F., 1962) (continuación).

## Equilibrio

La naturaleza del equilibrio de intercambio de iones es complicada y variada, lo cual resulta en una amplia gama de aplicaciones para este proceso.

Como evidencia de esta versatilidad, en las Tablas 3 y 4 se muestran los coeficientes de selectividad (constantes de equilibrio) para varios iones en intercambiadores catiónicos fuertemente ácidos y aniónicos fuertemente básicos, respectivamente.

Iones	Grado de Entrecruzamiento			
	4	8	12	16
<b>Iones monovalentes</b>				
H	1.0	1.0	1.0	1.0
Na	1.3	1.5	1.7	1.9
NH <sub>4</sub>	1.6	1.95	2.3	2.5
K	1.75	2.5	3.5	4.5
Rb	1.9	2.6	3.1	3.4
Cs	2.0	2.7	3.2	3.45
Cu	3.2	5.3	9.5	14.5
Ag	6.0	7.6	12.0	17.0
<b>Iones divalentes</b>				
Mg	2.4	2.5	2.6	2.8
Fe	2.4	2.55	2.7	2.9
Zn	2.6	2.7	2.8	3.0
Cd	2.8	2.95	3.3	3.95
Ni	2.85	3.0	3.4	4.15
Ca	3.4	3.9	4.6	5.8
Pb	5.4	7.5	10.1	14.5
Hg	5.1	7.2	9.7	14.0
Ba	6.15	18.7	11.6	16.5

Tabla 3. Coeficientes de Selectividad de Iones en una Resina Catiónica Fuertemente Ácida (Simon, G.P., 1991).

Iones monovalentes	Tipo 1	Tipo 2
Hidróxido	1.0	1.0
Bencensulfonato	>500	75
Salicilato	450	65
Citrato	220	23
Yoduro	175	17
Bisulfato	85	15
Clorato	74	12
Bromuro	50	6
Cianuro	28	3
Bisulfito	27	3
Bromato	27	3
Cloruro	22	2.3
Bicarbonato	6.0	1.2
Yodato	5.5	0.5
Formiato	4.6	0.5
Acetato	3.2	0.5
Propionato	2.6	0.3
Fluoruro	1.6	0.3

Tabla 4. Coeficientes de Selectividad de Iones en una Resina Aniónica Fuertemente Básica (Simon, G.P., 1991).

## 2.4 CARACTERÍSTICAS DE RESINAS COMERCIALES.

En la Tabla 5 se muestran algunas características de resinas aniónicas y catiónicas (The Dow Chemical Company, 1993).

Resina	Grado de entrecruzamiento	Forma iónica comercial	Porcentaje de retención de agua	Capacidad de intercambio iónico, meq/ml
Dowex 50W (resina catiónica fuertemente ácida)	2	H <sup>+</sup>	74-82	0.6
	4	H <sup>+</sup>	64-72	1.1
	8	H <sup>+</sup>	50-58	1.7
Dowex 1 (resina aniónica fuertemente básica)	2	Cl <sup>-</sup>	70-80	0.6
	4	Cl <sup>-</sup>	55-63	1.0
	8	Cl <sup>-</sup>	39-45	1.2

Tabla 5. Características de resinas aniónicas y catiónicas.

Si se desea emplear un intercambiador para la retención de ácidos muy débiles, entonces la resina de elección es del tipo Dowex 1, dado su mayor carácter básico, en comparación con la resina Dowex 2, aun cuando ambas son resinas fuertemente básicas. Por otra parte, la resina Dowex 50W, fuertemente ácida, se recomienda para procesos que involucran la retención de bases relativamente débiles, mientras para la retención de bases fuertes, el uso de intercambiadores débilmente ácidos, como Amberlite IRP-64, es más conveniente a fin de tener una mejor eficiencia de regeneración de la resina.

Las resinas empleadas en este trabajo presentan las siguientes características.

Nombre comercial	Tipo de intercambiador	Grupo funcional activo	Forma iónica comercial	Grado de entrecruzamiento	Malla
Dowex 1X4-400	Aniónico, fuertemente básico	R- N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	4	200-400
Amberlita IRP-64	Catiónico, débilmente ácido	R- COO <sup>-</sup>	H <sup>+</sup>	4	100-400
Dowex 50WX4-400	Catiónico, fuertemente ácido	R- SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H <sup>+</sup>	4	200-400

Tabla 6. Resinas empleadas en este trabajo.

## ***2.5 APLICACIONES DE LOS INTERCAMBIADORES DE IONES EN EL ESTUDIO DE ALCALOIDES.***

Los intercambiadores de iones han sido ampliamente usados en el aislamiento de compuestos presentes en material vegetal. Su uso en bioquímica vegetal es tan general que no es factible mencionar o aun localizar todos los casos en que los intercambiadores de iones han sido empleados en el trabajo con los constituyentes de las plantas. En la Tabla 7 se enlistan algunos artículos representativos de aplicación de intercambiadores de iones en el estudio de los alcaloides.

El uso común de intercambiadores de iones involucra la remoción de sustancias iónicas que podrían interferir con la subsecuente purificación de compuestos no iónicos. Mediante el empleo de un intercambiador catiónico en forma de hidrógeno es posible remover prácticamente todos los cationes metálicos, seguido por el uso de un intercambiador aniónico a fin de remover ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Con este procedimiento se facilita el aislamiento de componentes no iónicos o de alto peso molecular.

The Absorption of Quinine by a Carboxylic Acid Ion Exchange Resin.	Saunders, L.; Srivastava, R., 1950.
The Separation of Morphine from Codeine by Means of Ion Exchange.	Grant, E. W.; Hilty, W. W., 1953.
Quantitative Determination of Morphine in Opium by Gas-Liquid Chromatography. En este artículo la morfina fue purificada por medio de resinas de intercambio iónico.	Brochmann-Hanssen, E.; Baerheim Svendsen, A., 1963.
Studies with Ion-Exchange Resins on Cinchona Alkaloids. Effects of the Ionic Form and of the Solvent Medium.	Bhat, C. V.; Kamath, B. R.; Shah, R.S.; Kanhere, S.S.; Bafna, S. L., 1968.
Chromatographic Behaviour of Alkaloids on Thin Layers of Anion and Cation Exchangers.	Lepri, L.; Desideri, P. G.; Lepori, M., 1976.
Isolation, Characterization and Analysis of Polyhydroxy Alkaloids. En este artículo se recomienda el uso de intercambiadores de iones en el proceso de purificación de alcaloides polihidroxilados.	Molyneux, R. J., 1993.

Tabla 7. Ejemplos de Aplicación de Intercambiadores de Iones en el Estudio de Alcaloides.

## CAPÍTULO III. CARACTERÍSTICAS DEL BOLDO Y LA BOLDINA

### 3.1 GENERALIDADES DEL BOLDO.

El Boldo (*Peumus boldus* Mol., Monimiaceae) representa un caso de una planta medicinal cuyo uso está fuertemente arraigado en la medicina tradicional, y que durante este siglo ha sido objeto de considerable atención desde el punto de vista farmacológico. Por lo menos dos factores han contribuido al reciente resurgimiento del interés en esta especie: la acumulación de una amplia base de conocimiento químico de sus constituyentes (aislamiento, identificación y cuantificación), y su percepción cultural muy difundida como una planta medicinal efectiva para el tratamiento de desórdenes digestivos y hepatobiliares.

El boldo es un árbol originario del centro y sur de Chile. Descrito botánicamente en el siglo XVIII por el abate Molina, *P. boldus* crece espontáneamente en Chile entre los 33° y 39° de latitud sur desde la cálida y semiárida región de Limari hasta el frío y lluvioso Osorno. Los árboles maduros de Boldo miden entre 6 y 12 m de alto, aunque algunos especímenes pueden alcanzar más de 20 m. Sin embargo, después de que el tronco ha sido cortado, el Boldo ocurre como un arbusto con varios tallos principales. El nombre "boldo" se deriva presumiblemente de los verbos Mapuches "weltún" (retoñar) o "volitún" (extender nuevas raíces), que podrían referirse a esta característica. Las hojas del boldo son perennes, correosas, aovadas-elípticas, con su lado superior densamente glandular de color verde oscuro y un lado

inferior rico en pili fascicular de color verde grisáceo claro. La estructura de las hojas de boldo se describe en varios libros de farmacognosia, y la anatomía e histología de la corteza también han sido estudiadas. Debido a que el Boldo sólo crece en abundancia en Chile; este país ha sido por décadas la única fuente original de las hojas y la corteza, actualmente exportando cerca de 800 toneladas de hojas de boldo secas por año, principalmente a Argentina, Brasil, Italia, Francia y Alemania (Speisky, H.; Cassels, B. K., 1994).

Siendo una de las plantas medicinales más comunes de Chile, el Boldo es empleado en la forma de infusiones, tinturas y extractos. En la práctica de la medicina tradicional, las preparaciones de Boldo son generalmente indicadas para el tratamiento de enfermedades, entre las cuales los desórdenes digestivos y hepatobiliares han sido los más comúnmente mencionados. La indicación farmacológica más antigua del boldo probablemente no es para el tratamiento de desórdenes del hígado, ya que la gente Mapuche aparentemente usaba el boldo en el tratamiento contra el reumatismo. Hojas de boldo fosilizadas con 13,000 años de antigüedad que presentan la impresión de molares humanos, han sido localizadas en un sitio arqueológico al sur de Chile (Dillehay, T. D., 1984), pero de ello sólo puede suponerse que los antiguos habitantes de esa región consumían las hojas como medicina o simplemente por su sabor agradable y refrescante. Otras indicaciones para el uso del boldo son muy diversas pero no están confirmadas. De acuerdo a los tratados sobre plantas medicinales, el boldo ha sido usado para el dolor de cabeza y oídos, congestión nasal, reumatismo, “debilidad nerviosa”, hidropesía, dispepsia, flatulencia, dolor menstrual, sífilis y gonorrea, además de atribuírsele propiedades sedantes e hipnóticas suaves.

Más allá de su uso en la medicina tradicional, las preparaciones basadas en el boldo han sido descritas en varios textos farmacognósticos oficiales, incluyendo la farmacopea francesa, la Martindale Extra Pharmacopeia y las farmacopeas oficiales de Brasil, Chile, Alemania, Portugal, Rumania, España y Suiza. En la actualidad hay más de 60 productos farmacéuticos registrados en diferentes países que incluyen el boldo o sus constituyentes, usualmente como ingredientes minoritarios, en sus formulaciones. La mayoría de estas preparaciones que contienen boldo son indicadas para el tratamiento de desórdenes digestivos y/o hepatobiliares. El boldo también es usado actualmente en medicina homeopática.

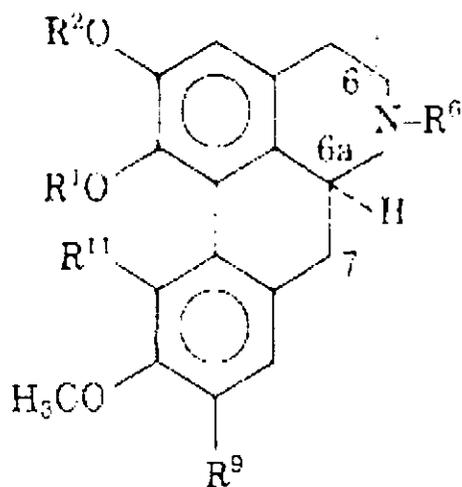
### ***3.2 CONSTITUYENTES QUÍMICOS DEL BOLDO.***

Estudios sobre los constituyentes químicos del boldo, iniciados en la segunda mitad del siglo pasado, continúan apareciendo. Se ha informado que las hojas de boldo contienen 1.2% de taninos y 2-3% de aceites esenciales (hasta 45% de ascaridol, 30% de cineol, y por lo menos otros 22 constituyentes identificados, principalmente terpenoides). La variación estacional de la composición del aceite esencial ha sido estudiada. El aceite esencial del boldo fue empleado hasta recientemente en medicina por sus reconocidas propiedades antihelmínticas, debidas a la presencia de ascaridol. Flavonoides están presentes (p. ej. quercetin), y cinco glicósidos de flavonol han sido identificados: peumósido (ramnetin-3-arabinósido-3'-ramnósido), boldósido (isoramnetin 3-glucósido-7-ramnósido), fragósido (un isoramnetin

diramnósido), kaemferol-3-glucósido-7-ramnósido, e isoramnetin-3-arabinósido-7-ramnósido (Speisky, H.; Cassels, B. K., 1994).

Los alcaloides fueron reconocidos tempranamente como los componentes activos en el boldo. De éstos, la boldina fue el primero en ser aislado, hace más de 120 años, por Bourgoïn y Verne (ibid, 1994). Esta sustancia fue preparada en estado puro en 1922, en los laboratorios de Merck, y su estructura fue probada años más tarde, por Späth y Tharrer, e independientemente por Schlittler, como (S)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxi-aporfina (I, Figura 1) (ibid, 1994). Además de la boldina, por lo menos otros seis alcaloides aporfínicos (isoboldina II, isocoridina III, norisocoridina IV, N-óxido de isocoridina V, N-metil laurotetanina VI, laurotetanina VII y laurilitsina VIII) han sido identificados en *P. Boldus* (Rüegger, A., 1959 y Hughes, D. W.; Genest, K.; Skakum, W., 1968). Hay evidencia, sin embargo, de la presencia de por lo menos 17 diferentes alcaloides en el boldo (ibid, 1968). Un aporfinoide minoritario aparentemente presente en la corteza del boldo, pero que bien podría ser un artefacto del aislamiento o almacenamiento es 6a,7-dehidrobaldina (IX) (Urzúa, A.; Torres, R., 1984). Entre los alcaloides no aporfínicos de esta planta, la benciltetrahidroisoquinolina reticulina (X, Figura 2) (Hughes, D. W.; Genest, K.; Skakum, W., 1968) es un precursor biosintético común de aporfinas 1,2,9,10- y 1,2,10,11-tetraoxigenadas. Más recientemente, se ha aislado una mezcla de (R)- y (S)-coclaurinas (XI, Figura 2) de la corteza del boldo (Asencio, M.; Cassels, B. K.; Speisky, H.; Valenzuela, A., 1993), la última de las cuales, además de ser precursor clave de la reticulina, sufre una amplia variedad de biotransformaciones para originar la mayoría de los otros alcaloides isoquinolínicos (Stadler, R.;

Kutchan, T. M.; Loeffler, S.; Nagakura, N.; Cassels, B. K.; Zenk, M. H., 1987 y Stadler, R.; Kutchan, T. M.; Zenk, M. H., 1989). Dos alcaloides estructuralmente divergentes derivados de la coclaurina, aislados de la corteza del boldo son proaporfina (R)-pronuciferina (XII, Figura 3) y morfinandienona sinoacutina (XIII, Figura 4) (Urzúa, A.; Acuña, P., 1983).



- |      |                                                                                                        |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I    | $R^1 = R^6 = \text{CH}_3$<br>$R^2 = R^{11} = \text{H}$<br>$R^9 = \text{OH}$                            |
| II   | $R^2 = R^6 = \text{CH}_3$<br>$R^1 = R^{11} = \text{H}$<br>$R^9 = \text{OH}$                            |
| III  | $R^1 = R^2 = R^6 = \text{CH}_3$<br>$R^{11} = \text{OH}$<br>$R^9 = \text{H}$                            |
| IV   | $R^1 = R^2 = \text{CH}_3$<br>$R^{11} = \text{OH}$<br>$R^6 = R^9 = \text{H}$                            |
| V    | $R^1 = R^2 = \text{CH}_3$<br>$R^6 = \text{CH}_3, \text{O}$<br>$R^{11} = \text{OH}$<br>$R^9 = \text{H}$ |
| VI   | $R^1 = R^2 = R^6 = \text{CH}_3$<br>$R^9 = \text{OH}$<br>$R^{11} = \text{H}$                            |
| VII  | $R^1 = R^2 = \text{CH}_3$<br>$R^9 = \text{OH}$<br>$R^6 = R^{11} = \text{H}$                            |
| VIII | $R^1 = \text{CH}_3$<br>$R^9 = \text{OH}$<br>$R^2 = R^6 = R^{11} = \text{H}$                            |
| IX   | Como en I, con doble enlace<br>$\text{C}^{6a} = \text{C}^7$                                            |

Figura 1

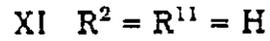
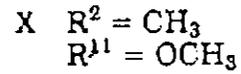
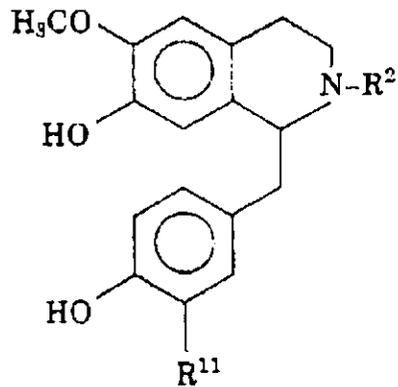
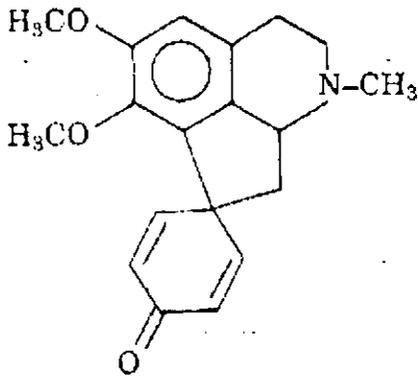
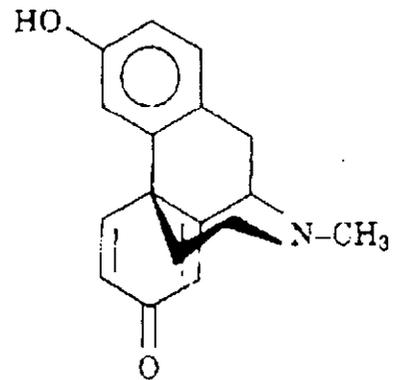


Figura 2



XII

Figura 3



XIII

Figura 4

La boldina se ha encontrado como un constituyente minoritario en más de una docena de otras especies de plantas pertenecientes a las familias Lauraceae, Magnoliaceae y Monimiaceae, junto con muchos otros aporfinoides (Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A., 1975, 1979, 1983 y 1988). Se ha informado que las hojas secas de *Peumus boldus* tienen un

contenido de alcaloides de 0.4-0.5% (Rüegger, A., 1959), del cual aproximadamente 12-19% corresponde a boldina (Van Hulle, C.; Braeckman, P.; Van Severen, R., 1983). La corteza del boldo es una fuente especialmente rica en alcaloides, de los cuales boldina constituye cerca del 75% (Urzúa, A.; Acuña, P., 1983).

### 3.3 DETERMINACIÓN DE BOLDINA.

En la Tabla 8 se enlistan diferentes métodos para la determinación de boldina:

Métodos	Referencias
Determinación colorimétrica por alcalinización del bromhidrato.	Malcangio, A.M., 1955.
Determinación colorimétrica con el Reactivo de Folin-Ciocalteu.	Sobiczewska, M.; Borkowski, B., 1972.
Determinación espectrofotométrica como tetrafenilborano.	Gautier, J. A.; Renault, J.; Rabiant, J., 1959.
Determinación densitométrica	Di Renzo, N., 1972.
Cromatografía de gases de su derivado trifluoroacetilado.	Quercia, V.; Cavazzuti, G.; Merli, F., 1970. Van Hulle, C.; Braeckman, P.; Van Severen, R., 1983.

Tabla 8. Determinación de Boldina.

Cromatografía de líquidos de alta eficiencia.	<p>Quercia, V.; Bucci, B.; Iela, G.; Terracciano, M.; Pierini, N., 1978.</p> <p>Betts, T.J., 1990.</p> <p>Pietta, P.; Mauri, P.; Manera, E.; Ceva, P., 1988.</p> <p>Speisky, H.; Cassels, B.K.; Nieto, S.; Valenzuela, A.; Nuñez-Vergara, L. J., 1993.</p>
-----------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Tabla 8. Determinación de Boldina (continuación).

La determinación del contenido total de alcaloides se basa en la purificación de éstos, aprovechando sus propiedades de partición en un sistema agua/disolvente orgánico, y su cuantificación posterior por volumetría o gravimetría ("Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos", 1994).

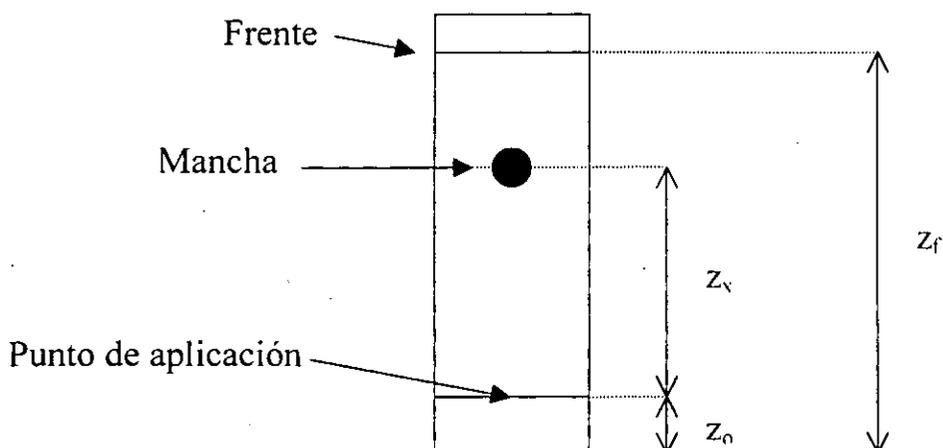
## CAPÍTULO IV. ASPECTOS TEÓRICOS SOBRE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

### 4.1 ASPECTOS GENERALES

El método comúnmente usado para la determinación de valores de  $R_f$  es simplemente una instrucción a seguir: medir dos longitudes en el cromatograma y calcular su cociente:

$$(I) \quad (R_f)_{\text{obs}} = R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la mancha, } z_x}{\text{distancia del frente - distancia de aplicación, } z_f - z_0}$$

Este valor de  $R_f$  "observado" sólo describe numéricamente la posición de una mancha en un cromatograma. No dice nada sobre el proceso cromatográfico ni otras condiciones que han generado el resultado.



Este sencillo procedimiento de medición contrasta con las definiciones del valor de  $R_f$  termodinámico,  $R'_f$ , el cual está basado en el equilibrio de distribución de una sustancia entre una fase móvil y una fase estacionaria (Geiss, F., 1987).

(II)  $R'_f \equiv$  probabilidad promedio de residencia de una molécula de sustancia en la fase móvil.

(III)  $R'_f \equiv$  fracción del tiempo de residencia de una molécula de sustancia en la fase móvil.

$$R'_f = t_m / (t_m + t_s)$$

(IV)  $R'_f \equiv$  fracción de moléculas de sustancia en la fase móvil.

$$R'_f = n_m / (n_m + n_s)$$

ó

$$R'_f = m_m / (m_m + m_s)$$

(V)  $1 - R'_f \equiv$  fracción de moléculas de sustancia en la fase estacionaria.

$$1 - R'_f = n_s / (n_m + n_s)$$

ó

$$1 - R'_f = m_s / (m_m + m_s)$$

Las definiciones (II) a (IV), aunque formalmente diferentes, significan lo mismo. Otra definición termodinámica es la siguiente:

$$(VI) R'_f = \frac{\text{velocidad de migración de la mancha para una distancia } z \text{ dada}}{\text{velocidad de migración del eluyente a la distancia } z}$$

El valor de  $R'_f$  definido de acuerdo a (VI) cambia durante la corrida. Iniciando desde un valor relativamente bajo, se aproxima más o menos rápidamente, al valor de  $R'_f$  definido en (VII):

$$(VII) R'_f = \frac{\text{velocidad de migración de la mancha}}{\text{velocidad de migración del frente del eluyente}}$$

Por otra parte, la razón de las concentraciones al equilibrio de una sustancia en las fases estacionaria y móvil es el coeficiente de distribución  $K$ .

$$(VIII) K = \frac{\text{concentración de soluto en la fase estacionaria, } c_s}{\text{concentración de soluto en la fase móvil, } c_m}$$

De las definiciones (IV) y (VIII) se obtiene:

$$(IX) R'_f = \frac{m_m}{m_m + m_s} = \frac{c_m V_m}{c_m V_m + c_s V_s} = \frac{V_m}{V_m + (c_s/c_m) V_s} = \frac{V_m}{V_m + K V_s}$$

Rearreglando términos y sustituyendo  $V_s/V_m$  por  $A_s/A_m$  se llega a la ecuación de Martin-Synge (1941):

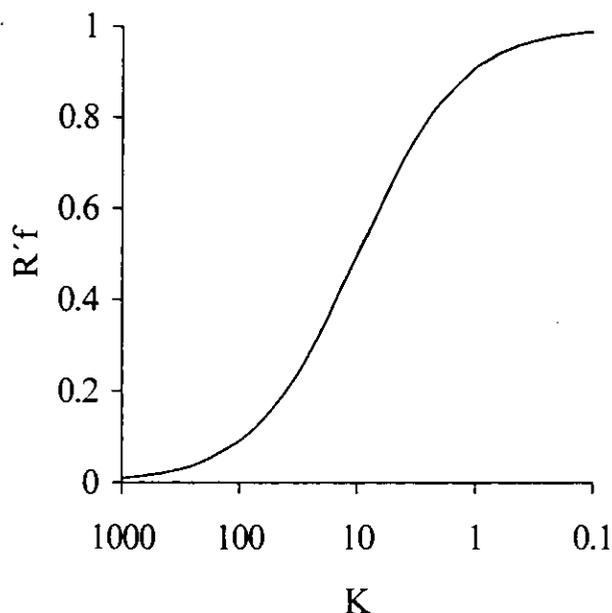
$$(X) \quad R'_f = \frac{1}{1 + K(A_s/A_m)}$$

$V_s$  y  $V_m$  son los volúmenes de las fases estacionaria y móvil, respectivamente.  $V_s/V_m$  es numéricamente igual a  $A_s/A_m$  (la razón de las áreas de la sección transversal de las fases). El término  $K(A_s/A_m)$  se denomina  $k'$  ("número de distribución" o "factor de capacidad"). Por lo tanto,

$$(XI) \quad R'_f = \frac{1}{1 + k'} \quad ; \quad (XII) \quad k' = \frac{1}{R'_f} - 1$$

### Discusión de la ecuación de Martin-Synge.

La dependencia de  $R_f$  respecto a  $K$  o  $k'$  y  $A_s/A_m$ , descrita en las ecuaciones (X) y (XI), no es lineal sino sigmoïdal, como se muestra en la Gráfica 1. Para valores muy pequeños y para valores muy grandes de  $K$ ,  $R'_f$  se aproxima asintóticamente a 1 y 0, respectivamente. En estos intervalos extremos, incluso muy grandes variaciones de  $K$  producen cambios mínimos de  $R_f$ . Por esta razón, valores muy grandes o muy pequeños de  $R'_f$ , aun afectados por factores externos, son más reproducibles que valores intermedios de  $R'_f$ , sujetos a los mismos factores (Moffat, A. C., 1975). La máxima sensibilidad de  $R'_f$  respecto a los cambios de  $K$  es en el punto de inflexión, es decir a  $R'_f = 0.5$ , donde  $K(A_s/A_m) = k' = 1$ . En el ejemplo de la Gráfica 1, el punto de inflexión está en  $K=10$  porque  $A_s/A_m = 0.1$



Gráfica 1. Curva de  $R'_f$  vs. el coeficiente de distribución  $K$

El valor medido  $(R_f)_{obs}$  puede igualar al valor “real”  $R'_f$  [ecuación (X)] sólo si se cumplen las siguientes condiciones (Geiss, F., 1987):

- la razón de fases  $A_s/A_m$  sea constante a lo largo de la capa fina la composición fisicoquímica de la capa sea constante.
- la velocidad del frente iguale a la velocidad del eluyente en la posición de la mancha.
- no haya moléculas de eluyente o de cualquier otro líquido móvil en la capa antes de que la corrida se efectúe.

## El valor $R_m$

El valor de  $R_f$  no presenta relación lineal con ningún parámetro básico de cromatografía en capa fina, Tal linealidad existe, sin embargo, para el denominado "valor  $R_m$ ", el cual es una función logarítmica del valor de  $R_f$ . Según Bate-Smith, E. C. (1950):

$$(XIII) R_m = \log \frac{1-R_f}{R_f} = \log \left( \frac{1}{R_f} - 1 \right)$$

La ecuación (X) puede ser transformada en:

$$(XIV) \frac{1}{R_f} - 1 = K(A_s / A_m) = k'$$

De (XIII) y (XIV) se obtiene:

$$(XV) R_m = \log(A_s / A_m) + \log K = \log k'$$

## Influencia del pH

Para los compuestos que se disocian en agua, los valores de  $R_f$  dependen no sólo del coeficiente de distribución  $K$ , sino también de las constantes de disociación  $K_a$  y  $K_b$  de la sustancia. Este hecho puede ser aprovechado cuando los coeficientes de distribución de dos sustancias no difieren lo suficiente para efectuar una separación en sistemas cromatográficos comunes. Sin embargo, si sus constantes de disociación son significativamente

diferentes, es posible una separación mediante disolventes acuosos a ciertos valores de pH .

Las principales aplicaciones de las separaciones controladas por pH se hallan en la cromatografía de intercambio iónico. No obstante existen numerosos ejemplos de separaciones sensibles al pH en fase normal y fase reversa.

En la ecuación (XII) se definió el factor de capacidad  $k'$ , el cual representa la razón de la cantidad de sustancia en la fase estacionaria, respecto a la cantidad de sustancia en la fase móvil al equilibrio. La ecuación (XII) también puede escribirse de la siguiente manera:

$$(XVI) \quad k' = K(A_s/A_m) = \frac{1 - R'_f}{R'_f} = \frac{\text{cantidad de sustancia en la fase estacionaria}}{\text{cantidad de sustancia en la fase móvil}}$$

En el caso de un ácido HA es posible definir:

$$(XVII) \quad k' = K(A_s/A_m) = \frac{1 - R'_f}{R'_f} \times \frac{[HA]}{[A^-]_{Tot}} = \frac{1 - R'_f}{R'_f} \times \frac{[HA]}{[HA] + [A^-]}$$

con una constante de disociación:

$$(XVIII) \quad K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]}$$

De (XVII) y (XVIII) se obtiene:

$$(XIX) \quad k' = K(A_s / A_m) = \frac{1 - R'_f}{R'_f} \times \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a}$$

Rearreglando términos se llega a la ecuación establecida por Golumbic C. (1950) que relaciona  $R_f$  con pH para ácidos en cromatografía de capa fina.

$$(XX) \quad R'_f = \frac{1}{1 + K(A_s / A_m)[1 + 10^{(pH - pK_a)}]}$$

La correspondiente ecuación para  $R_m$  es:

$$(XXI) \quad R_m = \log[K(A_s / A_m)] + \log[1 + 10^{(pH - pK_a)}]$$

Para valores de pH mucho mayores que  $pK_a$ , es decir, en el intervalo de disociación fuerte del ácido, esta ecuación se simplifica:

$$(XXII) \quad R_m = \log[K(A_s / A_m)] + pH - pK_a = \log k' + pH - pK_a$$

En el caso de ácidos, el valor de  $R_m$  se incrementa al aumentar el pH. Bajo las condiciones de la ecuación (XXII) este incremento es lineal.

Asimismo, en el caso de la base conjugada  $A^-$  puede definirse:

$$(XXIII) \quad k' = K(A_s / A_m) = \frac{1 - R'_f}{R'_f} \times \frac{[A^-]}{[A^-]_{Tot}} = \frac{1 - R'_f}{R'_f} \times \frac{[A^-]}{[HA] + [A^-]}$$

De (XVIII) y (XXIII) se llega a:

$$(XXIV) \quad k' = K(A_s / A_m) = \frac{1 - R'_f}{R'_f} \times \frac{K_a}{[H^+] + K_a}$$

Rearreglando términos se llega a la ecuación que relaciona  $R_f$  con pH para bases en cromatografía de capa fina.

$$(XXV) \quad R'_f = \frac{1}{1 + K(A_s / A_m)[1 + 10^{(pK_a - pH)}]}$$

Siendo la correspondiente ecuación para  $R_m$ :

$$(XXVI) \quad R_m = \log[K(A_s / A_m)] + \log[1 + 10^{(pK_a - pH)}]$$

Para valores de pH mucho menores que  $pK_a$ , es decir, en el intervalo de disociación fuerte de la base, esta ecuación se simplifica:

$$(XXVII) \quad R_m = \log[K(A_s / A_m)] + pK_a - pH = \log k' + pK_a - pH$$

En el caso de bases, el valor de  $R_m$  se reduce al aumentar el pH. Bajo las condiciones de la ecuación (XXVII) este incremento es lineal.

## Discusión de las ecuaciones XX y XXV.

A fin de hacer las ecuaciones (XX) y (XXV) más fácilmente comprensibles, se define  $k^*r = 1/k' = (A_m/A_s)/K$ . El término  $k^*$  es el recíproco del coeficiente de distribución  $K$  y  $r$  el inverso de la razón de fases. El término  $k^*r$  representa la razón de la cantidad de sustancia en la fase móvil respecto a la cantidad de sustancia en la fase estacionaria.  $R_f$  y  $k^*r$  cambian en la misma dirección. Con  $k^*r$ , la ecuación XX se escribe:

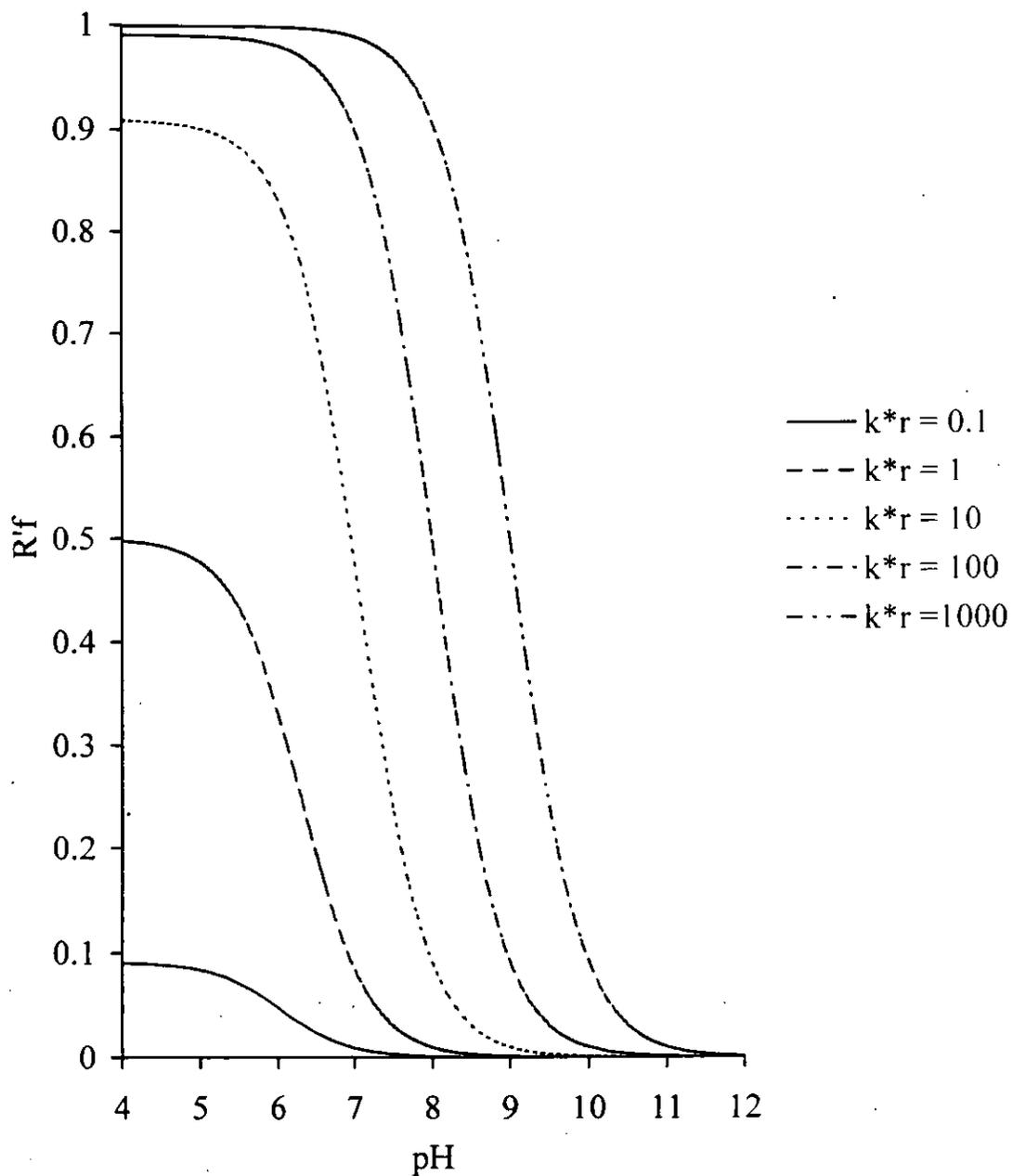
$$(XX') \quad R'_f = \frac{1}{1 + [1 + 10^{(pH - pK_a)}]/(k^*r)} \quad (\text{ácidos})$$

Análogamente, para la ecuación (XXV) se tiene:

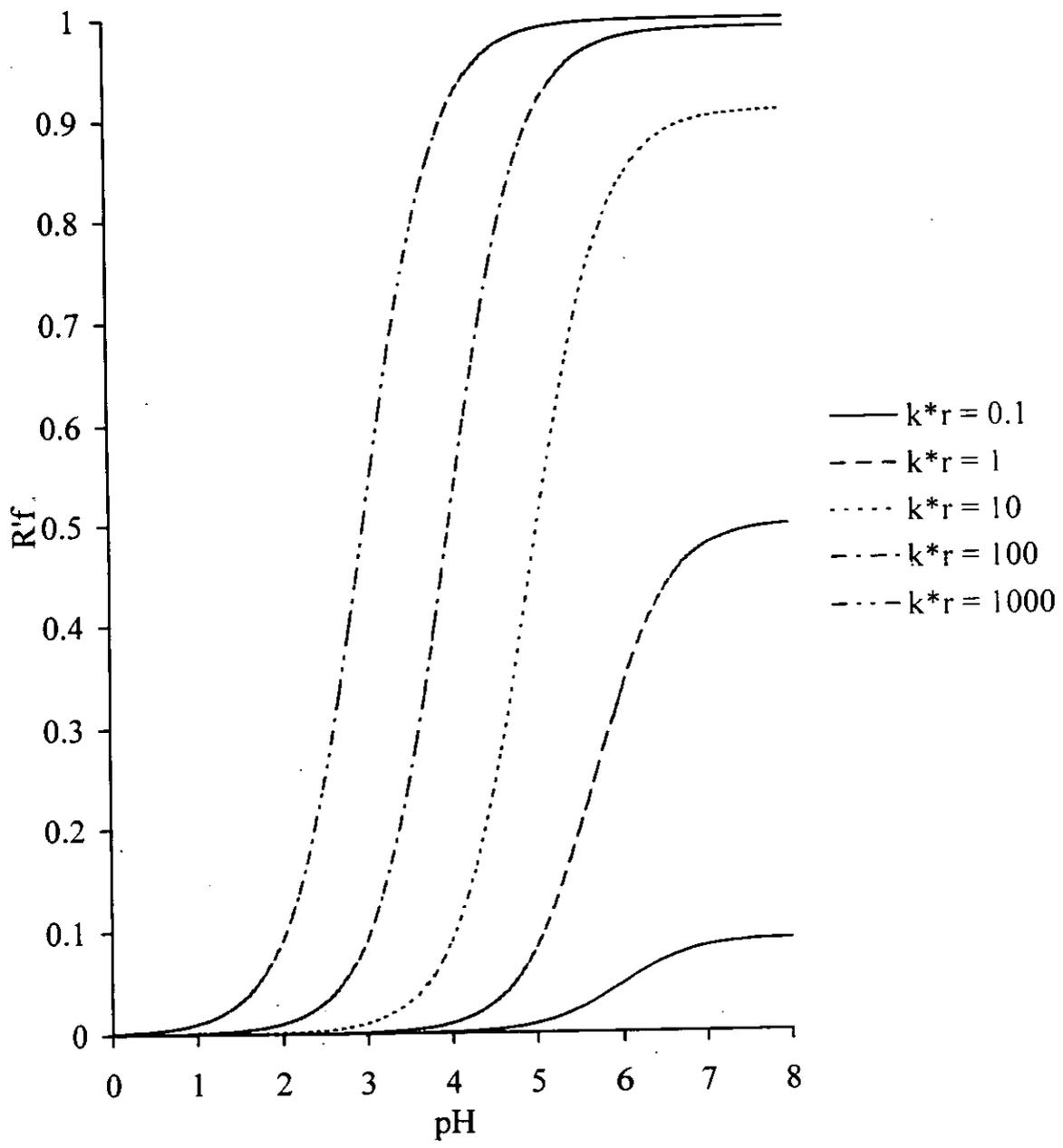
$$(XXV') \quad R'_f = \frac{1}{1 + [1 + 10^{(pK_a - pH)}]/(k^*r)} \quad (\text{bases})$$

Las siguientes gráficas representan la variación de  $R'_f$  con respecto al pH para ácidos y bases.

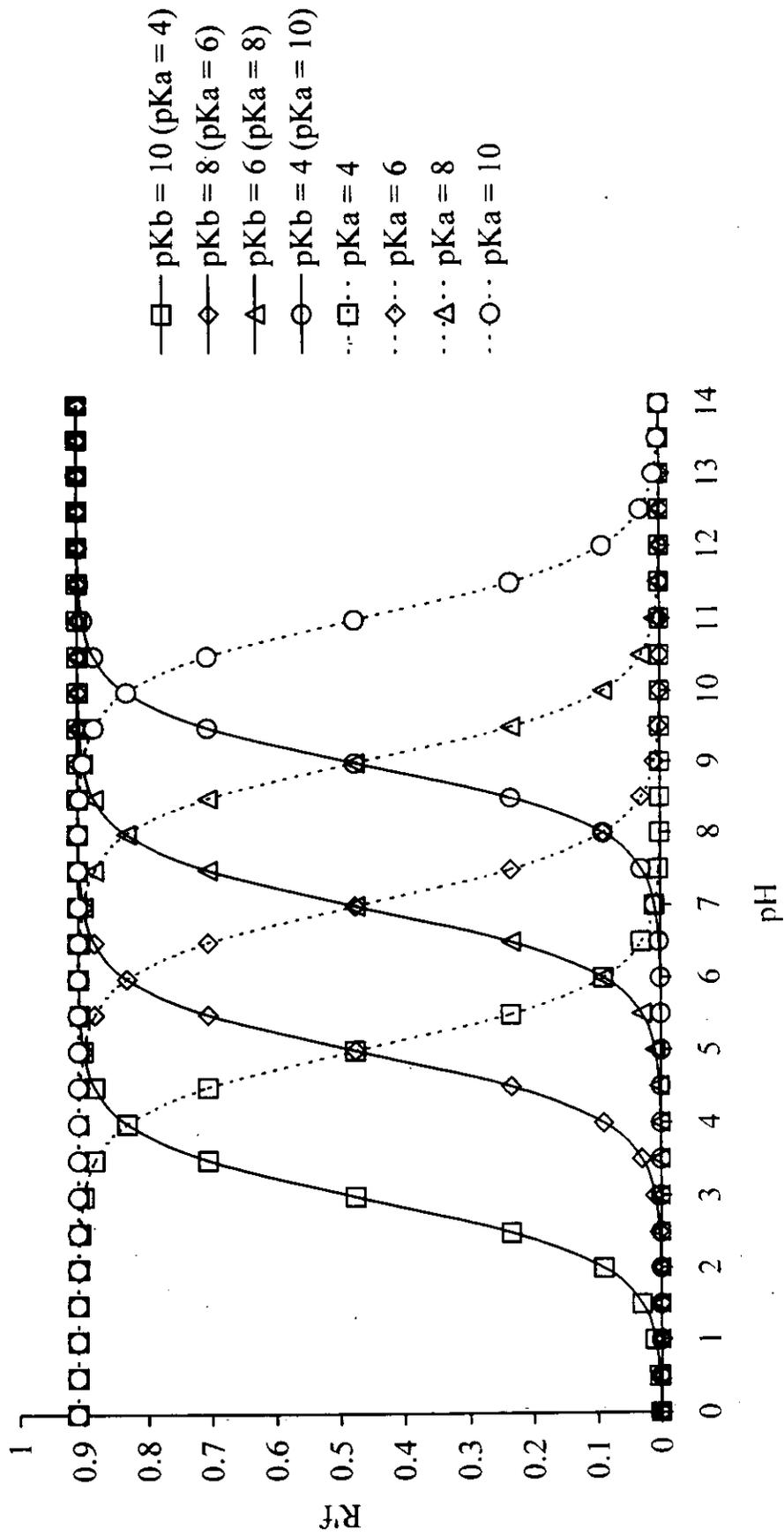
- Gráfica de  $R'_f$  vs. pH para un ácido ( $k^*r$  variable,  $pK_a$  constante).
- Gráfica de  $R'_f$  vs. pH para la correspondiente base conjugada ( $k^*r$  variable,  $pK_a$  constante).
- Gráfica de  $R'_f$  vs. pH para ácidos y bases ( $k^*r$  constante,  $pK_a$  variable).



Gráfica 2. Curvas de  $R'f$  vs. pH para un ácido con  $pK_a = 6$



Gráfica 3. Curvas de  $R'f$  vs.  $pH$  para una base con  $pK_b = 8$  ( $pK_a = 6$ )



Gráfica 4. Curvas de  $R_f$  vs. pH para ácidos (líneas continuas) y bases (líneas punteadas).  $k^*r = 10$

Analizando la ecuación (XX') pueden considerarse los siguientes casos:

Caso 1. pH mucho menor a  $pK_a$  ( $pH-pK_a$  mucho menor que cero). En este caso el ácido prácticamente no está disociado. Por lo tanto, el valor dentro de los corchetes se aproxima a la unidad y el valor de  $R_f'$  sólo depende del parámetro de distribución  $k^*r$ : A mayor valor de  $k^*r$ , mayor será el número de moléculas en la fase móvil y, en consecuencia,  $R_f'$  también aumentará (ver gráfica). Para  $k^*r \rightarrow \infty$  se tiene  $R_f' \rightarrow 1$ .

Caso 2.  $k^*r$  y pH constante,  $pK_a$  variable. A mayor grado de disociación del ácido, más pequeño es el valor de  $pK_a$ , y mayor la diferencia  $pH-pK_a$ . Por lo tanto, el valor dentro de los corchetes tiende al infinito y  $R_f'$  se aproxima a cero. Debido a un mayor grado de disociación del ácido, el número de moléculas de sustancia en la fase estacionaria también aumenta.

Caso 3.  $k^*r$  y  $pK_a$  constantes, pH variable. Al disminuir el pH, el grado de disociación del ácido también disminuye. El valor de  $R_f'$  alcanza un valor máximo cuando el grado de disociación del ácido tiende a cero. En esta condición, el valor de  $R_f'$  depende sólo del parámetro de distribución  $k^*r$ .

En el caso de las bases se producen las situaciones inversas. Sin embargo, al igual que en el caso de los ácidos, a un mayor grado de disociación corresponde una disminución en el valor de  $R_f'$ , como se explica a continuación.

Analizando la ecuación (XXV') pueden considerarse los siguientes casos:

Caso 1. pH mucho mayor a  $pK_a$  ( $pK_a - pH$  mucho menor que cero). En este caso la base prácticamente no está disociada. Por lo tanto, el valor dentro de los corchetes se aproxima a la unidad y el valor de  $R_f'$  sólo depende del parámetro de distribución  $k^*r$ . Para  $k^*r \rightarrow \infty$  se tiene  $R_f' \rightarrow 1$ .

Caso 2.  $k^*r$  y pH constante,  $pK_a$  variable. A mayor grado de disociación de la base ( $pK_b$  pequeño), más grande es el valor de  $pK_a$  del ácido conjugado, y mayor la diferencia  $pK_a - pH$ . Por lo tanto, el valor dentro de los corchetes tiende al infinito y  $R_f'$  se aproxima a cero. Debido a un mayor grado de disociación de la base, el número de moléculas de sustancia en la fase estacionaria también aumenta.

Caso 3.  $k^*r$  y  $pK_a$  constantes, pH variable. Al aumentar el pH, el grado de disociación de la base también disminuye. El valor de  $R_f'$  alcanza un valor máximo cuando el grado de disociación de la base tiende a cero. En esta condición, el valor de  $R_f'$  depende sólo del parámetro de distribución  $k^*r$ .

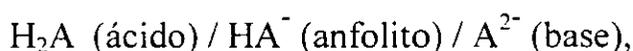
A fin de estudiar cuantitativamente la influencia del pH en el comportamiento cromatográfico de sustancias, se parte de una ecuación de  $k'$  que considera los resultados de  $k'$  cuando la especie química está protonada ( $k'_{\text{ácido}}$ ) y cuando está sin protonar ( $k'_{\text{base}}$ ):

$$(XXVIII) \quad k' = k'_{\text{ácido}} + k'_{\text{base}}$$

Sustituyendo las ecuaciones (XVI), (XIX) y (XXIV) en (XXVIII) se obtiene la ecuación empleada por Lepri, L. *et. al.* en el estudio del comportamiento cromatográfico de fenoles (1975) y alcaloides (1976) en capas finas de intercambiadores de iones.

$$(XXIX) \quad \frac{1 - R'_f}{R'_f} = \frac{1 - R'_{f,\text{ácido}}}{R'_{f,\text{ácido}}} \times \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} + \frac{1 - R'_{f,\text{base}}}{R'_{f,\text{base}}} \times \frac{K_a}{[H^+] + K_a}$$

Por otra parte, en el caso de un sistema :



es posible escribir:

$$(XXX) \quad k' = k'_{\text{ácido}} + k'_{\text{anfolito}} + k'_{\text{base}}$$

donde:

$$(XXXI) \quad k'_{\text{ácido}} = \frac{1 - R'_{f,\text{ácido}}}{R'_{f,\text{ácido}}} \times \frac{[H_2A]}{[A']_{\text{Tot}}} = \frac{1 - R'_{f,\text{ácido}}}{R'_{f,\text{ácido}}} \times \frac{[H_2A]}{[H_2A] + [HA^-] + [A^{2-}]}$$

$$(XXXII) \quad k'_{\text{anfolito}} = \frac{1 - R'_{f, \text{anfolito}}}{R'_{f, \text{anfolito}}} \times \frac{[\text{HA}^-]}{[\text{A}']_{\text{Tot}}} = \frac{1 - R'_{f, \text{anfolito}}}{R'_{f, \text{anfolito}}} \times \frac{[\text{HA}^-]}{[\text{H}_2\text{A}] + [\text{HA}^-] + [\text{A}^{2-}]}$$

$$(XXXIII) \quad k'_{\text{base}} = \frac{1 - R'_{f, \text{base}}}{R'_{f, \text{base}}} \times \frac{[\text{A}^{2-}]}{[\text{A}']_{\text{Tot}}} = \frac{1 - R'_{f, \text{base}}}{R'_{f, \text{base}}} \times \frac{[\text{A}^{2-}]}{[\text{H}_2\text{A}] + [\text{HA}^-] + [\text{A}^{2-}]}$$

Asimismo, se establecen las constantes de disociación ácida siguientes:

$$(XXXIV) \quad K_{a,1} = \frac{[\text{HA}^-][\text{H}^+]}{[\text{H}_2\text{A}]} \quad \text{y} \quad (XXXV) \quad K_{a,2} = \frac{[\text{A}^{2-}][\text{H}^+]}{[\text{HA}^-]}$$

de donde es posible definir:

$$(XXXVI) \quad \frac{[\text{H}_2\text{A}]}{[\text{A}']_{\text{Tot}}} = \frac{[\text{H}_2\text{A}]}{[\text{H}_2\text{A}] + [\text{HA}^-] + [\text{A}^{2-}]} = \frac{1}{1 + \frac{K_{a,1}}{[\text{H}^+]} + \frac{K_{a,1}K_{a,2}}{[\text{H}^+]^2}}$$

$$(XXXVII) \quad \frac{[\text{HA}^-]}{[\text{A}']_{\text{Tot}}} = \frac{[\text{HA}^-]}{[\text{H}_2\text{A}] + [\text{HA}^-] + [\text{A}^{2-}]} = \frac{1}{\frac{[\text{H}^+]}{K_{a,1}} + 1 + \frac{K_{a,2}}{[\text{H}^+]}}$$

$$(XXXVIII) \quad \frac{[\text{A}^{2-}]}{[\text{A}']_{\text{Tot}}} = \frac{[\text{A}^{2-}]}{[\text{H}_2\text{A}] + [\text{HA}^-] + [\text{A}^{2-}]} = \frac{1}{\frac{[\text{H}^+]^2}{K_{a,1}K_{a,2}} + \frac{[\text{H}^+]}{K_{a,2}} + 1}$$

Sustituyendo (XXXVI) en (XXXI), (XXXVII) en (XXXII) y (XXXVIII) en (XXXIII) se obtiene:

$$(XXXIX) \quad k'_{\text{ácido}} = \frac{1 - R'_{f, \text{ácido}}}{R'_{f, \text{ácido}}} \times \frac{[H_2A]}{[A']_{\text{Tot}}} = \frac{1 - R'_{f, \text{ácido}}}{R'_{f, \text{ácido}}} \times \frac{1}{1 + \frac{K_{a,1}}{[H^+]} + \frac{K_{a,1}K_{a,2}}{[H^+]^2}}$$

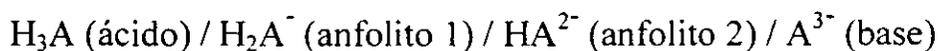
$$(XL) \quad k'_{\text{anfolito}} = \frac{1 - R'_{f, \text{anfolito}}}{R'_{f, \text{anfolito}}} \times \frac{[HA^-]}{[A']_{\text{Tot}}} = \frac{1 - R'_{f, \text{anfolito}}}{R'_{f, \text{anfolito}}} \times \frac{1}{\frac{[H^+]}{K_{a,1}} + 1 + \frac{K_{a,2}}{[H^+]}}$$

$$(XLI) \quad -k'_{\text{base}} = \frac{1 - R'_{f, \text{base}}}{R'_{f, \text{base}}} \times \frac{[A^{2-}]}{[A']_{\text{Tot}}} = \frac{1 - R'_{f, \text{base}}}{R'_{f, \text{base}}} \times \frac{1}{\frac{[H^+]^2}{K_{a,1}K_{a,2}} + \frac{[H^+]}{K_{a,2}} + 1}$$

Sustituyendo (XVI), (XXXIX), (XL) y (XLI) en (XXX) se llega a:

$$(XLII) \quad \frac{1 - R'_f}{R'_f} = \frac{\frac{1 - R'_{f, \text{ácido}}}{R'_{f, \text{ácido}}}}{1 + \frac{K_{a,1}}{[H^+]} + \frac{K_{a,1}K_{a,2}}{[H^+]^2}} + \frac{\frac{1 - R'_{f, \text{anfolito}}}{R'_{f, \text{anfolito}}}}{\frac{[H^+]}{K_{a,1}} + 1 + \frac{K_{a,2}}{[H^+]}} + \frac{\frac{1 - R'_{f, \text{base}}}{R'_{f, \text{base}}}}{\frac{[H^+]^2}{K_{a,1}K_{a,2}} + \frac{[H^+]}{K_{a,2}} + 1}$$

En el caso de un sistema:



donde  $\text{HA}^{2-}$  (anfolito 2) se considere inestable para cualquier valor de pH, se tiene:

$$\text{(XLIII)} \quad k' = k'_{\text{ácido}} + k'_{\text{anfolito 1}} + \overset{\nearrow \approx 0}{k'_{\text{anfolito 2}}} + k'_{\text{base}}$$

donde:

$$\text{(XLIV)} \quad k'_{\text{ácido}} = \frac{1 - R'_{\text{f, ácido}}}{R'_{\text{f, ácido}}} \times \frac{[\text{H}_3\text{A}]}{[\text{A}']_{\text{Tot}}} = \frac{1 - R'_{\text{f, ácido}}}{R'_{\text{f, ácido}}} \times \frac{[\text{H}_3\text{A}]}{[\text{H}_3\text{A}] + [\text{H}_2\text{A}^-] + [\text{A}^{3-}]}$$

$$\text{(XLV)} \quad k'_{\text{anfolito 1}} = \frac{1 - R'_{\text{f, anfolito 1}}}{R'_{\text{f, anfolito 1}}} \times \frac{[\text{HA}^-]}{[\text{A}']_{\text{Tot}}} = \frac{1 - R'_{\text{f, anfolito 1}}}{R'_{\text{f, anfolito 1}}} \times \frac{[\text{H}_2\text{A}^-]}{[\text{H}_3\text{A}] + [\text{H}_2\text{A}^-] + [\text{A}^{3-}]}$$

$$\text{(XLVI)} \quad k'_{\text{base}} = \frac{1 - R'_{\text{f, base}}}{R'_{\text{f, base}}} \times \frac{[\text{A}^{2-}]}{[\text{A}']_{\text{Tot}}} = \frac{1 - R'_{\text{f, base}}}{R'_{\text{f, base}}} \times \frac{[\text{A}^{3-}]}{[\text{H}_3\text{A}] + [\text{H}_2\text{A}^-] + [\text{A}^{3-}]}$$

Asimismo, se establecen las constantes de disociación ácida siguientes:

$$\text{(XLVII)} \quad K_{a,1} = \frac{[\text{H}_2\text{A}^-][\text{H}^+]}{[\text{H}_3\text{A}]}$$

$$(XLVIII) \quad K_{a,2} = \frac{[HA^{2-}][H^+]}{[H_2A^-]}$$

$$(XLIX) \quad K_{a,3} = \frac{[A^{3-}][H^+]}{[HA^{2-}]}$$

de donde es posible definir:

$$(L) \quad \frac{[H_3A]}{[A]_{Tot}} = \frac{[H_3A]}{[H_3A] + [H_2A^-] + [A^{3-}]} = \frac{1}{1 + \frac{K_{a,1}}{[H^+]} + \frac{K_{a,1} K_{a,2} K_{a,3}}{[H^+]^3}}$$

$$(LI) \quad \frac{[H_2A^-]}{[A]_{Tot}} = \frac{[H_2A^-]}{[H_3A] + [H_2A^-] + [A^{3-}]} = \frac{1}{\frac{[H^+]}{K_{a,1}} + 1 + \frac{K_{a,2} K_{a,3}}{[H^+]^2}}$$

$$(LII) \quad \frac{[A^{3-}]}{[A]_{Tot}} = \frac{[A^{3-}]}{[H_3A] + [H_2A^-] + [A^{3-}]} = \frac{1}{\frac{[H^+]^3}{K_{a,1} K_{a,2} K_{a,3}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a,2} K_{a,3}} + 1}$$

Sustituyendo (L) en (XLIV), (LI) en (XLV) y (LII) en (XLVI) se obtiene:

$$(LIII) \quad k'_{\text{ácido}} = \frac{1 - R'_{f, \text{ácido}}}{R'_{f, \text{ácido}}} \times \frac{[H_3A]}{[A']_{\text{Tot}}} = \frac{1 - R'_{f, \text{ácido}}}{R'_{f, \text{ácido}}} \times \frac{1}{1 + \frac{K_{a,1}}{[H^+]} + \frac{K_{a,1} K_{a,2} K_{a,3}}{[H^+]^3}}$$

$$(LIV) \quad k'_{\text{anfolito 1}} = \frac{1 - R'_{f, \text{anfolito 1}}}{R'_{f, \text{anfolito 1}}} \times \frac{[H_2A^-]}{[A']_{\text{Tot}}} = \frac{1 - R'_{f, \text{anfolito 1}}}{R'_{f, \text{anfolito 1}}} \times \frac{1}{\frac{K_{a,1}}{[H^+]} + 1 + \frac{K_{a,2} K_{a,3}}{[H^+]^2}}$$

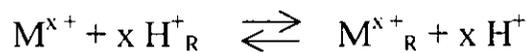
$$(LV) \quad k'_{\text{base}} = \frac{1 - R'_{f, \text{base}}}{R'_{f, \text{base}}} \times \frac{[A^{3-}]}{[A']_{\text{Tot}}} = \frac{1 - R'_{f, \text{base}}}{R'_{f, \text{base}}} \times \frac{1}{\frac{[H^+]^3}{K_{a,1} K_{a,2} K_{a,3}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a,2} K_{a,3}} + 1}$$

Sustituyendo (XVI), (XXXIX), (XL) y (XLI) en (XXX) se llega a:

$$(LVI) \quad \frac{1 - R'_f}{R'_f} = \frac{\frac{1 - R'_{f, \text{ácido}}}{R'_{f, \text{ácido}}}}{1 + \frac{K_{a,1}}{[H^+]} + \frac{K_{a,1} K_{a,2} K_{a,3}}{[H^+]^3}} + \frac{\frac{1 - R'_{f, \text{anfolito 1}}}{R'_{f, \text{anfolito 1}}}}{\frac{[H^+]}{K_{a,1}} + 1 + \frac{K_{a,2} K_{a,3}}{[H^+]^2}} + \frac{\frac{1 - R'_{f, \text{base}}}{R'_{f, \text{base}}}}{\frac{[H^+]^3}{K_{a,1} K_{a,2} K_{a,3}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a,2} K_{a,3}} + 1}$$

## 4.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE INTERCAMBIADOR DE IONES

El proceso de intercambio iónico puede ser establecido de acuerdo a la ley de acción de masas. Así, para un ion con carga  $x +$ , el equilibrio con la forma  $H^+$  de una resina R será (el subíndice R indica "en la resina"):



La constante  $K_{eq}$  estará definida por:

$$(LVII) \quad K_{eq} = \frac{[M^{x+}]_R [H^+]^x}{[M^{x+}] [H^+]^x_R}$$

ó

$$(LVIII) \quad \log K_{eq} = \log \frac{[M^{x+}]_R}{[M^{x+}]} + x \log [H^+] - x \log [H^+]_R$$

Dado que  $[M^{x+}]_R = c_s$  y  $[M^{x+}] = c_m$ , y por las ecuaciones (VIII) y (XVI), se cumple:

$$(LIX) \quad \frac{[M^{x+}]_R}{[M^{x+}]} = \frac{c_s}{c_m} = K = \left( \frac{1}{R'_f} - 1 \right) (A_m / A_s)$$

Sustituyendo (LIX) en (LVIII) se tiene:

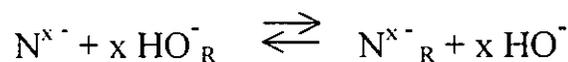
$$(LX) \quad \log K_{eq} = \log \left( \frac{1}{R'_f} - 1 \right) + \log (A_m / A_s) + x \log [H^+] - x \log [H^+]_R$$

Sustituyendo (XIII) en (LX), y suponiendo que  $\log K_{eq}$ ,  $\log (A_m/A_s)$  y  $x \log [H^+]_R$  son constantes, se obtiene la ecuación establecida por Lederer, M. y Kertes, S. (1956):

$$(LXI) \quad R_m = x \text{ pH} + \text{cte}$$

La ecuación (LXI) describe una función  $R_m = f(\text{pH})$ , que corresponde a una línea recta con pendiente positiva igual a la carga  $x$  del ion.

Análogamente, para el caso de un ion con carga  $x^-$  en contacto con una resina aniónica en forma de  $\text{HO}^-$ , puede escribirse el equilibrio:



La constante  $K_{eq}$  estará definida por:

$$(LXII) \quad K_{eq} = \frac{[\text{N}^{x-}]_R [\text{HO}^-]^x}{[\text{N}^{x-}] [\text{HO}^-]_R^x}$$

Rearreglando términos puede escribirse:

$$(LXIII) \quad \log K_{eq} = \log \frac{[N^{x-}]_R}{[N^{x-}]} + x \log [HO^-] - x \log [HO^-]_R$$

Dado que  $[N^{x-}]_R = c_s$  y  $[N^{x-}] = c_m$ , y por las ecuaciones (VIII) y (XVI), se cumple:

$$(LXIV) \quad \frac{[N^{x-}]_R}{[N^{x-}]} = \frac{c_s}{c_m} = K = \left( \frac{1}{R'_f} - 1 \right) (A_m/A_s)$$

Sustituyendo (LXIV) en (LXIII) se tiene:

$$(LXV) \quad \log K_{eq} = \log \left( \frac{1}{R'_f} - 1 \right) + \log (A_m/A_s) + x \log [HO^-] - x \log [HO^-]_R$$

Sustituyendo (XIII) en (LXV), y suponiendo que  $\log K_{eq}$ ,  $\log (A_m/A_s)$  y  $x \log [HO^-]_R$  son constantes, se obtiene:

$$(LXVI) \quad R_m = x \text{ pOH} + \text{cte } 1 = x (14 - \text{pH}) + \text{cte } 1 = -x \text{ pH} + \text{cte } 2$$

La ecuación (LXVI) describe una función  $R_m = f(\text{pH})$ , que corresponde a una línea recta con pendiente negativa igual a la carga  $x$ - del ion.

## CAPÍTULO V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### *5.1 PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE CAPA FINA DE INTERCAMBIADORES DE IONES.*

Se probaron los siguientes aglutinantes en diferentes proporciones con intercambiador de iones Amberlita IRP-64, con el objeto de hallar la mezcla óptima para la preparación de las placas de capa fina. Los factores que se consideraron fueron la apariencia y la adherencia del material al vidrio.

- Methocel A (Dow Chemical Co.) Metilcelulosa.
- Tylose MH (Química Hoechst de México S.A. de C.V.) Metilhidroxietil celulosa.
- Unitab 101 (Degussa AG.) Celulosa microcristalina.

El Unitab 101 (celulosa microcristalina), presenta adherencia satisfactoria al vidrio, mientras que los aglutinantes Methocel A y Tylose MH (ésteres de celulosa), no se adhieren al vidrio.

A fin de encontrar la mezcla óptima de Amberlita IRP-64 / celulosa microcristalina que diera como resultado placas de capa fina con la máxima proporción de resina y textura uniforme, se realizaron las siguientes pruebas:

Proporción Amberlita IRP-64/ celulosa microcristalina	Apariencia
1:1	Muy agrietada
1:2	Medianamente agrietada
1:3	Uniforme
1:4	Uniforme

Tabla 9. Optimización de la proporción resina / celulosa microcristalina

Una vez hallado el tipo de aglutinante (celulosa microcristalina) y la proporción resina / celulosa microcristalina (1:3) apropiados, se prepararon las placas de capa fina del intercambiador de iones a estudiar, siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

Se preparó una suspensión con 3g de resina intercambiadora de iones, previamente lavada con agua en Soxhlet durante 15 h, y 9g de celulosa microcristalina (Unitab 101, Degussa AG.) en 50 ml de agua.

La mezcla resina / celulosa microcristalina en agua se aplicó con pipeta Pasteur sobre placas de vidrio, que se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez preparadas las placas, se utilizaron dentro de un plazo no mayor a 24h a fin de evitar contaminación del intercambiador de iones.

Para convertir el intercambiador Dowex 1X4-400 (aniónica, fuertemente básica) a forma de hidróxido o de acetato, fue necesario pasar una solución de hidróxido de sodio al 10% (p/v) o de acetato de sodio al

10%(p/v), según correspondiera, a través de una columna empacada con la resina comercial en forma de cloruro, hasta que no se detectara en el efluente la presencia del ion cloruro. (ACS, "Reagent Chemicals", 1993).

### **Aplicación y detección de los alcaloides sobre las placas finas.**

Se prepararon soluciones de boldina (Sigma) y Sinomenina (Aldrich) al 0.5% (p/v) en metanol, y de clorhidrato de isocoridina (Aldrich) al 0.5% (p/v) en agua / metanol 1:1. Con microjeringa se aplicaron 10  $\mu$ l de solución en la placa de intercambiador de iones.

Una vez que las placas corrieron dentro de una cámara de vidrio con el eluyente apropiado, se procedió a detectar los alcaloides mediante un aspersor con solución reveladora de sulfato cérico.

### **5.2 DOWEX 1X4-400 (ANIÓNICA, FUERTEMENTE BÁSICA)**

Con el objeto de estudiar la retención de boldina e isocoridina como fenóxidos en la placa de capa fina de Dowex 1X4-400 en su forma comercial de  $\text{Cl}^-$ , se empleó eluyente a  $\text{pH} = 11.5$  (amoníaco 0.63M en agua). El resultado fueron bandas a lo largo de la placa, mientras que la prueba con el mismo eluyente sobre placas con resina en forma de  $\text{HO}^-$ , dio como resultado bandas significativamente más cortas, centradas en  $R_f = 0.05$  para boldina,  $R_f = 0.31$  para isocoridina y  $R_f = 0.62$  para sinomenina. Cabe mencionar que la sinomenina no es un alcaloide presente en el boldo, pero se incluyó en el estudio en vistas a su posible utilización como estándar interno.

En un intercambiador de aniones fuertemente básico, del Tipo I, como es el caso de la resina Dowex 1X4-400, el coeficiente de selectividad para el ion cloruro es 22 veces mayor que el coeficiente para el ion hidróxido. Por lo tanto, los alcaloides fenólicos, que en agua a pH=11.5 se encuentran como fenóxidos, más fácilmente se intercambian por iones hidróxido que por cloruros, en esta resina. Así se explica el hecho de que la boldina e isocoridina, bajo las condiciones de elución mencionadas describan bandas a lo largo de toda su trayectoria por la placa de capa fina de Dowex 1X4-400 en forma de cloruro, mientras que en la placa con la resina en forma de hidróxido, los alcaloides eluyan como bandas más cortas.

La elución de la boldina, isocoridina y sinomenina en la placa de capa fina de Dowex 1X4-400 en forma de  $\text{HO}^-$  es un ejemplo de la separación que se puede lograr en un intercambiador de iones cuando se trabaja con sustancias cuyas estructuras son lo suficientemente diferentes entre sí.

En agua a pH=11.5 la boldina, cuya estructura presenta dos grupos fenólicos, es un dianión, lo cual explica su relativamente alta afinidad por la resina aniónica ( $R_f = 0.05$ ). Bajo las mismas condiciones de elución, la isocoridina, con un solo grupo fenólico en su estructura, es un anión cuyo valor de  $R_f = 0.31$  denota una relativamente baja retención en la resina Dowex 1X4-400 en forma de  $\text{HO}^-$ . La sinomenina, al igual que la isocoridina, presenta un solo grupo fenólico en su estructura; sin embargo, a diferencia de la boldina e isocoridina, contiene un grupo carbonilo que, al conferirle a la molécula un carácter polar adicional, la hace más afin al eluyente acuoso,

obteniéndose una pobre retención del alcaloide en la resina aniónica ( $R_f = 0.62$ ).

Con la finalidad de encontrar las mejores condiciones para la elución y retención de alcaloides, así como lograr una mejor comprensión de los mecanismos involucrados, se efectuó un estudio de cromatografía en capa fina. A continuación se muestran los resultados obtenidos al utilizar diferentes tipos de resinas y eluyentes. Para la preparación de los eluyentes empleados en este trabajo, ver el Apéndice 2. Cada valor de  $R_f$  anotado corresponde al promedio de tres determinaciones.

Alcaloides	pH				
	4.78	6.76	8.18	9.12	11.68
Boldina	0.28	0.12	0.09	0.09	0.05
Isocoridina	0.33	0.30	0.28	0.27	0.25
Sinomenina	0.60	0.58	0.55	0.54	0.52

Tabla 10. Valores de  $R_f$  en Dowex 1X4-400 (aniónica, fuertemente básica, en forma de  $AcO^-$ ). Fuerza iónica 0.5 . Ver Gráfica 5

Alcaloides	pH				
	11.68	12.05	12.48	12.85	13.30
Boldina	0.05	0.22	0.62	0.75	0.80
Isocoridina	0.32	0.52	0.77	0.85	0.88
Sinomenina	0.65	0.82	0.92	0.94	0.95

Tabla 11. Valores de  $R_f$  en Dowex 1X4-400 (aniónica, fuertemente básica, en forma de  $HO^-$ ). Ver Gráfica 6

Alcaloides	Concentración de ácido acético en agua							
	0.0M	1.0M	2.0M	3.0M	4.0M	5.0M	6.0M	7.0M
Boldina	0.03	0.23	0.48	0.72	0.81	0.86	0.88	0.90
Isocoridina	0.02	0.23	0.50	0.75	0.84	0.88	0.91	0.92
Sinomenina	0.05	0.28	0.54	0.78	0.89	0.92	0.94	0.95

Tabla 12. Valores de Rf en Dowex 1X4-400 (aniónica, fuertemente básica, en forma de HO<sup>-</sup>). Ver Gráfica 7

La Gráfica 5 muestra que los valores experimentales se ajustan satisfactoriamente a las ecuaciones (XLII) y (LVI). Es importante señalar que la concordancia se debe, en cierto modo, a que las ecuaciones utilizadas no son estrictamente teóricas, sino más bien semiempíricas.

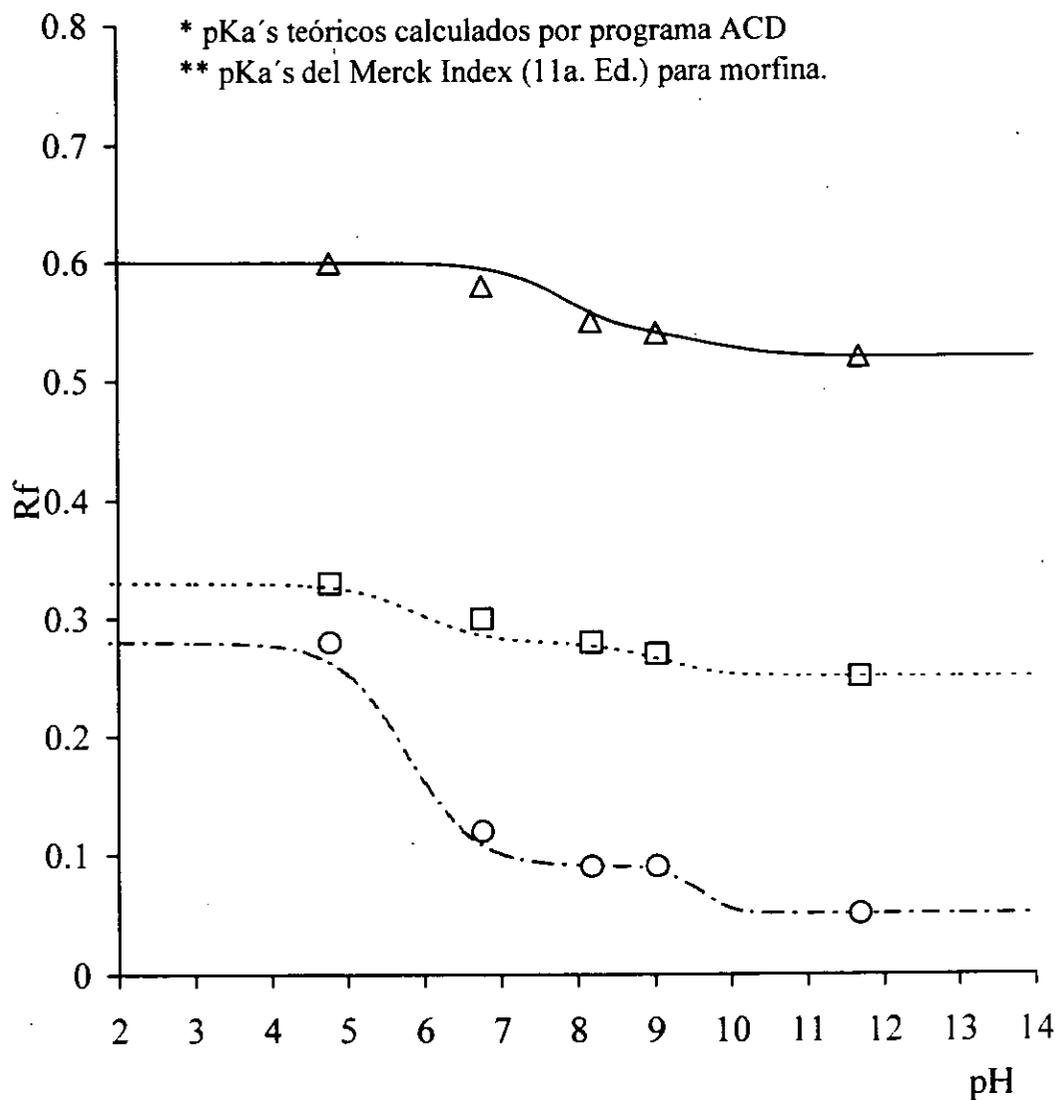
En la Gráfica 6 se observa que las pendientes de los segmentos lineales (pH de 11.68 a 12.48) son comparables a las cargas de los aniones, de acuerdo con la ecuación (LXVI). Así, para la boldina se tiene una pendiente igual a -1.86, valor similar a la carga 2- del anion correspondiente. Para isocoridina y sinomenina, las pendientes son -1.07 y -0.99, respectivamente, lo cual concuerda con la carga 1- de los aniones involucrados. El hecho de que a valores de pH mayores de 12.48, las curvas de  $R_m$  vs. pH no se ajusten a la ecuación (LXVI), puede interpretarse como una disminución en la capacidad de la resina, al no estar los grupos ionógenos completamente ionizados.

La Gráfica 7 muestra la optimización de la concentración de ácido acético en agua, para la elución de alcaloides de la resina.

Boldina: pKa's\* = 6.27 ; 9.56 ; 9.79

Isocoridina: pKa's\* = 5.98 ; 9.13

Sinomenina: pKa's\*\* = 7.87 ; 9.85

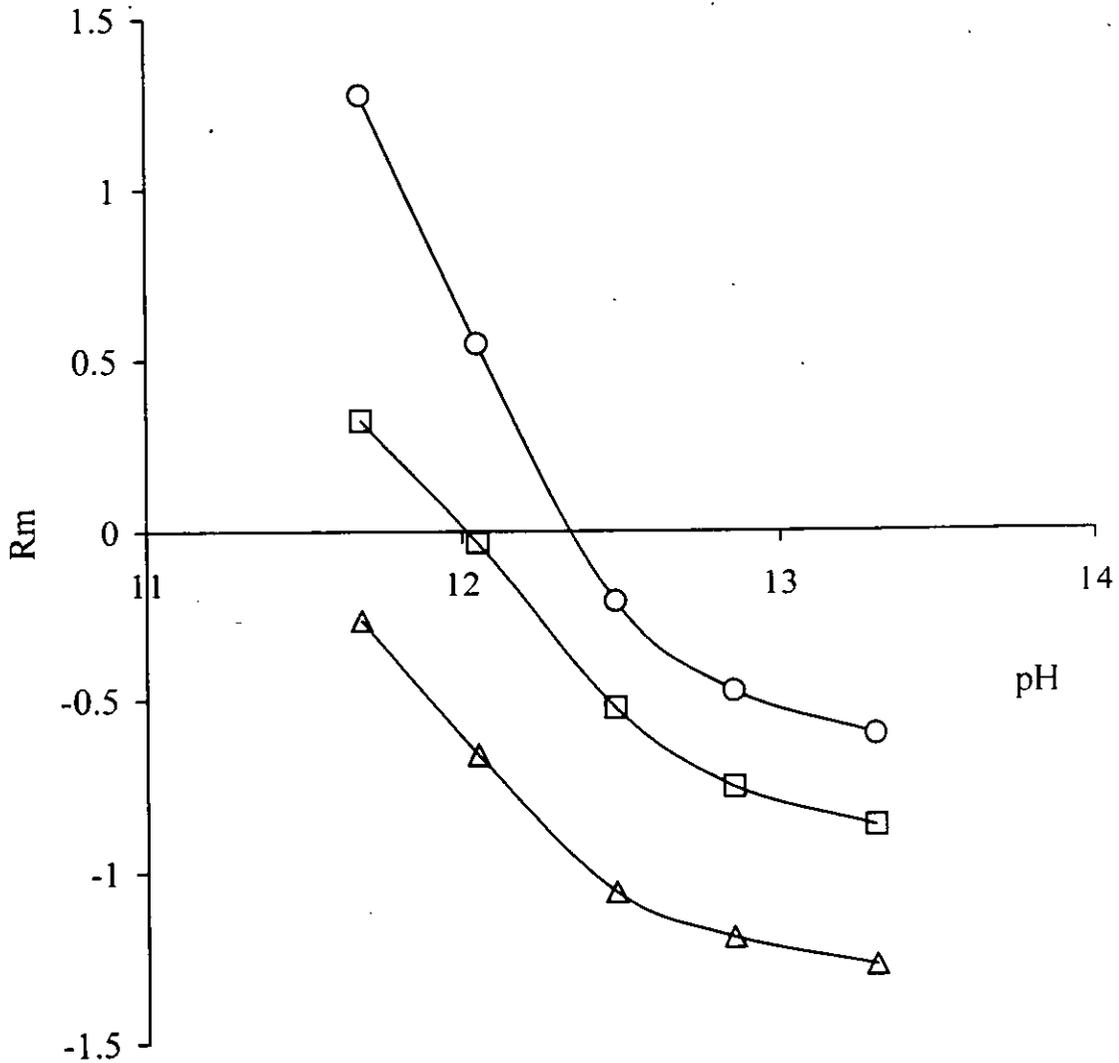


- - - Curva semiempírica para boldina. Ecuación (LVI)
- Datos experimentales de boldina
- - - - Curva semiempírica para isocoridina. Ecuación (XLII)
- Datos experimentales de isocoridina
- Curva semiempírica para sinomenina. Ecuación (XLII)
- Δ Datos experimentales de sinomenina

Gráfica 5. Curvas de Rf vs. pH (fuerza iónica 0.5) en Dowex 1X4-400 (aniónica, fuertemente básica, en forma de AcO<sup>-</sup>)

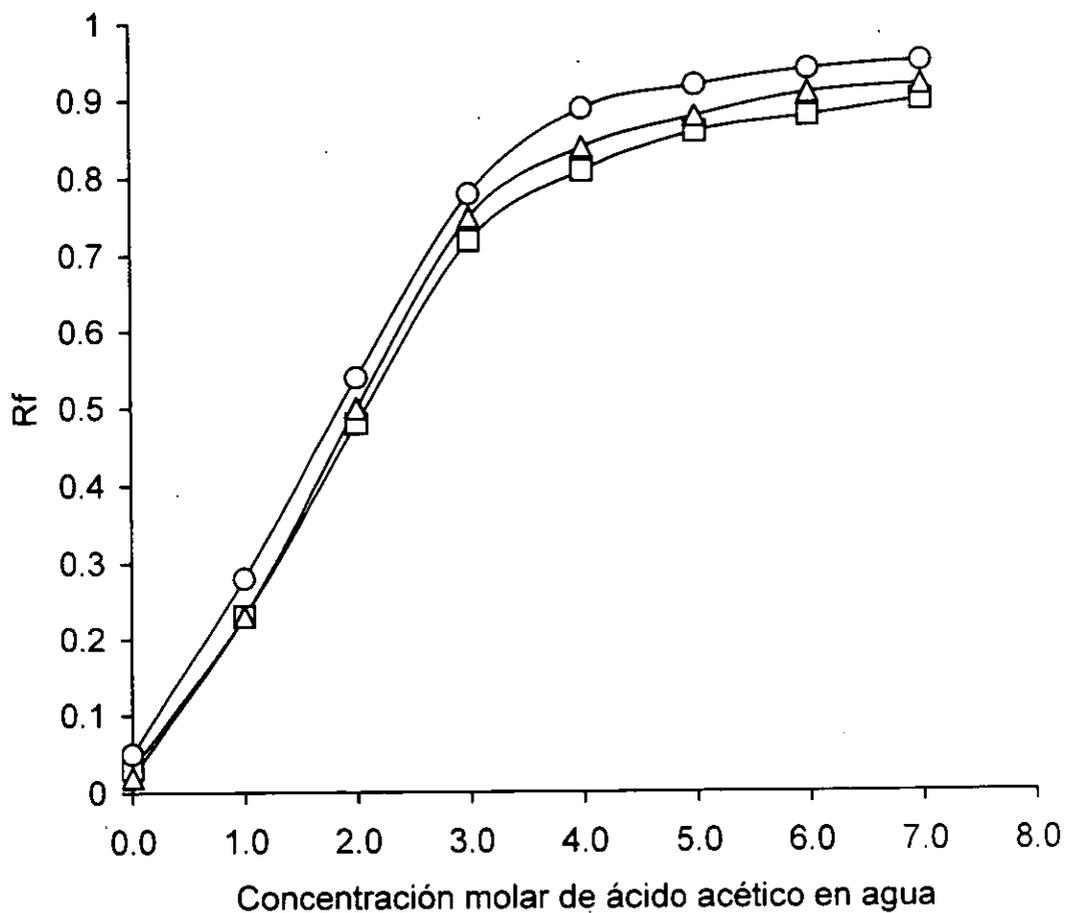
Pendiente del segmento lineal para boldina\* = -1.86  
 Pendiente del segmento lineal para isocoridina\* = -1.07  
 Pendiente del segmento lineal para sinomenina\* = -0.99

\*Los segmentos lineales corresponden a las curvas en el intervalo de pH de 11.68 a 12.48



- Datos experimentales de boldina
- Datos experimentales de isocoridina
- △— Datos experimentales de sinomenina

Gráfica 6. Curvas de Rm vs. pH en Dowex 1X4-400 (aniónica, fuertemente básica, en forma de HO-)



-□- Datos experimentales de boldina  
 -△- Datos experimentales de isocoridina  
 -○- Datos experimentales de sinomenina

Gráfica 7. Curvas de Rf vs. concentración molar de ácido acético en agua, en Dowex 1X4-400 (aniónica, fuertemente básica, en forma de HO<sup>-</sup>)

Las tablas que se muestran a continuación incluyen los resultados obtenidos en el estudio con diferentes alcoholes. Los valores de  $R_f$  no incluidos corresponden a bandas alargadas y, por lo tanto, poco precisos; sin embargo, se anotaron sólo aquéllos necesarios para mostrar la tendencia de los datos. En el caso particular del *tert*-butanol no se realizaron experimentos con el disolvente 100% puro, ya que a temperatura ambiente, éste se encontraba en estado sólido.

En las Gráficas 8 a 10 se observa claramente que a mayor polaridad del alcohol, mayor es su fuerza eluyente.

% (v/v) de alcohol en agua	Metanol	Etanol	Isopropanol	<i>tert</i> -Butanol
0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	0.01	0.0	0.0	0.0
10	0.03	0.02	0.0	0.0
15	0.04	0.02	0.01	0.0
20	0.05	0.03	0.01	0.0
25	0.05	0.03	0.02	0.0
75	0.23	0.18	-	0.01
100	0.36	0.26*	0.12*	

Tabla 13. Valores de  $R_f$  de boldina en Dowex 1X4-400 (aniónica, fuertemente básica, en forma de HO<sup>-</sup>). Ver Gráfica 8

\*Manchas alargadas. Los valores de  $R_f$  se incluyen sólo para mostrar la tendencia de los datos.

% (v/v) de alcohol en agua	Metanol	Etanol	Isopropanol	<i>tert</i> -Butanol
0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	0.01	0.0	0.0	0.0
10	0.03	0.02	0.0	0.0
15	0.04	0.02	0.01	0.0
20	0.05	0.03	0.01	0.0
25	0.05	0.03	0.02	0.0
75	0.25	0.19	-	0.01
100	0.39	0.27*	0.14*	-

Tabla 14. Valores de Rf de boldina en Dowex 1X4-400 (aniónica, fuertemente básica, en forma de HO<sup>-</sup>). Las mezclas eluyentes tienen ácido clorhídrico en concentración 1M.  
Ver Gráfica 9

% (v/v) de alcohol en agua	Metanol	Etanol	Isopropanol	<i>tert</i> -Butanol
0	0.23	0.23	0.23	0.23
5	0.24	0.23	0.23	0.23
10	0.25	0.24	0.24	0.23
15	0.25	0.25	0.24	0.23
20	0.26	0.25	0.25	0.23
25	0.26	0.26	0.25	0.23
75	0.38	-	-	0.24
100	0.47	0.41*	0.33*	-

Tabla 15. Valores de Rf de boldina en Dowex 1X4-400 (aniónica, fuertemente básica, en forma de HO<sup>-</sup>). Las mezclas eluyentes tienen ácido acético en concentración 1M.  
Ver Gráfica 10

\*Manchas alargadas. Los valores de Rf se incluyen sólo para mostrar la tendencia de los datos.

Si se comparan las Gráficas 8 y 9, se observa que las diferencias entre ambas son mínimas, mientras que la Gráfica 10 difiere significativamente de las dos anteriores. El poder eluyente de los disolventes no se incrementa apreciablemente por la presencia de ácido clorhídrico en concentración 1M (Gráfica 9), en comparación con las mezclas que no contienen ácido clorhídrico (Gráfica 8). En contraste, se observa un incremento considerable en el poder eluyente de los disolventes, respecto a los dos casos anteriores, debido a la presencia de ácido acético en concentración 1M (Gráfica 10).

### 5.3 AMBERLITA IRP-64 (CATIÓNICA, DÉBILMENTE ÁCIDA)

Alcaloides	pH				
	0.62	1.13	1.39	1.98	2.37
Boldina	0.36	0.37	0.35	0.30	0.21
Isocoridina	0.40	0.40	0.39	0.31	0.23
Sinomenina	0.53	0.53	0.50	0.42	0.33

Tabla 16. Valores de  $R_f$  en Amberlita IRP-64 (catiónica, débilmente ácida, en forma de  $H^+$ ). Ver Gráfica 11

En la Gráfica 11 no se consideraron segmentos lineales, ya que no son tan evidentes como en el caso de la Gráfica 6. Sin embargo, a valores de pH menores a 1.39 se observa la tendencia de  $R_m$  a volverse constante. En ausencia de un mecanismo de intercambio iónico [ $x = 0$  en la ecuación (LXI)] el resultado es un valor de  $R_m = cte$ .

El hecho de que a valores muy bajos de pH la tendencia de las curvas de  $R_m$  vs. pH implique una menor influencia del mecanismo iónico descrito por la ecuación (LXI), puede interpretarse como una disminución en la capacidad de la resina, al no estar los grupos ionógenos completamente ionizados.

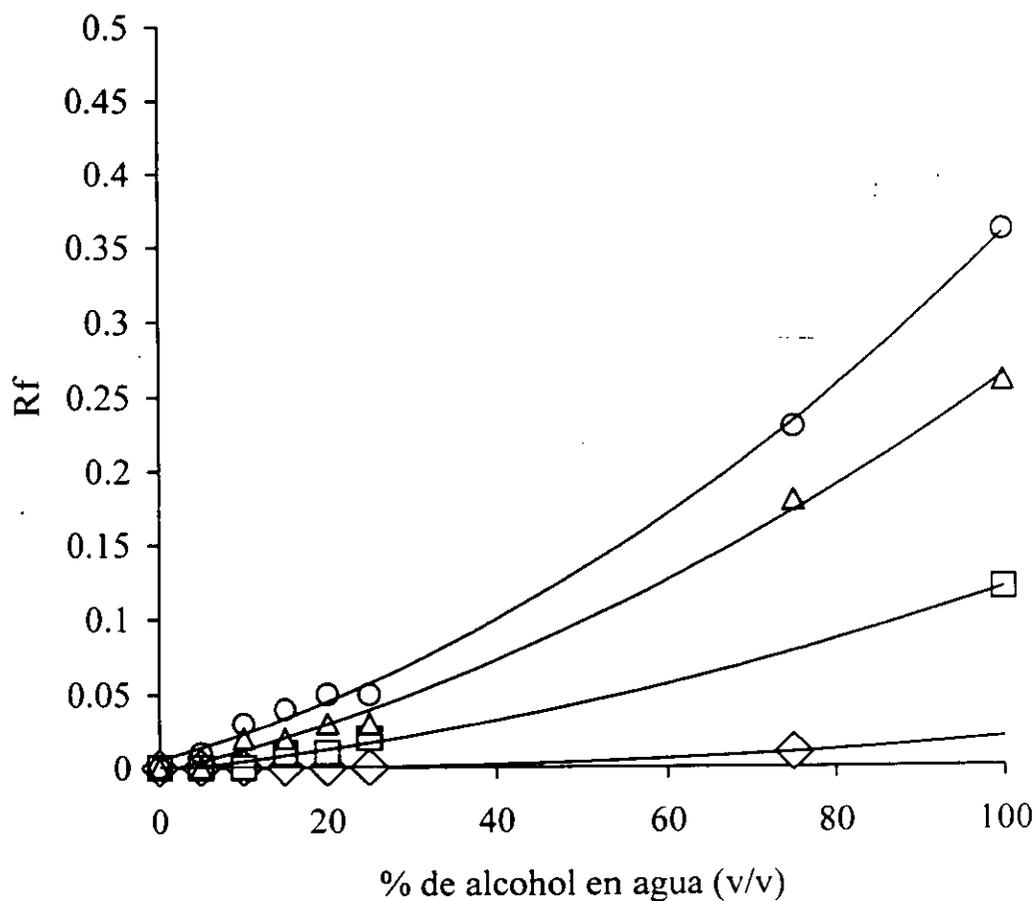
#### 5.4 CELULOSA MICROCRISTALINA

A fin de conocer la medida en que la celulosa microcristalina, usada como aglutinante para soportar las resinas en las placas de vidrio, influye en los mecanismos de retención de alcaloides, se realizaron experimentos, cuyos resultados se muestran a continuación.

Alcaloides	pH				
	4.78	6.76	8.18	9.12	11.68
Boldina	0.40	0.32	0.30	0.30	0.68
Isocoridina	0.25	0.17	0.17	0.19	0.50
Sinomenina	0.62	0.62	0.53	0.42	0.78

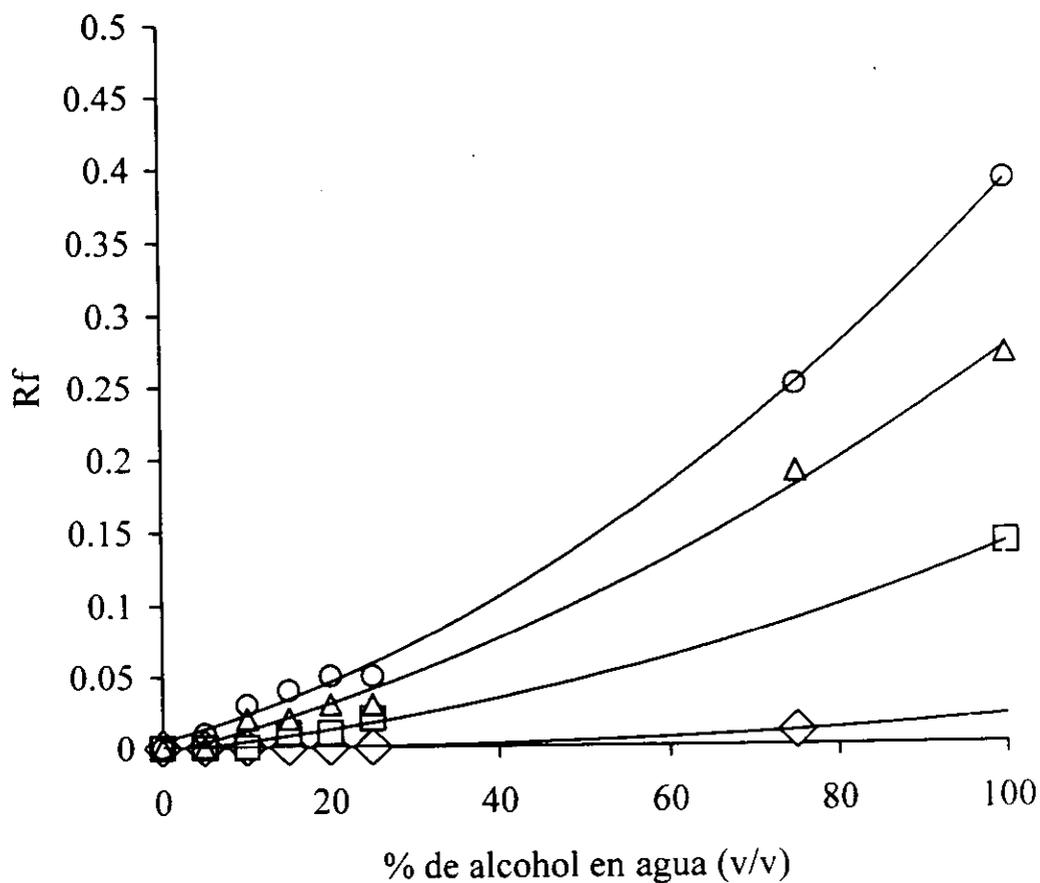
Tabla 17. Valores de  $R_f$  en celulosa microcristalina.  
Fuerza iónica 0.5 . Ver Gráfica 12

La Gráfica 12, a diferencia de la Gráfica 5, muestra curvas características de sistemas con un anfolito, análogas a las que podrían obtenerse en el caso de extracción líquido-líquido. Esto sugiere que la retención de alcaloides en celulosa microcristalina no obedece a un mecanismo de intercambio iónico.



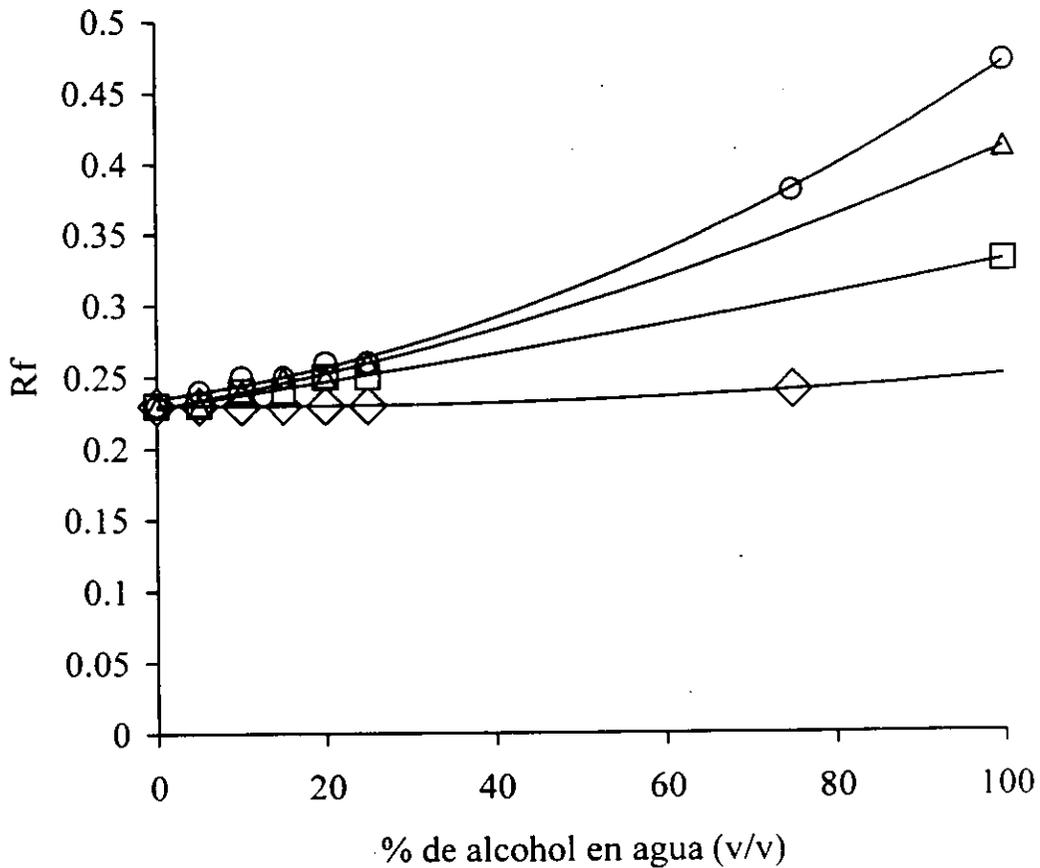
- ◇ Datos experimentales con tert-butanol
- Datos experimentales con isopropanol
- △ Datos experimentales con etanol
- Datos experimentales con metanol

Gráfica 8. Curvas de Rf vs. % de alcohol en agua (v/v) para boldina en Dowex 1X4-400 (aniónica, fuertemente básica, en forma de HO<sup>-</sup>)



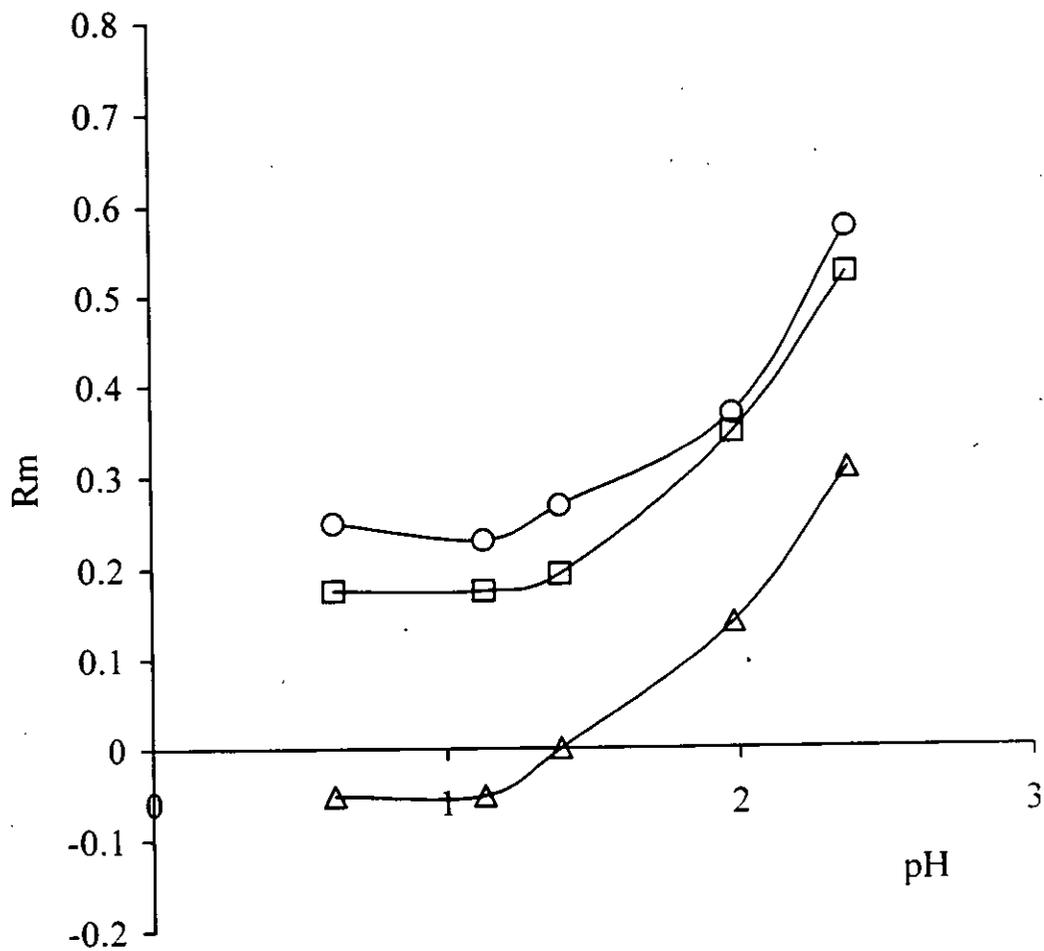
- ◇ Datos experimentales con tert-butanol
- Datos experimentales con isopropanol
- △ Datos experimentales con etanol
- Datos experimentales con metanol

Gráfica 9. Curvas de Rf vs. % de alcohol en agua (v/v) para boldina en Dowex 1X4-400 (aniónica, fuertemente básica, en forma de HO<sup>-</sup>). Las mezclas eluyentes tienen ácido clorhídrico en concentración 1M



- ◇ Datos experimentales con tert-butanol
- Datos experimentales con isopropanol
- △ Datos experimentales con etanol
- Datos experimentales con metanol

Gráfica 10. Curvas de Rf vs. % de alcohol en agua (v/v) para boldina en Dowex 1X4-400 (aniónica, fuertemente básica, en forma de HO<sup>-</sup>). Las mezclas eluyentes tienen ácido acético en concentración 1M



- Datos experimentales de boldina
- Datos experimentales de isocoridina
- △- Datos experimentales de sinomenina

Gráfica 11. Curvas de Rm vs. pH en Amberlita IRP-64 (catiónica, débilmente ácida, en forma de H<sup>+</sup>)

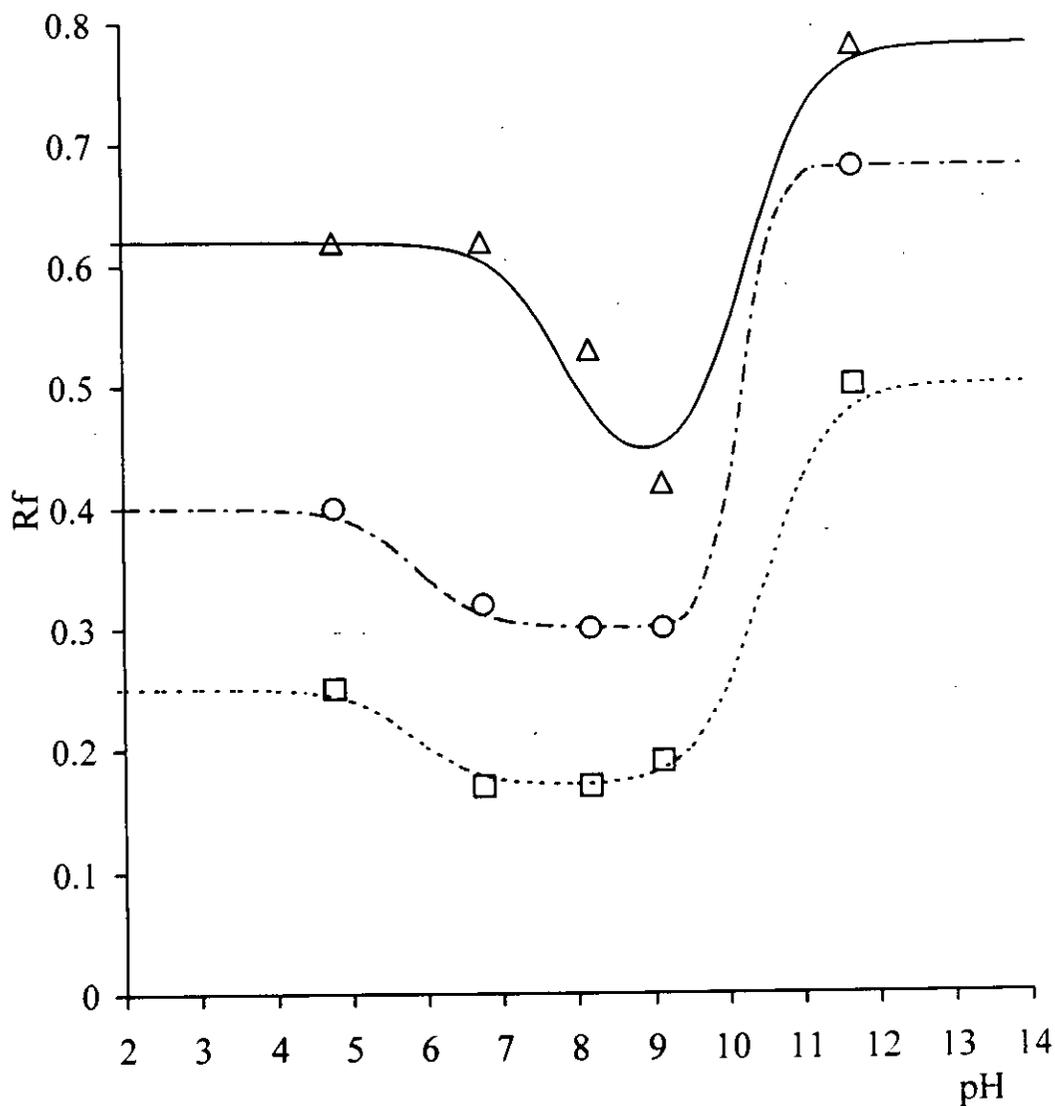
Boldina: pKa's\* = 6.27 ; 9.56 ; 9.79

Isocoridina: pKa's\* = 5.98 ; 9.13

Sinomenina: pKa's\*\* = 7.87 ; 9.85

\* pKa's teóricos calculados por programa ACD

\*\* pKa's del Merck Index (11a. Ed.) para morfina.



- Curva semiempírica para boldina. Ecuación (LVI)
- Datos experimentales de boldina
- ..... Curva semiempírica para isocoridina. Ecuación (XLII)
- Datos experimentales de isocoridina
- Curva semiempírica para sinomenina. Ecuación (XLII)
- Δ Datos experimentales de sinomenina

Gráfica 12. Curvas de Rf vs. pH (fuerza iónica 0.5) en celulosa microcristalina

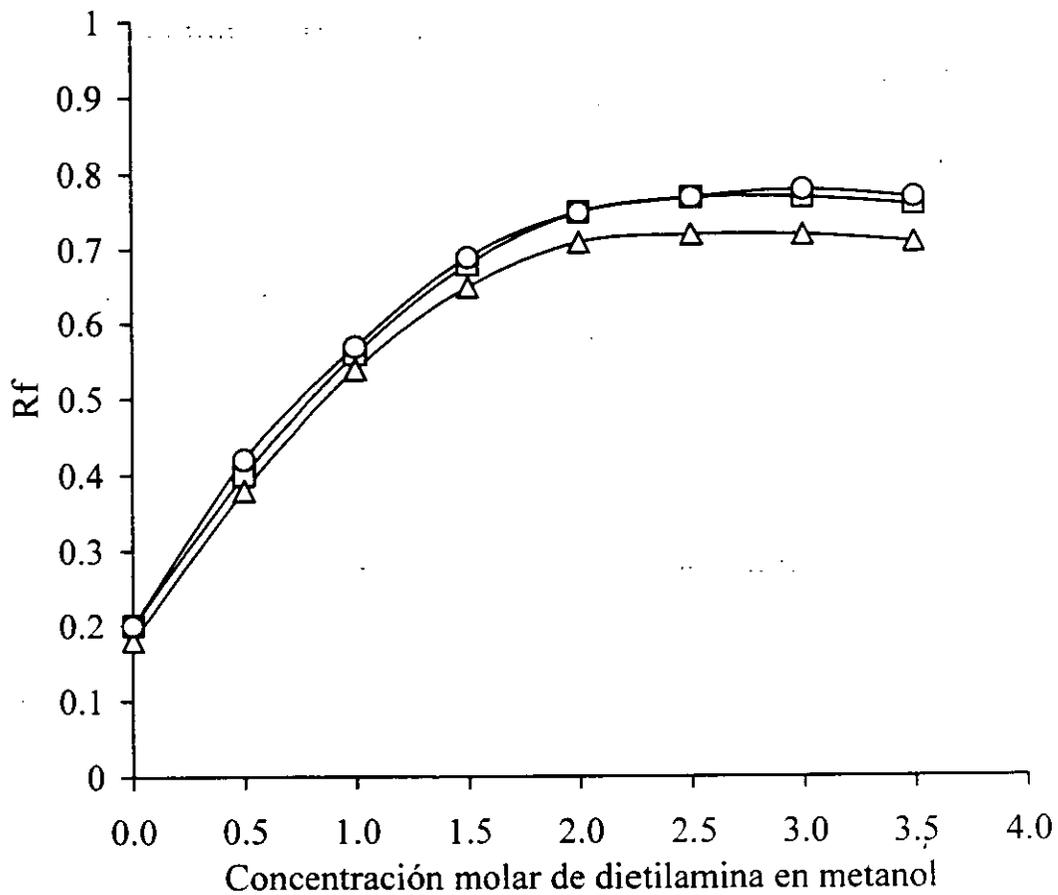
### 5.5 DOWEX 50WX4-400 (CATIÓNICA, FUERTEMENTE ÁCIDA)

Los intercambiadores de iones fuertemente ácidos se caracterizan por una alta capacidad de retención de alcaloides. A fin de comprobar esta propiedad, se realizó una prueba en placa de capa fina de Dowex 50WX4-400 (catiónica, fuertemente ácida, en forma de  $H^+$ ), usando como eluyente ácido acético 5M + ácido tricloroacético 0.1M en agua, que es la mezcla de máxima eficiencia documentada para la extracción de alcaloides presentes en material vegetal (Ciesielski, M.; Popiolek, S.; Kuczynski, J. y Jusiak, L., 1986). Los valores de  $R_f$  obtenidos para boldina, isocoridina y sinomenina no son confiables debido a que se observaron manchas alargadas, sin embargo se determinó un valor aproximado de  $R_f = 0.10$  para los tres alcaloides. A fin de optimizar las condiciones de elución de los alcaloides, se realizaron los siguientes experimentos.

Alcaloides	Concentración de dietilamina en metanol							
	0.0M	0.5M	1.0M	1.5M	2.0M	2.5M	3.0M	3.5M
Boldina	0.20	0.40	0.56	0.68	0.75	0.77	0.77	0.76
Isocoridina	0.18	0.38	0.54	0.65	0.71	0.72	0.72	0.71
Sinomenina	0.20	0.42	0.57	0.69	0.75	0.77	0.78	0.77

Tabla 18. Valores de  $R_f$  en Dowex 50WX4-400 (catiónica, fuertemente ácida, en forma de  $H^+$ ). Ver Gráfica 13

La Gráfica 13 muestra la optimización de la concentración de dietilamina en metanol, para la elución de alcaloides de la resina.



- Datos experimentales de boldina
- △- Datos experimentales de isocoridina
- Datos experimentales de sinomenina

Gráfica 13. Curvas de Rf vs. concentración molar de dietilamina en metanol, en Dowex 50WX4-400 (catiónica, fuertemente ácida, en forma de H<sup>+</sup>)

% (v/v) de alcohol en agua	Metanol	Etanol	Isopropanol	<i>tert</i> -Butanol
0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	0.0	0.0	0.0	0.0
10	0.0	0.0	0.0	0.0
15	0.0	0.0	0.0	0.0
20	0.0	0.0	0.0	0.0
25	0.0	0.0	0.0	0.0
75	-	-	-	0.02
100	0.20	0.15*	0.10*	-

Tabla 19. Valores de Rf de boldina en Dowex 50WX4-400 (catiónica, fuertemente ácida, en forma de H<sup>+</sup>). Ver Gráfica 14

% (v/v) de alcohol en agua	Metanol	Etanol	Isopropanol	<i>tert</i> -Butanol
0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	0.0	0.0	0.0	0.0
10	0.0	0.0	0.0	0.0
15	0.0	0.0	0.0	0.0
20	0.0	0.0	0.0	0.0
25	0.0	0.0	0.0	0.0
75	0.18	-	-	0.05
100	0.25	0.20*	0.15*	-

Tabla 20. Valores de Rf de boldina en Dowex 50WX4-400 (catiónica, fuertemente ácida, en forma de H<sup>+</sup>). Las mezclas eluyentes tienen amoníaco en concentración 1M. Ver Gráfica 15

\*Manchas alargadas. Los valores de Rf se incluyen sólo para mostrar la tendencia de los datos.

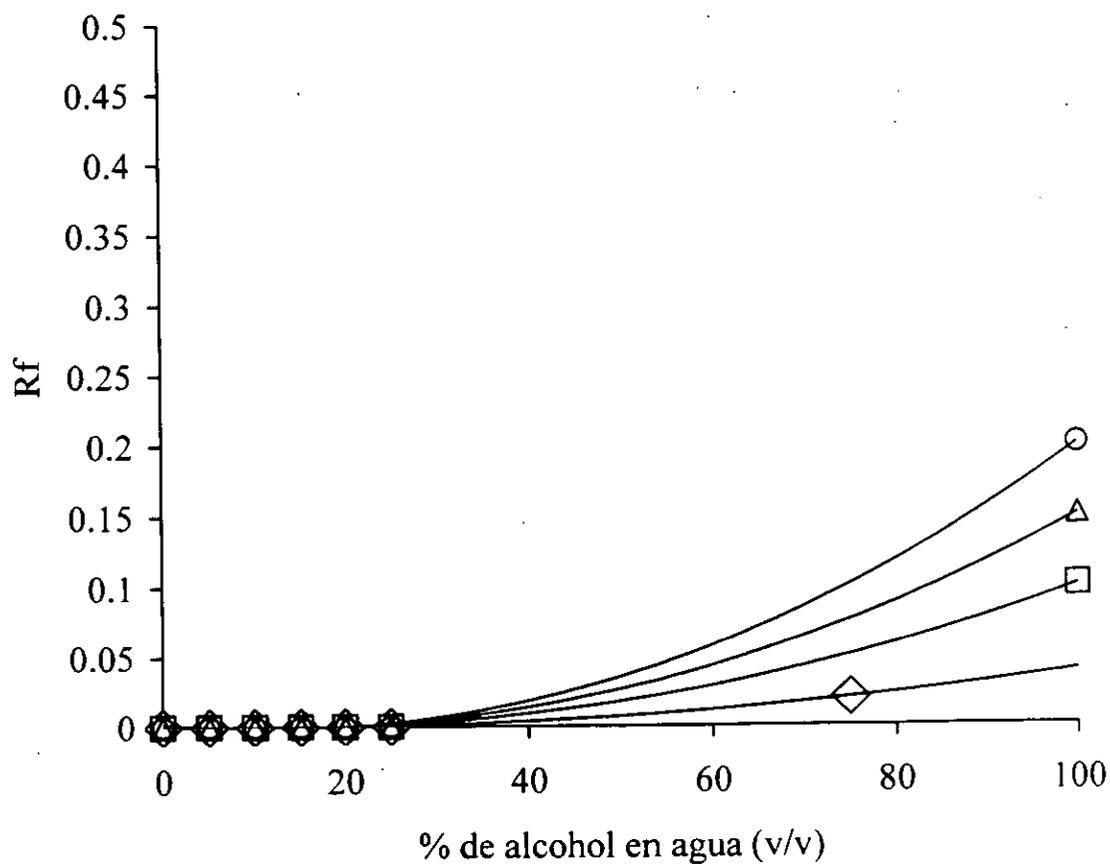
% (v/v) de alcohol en agua	Metanol	Etanol	Isopropanol	<i>tert</i> -Butanol
0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	0.0	0.0	0.0	0.0
10	0.0	0.0	0.0	0.0
15	0.0	0.0	0.0	0.0
20	0.0	0.0	0.0	0.0
75	0.30	-	-	0.03
100	0.56	0.46*	0.25*	-

Tabla 21. Valores de Rf de boldina en Dowex 50WX4-400 (catiónica, fuertemente ácida, en forma de H<sup>+</sup>). Las mezclas eluyentes tienen dietilamina en concentración 1M.

Ver Gráfica 16

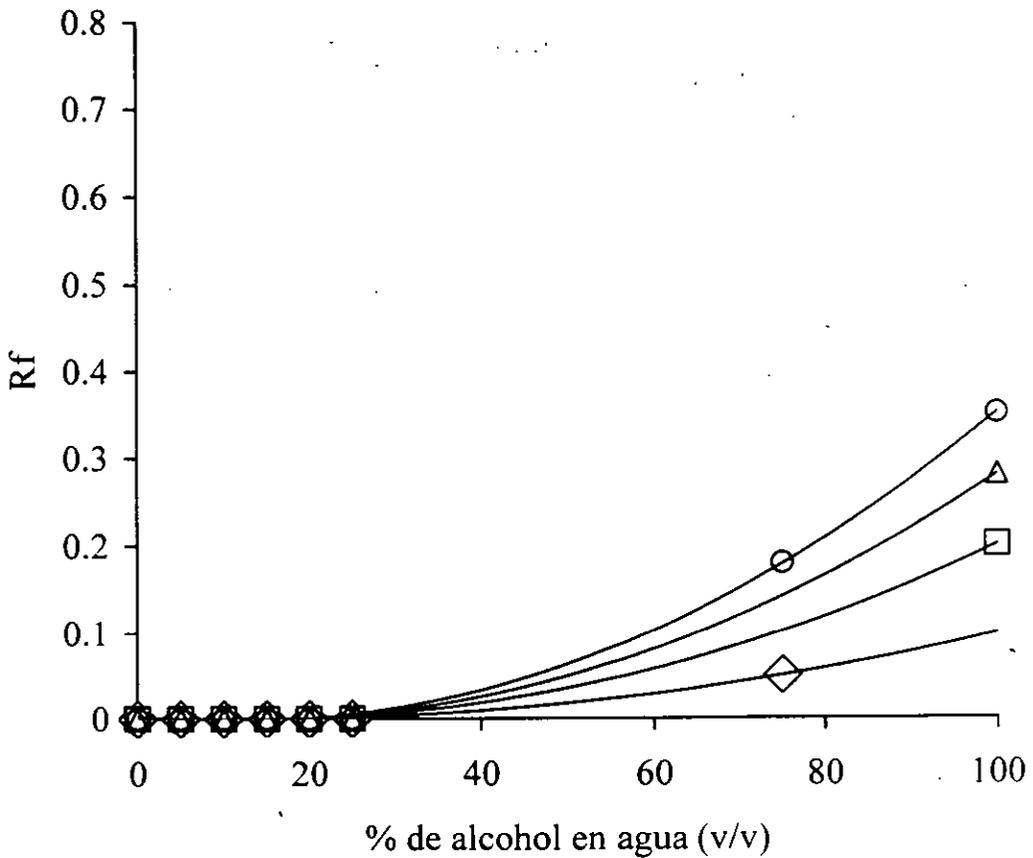
Al comparar las Gráficas 14 y 15, se observa que las diferencias entre ambas son mínimas, mientras que la Gráfica 16 difiere significativamente de las dos anteriores. El poder eluyente de los disolventes no se incrementa apreciablemente por la presencia de amoniacó en concentración 1M (Gráfica 15), en comparación con las mezclas que no contienen amoniacó (Gráfica 14). En contraste, se observa un incremento considerable en el poder eluyente de los disolventes, respecto a los dos casos anteriores, debido a la presencia de dietilamina en concentración 1M (Gráfica 16).

\*Manchas alargadas. Los valores de Rf se incluyen sólo para mostrar la tendencia de los datos.



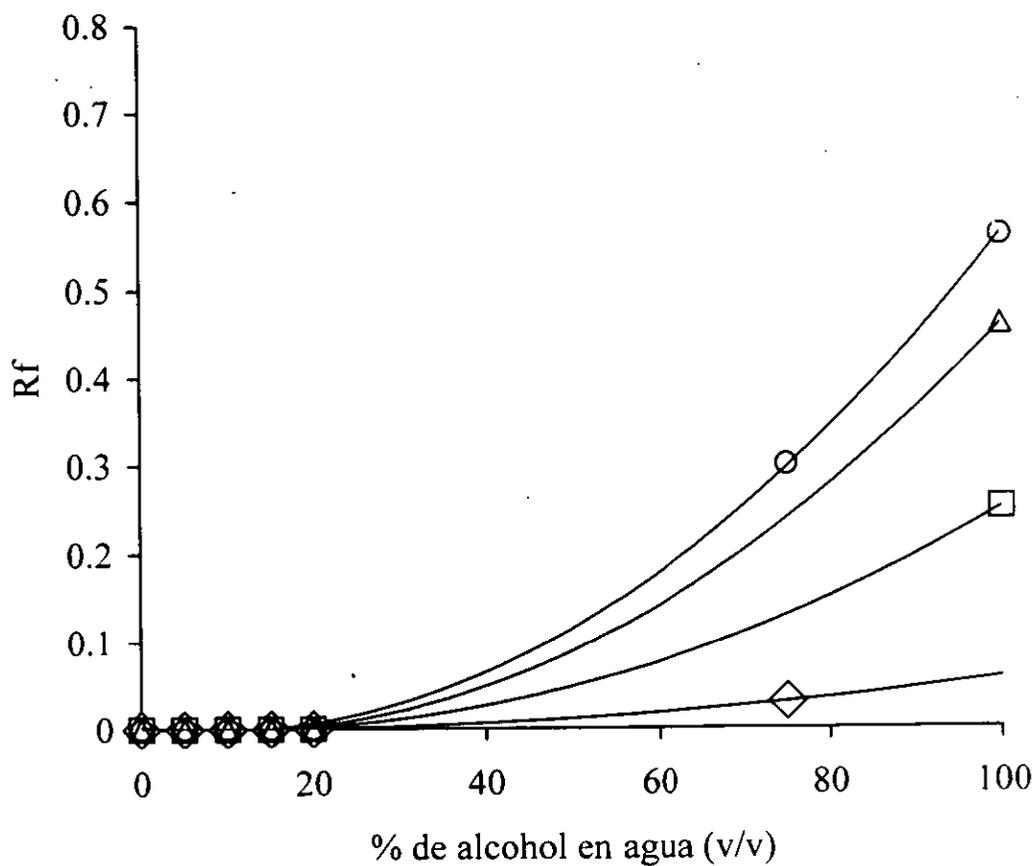
- ◇ Datos experimentales con tert-butanol
- Datos experimentales con isopropanol
- △ Datos experimentales con etanol
- Datos experimentales con metanol

Gráfica 14. Curvas de Rf vs. % de alcohol en agua (v/v) para boldina, en Dowex 50WX4-400 (catiónica, fuertemente ácida, en forma de H+)



- ◇ Datos experimentales con tert-butanol
- Datos experimentales con isopropanol
- △ Datos experimentales con etanol
- Datos experimentales con metanol

Gráfica 15. Curvas de Rf vs. % de alcohol en agua para boldina, en Dowex 50WX4-400 (catiónica, fuertemente ácida, en forma de H<sup>+</sup>). Las mezclas eluyentes tienen amoniaco en concentración 1M



- ◇ Datos experimentales con tert-butanol
- Datos experimentales con isopropanol
- △ Datos experimentales con etanol
- Datos experimentales con metanol

Gráfica 16. Curvas de Rf vs. % de alcohol en agua (v/v) para boldina, en Dowex 50WX4-400 (catiónica, fuertemente ácida, en forma de H<sup>+</sup>). Las mezclas eluyentes tienen dietilamina en concentración 1M

## **5.6 ELECCIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVACIÓN PARA BOLDINA.**

### **Obtención de derivados trifluoroacetilados con N-metil, bis-trifluoroacetamida (MBTFA).**

A 0.1 mg aprox. de boldina contenida en un vial de reacción se agregó 100  $\mu$ l de MBTFA y se hizo reaccionar a 80°C el tiempo necesario para trifluoroacetilación cuantitativa (1 h aprox.). La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se procedió a la inyección de 2  $\mu$ l en el cromatógrafo de gases.

### **Obtención de derivados trifluoroacetilados con anhídrido trifluoroacético (TFAA).**

A 0.1 mg aprox. de boldina contenida en un vial de reacción se agregó 100  $\mu$ l de TFAA y se hizo reaccionar a 60°C el tiempo necesario para reacción cuantitativa (30 min aprox.). La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se evaporó el exceso de TFAA bajo corriente de nitrógeno; el derivado se reconstituyó con 50  $\mu$ l de 1,2-dicloroetano y se agitó en vortex durante 10 seg. Se inyectaron 2  $\mu$ l en el cromatógrafo de gases. El tiempo transcurrido entre la reconstitución del derivado y la inyección en el equipo no excedió de un minuto.

## **Derivados trifluoroacetilados de boldina obtenidos con MBTFA vs. los obtenidos con TFAA.**

Con el objeto de conocer la estabilidad del derivado trifluoroacetilado de boldina, obtenido con MBTFA, se hicieron 5 inyecciones sucesivas de 2  $\mu$ l del derivado, bajo idénticas condiciones cromatográficas (Columna Ultra 1-metilsilicona, 25 m, 0.2 mm, 0.33  $\mu$ m. Temperatura inyector, 250°C; temperatura detector, 280°C; temperatura columna, 250°C), observándose una disminución muy significativa del área del pico en el cromatograma, entre una inyección y la siguiente.

Se prepararon tres derivados de boldina con anhídrido trifluoroacético. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que en el caso de los derivados con MBTFA. Las áreas de los tres picos correspondientes a los tres derivados preparados con TFAA resultaron muy comparables entre sí.

La inestabilidad del derivado trifluoroacetilado de boldina obtenido con MBTFA, en contraste con el preparado con TFAA, puede explicarse por las diferencias entre los subproductos de las dos reacciones.

La reacción con MBTFA tiene como principal subproducto a la N-metil trifluoroacetamida, siendo el derivado trifluoroacetilado más susceptible de sufrir oxidación, bajo las condiciones básicas de este medio. Por el contrario, la reacción con TFAA tiene como subproducto al ácido trifluoroacético, por lo que el derivado trifluoroacetilado de boldina no se oxida, en virtud de las condiciones ácidas del medio.

## **5.7 EXTRACCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA DE HOJA DE BOLDO**

### **Extracción con disolvente.**

Sobre una muestra de 200 mg aprox. de hoja de boldo, seca, finamente molida, contenida en un cartucho de polipropileno tapado en su extremo inferior, (colocándola sobre un prefiltro de celulosa microcristalina, que a su vez se colocó sobre un filtro Whatman No. 3), se vertió 3 ml de mezcla extractante de ácido acético 5M + ácido tricloroacético 0.1M en agua, y se extrajo mediante ultrasonido, durante tres períodos de 5 min c/u.

### **Filtración del extracto.**

El cartucho de polipropileno se destapó de su extremo inferior y con ayuda de vacío, se recibió el extracto en una probeta de polipropileno de 10 ml, lavando el material extraído con alícuotas de 0.4 ml de la mezcla extractante mencionada en la primera etapa, hasta completar un volumen total de extracto de 5 ml.

### **Extracción en fase sólida.**

Sobre el extracto se vertió la resina Dowex 50WX4-400\*, poniéndolos en contacto con agitación durante 5 períodos de 5 min c/u. La resina se transfirió cuantitativamente a un cartucho de polipropileno, que contenía un

mililitro de resina soportada sobre una membrana de Nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

### **Lavado de la resina.**

La resina se lavó con 5 alícuotas\* de mezcla (ácido acético 5M en agua)/etanol 9:1. Posteriormente se lavó con 5 alícuotas\* de agua hasta que el eluyente tuviera pH neutro.

### **Elución de alcaloides.**

A través de la resina se hicieron pasar 5 alícuotas\* de dietilamina 2.5M en metanol hasta elución completa de los alcaloides.

### **Evaporación del disolvente y reacción de derivación.**

El eluato conteniendo a los alcaloides se concentró a un volumen de 0.5 ml aproximadamente calentando a 60°C, bajo corriente de nitrógeno, y se transfirió a un vial de reacción, donde se llevó a sequedad bajo las mismas condiciones. Se agregó 200  $\mu\text{l}$  de anhídrido trifluoroacético y se hizo reaccionar a 60°C el tiempo necesario para derivación cuantitativa (30 min aprox.).

\* La cantidad de resina empleada, así como el volumen de las alícuotas, se especifican en las secciones 5.8 y 5.9 .

## Reconstitución del derivado e inyección en el cromatógrafo de gases.

La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se evaporó el exceso de TFAA bajo corriente de nitrógeno, el derivado se reconstituyó con 100  $\mu$ l de 1,2-dicloroetano y se agitó en vortex durante 10 seg. Se inyectaron 2  $\mu$ l en el cromatógrafo de gases. El tiempo transcurrido entre la reconstitución del derivado y la inyección en el equipo no excedió de un minuto.

### Condiciones cromatográficas

Cromatógrafo de gases	Varian 3400 Cx
Columna	DB-5
Longitud	30 m
Diámetro interno	0.32 mm
Espesor de película	0.25 $\mu$ m
Temperatura del inyector	250°C
Temperatura del detector (FID)	280°C
Temperatura inicial	150°C
Temperatura final	230°C
Rampa	10°C/min
Velocidad lineal media del gas acarreador	28 cm/seg

Tabla 22. Condiciones cromatográficas

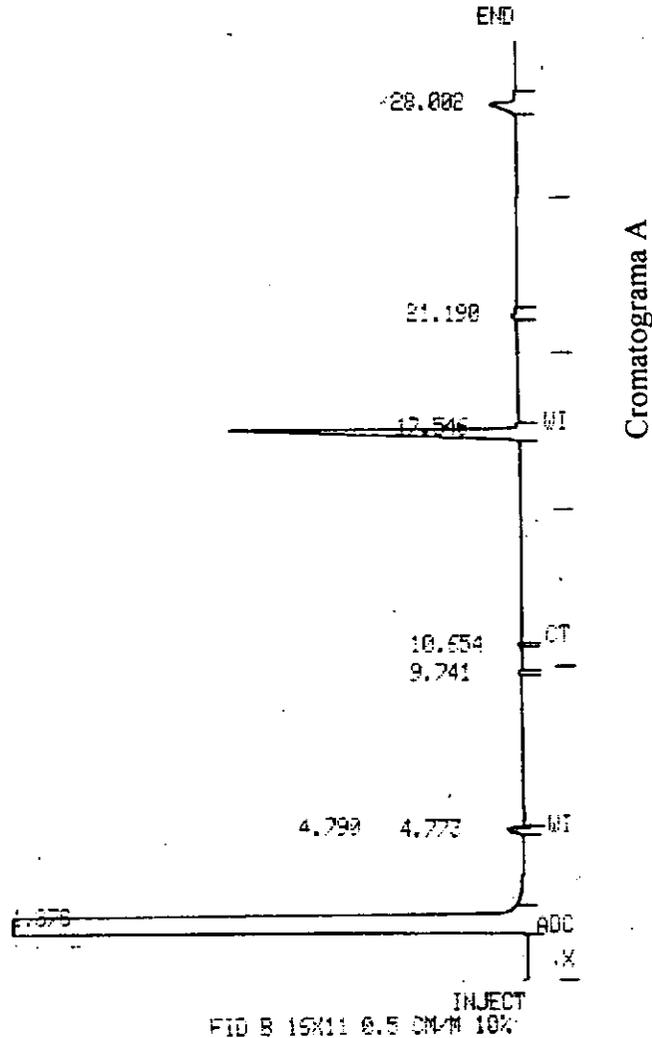
Bajo estas condiciones cromatográficas, el tiempo de retención del derivado trifluoroacetilado de boldina es 17.546 min (Cromatograma A), que tentativamente correspondería al pico con tiempo de retención 17.510 min del cromatograma B. Cabe señalar que en todos los casos se efectuaron blancos de señal y de disolvente.

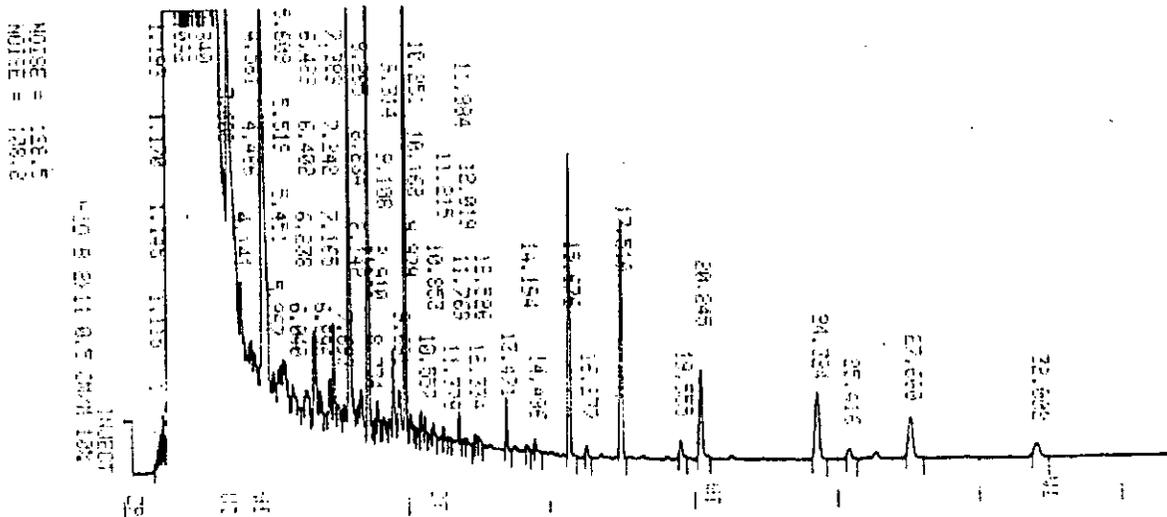
VARIAN 3400 GAS CHROMATOGRAPH  
 METHOD 1 RUN 1233  
 TIME 11:20 21 DEC 96  
 SAMPLE:  
 RUN MODE: ANALYSIS  
 CALCULATION TYPE: PERCENT

PEAK NO.	PEAK NAME	TIME MIN	RESULT	AREA COUNTS
1		1.878	99.5564	254141471
2		4.773	0.0045	25341
3		4.790	0.0045	11529
4		17.546	0.3490	990566
5		21.190	0.0039	10021
6		28.002	0.0341	67034
TOTALS:			100.0000	255165965

DETECTED PEAKS: 8 REJECTED PEAKS: 2  
 AMOUNT STANDARD: 1.0000000  
 MULTIPLIER: 1.0000000 DIVISOR: 1.0000000  
 NOISE: 169.1 OFFSET: -13

ERROR LOG:  
 ADC OVERRANGE  
 ANNOTATION OMITTED





Cromatograma B

### 5.8 CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.

A partir de una solución de boldina cuya concentración fue de 0.2 mg/ml, en mezcla de ácido acético 5M y ácido tricloroacético 0.1M en agua, como disolvente, se prepararon las siguientes seis soluciones estándares (cada una de ellas por duplicado, de modo que en total se prepararon doce soluciones), usando como disolvente la misma mezcla que en la solución inicial:

- 1) 0.02 mg de boldina en 5 ml de disolvente.
- 2) 0.04 mg de boldina en 5 ml de disolvente.
- 3) 0.06 mg de boldina en 5 ml de disolvente.
- 4) 0.08 mg de boldina en 5 ml de disolvente.
- 5) 0.10 mg de boldina en 5 ml de disolvente.
- 6) 0.12 mg de boldina en 5 ml de disolvente.

Las seis soluciones de boldina se prepararon por duplicado, de modo que en total se tuvieron doce soluciones, cada una de las cuales se puso en contacto con 1ml de resina Dowex 50WX4-400, contenida en una probeta de polipropileno de 10 ml, bajo agitación durante 5 periodos de 5 min c/u. La resina se transfirió cuantitativamente a un cartucho de polipropileno, que contenía un mililitro de resina soportada sobre una membrana de Nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. En cada caso, la resina se lavó con 5 alícuotas de 1 ml c/u de mezcla (ácido acético 5M en agua) / etanol 9:1. Posteriormente se lavó con 5 alícuotas de 1ml c/u de agua. Para eluir la boldina se hicieron pasar a través de la resina 5 alícuotas de 1 ml de dietilamina 2.5M en metanol. El eluato conteniendo la boldina se concentró a un volumen de 0.5 ml aproximadamente calentando a 60°C, bajo corriente de nitrógeno, y se transfirió a un vial de reacción, donde se llevó a sequedad bajo las mismas condiciones. La reacción de derivación se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.6 bajo el subtítulo "Obtención de derivados trifluoroacetilados con anhídrido trifluoroacético (TFAA)". Las condiciones cromatográficas para la inyección de los estándares en el cromatógrafo de gases son las mismas que para las muestras (sección 5.7).

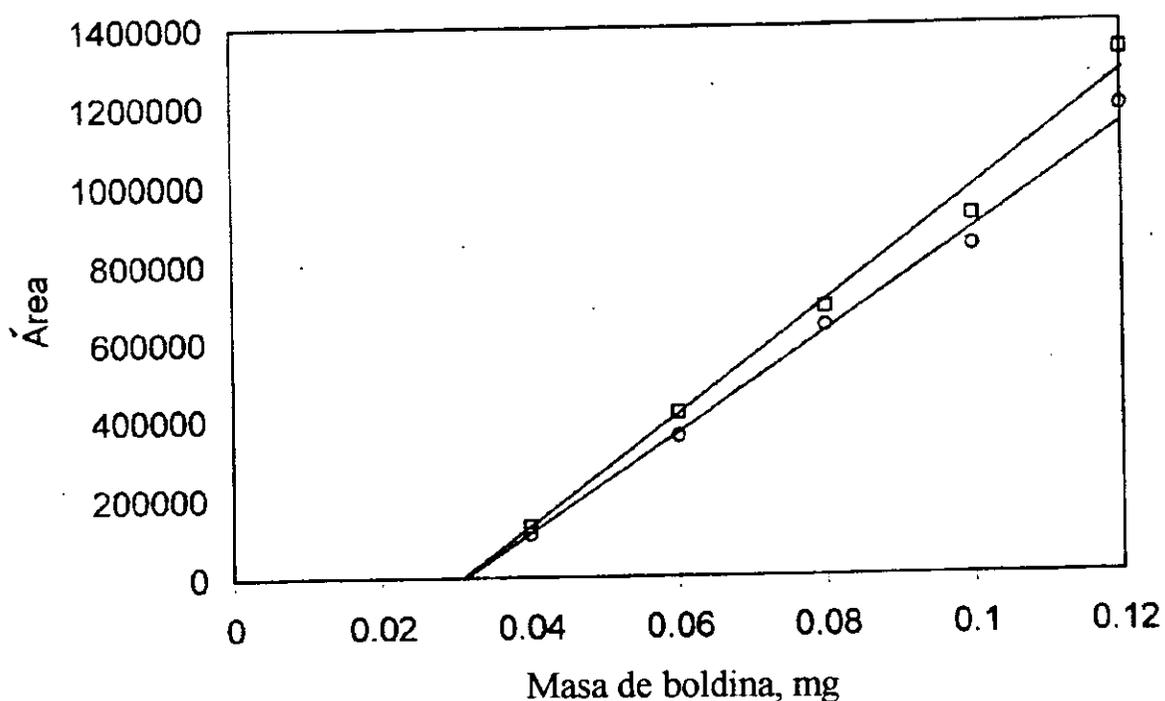
Masa de boldina, mg	Area del pico 1, A1	Promedio	Area del pico 2, A2	Suma A1 + A2	Promedio
0.02	No cuantificable	-	No cuantificable	-	-
0.04	107,415	109,568.5	20,726	128,141	129,241.0
	111,722		18,619	130,341	
0.06	338,601	356,434.5	63,652	402,253	415,208.5
	374,268		53,896	428,164	
0.08	666,056	636,574.0	77,433	743,489	707,934.0
	607,092		65,287	672,379	
0.10	890,566	837,870.0	87,034	977,600	914,030.5
	785,174		74,576	850,461	
0.12	1'165,502	1'184,432.5	143,000	1'308,502	1'328,376.5
	1'203,363		144,888	1'348,251	

Tabla 23. Resultados obtenidos para la construcción de la curva de calibración

## Curvas de calibración.

En la curva de calibración 1 se grafica el área del pico 1 vs. la masa de boldina.

En la curva de calibración 2 se grafica la suma de las áreas de los picos 1 y 2 vs. la masa de boldina.



○ Curva de Calibración 1 □ Curva de Calibración 2

	Intersección con el eje de las abscisas, mg	Pendiente	Coefficiente de correlación, r
Curva de calibración 1	0.0325	$1.32 \times 10^7$	0.9972
Curva de calibración 2	0.0317	$1.45 \times 10^7$	0.9951

A fin de conocer el porcentaje de recuperación del método de extracción en fase sólida, se preparó una solución de boldina de concentración 0.2 mg / ml en etanol, de donde se transfirieron 300 µl a un vial de reacción. Se evaporó el etanol bajo corriente de nitrógeno y se procedió a efectuar la reacción de derivación mediante la técnica descrita en la sección 5.6 bajo el subtítulo "Obtención de derivados trifluoroacetilados con anhídrido trifluoroacético (TFAA)". A continuación se muestran los resultados comparativos de la determinación por duplicado:

Determinación	A1	Promedio	A2	A1 + A2	Promedio
sin extracción en fase sólida	534,902	524,681.5	56,016	590,918	588,316
	514,461		71,253	585,714	
con extracción en fase sólida (ref. Tabla 23*)	338,601	356,434.5	63,652	402,253	415,208.5
	374,268		53,896	428,164	

Tabla 24. Resultados comparativos para el cálculo del porcentaje de recuperación.

Considerando sólo el área del pico 1 (A1) se tiene :

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{\text{Promedio de A1 (con extracción en fase sólida)}}{\text{Promedio de A1 ( sin extracción en fase sólida)}} \times 100$$

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{356,434.5}{524,681.5} \times 100 = 67.93 \%$$

\* Datos correspondientes a 0.06 mg de boldina.

Considerando la suma de las áreas de los picos 1 y 2 (A1 + A2) se tiene :

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{\text{Promedio de (A1 + A2) (con extracción en fase sólida)}}{\text{Promedio de (A1 + A2) (sin extracción en fase sólida)}} \times 100$$

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{415,208.5}{588,316} \times 100 = 70.58\%$$

### **5.9 PRUEBAS EN UNA MUESTRA DE HOJA DE BOLDO COMERCIAL.**

Se prepararon 3 extractos a partir de una muestra de hoja de boldo y se trataron de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.7, variando en cada caso la cantidad de resina (1 ml, 3 ml y 5 ml), y por lo tanto, multiplicando por un factor de 1, 3 ó 5, respectivamente, los volúmenes de las alícuotas de lavado y elución utilizados en la construcción de la curva de calibración (sección 5.8). Asimismo, a cada uno de los extractos obtenidos como primera etapa del procedimiento descrito en la sección 5.7, se agregó 500 µl de solución de boldina de concentración 0.2 mg/ml, a fin de conocer el comportamiento del alcaloide en la matriz estudiada.

Todas las pruebas realizadas dieron como resultado el mismo perfil cromatográfico, mostrado en el Cromatograma B. La boldina adicionada al extracto de boldo no fue recuperada por el método de manera significativa, probablemente debido a la saturación de los sitios activos del intercambiador de iones por otros componentes del extracto, y al bajo porcentaje de recuperación del método de extracción en fase sólida.

## CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

En el presente Informe de Trabajo se pudo reconocer al proceso de intercambio iónico, como una alternativa para la purificación de alcaloides, la cual puede conducir al establecimiento de metodologías químico analíticas, aplicables al estudio de los constituyentes de materiales vegetales.

Asimismo, se hizo evidente la necesidad de una mejor comprensión de los mecanismos de reparto entre una fase líquida y una sólida, con el objeto de hacer una elección apropiada de la técnica de extracción en fase sólida a emplear.

La complejidad de la matriz elegida, hace que el proceso de purificación mediante una sola etapa de extracción en fase sólida de intercambiador de iones sea particularmente difícil, considerando además que en una resina se presentan mecanismos combinados de absorción e intercambio iónico.

Por lo anterior, se sugiere usar una técnica de extracción líquido líquido o de extracción en fase sólida, en adición a la de intercambio iónico, a fin de lograr una efectiva purificación de la fracción de alcaloides presentes en material vegetal.

Durante el desarrollo de la metodología analítica, sería recomendable identificar, en la medida de lo posible, los compuestos químicos o grupos de éstos, en los cromatogramas obtenidos con ayuda de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ACS. "Reagent Chemicals. American Chemical Society Specifications". 8<sup>th</sup> edition. Washington, D.C., 1993, pp. 25, 77 y 81.
2. Asencio, M.; Cassels, B. K.; Speisky, H.; Valenzuela, A. *Fitoterapia*. 1993, **64**, 455-8.
3. Bate-Smith, E. C.; Westall, R.G. *Biochim. Biophys. Acta* 1950, **4**, 427.
4. Bauman, W. C.; Eichorn, J. J. *Am. Chem. Soc.* 1947, **69**, 2380.
5. Betts, T.J. *J. Chromatogr.* 1990, **511**, 373-8.
6. Bhat, C. V.; Kamath, B. R.; Shah, R.S.; Kanhere, S.S.; Bafna, S. L. *J. Pharm. Sci.* 1968, **57**(7), 1195-8.
7. Brochmann-Hanssen, E.; Baerheim Svendsen, A. *J. Pharm. Sci.* 1963, **52**(12), 1134-6.
8. Calmon, C.; Kressman, T. R. E. "Ion Exchangers in Organic and Biochemistry". New York, 1957.
9. Ciesielski, M.; Popiolek, S.; Kuczynski, J.; Jusiak, L. Pol. PL 136,380; 15 Nov 1986. (CA 112:240480f).
10. Di Renzo, N. *Boll. Chim. Farm.* 1972, **111**(7), 450-3. (CA 77:143829c)
11. "Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos". Sexta Edición. México, 1994, pp 69-71.
12. Dillehay, T. D. *Scientific American*. 1984, **251**(4), 100-9.
13. Gautier, J. A.; Renault, J.; Rabiant, J. *Ann. Pharm. Franç.* 1959, **17**, 401-8. (CA 54:5016h).
14. Geiss, F. "Fundamentals of Thin Layer Chromatography". Germany, 1987.
15. Golubic, C. *J. Am. Chem. Soc.* 1950, **72**, 4145.

16. Grant, E. W.; Hilty, W. W. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1953, **42**(3), 150-2.
17. Green, J. F.; Jham, G. N.; Neumeyer, J. L.; Vouros, P. *J. Pharm. Sci.* 1980, **69**(8), 936-942.
18. Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A. *J. Nat. Prod.* 1975, **38**, 275-338.
19. Idem. 1979, **42**, 325-60.
20. Idem. 1983, **46**, 761-835.
21. Idem. 1988, **51**, 389-474.
22. Helfferich, F. "Ion Exchange". USA., 1962, pp 72-3.
23. Hughes, D. W.; Genest, K.; Skakum, W. *J. Pharm. Sci.* 1968, **57**, 1619-20.
24. Lederer, M.; Kertes, S. *Anal. Chim. Acta.* 1956, **15**, 226-231.
25. Lepri, L.; Desideri, P. G.; Landini, M.; Tanturli, G. *J. Chromatogr.* 1975, **109**, 365-376.
26. Lepri, L.; Desideri, P. G.; Lepori, M. *J. Chromatogr.* 1976, **116**, 131-140.
27. Malcangio, A. M. *Il Farmaco, Ed. sci.* 1955, **10**, 263-7. (CA **49**:12779f).
28. Martin, A. J. P.; Syngé, R. L. M. *Biochem. J.* 1941, **35**, 1358.
29. Moffat, A. C. *J. Chromatogr.* 1975, **110**, 341.
30. Molyneux, R. J. *Phytochem. Anal.* 1993, **4**, 193-204.
31. Pietta, P.; Mauri, P.; Manera, E.; Ceva, P. *J. Chromatogr.* 1988, **457**, 442-5.
32. Quercia, V.; Bucci, B.; Iela, G.; Terracciano, M.; Pierini, N. *Boll. Chim. Farm.* 1978, **117**(9), 545-8. (CA **90**:76631k).
33. Quercia, V.; Cavazzuti, G.; Merli, F. *Fitoterapia.* 1970, **41**(1), 34-9.
34. Rügger, A. *Helv. Chim. Acta.* 1959, **48**, 754-62.
35. Saunders, L.; Srivastava, R. *J. Chem. Soc.* 1950, 2915-9.
36. Simon, G.P., "Ion Exchange Training Manual". New York, 1991,

pp. 10-46.

37. Sobiczewska, M.; Borkowski, B. *Acta Pol. Pharm.* 1972, **29**(3), 271-5.  
(CA 77:137008t)
38. Speisky, H.; Cassels, B.K. *Pharmacol. Res.* 1994, **29**(1), 1-12.
39. Speisky, H.; Cassels, B.K.; Nieto, S.; Valenzuela, A.; Nuñez-Vergara L. J. *J. Chromatogr.* 1993, **612**, 315-319.
40. Stadler, R.; Kutchan, T. M.; Loeffler, S.; Nagakura, N.; Cassels, B. K.; Zenk, M. H. *Tetrahedron Lett.* 1987, **28**, 1251-4.
41. Stadler, R.; Kutchan, T. M.; Zenk, M. H. *Phytochemistry.* 1989, **28**, 1083-6.
42. The Dow Chemical Company. "Dowex Resins". Boletín Técnico. USA, 1971, pp 9-11.
43. The Dow Chemical Company. "Dowex Fine Mesh Spherical Ion Exchange Resins for Fine Chemical and Pharmaceutical Column Separations". Boletín Técnico. USA., 1993, pp 2,3.
44. Urzúa, A.; Acuña, P. *Fitoterapia.* 1983, **54**, 175-7.
45. Urzúa, A.; Torres, R. *J. Nat. Prod.* 1984, **47**, 525-6.
46. Van Hulle, C.; Braeckman, P.; Van Severen, R. *J. Pharm. Belg.* 1983, **38**(2), 97-100.
47. Wheaton, R. M.; Bauman, W. C. *Ind. Eng. Chem.* 1947, **45**, 228.

## APÉNDICE 1. LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$A_m$	Área de la sección transversal de la fase móvil
$A_s$	Área de la sección transversal de la fase estacionaria
$A_s/A_m$	Razón de fases
$c_m$	Concentración de sustancia en la fase móvil
$c_s$	Concentración de sustancia en la fase estacionaria
cte	Constante
$K$	Coefficiente de distribución = $c_s/c_m$
$K_{eq}$	Constante de equilibrio
$K_a$	Constante de disociación de un ácido
$K_b$	Constante de disociación de una base
$k'$	Número de distribución o factor de capacidad
$k'$	Cantidad de sustancia en la fase estacionaria / cantidad de sustancia en la fase móvil al equilibrio
$k'$	$K(A_s/A_m) = (1-R_f)/R_f$
$k^*r$	$1/k' = (A_m/A_s)/K$
$[M]$	Concentración de M en solución
$[M]_R$	Concentración de M en resina
$[M]_{Tot}$	Concentración total de M en solución
$m_m$	Masa de sustancia en la fase móvil
$m_s$	Masa de sustancia en la fase estacionaria
$n_m$	Moles de sustancia en la fase móvil
$n_s$	Moles de sustancia en la fase estacionaria

pH	$-\log [H^+]$
pOH	$-\log [HO^-] = 14 - \text{pH}$
$R_f$	$(R_f)_{\text{obs}}$
$(R_f)_{\text{obs}}$	$R_f$ observado
$(R_f)_{\text{obs}}$	$\frac{\text{distancia recorrida por la mancha, } z_x}{\text{distancia del frente} - \text{distancia de aplicación, } z_f - z_o}$
$R'_f$	$R_f$ termodinámico
$R'_f$	probabilidad promedio de residencia de una molécula de sustancia en la fase móvil, o fracción del tiempo de residencia de una molécula de sustancia en la fase móvil, o fracción de moléculas de sustancia en la fase móvil.
$R'_f$	$t_m/(t_m + t_s) = n_m/(n_m + n_s) = m_m/(m_m + m_s)$
$R_m$	$\log k' = \log[(K(A_s/A_m))] = \log [(1 - R_f)/R_f]$
$V_m$	Volumen de la fase móvil
$V_s$	Volumen de la fase estacionaria
$V_s/V_m$	Razón de fases = $A_s/A_m$
$z_f$	Distancia del frente del disolvente en una placa de capa fina
$z_o$	Distancia de aplicación de muestra en una placa de capa fina
$z_x$	Distancia recorrida por la mancha en una placa de capa fina

## APÉNDICE 2. PREPARACIÓN DE ELUYENTES

pH experimental	Fuerza iónica	Eluyentes
0.62	-	Ácido acético 1M en agua, ajustado con HCl
1.13	-	Ácido acético 1M en agua, ajustado con HCl
1.39	-	Ácido acético 1M en agua, ajustado con HCl
1.98	-	Ácido acético 1M en agua, ajustado con HCl
2.37	-	Ácido acético 1M en agua
4.78	0.5	Ácido acético 0.5M + acetato de sodio 0.5M en agua
6.76	0.5	Acetato de amonio 0.5M
8.18	0.5	Acetato de amonio 0.5M en agua, ajustado con amoniaco
9.12	0.5	Amoniaco 0.5M + acetato de amonio 0.5M en agua
11.68	0.5	Amoniaco 1M + acetato de sodio 0.5M en agua
11.68	-	Amoniaco 1M en agua
12.05	-	Amoniaco 1M en agua, ajustado con NaOH
12.48	-	Amoniaco 1M en agua, ajustado con NaOH
12.85	-	Amoniaco 1M en agua, ajustado con NaOH
13.30	-	Amoniaco 1M en agua, ajustado con NaOH

### APÉNDICE 3. CUADRO METODOLÓGICO

