

Tesis
H.C.
Q. Anál
R 64

DETERMINACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS
DE CASIMIROA EDULIS POR CROMATOGRAFIA
LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA.*

MA. DE LA LUZ ROMERO MADRID

1 9 8 4

* J. Chromatogr. 281, 245 (1983) y 287, 209 (1984)

M-56693



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Sustentante:

MA. DE LA LUZ ROMERO MADRID

Asesor del Tema:

Dr. RAUL ENRIQUEZ H.

Jurado Asignado:

Presidente

Dr. ARMANDO MANJARREZ

1er vocal

M. EN C. SANTIAGO CAPELLA

Secretario

DR. RAUL ENRIQUEZ H.

Suplente

DRA. MA. ANTONIA DOSAL

Suplente

M. EN C. JOSEFINA DE GYVES

Sitio donde se desarrolló el tema:

Unidad de Investigación Biomédica en Medicina Tradicional
y Herbolaria del IMSS.

MAESTRÍA EN QUÍMICA ANALÍTICA.

" theory guides, experiment decides "

KOLTHOFF

Agradezco al Dr. Raúl Enríquez la dirección de este trabajo, a la M. en C. Abigail Aguilar por la identificación del material vegetal y a mis compañeros Marco Antonio Chávez Y Laura Escobar por su colaboración a lo largo del desarrollo de este trabajo.

CONTENIDO

Lista de figuras y tablas	i
I. Introducción	1
II. Antecedentes	
2.1 Estudios fitoquímicos y farmacológicos de <u>Casimiroa edulis</u>	4
2.2 Información etnobotánica	7
III. Cromatografía líquida de alta eficiencia	8
IV. Experimental	
4.1 Material y equipo	17
4.2 Preparación de extractos	18
4.3 Preparación de muestras para CLAE	19
4.4 Ensayos para el establecimiento de las condiciones para efectuar la cuanti- ficación de los metabolitos	19
4.5 Descripción de los métodos cromatografi- cos para la cuantificación	23
4.5.1 Determinación de dimetilhistamina, metilhistamina y casimiroedina	24
4.5.2 Determinación de histamina	24
4.5.3 Determinación de furocumarinas	25
4.5.4 Determinación de rutina	26
V. Resultados y discusión	27
VI. Conclusiones	34
VII. Bibliografía	45
Apéndice	50

Lista de tablas y figuras

Figuras

Fig. 1 Estructuras de compuestos imidazólicos de <u>Casmiroa edulis</u>	35
Fig. 2 Estructuras de las furocumarinas determinadas en este trabajo	36
Fig. 3 Cromatograma del extracto derivado de las semillas de zapote blanco	37
Fig. 4 Cromatograma de una mezcla artificial de histidina, histamina, metilhistamina, dimetilhistamina y casimiroedina separadas por cromatografía de pares de iones	38
Fig. 5 Perfil cromatográfico del extracto metanólico de la semilla de zapote blanco	39
Fig. 6 Curvas de calibración de metilhistamina, dimetilhistamina y casimiroedina	40
Fig. 7 Perfil cromatográfico del extracto hexánico de las semillas de zapote blanco	41
Fig. 8 Curvas de calibración de las furocumarinas	42

Tablas

Tabla I Contenido de metabolitos en extractos metanólicos y acuosos de semilla y hoja de zapote blanco	43
Tabla II Contenido de furocumarinas en extracto hexánico de semilla de zapote blanco	44

-I INTRODUCCION

Casimiroa edulis Llave et Lex (zapote blanco) es una de las muchas plantas medicinales con que cuenta la herbolaria mexicana. Su efecto farmacológico conocido ancestralmente (hoy establecido como efecto hipotensor) fue desde entonces plasmado en el nombre náhuatl de la planta: "cochizapotl" que significa "fruto dulce que induce el sueño". Desde mediados del siglo pasado esta planta fue objeto de numerosos estudios químicos, farmacológicos y botánicos (1), cuyo principal interés recayó en la semilla y eventualmente en la corteza de la planta.

Debido a que la hipertensión es un problema que afecta a una parte importante de la población y para el cual no existe, a la fecha, un tratamiento ideal (2), la incorporación de C. edulis -con sus propiedades hipotensoras- a la terapéutica moderna podría constituir un paso importante en el desarrollo de productos farmacéuticos elaborados a partir de plantas de reconocido uso medicinal, ya sea la planta misma o sus extractos crudos o semipurificados.

Uno de los requerimientos para poder lograrlo es la cuantificación de aquellos compuestos farmacológicamente activos que se encuentren presentes en la planta, esto exige el uso de técnicas analíticas poderosas que permitan el estudio de mezclas complejas como es el caso de los extractos de plantas.

Se ha demostrado que la $N\alpha$, $N\alpha$ -dimetilhistamina (DMH) es responsable, cuando menos en parte, de la actividad farmacológica detectada en los extractos metanólicos de la semilla de zapote blanco (3); por lo que el objetivo central del trabajo fue el desarrollo de un método analítico por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) que permitiera la detección y cuantificación de dicho metabolito en extractos orgánicos e infusiones, tanto de semilla como de hoja. La hoja se incorporó al estudio debido a que la información etnobotánica puso de manifiesto que esta parte de la planta es más utilizada que la semi-

lla con el mismo fin.

El logro de la detección de la DMH en las infusiones es particularmente importante porque la mayoría de las plantas medicinales encuentran uso práctico en forma de infusiones, de aquí que se haga necesario demostrar que una infusión puede ser sometida al estudio químico-analítico para establecer su contenido de metabolitos secundarios.

En este sentido, el estudio realizado constituye una contribución a la serie de trabajos que con el objeto de establecer métodos analíticos para la estandarización de productos para uso terapéutico elaborados a partir de plantas medicinales se están efectuando.

En el capítulo de Antecedentes se hace evidente que se habían soslayado los trabajos fitoquímicos con la hoja de la planta, por lo que actualmente se encuentra en proceso el rastreo fitoquímico de esta parte de la planta.

Asimismo, se consideró de importancia la cuantificación de cuatro furocumarinas encontradas en la semilla, dado que este tipo de compuestos puede tener una gran variedad de efectos farmacológicos (4).

Durante el trabajo experimental fue posible determinar otros metabolitos secundarios cuyo estudio no se había propuesto inicialmente; como es el caso de la N^{α} -metilhistamina (MHI), histamina (HI) y casimiroedina (CM) como grupo de derivados imidazólicos, así como del glicósido rutina. Los dos primeros fueron buscados sobre la base de la determinación exitosa de DMH y la hipótesis de que sería razonable buscar los metabolitos estrechamente relacionados como lo son la MHI e HI.

Es importante mencionar que en el estudio se aplicaron cuatro métodos cromatográficos distintos, lo cual resulta ilustrativo de la versatilidad y alternativas que para el análisis de mezclas complejas -como es el caso más frecuente en el estudio de extractos de plantas- se dispone con CLAE.

Otro aspecto importante de los métodos establecido en este trabajo es su aplicación para la determinación de metabolitos secundarios en extractos provenientes de cultivos de

células vegetales in vitro de C. edulis. El método para la cuantificación de metabolitos imidazólicos fue aplicado con éxito a muestras de callos de zapote blanco.*

* El cultivo de tejidos vegetales fue realizado por Roberto Enciso en la Unidad de Investigación Biomédica en Medicina Tradicional y Herbolaria, IMSS.

II ANTECEDENTES

2.1 Estudios fitoquímicos y farmacológicos de Casimiroa edulis.

Casimiroa edulis, Llave et Lex, conocida popularmente como zapote blanco, es un árbol perteneciente a la familia de las Rutáceas que se encuentra ampliamente distribuido en México y Centroamérica; ha sido ampliamente utilizado como planta medicinal desde los tiempos prehispánicos. Su uso se consigna en las obras de Hernández, Sahagún, Farfán y Ximénez (5); a las semillas se les ha atribuido propiedades hipnóticas y sedantes, también se menciona su uso como cicatrizante y a las hojas se les conceden propiedades antidiarreicas.

En las obras mencionadas se encuentran informaciones confusas y contradictorias que pueden deberse al hecho de una posible confusión entre diferentes especies de Casimiroa o a la interpretación de los recopiladores de la información que poseían una visión muy distinta a la del mundo indígena.

Al iniciarse los estudios sobre C. edulis, el mayor interés recayó sobre la semilla y el primer estudio químico de ésta corresponde a José Sánchez en 1863 (6), quién obtuvo una sustancia cristalina con las propiedades de un alcaloide, resultando inactiva en los ensayos farmacológicos.

El Instituto Médico Nacional dedicó varios años de estudio para intentar establecer claramente las propiedades medicinales de C. edulis, y es en esta época cuando se pone de manifiesto su efecto hipotensor. García Carmona (7) fue el primero en notar dicho efecto en los extractos metanólicos de la semilla y más tarde De Lille (8) publica los primeros trazos que permiten la corroboración de la actividad.

A partir de la década de los 50s, el estudio químico de la semilla se intensifica y es cuando se aislan de ella una serie de compuestos de estructuras muy variadas. Kincl y col. (9) determinan como la sustancia más abundante en el extracto metanólico de la semilla a la casimiroedina, cuya estruc-

tura fue determinada posteriormente (10). Sin embargo, dicha sustancia no mostró las propiedades farmacológicas encontradas en el extracto pero en cambio se encontró que poseía actividad antileucémica (11).

En 1958, Major y Dursch, y separadamente Ling y col. (3) confirman el efecto hipotensor de la semilla y aíslan de ella a la $N\alpha$, $N\alpha$ -dimetilhistamina (DMH) atribuyendo, cuando menos en parte, la actividad a dicho metabolito. Es interesante resaltar el hecho de que los primeros mencionan la existencia de al menos otros dos compuestos imidazólicos en el extracto, pero no pudieron establecer su identidad.

La DMH es un metabolito secundario que no se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, se ha encontrado también en la esponja Geodia gigas (12), en el hongo Coprinus comatus (13), en Spinacea oleracea (14) y más recientemente en el cactus Echinocereus triglochidiatus (15).

En el extracto metanólico de la semilla también se encontró N-benzoiltiramina que por su relación estructural con la amina simpatomimética tiramina podría ser considerada como potencialmente activa, aunque su acción no ha sido corroborada (9) y su presencia ha sido cuestionada (16).

En el mismo trabajo de Kincl se menciona la existencia en las semillas de la furocumarina 4-metoxi-9-hidroxipsoraleno*, pero este producto es resultado de las condiciones ácidas en las que se llevó a cabo la extracción.

Las furocumarinas cuantificadas en este trabajo son: 5-geraniloxipsoraleno, 8-geraniloxipsoraleno, 5-metoxi-8-geraniloxipsoraleno y felopterina. Dichos compuestos habían sido previamente aislados de las semillas de C. edulis, a excepción de la 5-geraniloxipsoraleno que resultó ser un compuesto nuevo en esta planta.

* En la nomenclatura moderna la posición 9 corresponde a la 8 y la 4 a la 5.

Sobre la hoja de zapote blanco no se encontró ningún estudio fitoquímico; de la corteza se aislaron tres compuestos nuevos que no están presentes en la semilla. La casimiroedina, que es el componente más abundante de la semilla, no se encontró en la corteza (17).

De los componentes químicos de la semilla, Kincl y col. (9) aislaron: casimirofina, casimiroedina, casimiroólido, sitosterol, ácido benzoico, ipuranol, ac. oleico, ac. linoleico, ac. palmítico, ac. esteárico, zapotina, zapotinina, zapoterina, palmitamida, N-benzoiltiraminay 9-hidroxi-bergapteno; Major y Dursch, y separadamente Ling y col. (3a, 3b) aislaron la $N\alpha$, $N\alpha$ -dimetil-histamina; Mechoulum y col. (18) aislaron la zapotidina, y Dreyer (16) los compuestos furocumarínicos: felopterina, 8-geraniloxipsoraleno y la 5-metoxi-8-geraniloxipsoraleno. Finalmente, Enríquez y col. demostraron la presencia de una furocumarina más: la 5-geraniloxipsoraleno.

Las estructuras químicas de los compuestos determinados en este trabajo: felopterina, 8-geraniloxipsoraleno, 5-geraniloxipsoraleno, 5-metoxi-8geraniloxipsoraleno, DMH, MHI, HI y CM, se dan en las Figs. 1 y 2.

Entre los componentes aislados de la corteza de C. edulis por Iriarte y col. se tienen: edulefina, edulitina, edulinina, zapotina, bergapteno, isopimpinolina, 5,6-dimetoxi-flavona, casimirofina, escopoletina, dictamnina, fagarina y skimmianina.

De los compuestos mencionados, algunos eran ya conocidos y otros resultaron compuestos nuevos. Es interesante notar la variedad de estructuras químicas producidas por la planta, dicha variedad de metabolitos constituye una característica de los miembros de la familia de las Rutáceas.

Las furocumarinas, cuya existencia ha sido corroborada en las semillas, pueden tener efectos farmacológicos muy variados. Algunas cumarinas simples pueden ejercer efectos narcóticos en animales (4a) y por otra parte, su acción fotosensibilizadora es bien conocida (4b). Un dato que resulta interesan-

te en el estudio del zapote blanco como planta medicinal con efecto hipotensor es la correlación posible con estudios en los cuales se manifiestan las propiedades hipotensoras de algunas cumarinas y furocumarinas (19).

2.2 Información Etnobotánica.

La investigación etnobotánica emprendida en 1975 por el IMEPLAM (en la actualidad Unidad de Investigación Biomédica en Medicina Tradicional y Herbolaria, IMSS) en diversos lugares de los estados de Hidalgo, Morelos, Tlaxcala y Puebla sobre el zapote blanco indica que la población que lo utiliza, lo hace principalmente como infusiones de hoja y en menor proporción como infusiones de semilla.

En la mayoría de los casos, los informantes mencionan su uso para bajar la presión, "curar la presión", "calmar los nervios" y para provocar el sueño. En el estado de Hidalgo se menciona su uso en el tratamiento de cólicos en niños pequeños. Se habla también del fruto como propiciador del sueño y como calmante de los nervios y de los dolores reumáticos.

El uso del zapote blanco como planta medicinal está difundido principalmente en las comunidades rurales mestizas que para su consumo lo adquieren en los mercados o lo cultivan en sus casas.

III CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA

La cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) es una técnica analítica muy poderosa y versátil, con aplicaciones en diversas disciplinas científicas.

La cromatografía líquida es conocida desde 1903, año en que Tsweet (20) separó pigmentos vegetales utilizando la cromatografía de adsorción; sin embargo, durante mucho tiempo estuvo relegada y sólo era utilizada con fines preparativos. Contribuyó a este hecho el gran desarrollo que se logró para la cromatografía de gases, con la cual se lograban determinaciones en mezclas complejas en tiempos muy cortos. Fue a mediados de la década de los sesentas cuando se hicieron las primeras descripciones de los cromatógrafos de líquidos de alta eficiencia que permitían separaciones comparables a las logradas por cromatografía de gases (21-23).

A partir de entonces el desarrollo de esta técnica ha sido muy amplio y ha abarcado diversos aspectos, tales como: diseño de empaques, empaçado de columnas, tipo y diseño de detectores, bombas y sistemas de control de flujo y de inyección. Se han publicado varias revisiones acerca del equipo utilizado en la CLAE (24-28), por lo cual no se describirá aquí.

Una de las ventajas de la cromatografía líquida con respecto a la cromatografía de gases es la operación a temperaturas relativamente bajas (inferiores a 70°), lo que disminuye la posibilidad de descomposiciones inducidas térmicamente durante el proceso de separación. Sin embargo, una de sus desventajas es no poseer un detector universal. Los detectores más utilizados en CLAE son el espectrofotómetro UV-visible, fluorómetro y refractómetro diferencial, que puede considerarse como potencialmente universal. Existen otros detectores de aplicación más reducida como son los detectores electroquímicos, de radioactividad y de conductividad (29-31); también se han descrito detectores de captura de electrones (32) y de ionización a la flama (33). Se encuentran también disponibles comercialmen-

te interfases CLAE-EM (34) que podrían llegar a alcanzar la potencialidad que tiene la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. Además, se realizan estudios para poder acoplar el sistema RMN-CLAE (35) que puede resultar más factible dada la similitud de requerimientos de operación de ambas técnicas.

La cromatografía líquida moderna debe su alta eficiencia al desarrollo de fases estacionarias constituidas por partículas muy pequeñas ($< 20 \mu\text{m}$) y de tamaño uniforme. La disminución en el tamaño de partícula trae consigo problemas en el empacado de las columnas y en el paso de la fase móvil a través de ella. A un tamaño de partícula menor corresponde una caída de presión mayor, por lo que existe un límite práctico en la reducción del tamaño de partícula como medio para incrementar la eficiencia.

La alta eficiencia de la técnica ha permitido una reducción de los tiempos de análisis, así como también determinaciones en mezclas muy complejas que en muchos casos pueden hacerse con un mínimo de pretratamiento de la muestra.

La versatilidad de la técnica se debe a los diferentes tipos de cromatografía líquida que existen, clasificados de acuerdo al tipo de interacción que rige la retención de los solutos. Estos tipos de Cromatografía líquida son: C. adsorción, C. partición, C. fases químicamente unidas (normal e inversa), C. intercambio iónico, C. pares de iones y C. exclusión. Recientemente se ha descrito la cromatografía con fases móviles micelares (36) que muestra propiedades análogas a los sistemas convencionales de cromatografía de fase inversa y se ha comenzado a establecer sus bases teóricas (37). Cada uno de los tipos de cromatografía se aplica dependiendo del tipo de compuestos por separar.

Dado que la descripción de esta técnica ha sido ampliamente tratada (38-42), tanto en sus aspectos teóricos como prácticos, sólo se pretende dar aquí una breve descripción de aquellos aspectos que son más relevantes para el tra-

bajo realizado. Giddings (42) puso de manifiesto que todo el desarrollo teórico hecho para la cromatografía de gases era igualmente válido para la cromatografía de líquidos.

De los tipos de cromatografía mencionados, la cromatografía de pares de iones (CPI) es la de más reciente uso. Su desarrollo se debe en gran medida a los estudios de Schill y col. (43) y ha sido de gran utilidad para la separación de componentes muy polares, ya sea iónicos o ionizables, con ventajas sobre la cromatografía de intercambio iónico que presenta problemas de estabilidad en los empaques y de reproducibilidad en los resultados.

La CPI ha recibido varias denominaciones, lo cual es reflejo de la incertidumbre que existe acerca del o los mecanismos de retención. Este tipo de cromatografía puede realizarse en fase normal o inversa. En fase normal, la sílice se recubre con una fase estacionaria acuosa adicionada de una base o un ácido (contraión), lo cual depende del tipo de compuesto por separar, la fase móvil está constituida por un disolvente orgánico inmiscible con el agua. En la práctica esta fase normal resulta problemática debido a que las fases estacionaria y móvil deben ser equilibradas previamente, lo cual en ocasiones puede resultar difícil, y además la fase estacionaria puede ser arrastrada del soporte. La principal aplicación que presenta esta cromatografía es en la separación de compuestos que no absorben en el UV y que mediante la formación de un par de iones con un contraión que absorbe en esta región puede lograrse la detección a la salida de la columna.

La CPI en fase inversa se lleva a cabo en un soporte constituido por sílice a la que se han unido químicamente cadenas hidrocarbonadas que pueden ser de diferente longitud. La fase móvil está constituida de una solución acuosa del contraión (ácido o base) adicionada de un disolvente orgánico miscible con el agua, que generalmente es el metanol o el acetonitrilo. Una descripción más detallada se hará para la CPI fase inversa por ser ésta la que presenta mayores ventajas.

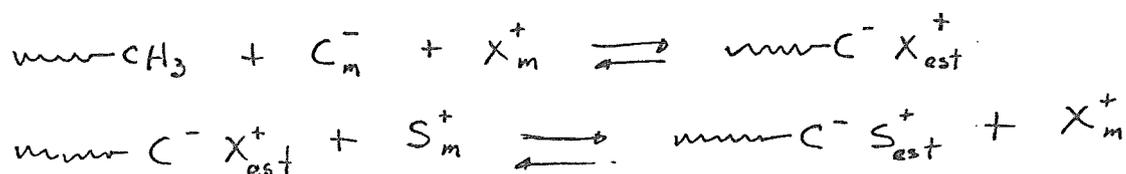
Las principales ventajas que presenta la CPI fase inversa son: mayor estabilidad de los empaques, ya que la fase estacionaria se encuentra químicamente unida; posibilidad de efectuar gradientes de elución y gran versatilidad debido al número relativamente grande de factores que intervienen en el establecimiento de las condiciones de una separación. Tales factores son: longitud de la cadena hidrocarbonada de la fase estacionaria, longitud de la cadena del contraión y naturaleza química, concentración del contraión, pH, amortiguadores, fuerza iónica y temperatura de la separación.

Las condiciones en CPI son relativamente más difíciles de establecer que en los otros tipos de cromatografía debido a lo mencionado anteriormente, por lo que para comprender el efecto que tiene cada uno de los parámetros por establecer se hace necesaria una descripción del o los posibles mecanismos de retención.

En el caso de la CPI el tema del mecanismo de retención ha sido objeto de numerosos estudios por parte de un número grande de investigadores sin llegar, a la fecha, a esclarecer inequívocamente como se lleva a cabo la retención.

Se han propuesto básicamente dos mecanismos de retención:

1) Intercambio iónico (44-47): En este mecanismo se propone que el contraión debido a su naturaleza hidrofóbica se adsorbe a la fase estacionaria, transformándola en un intercambiador de iones; así el mecanismo sería de intercambio iónico. Dicho mecanismo se puede representar como sigue:



donde:

---CH_2	fase estacionaria	
C^-	contraión	est = estacionaria
X^+	co-ión	m = móvil
S^+	soluto	

2) Adsorción de pares de iones (48-51): En este mecanismo se propone que el contraión y el soluto forman en la fase móvil un par de iones con las características de una molécula neutra, que se adsorbe a la fase estacionaria de naturaleza hidrofóbica. Se ha propuesto también que la formación de los pares de iones se efectúa en la interfase fase estacionaria-fase móvil (52), lo cual explicaría que en algunos estudios no se hayan detectado pares de iones en la fase móvil.

Ninguno de estos mecanismos ha resultado enteramente satisfactorio, por lo que Bidlingmeyer y col. (53) sugieren un término menos restrictivo para el mecanismo de retención tal como "interacción iónica", usado para englobar todas las fuerzas, además de las coulombicas, involucradas en la retención. Tales fuerzas las denomina: eluofóbicas, eluofílicas, adsorfóbicas y adsorfílicas. Al ión adicionado a la fase móvil (comúnmente llamado contraión) lo denomina "ión interaccionante". El mecanismo propuesto no requiere la formación de pares de iones en ninguna fase y no se basa en el intercambio iónico clásico, sino que propone un intercambio iónico dinámico.

Otros investigadores (54) han sugerido una superposición del mecanismo de intercambio iónico con el de formación de pares de iones.

Afortunadamente, a pesar de no conocer con certeza el mecanismo que rige la retención, es posible hacer predicciones de acuerdo con la naturaleza de los compuestos por separar para establecer las condiciones iniciales , que sobre la base de los resultados experimentales se iran afinando hasta lograr la resolución requerida en la separación.

A continuación se describirá cada una de las condiciones que tienen que ser establecidas y su efecto en la retención de los compuestos.

Fases estacionarias: En fase inversa las fases estacionarias más utilizadas son la C_8 y la C_{18} , que son empaques constituidos por sílice unida químicamente a cadenas hidrocarbonadas con 8 o 18 átomos de carbono, respectivamente. El aumento en la

longitud de la cadena conduce a aumentos en la retención de los solutos, ya que los contraiones hidrofóbicos se fijaran más fuertemente a la fase estacionaria (52).

Fase móvil: En cuanto a la fase móvil se discutiran separadamente cada una de las condiciones que deben ser establecidas en ella.

A) contraión: el efecto que el contraión tenga sobre la retención dependerá de la naturaleza del soluto y del contraión. Si el contraión (ión interaccionante) y el soluto son de la misma carga disminuirá la retención, esto se explica por un fenómeno de repulsión electrostática, en algunos casos esta repulsión hace que los compuestos eluyan en el tiempo muerto. Se han reportado, inclusive, eluciones antes del tiempo muerto lo que conduce a valores de k' negativos; esto se explica suponiendo que el soluto es excluido de los poros de la fase estacionaria a la cual esta fijado el contraión.

Si por el contrario, el contraión y el soluto son de cargas opuestas se tendrá una interacción y por tanto retención del soluto debido a la presencia del contraión. En el caso de solutos neutros se ha observado (53) que la presencia del contraión no afecta la retención del soluto, lo cual es claro debido a que no existirían las interacciones de tipo iónico.

Los contraiones utilizados con mayor frecuencia son las sales de tetralquilamonio, alquilsulfatos y alquilsulfonatos.

La longitud de la cadena es otro de los factores modificables, a una mayor longitud el contraión será más hidrófobo y por tanto tendrá una mayor afinidad por la fase estacionaria y se fijará más fuertemente a ella, lo que a su vez ocasionará un aumento en la retención de los solutos.

La concentración del contraión permitirá hacer variar la fuerza de la fase móvil, a una mayor concentración corresponde un aumento en la retención (a valores menores que la concentración micelar crítica), esto es predecible aún cuando no se tenga la certeza en cuanto al mecanismo de retención.

Es importante mencionar que por cambios en la concentración del contraíón o en la longitud de la cadena hidrocarbonada no se logran cambios en la selectividad, ya que las curvas $\log k'$ (k' = factor de capacidad) contra longitud de la cadena o contra concentración del contraíón para diferentes solutos generalmente son paralelas

B) Disolvente orgánico: los disolventes orgánicos más utilizados son el metanol y el acetonitrilo, en algunos casos se hace uso de otros disolventes miscibles con el agua, tal como el tetrahidrofurano. La fuerza de la fase móvil puede ser variada por cambios en la concentración del disolvente orgánico, a una mayor concentración de éste corresponde una menor retención. Los cambios en concentración de disolvente orgánico no conducen a cambios en la selectividad en una separación. Para lograr cambios en la selectividad se requiere de un cambio de disolvente, esto es debido a los diferentes tipos de interacciones que se presentan de acuerdo a la estructura química del disolvente y los solutos a separar. (41).

C) pH: este parámetro es un factor muy importante en la CPI debido a que mediante cambios en pH se pueden lograr cambios grandes en la selectividad, especialmente en el caso de ácidos y bases débiles. Los valores de pH que se elijen deben ser adecuados para que los solutos por separar se encuentren totalmente ionizados, ya que es precisamente en esta forma iónica que hay interacción con el contraíón.

En el estudio descrito por Kong y col. (55) en el que se caracterizó el comportamiento de ácidos y bases débiles en distintas condiciones de pH, se observó que a valores de pH bajos los tiempos de retención de los ácidos bajo estudio fueron esencialmente independientes de la concentración del contraíón, mientras que a pHs altos la retención era claramente afectada por la presencia del contraíón. En el caso de las bases débiles los resultados obtenidos fueron inversos, a pHs bajos la retención se ve afectada por el contraíón mientras que a pHs altos será prácticamente independiente. En resumen se puede decir que la retención depende del pH de la fase móvil y del pKa de los solutos por separar.

D) Fuerza iónica: Es otro de los parámetros que permite regular la fuerza de la fase móvil. A una mayor fuerza iónica se tendrá una menor retención, esto se explica, independientemente de cual sea el mecanismo de retención, si consideramos que existirá competencia entre el soluto y los iones de la fase móvil por el contraión.

E) Temperatura: En CPI, al igual que en cromatografía de fases químicamente unidas fase inversa, se trabaja a temperaturas superiores a la temperatura ambiente debido a que los procesos de transferencia de masa son lentos por lo que ocasionan ensanchamiento de bandas. A temperaturas más altas dicho ensanchamiento se ve disminuído.

La CPI también ha sido aplicada en la separación de compuestos zwitteriónicos mediante el uso de contraiones de la misma naturaleza. Los compuestos zwitteriónicos tienden a comportarse como moléculas sin carga (55) por lo que son poco afectados por la presencia de contraiones con un sólo tipo de carga; sin embargo, cuando el contraión también es de naturaleza zwitteriónica la retención de los solutos es afectada. Esta nueva forma de CPI ha permitido lograr separaciones de compuestos tales como los nucleótidos (56). En este tipo de cromatografía se propone la formación de pares de iones cuadrupolares de acuerdo con la siguiente reacción:



S Solute
C Contraión

Otra de las aplicaciones novedosas de la CPI es la separación de péptidos y proteínas (57) utilizando un contraión hidrofílico, tal como los iones fosfato, en lugar del contraión hidrofóbico usual. Esto trae como consecuencia un aumento en la carga neta del compuesto y por tanto una disminución en su carácter hidrofóbico lo cual evita su retención irreversible.

Entre las principales desventajas de este tipo de cromatografía se encuentran:

a) generalmente los sistemas son menos eficientes que los correspondientes a fases químicamente unidas fase inversa, lo que conduce a ensanchamiento de los picos.

b) coileo de los picos debido a la presencia de grupos silanoles libres en la fase estacionaria que interaccionan con los solutos iónicos.

c) el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio de las columnas puede ser muy largo en algunas ocasiones.

IV EXPERIMENTAL

4.1 Material y equipo.

El equipo de cromatografía líquida utilizado fue el modelo 5000 de Varian Assoc. con un inyector de válvula Rheodyne mod. 7125 (rizo de 20 μ l) y un detector de longitud de onda variable Varian mod. UV-50 conectado a una unidad de manejo de datos Vista 401-CDS.

Para la determinación de la HI se usó un detector de fluorescencia FluorichromTM de Varian , los filtros para la radiación de excitación proporcionan una banda de 340-380 nm y los de emisión permiten el paso de radiación de longitud de onda mayor de 400 nm.

Las columnas utilizadas fueron Micropack MCH-10 (C₁₈ monomérica) y Micropack SI-10, ambas con empaques de tamaño de partícula de 10 μ y longitudes de 30 cm X 0.4 cm de diámetro interno. Para protección de las columnas analíticas se utilizaron en todas las determinaciones guardacolumnas de aproximadamente 3 cm de longitud, empacadas con Vydac fase inversa o Vydac adsorbente, de acuerdo a la columna analítica empleada.

Jeringa Hamilton 10 μ l

Equipo de clarificación Millipore

Membrana Millipore 0.22 μ m para soluciones acuosas

Membrana Millipore 0.50 μ m para soluciones orgánicas

Rotavapor Buchi Brinkmann

Liofilizadora LAB CON SO

Balanza analítica Bosch S 2000

Placas analíticas de sílice de Merck

Reactivos empleados

Agua, metanol, cloroformo, cloruro de metileno, acetato de etilo, todos grado HPLC de Merck; ácido clorhídrico, ácido perclórico, sulfato de sodio anhidro, fosfato monobásico de sodio, ácido cítrico, hidróxido de sodio y ácido bórico, grado reacti-

vo analítico de Baker; o-ftalaldehído y mercaptoetanol, grado reactivo analítico de Aldrich; laurilsulfato de sodio, grado reactivo analítico de Sigma.

Sustancias patrón empleadas

Rutina *

Casimiroedina *

Felopterina *

5-geraniloxipsoraleno *

8-geraniloxipsoraleno *

5-metoxi-8-geraniloxipsoraleno *

diclorhidrato de histamina de Sigma

diclorhidrato de $N\alpha$, $N\alpha$ -dimetilhistamina de SKF⁺

diclorhidrato de $N\alpha$ -metil histamina de SKF⁺

4.2 Preparación de extractos.

El material vegetal fue adquirido en el mercado, por tratarse de una planta cultivada, y posteriormente identificada en el Herbario IMSSM de la Unidad.

SEMILLAS

60 g de semilla de C. edulis finamente molidas fueron extraídas exhaustivamente por maceración a temperatura ambiente, primero en hexano y posteriormente en metanol. Los disolventes fueron evaporados bajo presión reducida y los residuos secados al alto vacío. A partir de los extractos hexánico y metanólico se prepararon las muestras para CLAE como se indica más adelante.

La infusión de las semillas se preparó poniendo una semilla en trozos en 50 ml de agua destilada e hirviendo durante 10 min., la solución se filtró a través de papel Whatman 41 y se liofilizó, todo el residuo se utilizó para la preparación de la muestra.

* Obtenidos y caracterizados en la Unidad. Ver apéndice.

+ Se agradece a los laboratorios Smith, Kline and French, Inglaterra habernos proporcionado estas sustancias.

HOJAS

10 g de hoja molida se maceraron exhaustivamente en una mezcla ácido clorhídrico-metanol (25-75) a temperatura ambiente, el metanol fue eliminado al vacío en rotavapor y el agua por liofilización, todo el residuo se utilizó en la preparación de la muestra para CLAE.

El extracto metanólico se preparó macerando exhaustivamente 10 g de hoja molida en metanol a temperatura ambiente, del residuo se preparó la muestra para CLAE.

La infusión se preparó hirviendo 2 g de hoja molida en 50 ml de agua destilada durante 10 min, la solución se filtró a través de papel Whatman 42 y posteriormente se liofilizó, todo el residuo se utilizó en la preparación de la muestra para CLAE.

4.3 Preparación de muestras para CLAE.

Las soluciones para inyectar al sistema cromatográfico se prepararon disolviendo, tanto los estándares como los extractos, en un disolvente compatible con la fase móvil (dicho disolvente se especifica en cada método) y llevando a volumen en matraces volumétricos. Las soluciones se filtraron a través de membranas Millipore para soluciones acuosas u orgánicas, dependiendo de la muestra, para evitar la introducción de partículas que puedan dañar la columna analítica.

4.4 Ensayos para el establecimiento de los métodos cromatográficos para la cuantificación de los metabolitos.

Debido a la diversidad estructural que presentan los componentes de Casimiroa edulis fue necesario utilizar varios sistemas cromatográficos que permitieran la determinación de aquellos metabolitos secundarios de interés y de los cuáles se dispusiera de sustancias patrón.

Para el establecimiento de las condiciones más adecuadas se llevó a cabo una serie de ensayos que a continuación se describen brevemente.

Detección por UV. Selección de la longitud de onda.

HI, MHI y DMH: presentan un máximo de absorción a 269 nm con un valor de coeficiente de absorción muy pequeño, que en el caso de la HI tiene un valor $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 1$ en HCl 0.1 M (58).

CM: $\lambda_{\text{max EtOH}}$: 219 y 280 nm

8-geraniloxipsoraleno (II): $\lambda_{\text{max EtOH}}$: 302, 265, 250, 243, 223 nm

5-geraniloxipsoraleno (I): $\lambda_{\text{max EtOH}}$: 210, 220, 244, 250, 259, 267 y 310 nm

5-metoxi-8-geraniloxipsoraleno (III): $\lambda_{\text{max EtOH}}$: 238, 250, 267 y 312 nm

5-metoxi-8-dimetilalilpsoraleno (IV): $\lambda_{\text{max EtOH}}$: 240, 247, 269 y 311 nm
(felopterin)

Rutina: $\lambda_{\text{max EtOH}}$: 258 y 355 nm

Con base en los datos de los espectros UV, la HI, MHI, DMH y CM se detectaron a 220 nm lo que permitió aumentar la sensibilidad en el caso de los tres primeros compuestos; para las furocumarinas se eligió la longitud de onda de 270 nm y la rutina se detectó a 360 nm.

Detección por fluorescencia

La determinación de la histamina por fluorescencia se hizo a las longitudes de onda previamente reportadas (61), λ_{exc} : 340-380 y λ_{em} : >400 nm

Ensayos cromatográficos

En las condiciones de detección establecidas se probaron diferentes sistemas cromatográficos: adsorción, pares de iones y fases químicamente unidas fase inversa; a partir de los resultados se establecieron las condiciones de la separación para poder realizar adecuadamente la cuantificación de los metabolitos de interés.

HI, MHI, DMH y CM

A) Ensayos en fase inversa

La columna utilizada fue la MCH-10 (C₁₈)

Fases móviles:

- 1) Mezclas agua-metanol
- 2) Mezclas agua-acetonitrilo
- 3) Mezclas amortiguador de fosfatos (pH 7)-metanol
- 4) Mezclas ácido perclórico 0.01M - metanol

Temperatura:

Ambiente

50°

B) Ensayos en sílice

Para los ensayos en sílice se aprovechó la ventaja que se tiene en este tipo de cromatografía de poder probar las fases móviles en cromatografía en placa fina, lo cual trae consigo un ahorro considerable de tiempo y disolventes.

Las fases móviles probadas fueron mezclas cloroformo-metanol y mezclas cloroformo-metanol-amoníaco.

C) Ensayos en cromatografía de pares de iones.

Fase estacionaria: MCH-10

Fases móviles: Los parámetros a establecer en la fase móvil son:

Contraión: laurilsulfato de sodio

Concentración de contraión: 5×10^{-3} , 2.5×10^{-3} y 10^{-3} M

Disolvente orgánico: metanol

Sales neutras: sulfato de sodio $2 \times 10^{-2} M$
Amortiguadores: fosfatos 2.5×10^{-2} (pH 2)
 ácido perclórico 0.2 %
Temperatura:
Ambiente
50°

HI

Para la histamina también se probó el método descrito por Gerhke y col. (59) que mediante la formación de un derivado fluorescente de la histamina mejora las condiciones de separación en fase inversa y aumenta considerablemente la sensibilidad en la detección. Las condiciones utilizadas fueron esencialmente las mismas, la única modificación introducida fue no emplear ácido clorhídrico para ajustar el pH debido a que los iones cloruro son muy corrosivos y afectan la columna.

Furocumarinas: I, II, III y IV

A) Ensayos en fase inversa

Columna MCH-10 (C_{18})

Fases móviles:

Mezclas agua-metanol

Mezclas agua-acetonitrilo

Temperatura:

Ambiente

50°

B) Ensayos en sílice

1. Cromatografía en placa fina

Fases móviles: Cloroformo, hexano-acetato de etilo, cloruro de metileno, cloroformo-metanol, cloruro de metileno-metanol.

2. CLAE en sílice

Fases móviles: Los disolventes que mostraron retenciones adecuadas en cromatografía en placa se probaron en el sistema CLAE para ajustar las condiciones de la separación.

Los disolventes probados fueron: cloroformo-metanol en distintas proporciones hasta un máximo de 5% de metanol en régimen isocrático y con gradiente de elución. Se probó también la mezcla cloruro de metileno-metanol en las mismas condiciones de la mezcla anterior.

Temperatura: ambiente

Rutina

A) Fase inversa

Columna MCH-10

Fases móviles:

1. ácido perclórico 10^{-2} - metanol
2. amortiguador de fosfatos (pH 2)-metanol

Temperatura:

Ambiente

50°

4.5 Descripción de los métodos cromatográficos empleados en la cuantificación de los metabolitos.

La asignación de los picos en los cromatogramas se hizo por comparación directa de los tiempos de retención y por adición de las sustancias patrón a los extractos bajo estudio para observar si existía superposición del estándar con el pico que supuestamente correspondía al metabolito de interés.

Las cantidades mínimas detectables (CMD) fueron determinadas para una relación señal/ruido= 4. Las curvas patrón se elaboraron tomando como parámetro el área del pico, la cual se graficó contra la cantidad de sustancia de referencia. Para cada curva se utilizaron seis determinaciones que fueron ajustadas por el método de mínimos cuadrados. Los contenidos de los metabolitos se dan con sus intervalos de confianza que se calcularon como se detalla en el Apéndice. A continuación se describen cada uno de los métodos cromatográficos empleados.

4.5.1 Determinación de $N\alpha$, $N\alpha$ -dimetilhistamina, $N\alpha$ -metilhistamina y casimiroedina por CPI.

Para la determinación se utilizaron los siguientes extractos: 340 mg de metanólico de semilla, extracto metanólico-acuoso de las hojas (equivalente a 10 g de ~~hoja~~ hoja seca) y los liofilizados de las infusiones de hoja y semilla. Dichos extractos se disolvieron en ácido perclórico 0.1 M y se completó el volumen a 10 ml en matraces volumétricos de 10 ml.

Las curvas patrón se elaboraron inyectando 1, 3, 5, 8, 10 y 20 μ l de las soluciones de DMH, MHI y CM. Estas soluciones fueron preparadas por disolución de las sustancias de referencia en ácido perclórico 0.1 M y completando el volumen a 10 ml en matraces volumétricos.

La separación se efectuó isocráticamente con una fase móvil constituida por laurilsulfato de sodio 10^{-3} M, sulfato de sodio 2×10^{-2} M y $HClO_4$ 0.2% en una mezcla agua-metanol (1:1) a un flujo de 1 ml / min, temperatura de 50° y detección en el UV a 220 nm.

4.5.2 Determinación de histamina.

Para la determinación de la histamina se formó un derivado fluorescente , previamente a la inyección en el sistema cromatográfico, que además de mejorar las condiciones de separación permite niveles de detección más bajos.

Reactivo de derivación: Se pesaron 0.5 g de ácido bórico, se disolvieron en 20 ml de agua y el pH se ajustó a 10.4 ± 0.1 con NaOH 10%; a esta solución se adicionaron 50 mg de o-ftalaldehído disueltos en 200 μ l de metanol. El reactivo se almacenó en frascos ámbar a 4°

Reacciones de derivación: Se efectuaron con el estándar de histamina, extracto metanólico de semilla y extracto metanólico-acuoso de hoja. Cada una de las muestras se disolvió en agua y el pH se ajustó a 7, se añadieron 3 ml del reactivo de derivación y se agitó vigorosamente. Las soluciones acuosas se extra

jeron con acetato de etilo y el volumen se ajustó a 10 ml en matraces volumétricos. Para asegurar que no existían interferencias provenientes del extracto se hizo la derivación de los extractos adiconando histamina estándar, también se extrajo con acetato de etilo el extracto sin derivar en las mismas condiciones que los extractos derivados.

La separación se hizo en una columna Micropack MCH-10 con una fase móvil constituida por NaH_2PO_4 2.5×10^{-2} M en una mezcla metanol-agua (1:1) a un flujo de 1 ml/min, temperatura de 40° y detección por fluorescencia.

4.5.3 Determinación de furocumarinas

La determinación de furocumarinas se realizó en los extractos hexánicos de la semilla de zapote blanco, para lo cual se disolvieron en cloroformo cantidades exactamente pesadas de dichos extractos. Las cuatro furocumarinas estándar: 5-geraniloxipsoraleno (I), 8-geraniloxipsoraleno (II), 5-metoxi-8-geraniloxipsoraleno (III) y felopterina (IV) se disolvieron también en cloroformo y se llevaron a volumen en matraces volumétricos de 10 ml; a partir de estas soluciones se elaboraron las curvas patrón para la cuantificación inyectando 1, 3, 5, 8, 10 y 20 μl de cada solución.

La separación se efectuó en una columna de sílice (Micropack SI-10) aplicando un gradiente de elución; para poder lograr el gradiente de elución requerido se utilizaron dos recipientes: el A, que contenía cloroformo y el B, cloroformo-metanol (99:1). La variación de la composición en función del tiempo fue:

tiempo (min)	%A	%B	%MeOH
0	90	10	0.1
8	50	50	0.5
12	10	90	0.9

El flujo 1 ml/min, temperatura ambiente (22°) y la detección se hizo en el UV a 270 nm. Al finalizar cada corrida la columna se reacondicionaba mediante un gradiente inverso al que se había aplicado durante la separación y al llegar a la composición inicial el sistema se equilibraba durante 10 min.

4.5.4 Determinación de rutina

En la cuantificación se usaron los extractos metanólicos de las hojas de zapote blanco, de sus residuos se pesaron alrededor de 80 mg y se disolvieron en metanol aforando a 10 ml. La solución patrón se preparó disolviendo rutina estándar en metanol y ajustando el volumen en un matraz volumétrico. A partir de esta solución se construyó la curva patrón inyectando 1, 3, 5, 8, 10 y 20 μ l.

La columna empleada fue Micropack MCH-10 y la fase móvil una mezcla metanol-amortiguador de citratos (pH 2) en proporción 1:1. La elución se efectuó isocráticamente a un flujo de 1 ml/min, temperatura de 50° y detección a 360 nm.

V RESULTADOS Y DISCUSION

La histamina y sus $N\alpha$ -metilderivados no pudieron ser determinados adecuadamente en fase inversa en distintas condiciones ni en fase normal en sílice. En fase inversa, con las fases móviles agua-metanol y agua acetonitrilo en diferentes proporciones no se logró detectar la HI y sus derivados MHI y DMH, debido a que al no fijar el pH estos compuestos se encuentran en forma de monocatión, dicatión y en menor proporción en forma neutra.

Los valores de pKa reportados para la HI por Paiva y col. (60) son: $pK_{a1}=5.8$, $pK_{a2}=9.4$ y $pK_{a3}=14$. A partir de los valores anteriores se explica que aún cuando el pH se fije en 7 con amortiguador de fosfatos (máximo valor permitido para evitar el deterioro de la columna), no es posible suprimir la ionización. A este valor de pH si se pudieron detectar los compuestos pero la resolución entre ellos no fue adecuada porque los picos eran muy anchos. Se intentó un aumento en la temperatura para mejorar la eficiencia, pero no se obtuvieron buenos resultados. Aunque los valores de pKa de los derivados $N\alpha$ metilados de la HI no se encontraron reportados, dichos compuestos deben tener un comportamiento ácido-base muy similar al de la HI.

La casimiroedina tuvo parámetros adecuados en fase inversa independientemente del pH debido a su estructura (Fig. 1) que hace que sus propiedades básicas se vean reducidas con respecto a la histamina.

En la columna MCH-10 se probaron también como fases móviles mezclas de ácido perclórico $10^{-2}M$ - metanol, dado que los aniones perclorato tienen la capacidad de formar pares de iones, sin obtener buenos resultados porque la HI, MHI y DMH eluían en el tiempo muerto, es decir, no tenían interacciones con la fase estacionaria.

A partir de los resultados obtenidos en placa fina en sílice se observó que los compuestos eran retenidos fuer-

temente y para lograr retenciones adecuadas (k' entre 2 y 10) se requerían fases móviles con un alto contenido de agua; por lo que tales sistemas no era conveniente llevarlos a la CLAE, ya que causarían problemas de desactivación de columnas. La separación en fases químicamente unidas, fase normal, podría constituir una alternativa para eliminar los problemas antes mencionados; sin embargo dicha posibilidad no fue explorada debido a que no se contaba con columnas de este tipo; además de que el problema para fijar el pH podría subsistir.

Para la HI existen reportados varios métodos tanto por CLAE (59, 61) como por Cromatografía de gases (62-65), dichos métodos tienen como característica ser muy sensibles pero presentan la desventaja de emplear reacciones de derivación que en el caso de la DMH, metabolito sobre el cual se centró el trabajo, no es posible realizar por tratarse de una amina terciaria.

Finalmente fue la cromatografía de pares de iones (CPI) la que permitió la detección y cuantificación de los derivados MHI y DMH en los extractos de la planta sin efectuar reacciones de derivación.

La selección de las condiciones en CPI es más compleja que en los otros tipos de cromatografía, ya que los parámetros a fijar son más numerosos. De las concentraciones de contraíón ensayadas fue la de 10^{-3} M la que resultó más adecuada; con concentraciones mayores se observaron picos muy asimétricos y anchos, en ocasiones hubo desdoblamiento de los picos . Lo anterior puede ser indicativo de que se estén mezclando distintos mecanismos de retención, uno de los cuales puede ser la solubilización micelar, ya que la concentración de contraíón se acerca a su concentración micelar crítica (CMC) cuyo valor es 8×10^{-3} M (66).

La adición de sales neutras a la fase móvil en CPI, además de aumentar la fuerza de la fase móvil sin modificar el pH, permitió eliminar el coleamiento de los picos.

El coleo de los picos puede deberse a la presencia de grupos silanoles libres en la fase estacionaria que interaccionan fuertemente con las especies cargadas. La eficiencia se mejoró al fijar el pH con HClO_4 0.2 % que cuando se utilizó amortiguador de fosfatos (pH 2). En cuanto al disolvente orgánico, no existieron diferencias marcadas entre el metanol y el acetonitrilo, por lo que se eligió el primero por su mayor disponibilidad.

La principal desventaja observada para el sistema fue el tiempo de equilibración de la columna que resulta grande, tal inconveniente podría, tal vez, ser superado por el uso de un contraión de cadena más corta. El equilibrio de la columna se controlaba por la constancia en los tiempos de retención y por las resoluciones obtenidas entre los compuestos: HI, MHI y DMH.

El método establecido de CPI resultó adecuado también para la determinación del aminoácido histidina, que muy probablemente es el precursor de los derivados histamínicos en la planta.

La histamina presentó en este método parámetros de retención adecuados ($k'=3.7$) y un pico simétrico, pero tiene la desventaja de un nivel de detección alto (140 ng), dada su baja absorción en el UV, comparado con los métodos que emplean derivatización, ya sea en CLAE o en Cromatografía de gases (59, 61-65).

Durante el estudio de los extractos por CPI se puso de manifiesto la presencia de MHI, tanto en hojas como en semillas, dicho metabolito no había sido reportado previamente en Casimiroa edulis. Este resultado está en concordancia con los datos reportados por Major y Dursch (3a), quienes detectaron en el extracto metanólico de la semilla la presencia de otros dos compuestos imidazólicos, además de la DMH; uno de tales compuestos podría corresponder a la MHI.

El resultado del estudio de las hojas fue muy interesante porque permitió la detección de compuestos previamente encontrados en la semilla, particularmente la DMH que posee actividad farmacológica y además la casimiroedina, que no fue posible cuantificar porque la resolución entre ella y un componente que eluía antes y que se encontraba en proporción alta no fue adecuada.

La HI no pudo ser detectada por CPI en los extractos de la planta porque, además de la baja sensibilidad del método, el pico correspondiente a la casimiroedina no permitiría la observación del pico de la HI. Por lo que la determinación de dicho metabolito se hizo aplicando un método reportado por Gerhke y col. (59) que recurre a la derivación para la formación de un derivado fluorescente, lo cuál hace esta determinación muy selectiva y sensible.

En la Fig. 3 se muestra el cromatograma obtenido de la derivación del extracto metanólico de las semillas de zapote blanco, no se detectaron interferencias provenientes del extracto crudo ni de la reacción misma. En el caso de la hoja no se pudo determinar con certeza su presencia, debido a que no había una buena coincidencia en los tiempos de retención y además el pico era más ancho que el correspondiente a la HI patrón, por lo que era evidente que dos compuestos coelúan. Sin embargo, no puede descartarse su existencia con base en los resultados obtenidos.

La Fig. 4 muestra el perfil cromatográfico obtenido al inyectar en el sistema de pares de iones una mezcla artificial de los compuestos imidazólicos: HI, MHI, DMH, CM e histidina (HIS), en el cuál puede observarse que existe una buena resolución entre los cinco componentes.

El cromatograma obtenido al inyectar el extracto metanólico de la semilla se muestra en la fig. 5, en él se señalan los picos correspondientes a los tres metabolitos determinados en ese extracto (MHI, DMH y CM). Un hecho muy

importante es que el cromatograma obtenido de la infusión es idéntico al del extracto metanólico, dado que los ensayos farmacológicos reportados se han realizado sólo en el extracto metanólico y no en las infusiones que son las que se consumen popularmente, este dato permite establecer una correlación entre el contenido de metabolitos y la acción farmacológica.

La misma similitud, en cuanto a composición, se encontró en el extracto metanólico-acuoso y la infusión de la hoja. La detección de los derivados metilados de la histamina (MHI y DMH) en esta parte de la planta tiene una buena correlación con el uso popular que se le da, ya que es esta parte de la planta la que la gente usa con mayor frecuencia.

Durante el trabajo experimental con la hoja se detectó la presencia del metabolito rutina, que tampoco había sido reportado en esta planta. Se procedió a su cuantificación con el objeto de evaluar la planta como posible fuente de este metabolito y para conocer su abundancia con respecto a otros componentes, ya que puede jugar un papel importante en la actividad atribuida a la hoja de zapote blanco.

El método para la determinación de rutina permitió la cuantificación de este metabolito en forma rápida y selectiva mediante la cromatografía de fases químicamente unidas, fase inversa, con supresión de la ionización con amortiguador de citratos pH 2 y detección en el UV a 360 nm. En los ensayos previos al establecimiento del método se observó que al no fijar el pH de la fase móvil los picos obtenidos eran anchos y sufrían coleamientos. Al fijar el pH con ácido perclórico no se eliminó el coleo de los picos por completo por lo que se recurrió al uso de otro sistema amortiguador tal como el citrato, con este último se obtuvieron buenos resultados.

Qureshi y col. (67) describen un método por cromatografía de pares de iones en el que incluyen a la rutina, utilizan como contraión tetrabutilamonio y fijan el pH con ácido acético; en tales condiciones la rutina se encuentra sin

ionizar por lo que su retención debe verse poco afectada por la presencia del contraión, su tiempo de retención en ese sistema fue de 50.7 min. En otro trabajo (68) la rutina fue determinada en fase inversa con gradiente de elución y amortiguando la fase móvil con fosfato monobásico de potasio, el tiempo de retención en este sistema fue de 40 min. Para el caso del extracto metanólico de la hoja, en el cuál se cuantificó la rutina, se diseñó un método más simple y rápido con una detección más selectiva a 360 nm, ya que a esta longitud de onda el número de compuestos que presentan absorción disminuye considerablemente.

La separación de las furocumarinas del extracto hexánico de las semillas de Casimiroa edulis se intentó, primeramente, en fase inversa. Se obtuvieron buenas resoluciones para las furocumarinas: 8-geraniloxipsoraleno y 5-metoxi-8-geraniloxipsoraleno empleando como fase móvil agua-acetonitrilo (25:75) a una temperatura de 50°, sin embargo, para la felopterina se sospechó de la existencia de superposiciones por lo que se recurrió al uso de otro sistema cromatográfico.

En cromatografía de adsorción se logró una separación excelente para la mayoría de los componentes detectados en el extracto hexánico de la semilla, el número de picos observados fue mayor que para el caso de la cromatografía en fase inversa, lo que comprueba que este sistema resulta más adecuado para un estudio más completo de dicho extracto. El perfil cromatográfico obtenido se muestra en la fig. 7.

Para la elección de la fase móvil se probaron diferentes mezclas de disolventes bajo diferentes condiciones de elución, isocrática o gradiente. Después de numerosos ensayos se estableció como fase móvil una mezcla de cloroformo-metanol y se observó que la concentración de metanol era crítica; en ausencia de metanol los compuestos eran muy retenidos, cuando la concentración de metanol fue de 2% los compuestos no tenían las retenciones adecuadas y no se lograba la separación. Se intentó un regimen isocrático con metanol a una concentración de 0.5% pero tampoco se obtuvieron buenos resultados. Para superar el

problema y obtener las mejores resoluciones la elución se hizo empleando un gradiente de composición, el gradiente utilizado fue de 0.1 a 0.9 % de metanol aplicado como se indica en la parte experimental.

Para la separación también se probó la programación del flujo, pero los resultados obtenidos no fueron tan satisfactorios como los obtenidos por gradiente de composición que conducen a una selectividad mayor.

La separación de furocumarinas de estructuras semejantes a las determinadas en este trabajo ha sido previamente reportada tanto por CLAE fase inversa (69) como por cromatografía en placa fina (70). Sin embargo, el primer método no resultó muy selectivo por que dos furocumarinas tienen la misma retención y no se logra su separación, en el caso de la cromatografía en placa fina la eficiencia no es muy grande y no se lograron las resoluciones obtenidas por CLAE, modo adsorción.

En las Tablas I y II se resumen los contenidos de metabolitos en las partes estudiadas de la planta, las cantidades mínimas detectables y el factor de capacidad (k') en el sistema cromatográfico empleado.

Las curvas patrón utilizadas en la cuantificación de los compuestos se dan en las Figs. 6 y 8, las curvas correspondientes a la histamina y a la rutina se omitieron. En todos los casos, las curvas patrón fueron lineales en el rango de concentraciones utilizado.

VI CONCLUSIONES

En el trabajo se demuestra que la CLAE constituye una herramienta sumamente útil para efectuar el análisis de mezclas complejas provenientes de extractos de plantas. La combinación de cuatro métodos distintos permitió la determinación de nueve metabolitos de Casimiroa edulis.

El objetivo central del trabajo era la cuantificación de la DMH en extractos orgánicos e infusiones tanto de hoja como de semilla, dado que a este compuesto se ha atribuído la actividad farmacológica de la planta. Dicho objetivo quedó cumplido y superado al encontrar los metabolitos estrechamente relacionados HI y MHI que deben tener una contribución importante al efecto farmacológico.

Un resultado interesante es haber encontrado en la hoja de zapote blanco, la cuál no ha sido sometida a estudios fitoquímicos, los derivados metilados de la histamina, ya que permite establecer una correlación entre el uso popular de la planta y el contenido de metabolitos secundarios con actividad farmacológica.

A lo largo del desarrollo del estudio de los extractos de C. edulis se encontraron tres metabolitos que no habían sido reportados previamente en la planta, MHI, HI y rutina.

Una conclusión importante del trabajo es que mediante el manejo adecuado de las técnicas analíticas a nuestro alcance puede ser posible la estandarización de productos provenientes de plantas, ya sea extractos crudos o semipurificados e infusiones, siendo esta última la forma popularmente utilizada para el consumo de la mayoría de las plantas de uso medicinal.

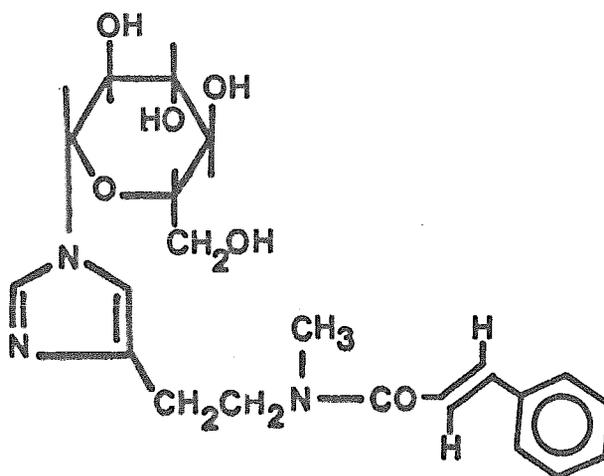
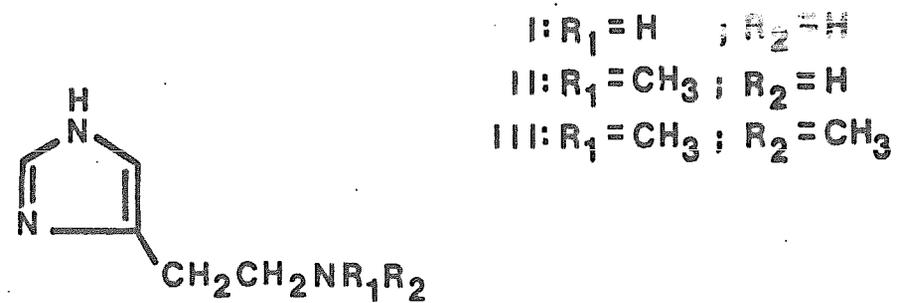
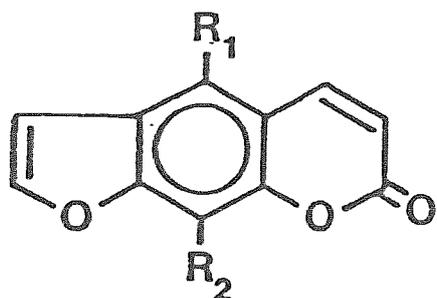


Fig. 1 Estructuras de los compuestos imidazólicos de Casimiroa edulis.
 Histamina (I), N^α -metilhistamina (II),
 N^α, N^α -dimetilhistamina (III) y casimiroe-
 dina.



- I $R_1 = \text{O-geranyl}; R_2 = \text{H}$
- II $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{O-geranyl}$
- III $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{O-geranyl}$
- IV $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OCH}_2\text{CHC}(\text{CH}_3)_2$

Fig. 2 Estructuras de las furocumarinas cuantificadas en la semilla de Casimiroa edulis.

- 5-geraniloxipsoraleno (I)
 8-geraniloxipsoraleno (II)
 5-metoxi-8-geraniloxipsoraleno (III)
 feloptերina (IV)

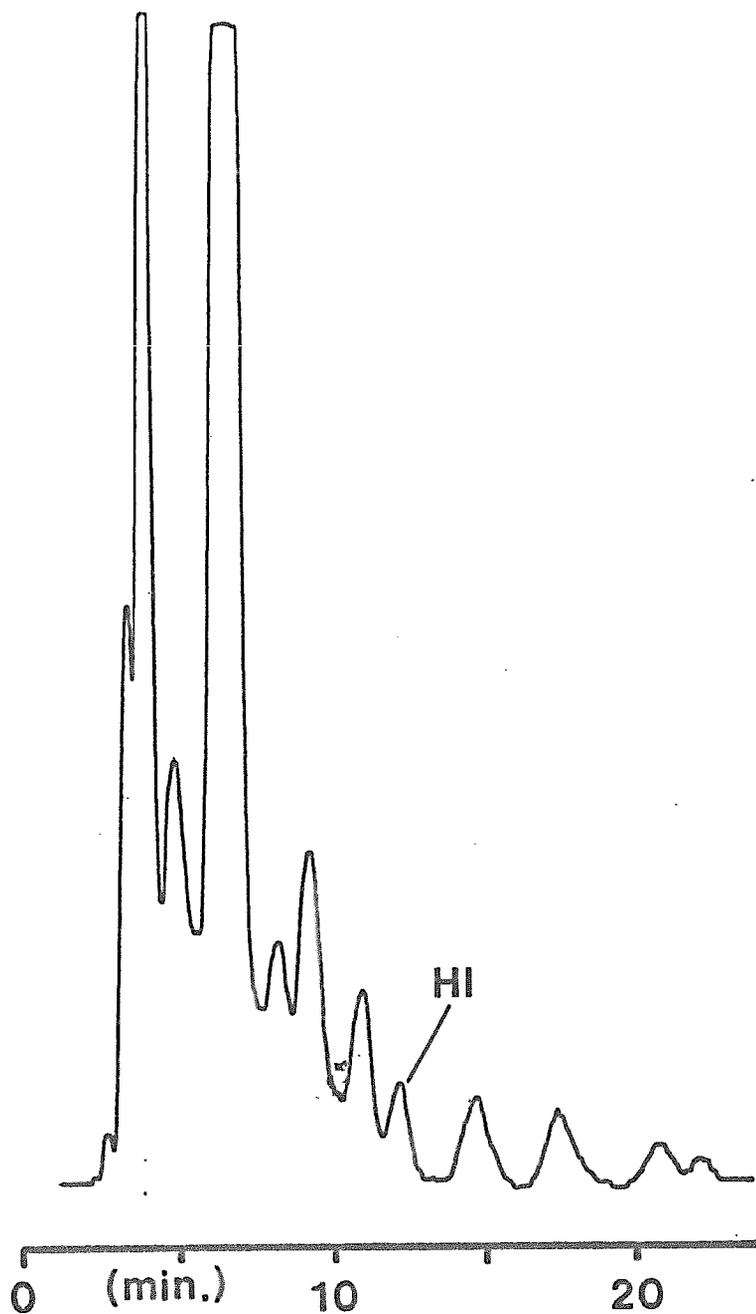


Fig. 3 Cromatograma del extracto metanólico derivado para la determinación de histamina (HI). Columna MCH-10, fase móvil: NaH_2PO_4 2.5×10^{-2} M- MeOH (1:1), flujo 1ml/min y temperatura 40° . Detección por fluorescencia, λ_{exc} 340-380 y $\lambda_{\text{em}} > 400$ nm.

Fig. 4 Mezcla artificial de histidina (HIS), histamina (HI), metilhistamina (MHI), dimetilhistamina (DMH) y casimiroedina (CM) separadas por CPI. Columna Micropack MCH-10, fase móvil: lauril-₂ sulfato de sodio 10^{-3} M, sulfato de sodio 2×10^{-2} M y HClO_4 0.2% en agua-metanol (1:1), flujo de 1 ml/min, temperatura 50° y detección en el UV a 220 nm.

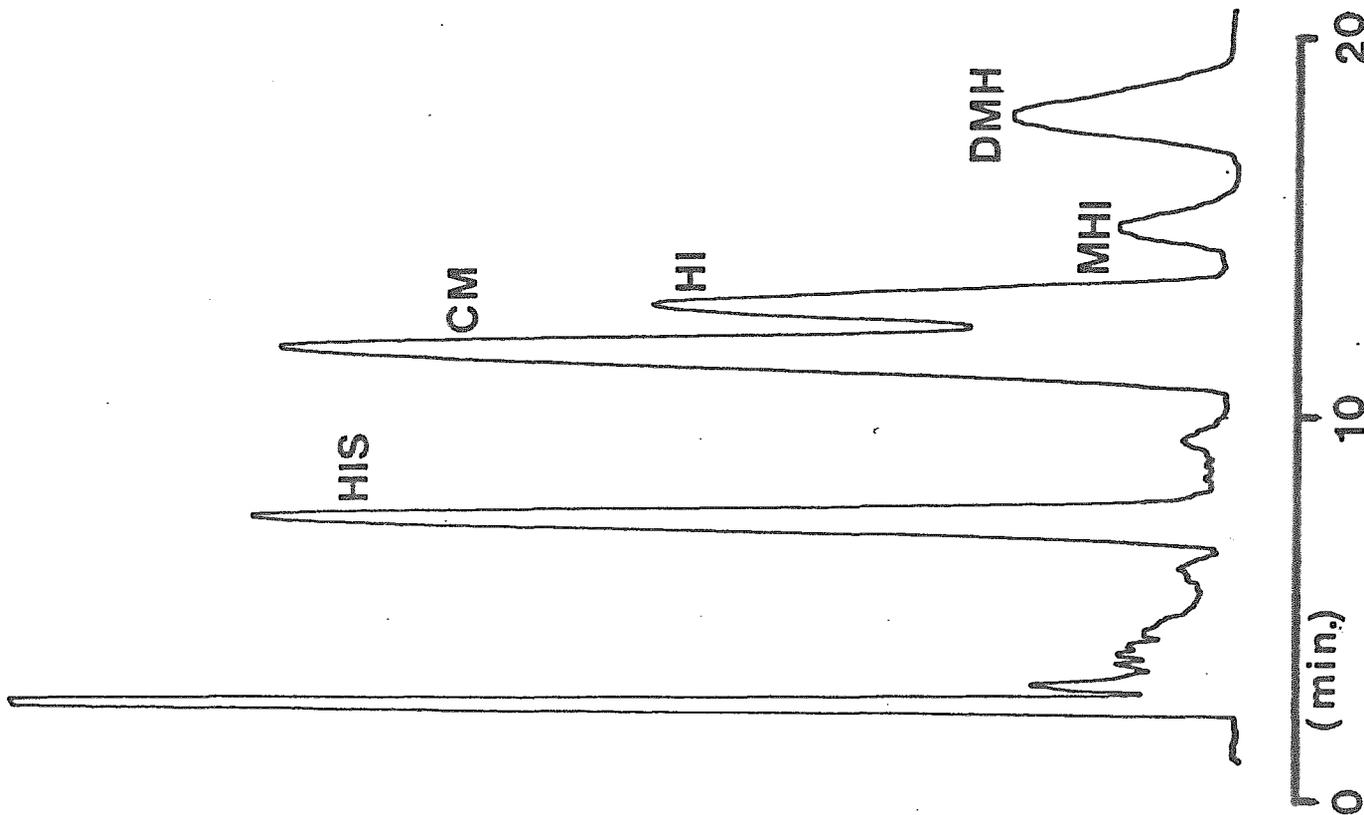
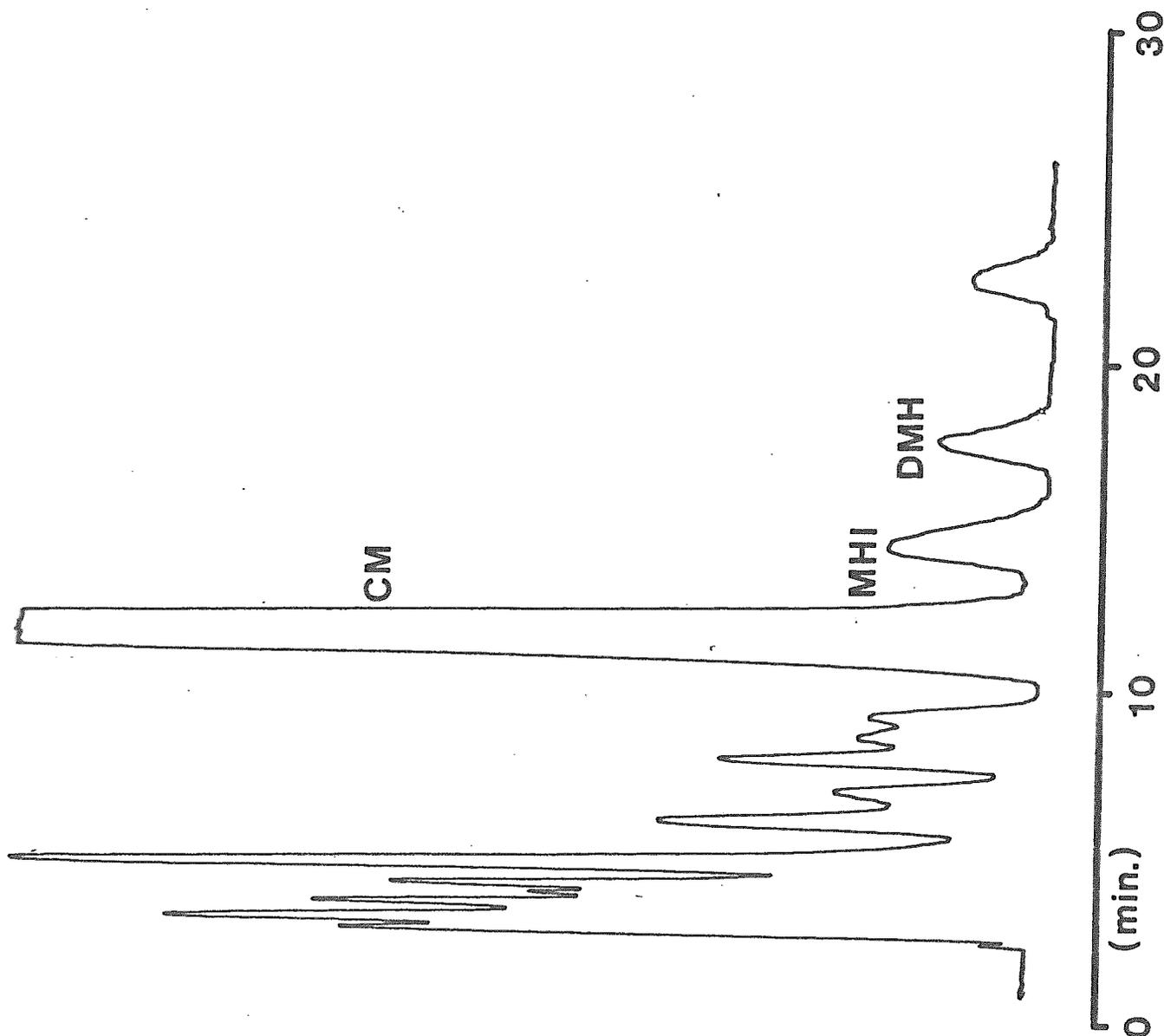


Fig. 5 Perfil cromatográfico del extracto metanólico de semilla de zapote blanco obtenida por CPI. Columna Micropack MCH-10, fase móvil: laurilsulfato de sodio 10^{-3} M, sulfato de sodio 2×10^{-2} M y HClO_4 0.2 % en agua-metanol (1:1), flujo 1 ml/min; temperatura 50° y detección en el UV a 220 nm.



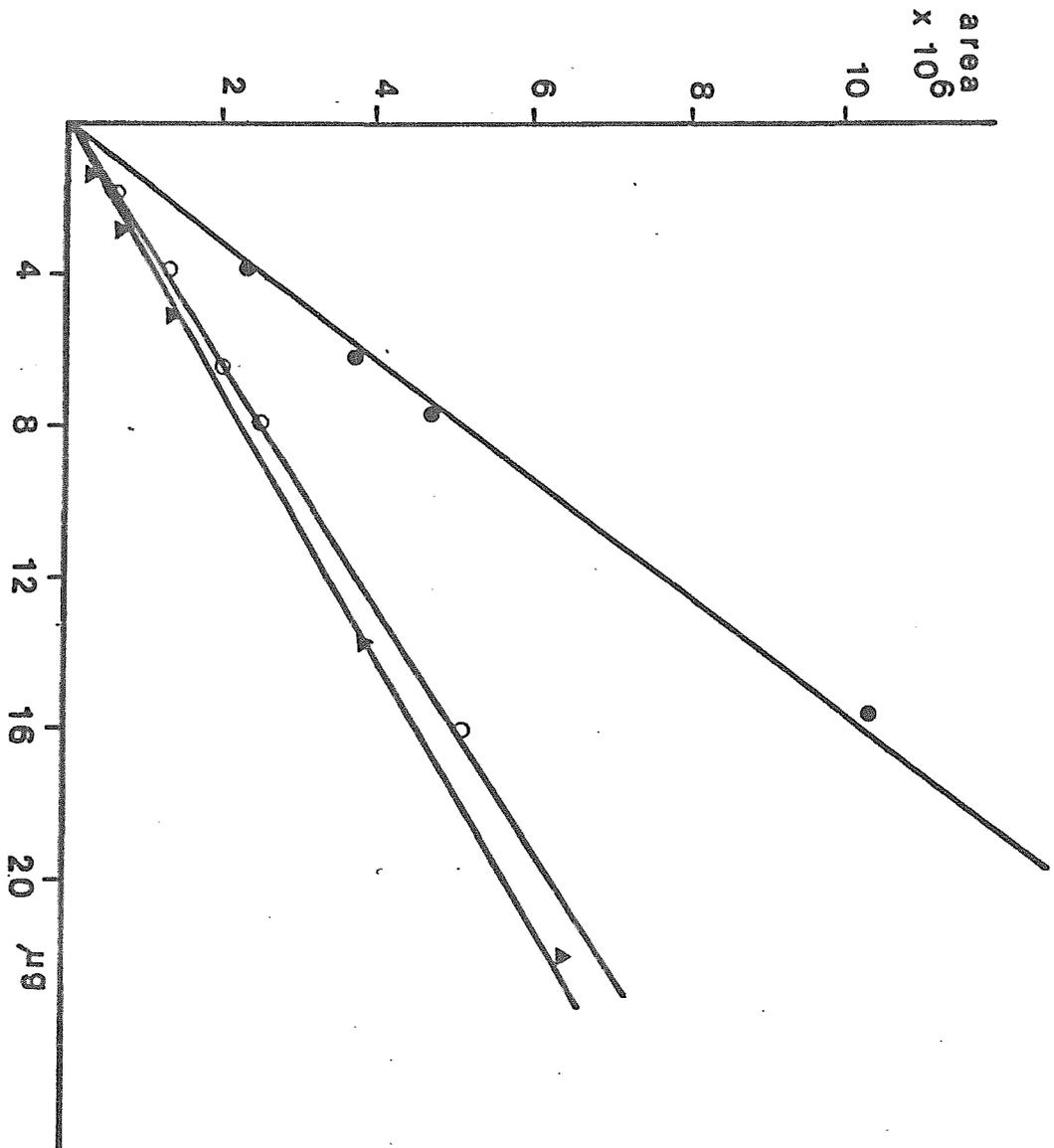


Fig. 6 Curvas de calibración de MHI (\blacktriangle), DMH (\circ) y CM (\bullet). Los coeficientes de regresión son, respectivamente: 0.991, 0.993 y 0.998.

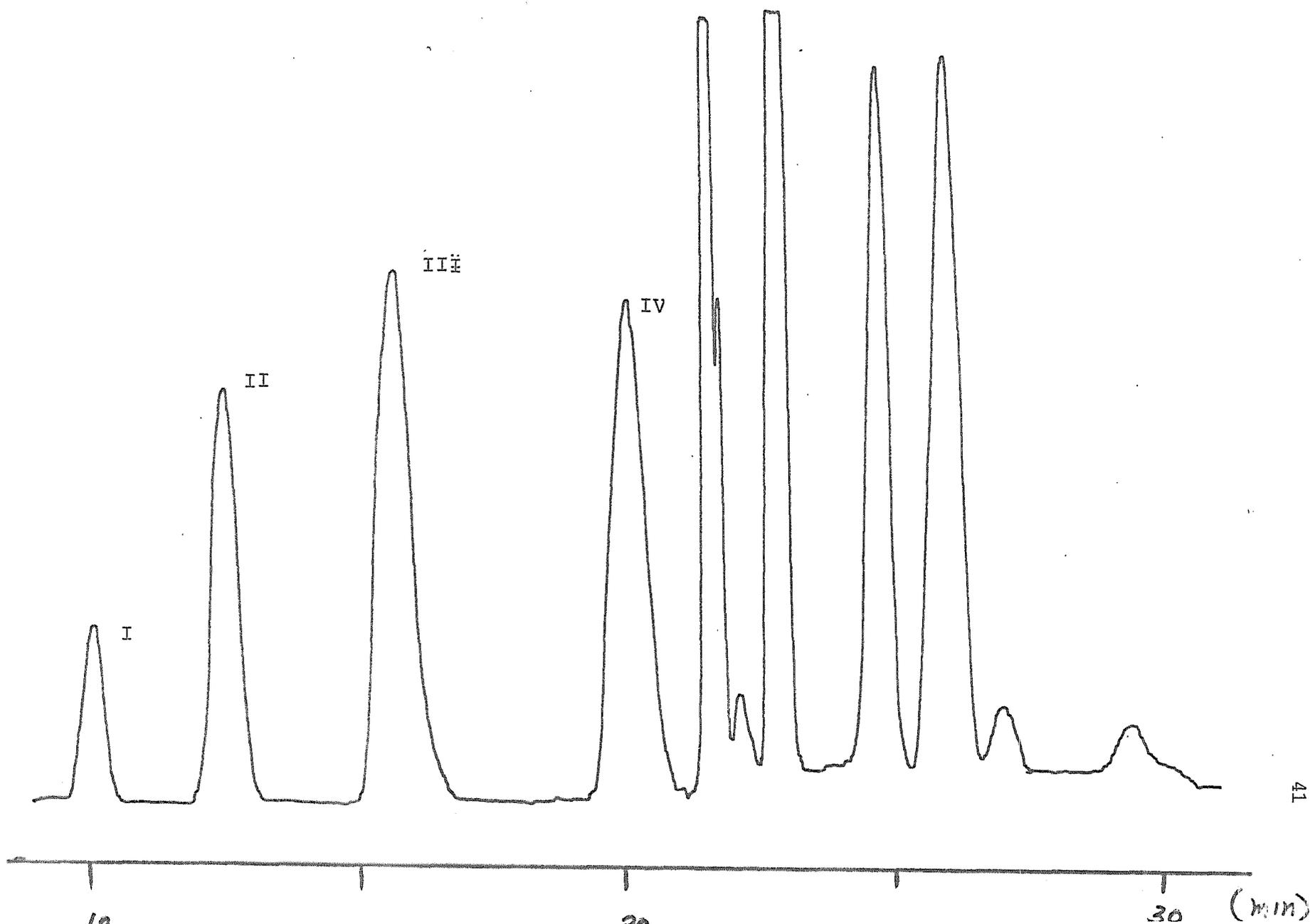


Fig. 7 Perfil cromatográfico del extracto hexánico de semilla de *C. edulis* obtenido por cromatografía de adsorción. Columna Micropack Si-10, fase móvil: cloroformo (A) y cloroformo-metanol (99:1) (B) cuya composición con respecto al tiempo fue:

t (min)	%A	%B
0	90	10
8	50	50
12	10	90

Flujo 1 ml/min, temperatura ambiente (22°) y detección a 270 nm.

5-geraniloxipsoraleno	I
8-geraniloxipsoraleno	II
5-metoxi-8-geraniloxipsoraleno	III
felofterina	IV

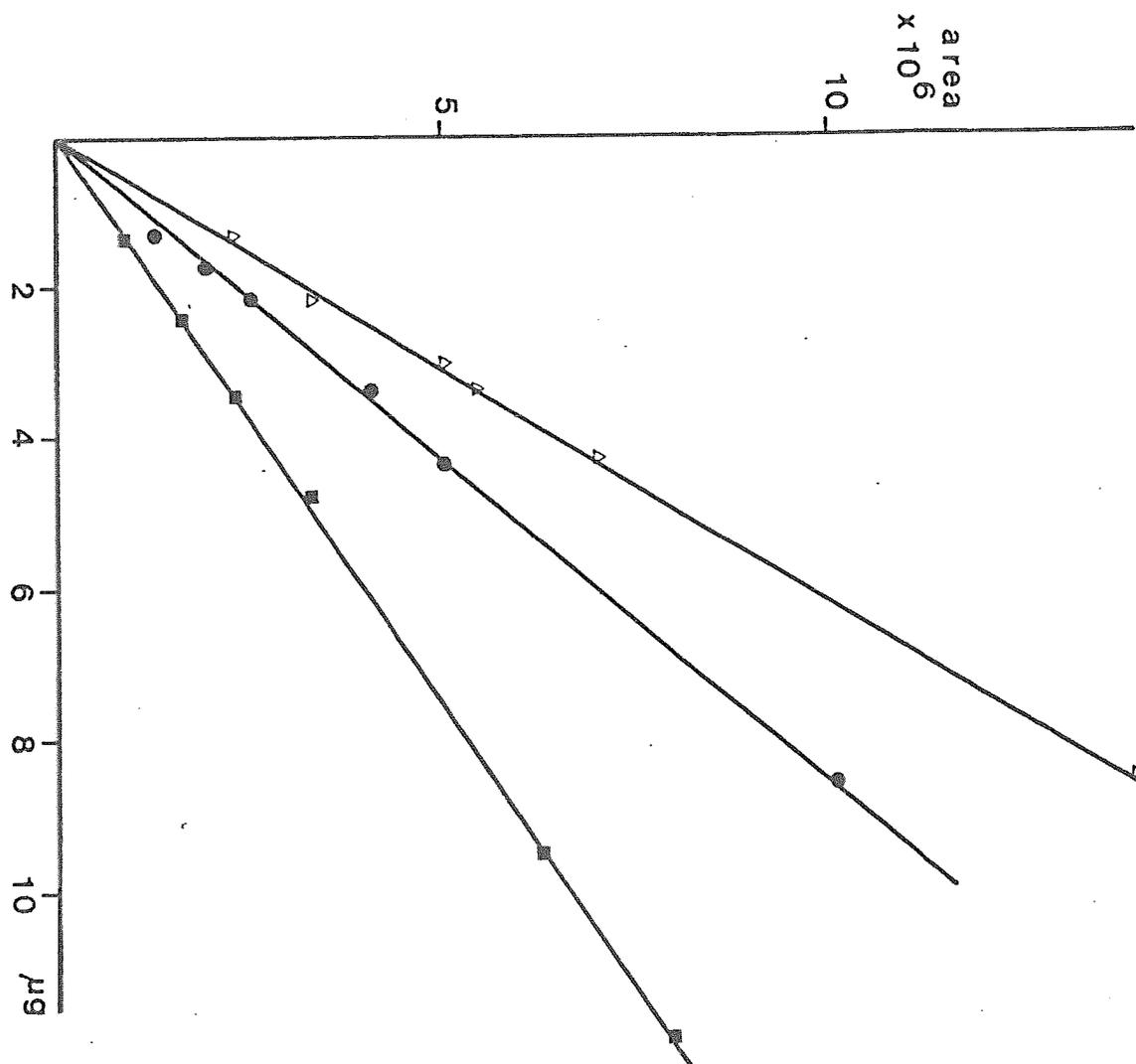


Fig. Curvas de calibración de la 5-geranioloxipsoraleno y 8-geranioloxipsoraleno (■), 5-metoxi-8-geranioloxipsoraleno (●) y felopterin (△). Los coeficientes de regresión (r) son, respectivamente: 0.9992, 0.9997 y 0.9994.

Tabla I. Contenido de metabolitos en hoja y semilla de C. edulis, determinados a partir de los extractos metanólicos y acuosos.

Metabolito	SEMILLAS c, d		HOJAS c, d			CMD ^a (ng)	k' ^b
	ext. MeOH % peso	Infusión mg/ml	ext. MeOH % peso	ext. mt.aq. % peso	Infusión mg/ml		
CM	0.92 ± 0.041	0.21 ± 0.016	_____	_____	_____	70	3.01
HI	0.0035 ± 0.0004	0.0011 ± 0.0001	_____	_____	_____		2.99
MHI	0.16 ± 0.011	0.050 ± 0.004	_____	0.15 ± 0.023	_____	240	4.24
DMH	0.12 ± 0.01	0.047 ± 0.003	_____	0.015 ± 0.01	0.029 ± 0.002	328	5.25
RUTINA	_____	_____	1.24 ± 0.074	_____	_____	60	0.48

a) La cantidad mínima detectable fue establecida como la relación Señal/Ruido = 4

b) k' fue calculada como $\frac{t_r - t_0}{t_0}$

c) Los límites de confianza fueron calculados como se indica en el Apéndice.

d) Los porcentajes se refieren al contenido total en base seca

Tabla II. Contenido de furocumarinas en las semillas de zapote blanco.

Metabolito	% peso ^a	CMD ^b ng	k' ^c
5-gps	0.021 ± 0.0012	70	2.57
8-gps	0.0716 ± 0.0029	90	3.41
5-met-8-gps	0.0711 ± 0.0031	90	4.53
Felopterina	0.0529 ± 0.0020	90	6.07

gps = geraniloxipsoraleno

met = metoxi

a) El porcentaje en peso está dado sobre base seca

b) La cantidad mínima detectable fue determinada como la relación señal/ruido = 4

c) Los factores de capacidad k' se determinaron como:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

VII BIBLIOGRAFIA

- 1.- X. Lozoya y R. Enríquez, E zapote blanco, Investigación sobre una planta medicinal mexicana, CONACYT, México 1981.
- 2.- M. Litter, Farmacología, Editorial El Ateneo, 1980.
- 3.- a) R. T. Major y F. Dursch, J. Org. Chem. 23, 1567 (1958)
b) J. S. Ling, S. Y. P'an y F. A. Hochstein, J. Pharmacol. Exptl. Therap. 122, 44A (1958).
c) X. Lozoya, D. Rodríguez, J. Ortega y R. Enríquez, Arch. Invest. Med. (MEX) 9, 565 (1978).
- 4.- a) A. M. Berrie, B. A. Knights y M. R. Hendrie, Phytochemistry 7, 567 (1968).
b) G. Rodghiero, P. Chandra y A. Wacker, FEBS Letters 10, 29 (1970).
- 5.- a) F. Hernández, Historia de las plantas de la Nueva España, UNAM, México 1959.
b) B. Sahagún, Historia general de las cosas de la Nueva España, Porrúa, México 1975.
c) A. Farfán, Tratado breve de medicina y de todas las enfermedades, México 1592.
d) F. Ximénez, Plantas, animales y minerales de la Nueva España usados en la medicina,
- 6.- J. Sánchez, Breve estudio sobre la almendra del fruto de zapote blanco, Tesis, Facultad de Medicina, UNAM, México 1893.
- 7.- S. García Carmona, Contribución al estudio del zapote blanco, Tesis, Facultad de Medicina, UNAM, México 1933.
- 8.- J. de Lille, Anales del Instituto de Biología, 45, (1934).
- 9.- F. A. Kincl, J. Romo, G. Rosenkranz y F. Sondheimer, J. Chem Soc. 4163 (1956).
- 10.- C. Djerassi, C. Bankiewicz, A. L. Kappor y B. Riniker, Tetrahedron 2, 178 a (1958).
- 11.- R. P. Panzica y L.L. Townsend, J. Amer. Chem. Soc. 95, 8737 (1973).

- 12.- D. A. Ackermann, F. Holtz y H. Reiwein, Zeitschrift fuer Biologie 82, 278 (1924).
- 13.- P. H. List, Arch. der Pharmazie 291, 502 (1958).
- 14.- W. Appel y E. Werle, Arzneimittel-Forschung 9, 22 (1959).
- 15.- N. R. Ferrigni, D. E Nichols, L. L. McLaughlin y R. Bye, J. Ethnopharmacology 5, 395 (1982).
- 16.- D. L. Dreyer, J. Org. Chem. 33, 3577 (1968).
- 17.- J. Iriarte, F. A. Kincl, G. Rosenkranz y F. Sondheimer, J. Chem. Soc. 4170 (1956).
- 18.- a) R. Mechoulum, F. Sondheimer, A. Milera y F. A. Kincl, J. Chem. Soc. 83, 2022 (1960).
b) R. Mechoulum y A. Hirshfeld, Tetrahedron 23, 239 (1967).
- 19.- A. Z. Adyshev y I. Brodskii, Leningr. San-Gigien. Med.In-Ta 108, 87 (1975). Chemical Abstracts 84: 132 d
- 20.- M. Tswett, Proc. Warsaw. Soc. Nat. Sci. (Biol.) 14 (6) 1903
- 21.- J. J. Kirkland, J. Chromatogr. Sci. 7, 7 (1969).
- 22.- J. F. K. Huber, J. Chromatogr. Sci. 7, 85 (1969).
- 23.- C. G. Hovart, B. A. Preiss, S. R. Lipsky, Anal. Chem. 39, 1422 (1967).
- 24.- J. N. Done, Practical High Performance Liquid Chromatography, Heyden, London 1976, pag. 69.
- 25.- H. M. Mc Nair y C. D. Chandler, J. Chromatogr. Sci. 12, 425 (1974).
- 26.- H. M. Mc Nair y C. D. Chandler, J. Chromatogr. Sci. 14, 477 (1976).
- 27.- N. A. Parris, Instrumental Liquid Chromatography, Elsevier, Amsterdam 1976, Capitulo 2.
- 28.- R. A. Henry, Modern Practice of Liquid Chromatography, Wiley Interscience, New York 1971, Capitulo 2.
- 29.- B. Fleet y C. J. Little, J. Chromatogr. Sci. 12, 747 (1974).
- 30.- J. Polesuk y D. G. Howery, J. Chromatogr. Sci. 11, 226 (1973).

- 31.- H. Engelhardt, High Performance Liquid Chromatography, Spring-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York 1979.
- 32.- R. J. Dolphin , F. W. Willmott, A. D. Mills, L. P. J. Hoogeveen; J. Chromatogr. 122, 359 (1976).
- 33.- J. J. Szakasits, R. E. Robinson; Anal. Chem. 46, 1648 (1974).
- 34.- W. H. Fadden, H. L. Schwartz, S. Evans; J. Chromatogr. Sci. 11, 263 (1973).
- 35.- J. F. Haw, T. E. Glass, D. W. Hausler, E. Motell y H. C. Dorn; Anal. Chem. 52, 1135 (1980).
- 36.- D. W. Armstrong y S. Henry; J. Liq. Chromatogr. 3, 657 (1980).
- 37.- D. W. Armstrong y F. Nome; Anal. Chem. 53, 1662 (1981).
- 38.- L. R. Snyder y J. J. Kirkland, Introduction to modern liquid chromatography, Wiley Interscience, 1979.
- 39.- D. Mikes, Laboratory Handbook of chromatographic and allied methods, Ellis Horward series in Analytical Chemistry
- 40.- E. Engelhardt, High performance liquid chromatography, Spring Verlag, Berlin 1979.
- 41.- B. L. Karger, L. R. Snyder y C. Hovart, An introduction to the separation science, Wiley-Interscience, New York 1973.
- 42.- J. C. Giddings, Dynamics of Chromatography, Dekker, New York 1965.
- 43.- S. Eksborg y G. Schill; Anal. Chem 45, 2092 (1973).
- 44.- J. C. Krak, K. M. Jonker, J. F. K. Huber; J. Chromatogr. 142, 671 (1977).
- 45.- N. E. Hoffman, J. C. Liao; Anal. Chem. 49, 2231 (1977).
- 46.- P. T. Kissinger; Anal. Chem. 49, 883 (1977).
- 47.- J. L. M. Van de Venne, J. L. H. M. Hendrikx and R. S. Deedler; J. Chromatogr. 167, 1 (1978).
- 48.- C. Hovarth, W. Melander, I. Mólнар y P. Mólнар; J. Chromatogr. 125, 129 (1976).
- 49.- D. P. Wittmer, N. O. Nuessle y W. G. Honey, Jr; Anal. Chem. 47, 1422 (1975).

- 50.- C. M. Riley, E. Tomlinson y J. M. Jefferies; J. Chromatogr. 185, 197 (1979).
- 51.- D. Westerland y A. Theodorsen; J. Chromatogr. 144, 27 (1977).
- 52.- L. E. Vera, Contribution a l'etude du mecanisme de rétention en chromatographie de paires d'ions, Tesis Universite Pierre et Marie Curie, Paris VI, 1980.
- 53.- J. H. Knox y R. A. Hartwick; J. Chromatogr. 204, 3 (1981).
- 54.- J. H. Knox, G. R. Laird; J. Chromatogr. 122, 17 (1976)
- 55.- R. C. Kong, B. Sachok y S. N. Deming; J. Chromatogr. 199, 307 (1980).
- 56.- J. H. Knox y J. Jurand; J. Chromatogr. 203, 85 (1981).
- 57.- W. S. Hancock, C. A. Bishop, R. L. P. Tidge, D. R. Harding y M. T. W. Hearn; J. Chromatogr. 153, 391 (1978).
- 58.- G. C. Clark, Isolation and identification of drugs Vol. 1, Pharmaceutical Press, London 1978.
- 59.- C. W. Gehrke, C. W. Gehrke Jr, T. D. Cunningham, K. C. Kuo, K. O. Gerhardt, H. D. Johnson y C. H. Williams; J. Chromatogr. 162, 293 (1979).
- 60.- T. B. Paiva, M. Tomonaga y A. C. M. Paiva, J. Med. Chem. 13, 689 (1970).
- 61.- H. Nakamura, C. L. Zimmerman y J. J. Pisano, Anal. Biochem. 93, 423 (1979).
- 62.- F. Perini, J. B. Sadow y C. B. Hixson; Anal. Biochem. 94, 431 (1979).
- 63.- Fong-Li Lieu, High resolut. Chromatogr. Commun. 3, 89 (1980). Chemical abstracts 92:176745 k
- 64.- H. Mita, H. Yasueda y T. Shida; J. Chromatogr. 175, 339 (1979).
- 65.- H. Mita, H. Yasueda y T. Shida; Iyo Masu Kenkyukai 4, 177 (1979). Chemical abstracts 92: 176795 b
- 66.- P. H. Elworthy, K. J. J. Mysels; Colloid Interface Sci. 21, 331 (1966).
- 67.- A. A. Quereschi, N. Prentice y W. C. Burger; J. Chromatogr. 170, 343 (1979).
- 68.- T. Okuda, K. Mori, K. Seno y T. Hatano; J. Chromatogr. 171, 313 (1979).

- 69.- Van der Sluis, J. Van Archel, F. L. Fischer y R. P. Labadie; J. Chromatogr. 214, 341 (1981).
- 70.- K. Vande Castele, H. Geiger y C. F. Van Sumere; J. Chromatogr. 258, 111 (1983).

APENDICE

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE ESTANDARES

Furocumarinas

El extracto crudo se obtuvo de la maceración en hexano a temperatura ambiente de 600 g de semilla seca molida, posteriormente se hizo la cromatografía en una columna empacada con sílice desactivada (5% de agua), la elución se inició con hexano y se fueron adicionando pequeños porcentajes de acetato de etilo hasta una concentración de 15 %. Las fracciones cromatográficas fueron monitoreadas por cromatografía en placa fina y por su espectro de RMN- H^1 , aquellas que el espectro mostraron las insaturaciones características furano/lactona se seleccionaron para una mayor purificación.

Las furocumarinas felopterina y 5-geraniloxipsoraleno fueron separadas en forma pura directamente, mientras que las dos restantes 8-geraniloxipsoraleno y la 5-metoxi-8-geraniloxipsoraleno se obtuvieron como una sustancia aceitosa. Estos compuestos fueron separados por cromatografía en placa fina preparativa utilizando como fase móvil diclorometano puro. El complejo aceitoso fue aplicado en las placas y corrido tres veces con el diclorometano recién destilado. La recuperación de los compuestos se efectuó tratando la sílice raspada de la placa con una mezcla cloroformo -metanol en proporción 9:1

Características espectrales

3-GERANILOXIPSORALENO.- Cristales de color amarillo pálido, p.f. 57-58°; 1H -RMN (δ): sistema AB lactona \int_A 7.78, \int_B 6.38 (1H cada una, d, J=10 Hz); 7.38 (1H, s), sistema AB furánico \int_A 7.71, \int_B 6.83 (1H cada una, d), 5.04 (2H, d, J=7Hz) 2.01 (4H, d), 1.68, 1.63 y 1.56 (3H cada una, s). UV: λ_{max} : 302, 265, 250, 243 y 223 nm.

5-GERANILOXIPSORALENO.- Cristales ligeramente amarillentos, p.f. 54-55°; 1H -RMN (δ): sistema AB lactona \int_A 8.16 (1H, dd,

$^3J = 10\text{Hz}$, $^5J \sim 1\text{Hz}$), δ_B 6.28 (1H, d), sistema AB furánico δ_A 7.61, δ_B 6.96 (1H, dd, $J^3 = 2\text{ Hz}$, $J^5 \sim 1\text{Hz}$), 7.15 (1H, dd, $2J^5 \sim 1\text{Hz}$), 5.56 (1H, t, $J = 7\text{ Hz}$), 5.09 (1H, m), 4.97 (2H, d, $J = 7\text{ Hz}$), 2.10 (4H, d), 1.68 (6H, s) y 1.60 (3H, s).
UV: λ_{max} : 310, 259, 250, 244, 220 y 210 nm.

5-METOXI-8-GERANILOXIPSORALENO.- Cristales amarillo pálido, p.f. 56-58°; $^1\text{H-RMN}$ (δ): sistema AB lactona δ_A 7.01, δ_B 7.63 (1H cada una, d, $J = 10\text{ Hz}$), sistema AB furánico δ_A 7.64, δ_B 7.01 (1H cada una, $J = 2\text{Hz}$), 5.61 (1H, t, $J = 7\text{Hz}$), 5.03 (1H, m), 4.88 (1H, d, $J = 7\text{Hz}$), 4.17 (3H, s), 2.00 (4H, d), 1.64 (6H, s), 1.56 (3H, s). UV: λ_{max} : 312, 267, 250 y 238 nm.

5-METOXI-8-DIMETILALILPSORALENO.- Cristales amarillos, p.f. 100-101°; $^1\text{H-RMN}$ (δ): sistema AB lactona δ_a 7.01, δ_B 7.63 (1H cada una, d, $J = 10\text{ Hz}$), 5.62 (1H, t, $J = 7\text{ Hz}$), 4.86 (2H, d, $J = 7\text{Hz}$), 4.18 (3H, s), 1.70 y 1.74 (2H, d).
UV: λ_{max} 311, 269, 247 y 240nm.

Rutina y Casimiroedina

Estos compuestos fueron comparados directamente con muestras auténticas.

Tratamiento estadístico de los resultados obtenidos

Las curvas patrón fueron ajustadas por el método de mínimos cuadrados de acuerdo a las siguientes relaciones:

$$a = \frac{(\sum x^2)(\sum y) - (\sum x)(\sum y^2)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

El coeficiente de regresión se calculó como:

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{[\sum (x_i - \bar{x})^2][\sum (y_i - \bar{y})^2]}}$$

Los coeficientes de regresión para cada una de las curvas se dan en la figura correspondiente.

Los intervalos de confianza para el contenido de cada metabolito se determinaron con los resultados obtenidos a partir de la curva patrón. En cada caso se prepararon 4 extractos provenientes del mismo lote de material vegetal y a partir de éstos se hicieron las soluciones que fueron inyectadas al sistema cromatográfico correspondiente. Los cálculos se hicieron para un nivel de significancia del 95%. La relación utilizada fue:

$$\bar{\mu} = \bar{x} \pm t_{\alpha/2} \frac{\hat{\sigma}}{\sqrt{n}}$$

donde: $n=4$

$$df = n-1$$

$$\alpha = 5\%$$

\bar{x} = media de las cuatro determinaciones

$\bar{\mu}$ = media de la población