

## DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO (HPLC) PARA DERIVADOS CUMARÍNICOS

**Raquel Nava Álvarez**

*Instituto Politécnico Nacional,UPIBI*

[rnavaa@ipn.mx](mailto:rnavaa@ipn.mx)

**Minerva Juárez Juárez**

*Instituto Politécnico Nacional,UPIBI*

[mjuarezju@ipn.mx](mailto:mjuarezju@ipn.mx)

**Efrén Venancio García Baez**

*Instituto Politécnico Nacional,UPIBI*

[egarciaba@ipn.mx](mailto:egarciaba@ipn.mx)

### Abstract

*La úlcera péptica se ha convertido en una enfermedad de salud pública a nivel mundial, se ha reportado que un 15-20% de la población mexicana, de entre 25 y 44 años principalmente, la padece, ubicándose entre las 20 principales causas de mortalidad en México en el año 2013<sup>1</sup>. En las últimas décadas se han investigado nuevas moléculas que puedan contrarrestar a esta enfermedad como son los derivados cumarínicos<sup>2</sup>. Actualmente, existe un interés por la investigación de las cumarinas debido a sus propiedades terapéuticas. En el presente trabajo se analizó el Ácido Salicílico Amido Cumarínico (ASAC) y como estándar a la Ranitidina mediante HPLC, ya que servirán de base para cuantificar en diferentes muestras biológicas, debido a que la cromatografía es una técnica rápida, eficiente y reproducible, que cumple un amplio espectro de aplicaciones siendo además un buen método analítico cuantitativo.*

*Palabras clave: cumarinas, cromatografía, HPLC,*

El tracto gastrointestinal está continuamente expuesto a diversas sustancias y factores agresivos como: pH del estómago, temperatura, fármacos y agentes bacterianos que son capaces de causar reacciones inflamatorias locales y sistémicas que en su conjunto dañan la mucosa (Jacobson, 1982).

El mecanismo protector contra el daño de la capa interna gástrica es la “mucosa gástrica”, compuesta por un revestimiento de moco y la integridad de la membrana mucosa (Pineda, 2013).

Los principales factores que provocan úlceras pépticas se pueden agrupar en factores fisiopatológicos y factores genéticos.

Los gastroprotectores son fármacos de gran utilidad en el tratamiento de varias enfermedades crónicas asociadas a disfunciones gástricas y como protección en pacientes que usan medicamentos ulcerogénicos (Quintana, 2012).

Además de la Ranitidina, la gastroprotección la producen muchos extractos vegetales que presentan terpenoides, alcaloides, taninos, glucósidos y esteroides y, en estudios recientes, cumarinas.

Las cumarinas son productos naturales que pertenecen al grupo de compuestos conocidos como benzopironas, consistentes en un anillo bencénico unido a una pirona. Un ejemplo es el ácido salicil amido cumarino (ASAC) que presenta una excelente actividad gastroprotectora pero que se necesita de métodos analíticos como la cromatografía para su cuantificación.

La cromatografía es una técnica cuyo campo de aplicación se extiende a todas las áreas de investigación, Química, Bioquímica, Biología, entre otras, aplicándose a escala macro o micro. Es un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una que permanece inmóvil mientras que la otra se mueve en una dirección determinada a través de la primera (Sierra y cols, 2010).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es una técnica analítica de separación que se produce por interacciones químicas entre el analito, que está en solución, y la columna cromatográfica por el flujo continuo de solvente, utiliza una presión elevada para forzar al disolvente a que pase

por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución (Harris 2003).

Por lo que es importante el empleo de métodos analíticos que deben iniciarse desde la etapa de investigación del mismo, donde se realizan análisis cuantitativos que permitan la determinación de estos compuestos que sirven de base para cuantificar en diferentes muestras biológicas, empleando para ello la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, ya que es una técnica rápida, eficiente y reproducible, que cumple un amplio espectro de aplicaciones siendo además un buen método analítico cuantitativo, con desviaciones menores a 5% (Volonte, 2013).

### Metodología

Los disolventes utilizados grado HPLC (marca Fermont) fueron filtrados en un equipo de ultrafiltración usando membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  diámetro del poro, posteriormente se sonicaron durante 30 minutos para eliminar los gases disueltos en los disolventes y finalmente se purga el equipo durante algunos minutos.

Se preparó una disolución madre de 0.1 mg/mL en una mezcla de Metanol-Acetato de Amonio (85:15) con agitación constante hasta su completa disolución, posteriormente se hicieron diluciones para obtener las concentraciones de 0.005, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025 mg/mL y determinar la ecuación que rige el comportamiento lineal del analito.

Se empleó un equipo de HPLC Varian 9010 con un detector de UV-Vis de longitud de onda variable; columna C-18 fase reversa de 25 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro, tamaño de partícula 5 micras, tamaño de poro 80 Angstrom; la separación cromatográfica se realizó a temperatura ambiente con una

elución de tipo isocrática, las soluciones preparadas anteriormente se filtran con membranas de Nylon de 0.45 µm y se inyectan al equipo cromatográfico.

Tabla 1. Datos de área bajo la curva para la construcción de la curva de calibración para análisis de ASAC.

| Concentración (mg/mL) | Área bajo la curva |
|-----------------------|--------------------|
| 0.005                 | 91.3839            |
| 0.010                 | 190.2102           |
| 0.015                 | 372.9510           |
| 0.020                 | 452.4637           |
| 0.025                 | 543.6089           |

La composición de fase móvil utilizada fue Metanol-Acetato de amonio (85:15) a un flujo de 1.2 mL/min, ya que con esta mezcla de fase móvil se obtuvieron tiempos de retención de 1.85 minutos (fig.1)

### Resultados

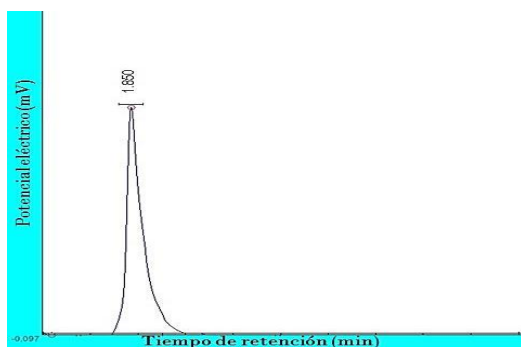


Fig 1. Cromatograma del Ácido Salicílico Amido Cumarínico

En la tabla 1 se presentan las concentraciones inyectadas con su respectiva area bajo la curva y la figura 1 muestra el cromatograma del analito.

En la figura 2 se muestra la curva de calibración que se obtiene al graficar los datos de la tabla 1.

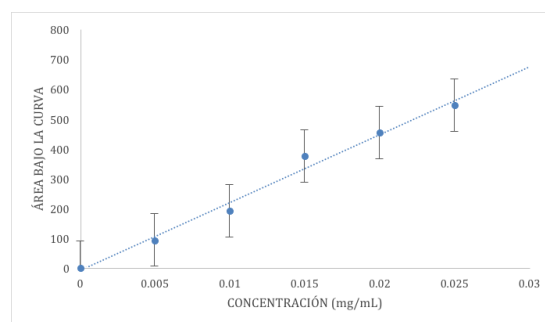


Fig 2. Curva de calibración para análisis de ASAC

La ecuación que se obtuvo fue la siguiente:  
**Area bajo la curva**= 22 766 **[Concentración]** – 9.4702 con un coeficiente  $R^2=0.9869$

### Conclusiones

El estudio cromatográfico del ASAC permitió llevar a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo de esta nueva molécula; cabe mencionar que es importante determinar las condiciones de operación adecuadas para llevar a cabo la identificación y cuantificación de cualquier compuesto ya que si no se conocen estas condiciones cromatográficas el compuesto podría quedar retenido dentro de la columna o eluiría y no sería detectado por el equipo; dichas condiciones de operación son: fase móvil adecuada, longitud de onda característica a la que absorbe el compuesto (esta se determina mediante espectroscopía UV-Vis) flujo de disolventes y tipo de columna.

Los parámetros cromatográficos que permitieron la identificación y cuantificación

del ASAC mediante HPLC fueron la fase móvil de metanol-acetato de amonio (85:15) y el flujo de 1.2 mL/min, a una longitud de onda de 300 nm.

El tiempo de retención del ASAC fue de 1.85 minutos debido a la polaridad de las fases móvil y estacionaria.

### Referencias

1. Jacobson, E. D. (1982). *Fundamentos de fisiología gastrointestinal*. España: Reverté.
2. Harris, C. D. (2003). *Análisis químico cuantitativo*. 3ra edición, Editorial Reverté, Barcelona.
3. Pineda, E. (2013). *Evaluación del efecto gastroprotector del DHA (ácido docosahexaenoico) en el daño gástrico inducido por indometacina*. México: Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía.
4. Quintana, E. (2012). *Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos de Achillea (Achillea millefolium L.) y Guadivuca (Piper carpunya Ruiz & Pav.) en ratas (Rattus Novergicus) con lesiones gástricas inducidas*. Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
5. Sierra, I., Pérez Damian, G. S., & Morante, S. (2010). *Fundamentos de cromatografía*. En I. Sierra, G. S. Pérez Damian, & S. Morante, *Análisis Instrumental* (págs. 140-155). España: NETBIBLO.
6. Volonté, M. G. (2013). *El método analítico en el control de calidad*. En M. G. Volonté, & P. Quriroga, *Análisis farmacéutico* (págs. 45-46). Buenos Aires: Editorial de la Universidad de Plata.