

Optimización del análisis mediante cromatografía líquida de metabolitos de la planta *Uncaria tomentosa* (uña de gato) utilizando el método simplex secuencial

Eric Romero Blanco ¹

Palabras clave

Cromatografía líquida, *Uncaria tomentosa*, optimización, simplex secuencial.

Resumen

Se desarrolló un método para el análisis mediante cromatografía líquida de metabolitos presentes en extractos de corteza de raíz de la planta *Uncaria tomentosa* (uña de gato). Se aplicó la técnica de simplex secuencial para determinar la magnitud de las variables cromatográficas: flujo, temperatura y composición de fase estacionaria, que permitieron optimizar el tiempo de elusión y la resolución de la separación cromatográfica. El análisis cromatográfico se realizó en modo isocrático, empleando una columna C12 (-urea) de 15 cm de largo y 4,6 mm de diámetro y detector UV. La magnitud de las variables cromatográficas que optimizaron la separación resultaron ser:

flujo de 1,80 mL/min, temperatura de 27,5 °C y una composición de la fase móvil de 22:78 (metanol:butter).

Introducción

El uso de la cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR) brinda una herramienta eficiente para el análisis de la concentración y naturaleza de metabolitos presentes en extractos de plantas, medicinales. Dado el gran número de metabolitos presentes en los extractos de plantas muchas veces se enfrenta con la problemática de obtener cromatogramas caracterizados por una baja resolución y excesivos tiempos de elusión. La posibilidad de contar con un método que permita determinar la magnitud de las variables cromatográficas, tales como flujo, temperatura y composición de la fase móvil para la mejor resolución y el menor tiempo de elusión posibles, es clave a la hora de enfrentar esta clase de análisis complejos. La técnica de

¹ Químico industrial, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Química, Laboratorio CEQIATEC, Cartago, Costa Rica. Tel.: 550-2368. Correo electrónico: eromero@costarricense.cr

simplex secuencial ha sido ampliamente utilizada en los últimos años como una forma eficiente y sencilla de optimizar señales analíticas, en función de variables instrumentales. Las bondades medicinales de la planta *Uncaria tomentosa* han sido extensamente reportadas en la literatura. Entre los metabolitos a los cuales se les atribuye la gran mayoría de los efectos reportados están los alcaloides oxindólicos presentes principalmente en la corteza de la raíz de la planta. Los resultados del presente trabajo son parte del desarrollo e implementación de un método mediante CLAR, que permita analizar la presencia de alcaloides oxindólicos en la corteza de raíz de plantas de *Uncaria* recolectadas en zona de Guápiles, Costa Rica. Se realiza la optimización mediante simplex secuencial, del tiempo de elusión y resolución de la separación cromatográfica de extractos de la planta, en función del flujo, temperatura y composición de la fase móvil. Si bien es cierto en la literatura ya se reportan métodos para el análisis de estos alcaloides mediante CLAR, nos encontramos con que al tratar de implementar estos en nuestro laboratorio se obtienen altos tiempos de elusión y bajas resoluciones.

Materiales y equipo

Material vegetal

La corteza de raíz de *Uncaria tomentosa* fue recolectada de la zona de Guápiles (Millón), Costa Rica. Fragmentos frescos de corteza fueron secados por un período de 48 horas a una temperatura de 45-50 °C. El material seco fue posteriormente molido y tamizado. Se almacenó en bolsas plásticas y se puso en refrigeración hasta el momento de la extracción.

Reactivos

Methanol (OmniSolv®), Amoníaco (Mallinckrodt®), H₃PO₄ 85% (JTBaker®), KH₂PO₄ (JTBaker®), agua

destilada/desionizada, *buffer* de fosfato: 25 mmol KH₂PO₄ a pH 3,0 con H₃PO₄.

El metanol y *buffer* de fosfato utilizados en la preparación de la fase móvil cromatográfica fueron filtrados mediante filtros de nailon de 0,45 μm y posteriormente desgasificados por burbujeo con helio.

Equipo

El sistema CL utilizado consistió de una bomba Perkin Elmer series 200, detector UV/Vis Perkin Elmer LC 295, y sistema de inyección con temperatura controlada Perkin Elmer 101.

Se utilizó una columna Prism®-RPN (ThermoHypersil) de 150 mm de largo y 4,6 mm de diámetro.

Procedimiento

Extracción de metabolitos

Se procedió a macerar 0,25 g de material seco de corteza de raíz de *Uncaria* en 10 mL de mezcla extractora metanol: amoníaco 10% (50:1)

El extracto alcalino obtenido fue filtrado a través de filtros de nailon de 0,2 μm y recolectado en viales de vidrio, los cuales se mantuvieron en congelación (< -10 °C) hasta el momento del análisis cromatográfico.

Función de respuesta cromatográfica

El objetivo que se busca en toda separación cromatográfica es el lograr la máxima resolución en el menor tiempo de análisis posible. La función de respuesta cromatográfica (*FRC*) es una expresión mediante la cual se definen las características de resolución y tiempo de análisis deseados en función de los parámetros experimentales adecuados. En nuestro caso, la expresión utilizada fue:

$$FRC = \sum R_i + L^a - b \cdot |T_M - T_L| - c \cdot |T_0 - T_1|$$

en la cual: R_I es la resolución entre pares de señales cromatográficas adyacentes, y su valor se limita a un máximo de 2,0, de tal forma que todas las señales que presenten una buena resolución no contribuyen a la FRC ; L es el número total de señales cromatográficas detectadas o consideradas en el análisis, T_M es un tiempo definido de análisis aceptable; T_L es el tiempo de retención de la última señal cromatográfica, T_I es el tiempo de retención de la primera señal, T_0 es un tiempo de retención mínimo; y a, b, c son constantes de peso cuyos valores se definen de forma arbitraria (igual a 1 en nuestro caso).

Optimización cromatográfica: variables experimentales

La optimización cromatográfica mediante la utilización del método de simplex secuencial se realizó por la maximización de la FRC en función de las variables experimentales (factores) flujo, temperatura y composición de la fase móvil. La temperatura se limitó al ámbito de 23 a 40 °C ($\pm 0,5$). El flujo se permitió variar en un ámbito de 0,8 a 2,0

mL/min. La composición de la fase móvil permitida fue de 10 a 30% en metanol (90 a 70% en *buffer* pH 3,0). La longitud de onda se mantuvo constante en 247 nm.

Resultados

El resultado de la optimización del análisis cromatográfico mediante simplex secuencial se muestra en la Figura 1. La optimización se logra cuando, al variar secuencialmente las condiciones cromatográficas de flujo, temperatura o composición de la fase móvil, siguiendo reglas bien establecidas por el método simplex, se logra maximizar y estabilizar la FRC . Para nuestro caso, la optimización se alcanzó luego de realizar 15 experimentos. En la Figura N.º 1. se aprecia como a partir del experimento N.º 13 no se obtuvo un cambio significativo en la magnitud óptima de la FRC , a pesar de subsiguientes modificaciones (simplex N.º 14 y 15) de las condiciones cromatográficas estudiadas.

El cromatograma correspondiente al experimento N.º 13 se muestra en la Figura N.º 2. En este se puede apreciar una excelente resolución y tiempo de elusión, a pesar del importante número de señales (metabolitos) que el extracto de *Uncaria* presenta a 247 nm.

Algo importante de mencionar es que a partir de un análisis del comportamiento de la FRC frente a los cambios experimentados por las condiciones cromatográficas (i.e., flujo, temperatura y composición de fase móvil), se establece que la temperatura tuvo el efecto más significativo sobre la magnitud de la FRC hasta que se logró alcanzar el óptimo.

Conclusiones

El utilizar el método de simplex secuencial como herramienta de

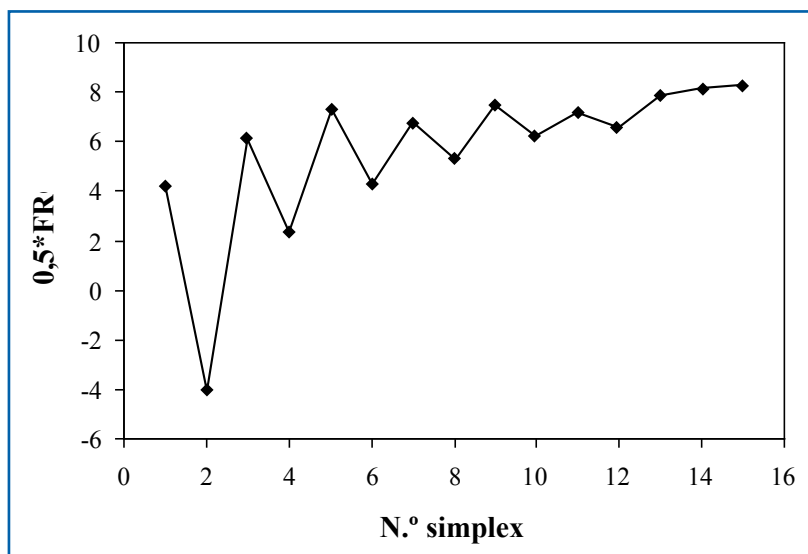


Figura N.º 1. Comportamiento de la función de respuesta cromatográfica (FRC) durante el proceso de optimización mediante simplex secuencial.

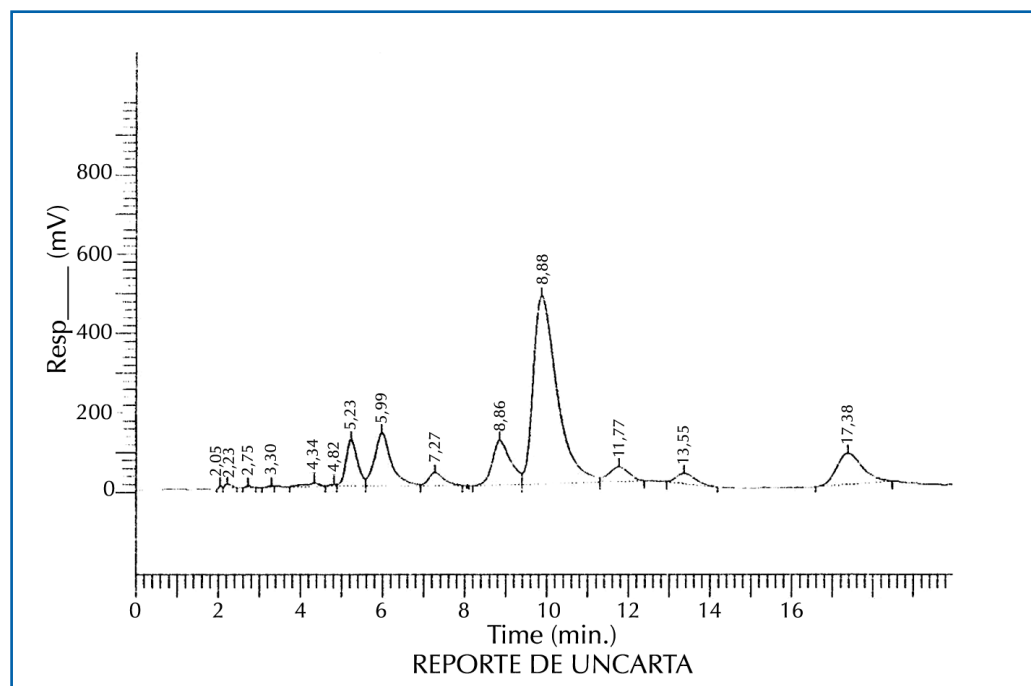


Figura N.º 2. Análisis mediante cromatografía de gases-NPD y extracción en fase sólida de una muestra de leche cruda: elusión de estándares (cromatograma superior), elusión de la muestra (cromatograma inferior). *Se indica la detección en la muestra del organofosforado Coumafos (ej. Asuntol).

optimización permitió mejorar de manera significativa el tiempo de elusión y resolución del análisis de los metabolitos presentes en extractos de raíz de *Uncaria tomentosa* mediante CLAR, con miras a detectar de una mejor manera la presencia de alcaloides oxindólicos. Se comprobó la eficiencia del simplex secuencial en la optimización de separaciones cromatográficas (CLAR) complejas.

Este trabajo forma parte de las actividades del proyecto: “Plan para la promoción del conocimiento y el aprovechamiento de la *Uncaria tomentosa* (uña de gato) en tres comunidades de la región atlántica de Costa Rica.”, realizado con fondos de la Vicerrectoría de Investigación del Instituto Tecnológico de Costa Rica y FundeCooperación.

Bibliografía

- Berridge, J. C., Morrissey, E. G. 1984. *J. Chromatogr.* 316, 69.
- Berridge, J. C. 1984. *Analyst*, 109, 291.
- Obregón V. 1994. *Uña de gato: Género Uncaria. Estudios botánicos, químicos y farmacológicos de Uncaria tomentosa y Uncaria guianensis*. Instituto de Fitoterapia Americano. Lima, Perú.
- Robbers, J.E.; Speedle, M.K. V.E. 1996. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Tyler Baltimore, Williams & Webius.
- Senatore, A.; Cataldo, A.; Lasccarino, F. P.; Elberti, M. G. 1989. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 65, 517.
- Walters, F. H., Parker, L. K., Morgan, S. L. (Jr.) y Deming, S. N. 1991. *Sequential Simplex Optimization: A Technique for Improving Quality and Productivity in Research, Development and Manufacturing*, CRC Press, Boca Raton.