

BASES DE APLICACION DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (CLAR) EN QUIMIOTAXONOMIA DE FLAVONOIDES

Por ENRIQUE M. ZALLOCCI¹, ALICIA B. POMILIO^{2,3} y RAMON A. PALACIOS^{1,3}

Summary *Applications of high performance liquid chromatography (HPLC) on chemotaxonomical flavonoid studies.* This report shows that the high performance liquid chromatographic analysis of flavonoids in chemotaxonomic studies offers an accurate sensitive technique that enables a rapid isolation and characterization of these compounds when compared with any other method. The procedure is illustrated by the identification of eleven flavonoids in six argentine species of the tribe *Phaseoleae* (*Papilionoideae-Leguminosae*). A comparative study was simultaneously carried out on the same species using the classical standardized two-dimensional paper chromatography. Although no meaningful differences in the number of detected flavonoids by both methods are observed, HPLC provides a more accurate correlation within species and a rapid identification of the compounds by their retention times. An appropriate method for clean-up and sample preparation is described. The main factors that affect optimization of HPLC conditions are also discussed.

INTRODUCCION

La cromatografía líquida de alta resolución — CLAR— (o HPLC por sus siglas en inglés) considerada desde hace largo tiempo uno de los métodos más promisorios para la identificación de compuestos fenólicos (K. Markham, 1975) ha pasado a convertirse en los últimos años en el más empleado por los diversos autores para el aislamiento y purificación de flavonoides dados los excelentes resultados obtenidos.

Una de las principales ventajas de esta técnica radica en la relativamente pequeña cantidad de muestra necesaria para una evaluación acertada de los compuestos presentes, mientras que respecto a cualquier otro sistema de cromatografía convencional sobre papel su capacidad resolutoria es muy superior (Wulf y Nagel, 1976) permitiendo un gran ahorro de tiempo y esfuerzo mediante su empleo (Daigle y Conkerton, 1982).

Si bien una desventaja de peso suele estar dada por el costo relativamente alto del equipamiento necesario, no son pocos los casos en que puede llegar a disponerse del equipo básico compartiéndolo temporalmente o aportando algún complemento adecuado, por lo que resulta importante su

aprovechamiento cuando exista la posibilidad de uso.

El objetivo de este trabajo es presentar la metodología básica y los principales parámetros a tener en cuenta para encarar estudios quimiota-xonómicos mediante esta técnica. Asimismo, como sistema de referencia respecto a los métodos empleados usualmente en botánica presentamos un estudio comparativo realizado para 6 especies argentinas de la tribu *Phaseoleae* (*Leguminosae*) en base a esta técnica y, paralelamente, el análisis de las mismas mediante cromatografía de partición líquido-líquido bidimensional sobre papel.

Se discuten en forma comparativa los resultados obtenidos y se presentan las principales aplicaciones que la CLAR puede presentar en quimiota-xonomía.

La técnica de la C.L.A.R.

La CLAR es un tipo de cromatografía líquida en la cual la fase estacionaria (que puede ser un sólido poroso como por ejemplo un adsorbente clásico, una resina de intercambio iónico o un polímero poroso) se halla encerrada en una columna metálica mientras que la fase móvil es un líquido que es forzado a atravesarla bajo una cierta presión (Hamilton y Sewell, 1982).

El término alta resolución ("high performance") tiende a emplearse últimamente con preferencia al nombre propuesto originalmente de cromatografía líquida de alta presión ("high pressure") dado que el primero expresa con mayor exactitud la princi-

¹ Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Cs. Exactas y Naturales-Universidad de Buenos Aires - Cdad. Universitaria, Pabellón II, 4^{to} piso - 1428 Buenos Aires.

² Departamento de Química Orgánica, Fac. de Cs. Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires.

³ Miembro de la Carrera del Investigador Científico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

pal característica de esta técnica, mientras que el segundo sólo hace referencia a un parámetro operacional.

En CLAR el término fase normal se refiere a la técnica cromatográfica en que la fase móvil es menos polar que la fase estacionaria.

El término fase reversa o fase invertida (o RP por "reversed phase") se utiliza para designar sistemas de fase estacionaria no polar, en general silicagel tratada (RP C18; RP C8), usándose una fase móvil más polar, como agua o alcoholes (H. Engelhardt, 1979).

Equipamiento

Si bien los distintos modelos de cromatógrafos líquidos de alta presión pueden alcanzar grados de sofisticación realmente notables (y en relación directa a su costo obviamente) la configuración básica de un equipo que reúna las condiciones imprescindibles para su uso en quimiotaxonomía se esquematiza en la figura 1-A.

Un sistema más complejo apto para utilizar gradiente de solventes (como se observa en la figura 1-B) ofrece la posibilidad de ir variando en forma programada durante el transcurso de la corrida la relación de los componentes de la fase móvil, es decir la polaridad de la mezcla de elución.

Se requieren bombas de alta presión para hacer pasar el solvente por la columna pues el relleno ofrece una alta resistencia.

Al trabajar con flavonoides lo aconsejable es un detector UV de onda variable ajustado a una longitud de onda entre 290 y 300 nm apropiada de acuerdo a la banda I de absorción de los flavonoides y que no se superponga con el rango de absorción del solvente. También se pueden utilizar detectores UV de onda fija (en particular los que trabajan a 256 nm), fluorimétricos o electroquímicos (Lunte, 1987).

Resulta muy conveniente en la práctica el empleo de guardacolumna (que se intercala a la entrada de la columna) ya que al trabajar con derivados de extractos naturales la vida útil de las columnas se puede ver restringida si no se toman precauciones en la purificación de las muestras.

Desarrollo cromatográfico

Los cromatogramas resultantes del proceso de CLAR se obtienen gráficamente mediante la conexión de un registrador adecuado al detector utilizado a la salida de la columna (Figura 2).

La graficación a lo largo del tiempo de las variaciones de absorbancia en el detector determinan la aparición de picos que corresponden a la salida de

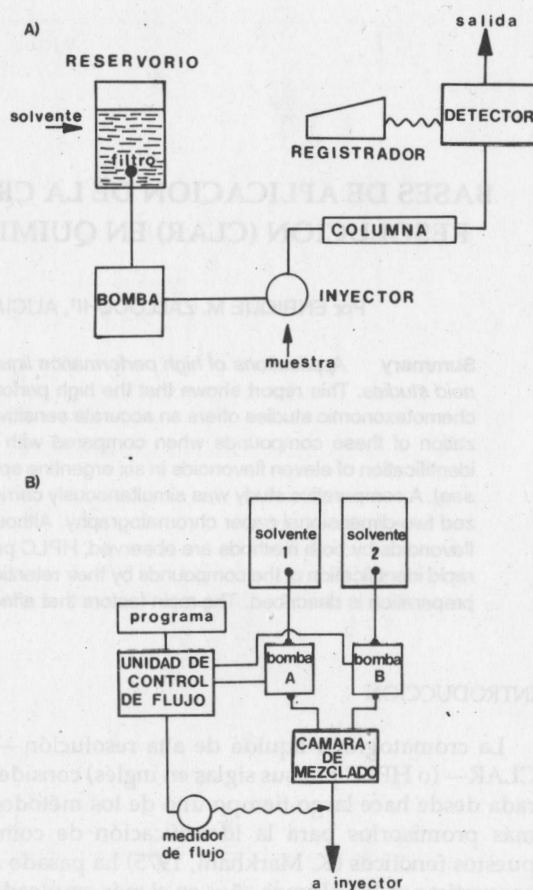


Fig. 1.— A) Configuración básica para CLAR; B) Configuración para utilizar gradiente de solvente.

cada uno de los componentes de la muestra inyectada.

La resolución o efectividad de la separación cromatográfica está dada por la relación entre la selectividad (o distancia entre picos) y la eficiencia de la columna (o ancho de banda).

Cada una de las sustancias separadas queda caracterizada por un parámetro que es el volumen de retención (V_R) o flujo total de solvente necesario para eluir el centro de una banda dada desde el momento de la inyección hasta que alcanza su valor máximo en el detector.

Sin embargo, el parámetro más utilizado para la caracterización de cada una de los compuestos separados es el tiempo de retención (t_R) dado que es mucho más sencillo de medir y es constante si no se varían las condiciones de flujo y temperatura.

La utilización de un registrador-integrador (electrónico) brindará además del gráfico correspondiente (cromatograma) todos los datos neces-

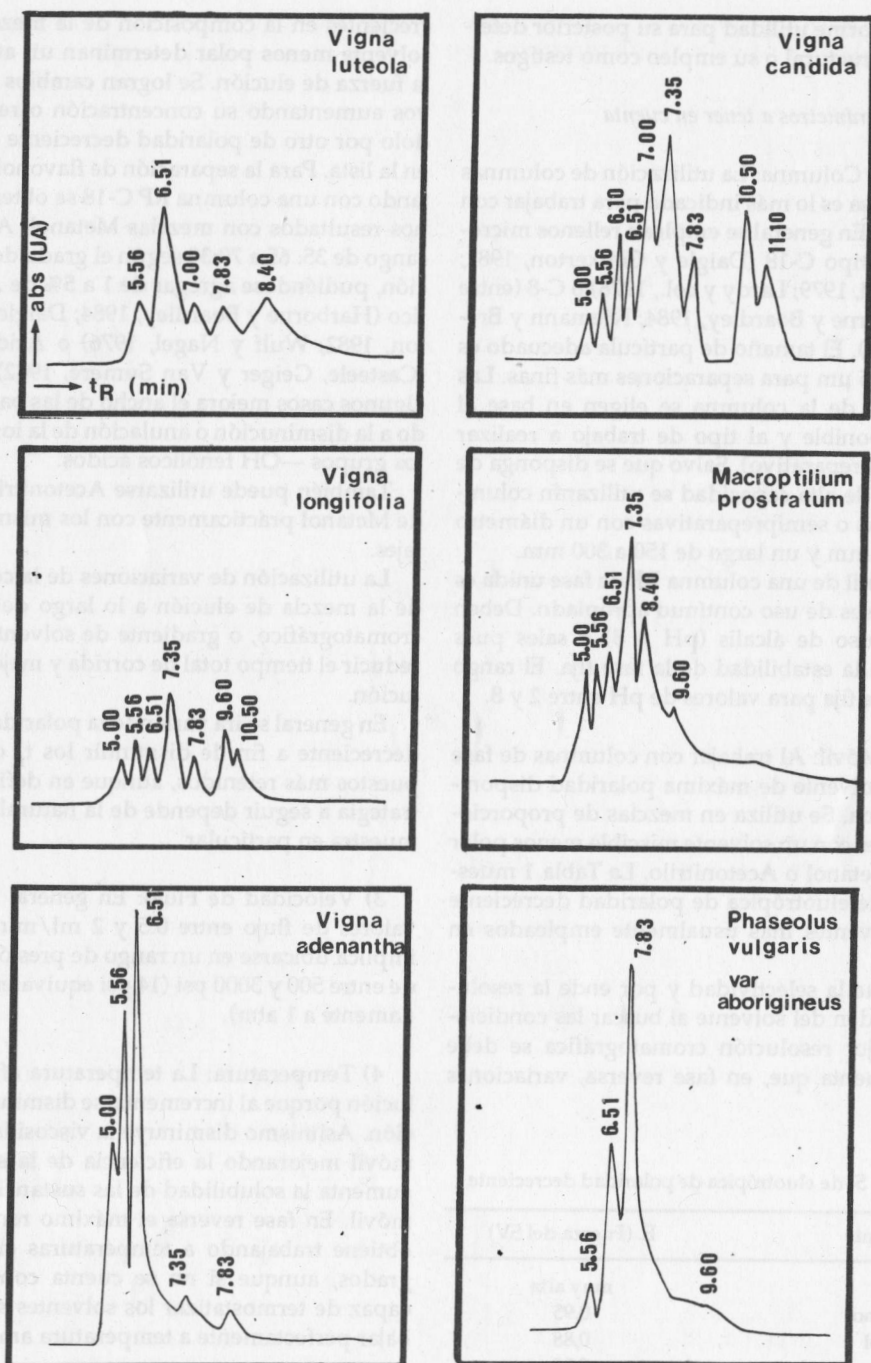


Fig. 2.— Cromatogramas de alta resolución para seis especies de la Tribu *Phaseoleae* (*Papilionoideae-Leguminosae*).

rios para un análisis cuali-cuantitativo de cada muestra, correspondientes a cada uno de los picos. Incluso se podrá calcular (si se ha calibrado previamente con una muestra testigo de concentración conocida) la concentración relativa de cada flavonoide aislado por integración del área bajo cada pico.

En caso de emplearse otro tipo de registrador (electromecánico) se calcula en forma gráfica el t_R de cada componente midiendo la distancia al origen (t_0) de cada pico, y convirtiendo este valor en tiempo conociendo la velocidad del papel. Cada una de los flavonoides de la muestra puede recogerse en orden sucesivo y en forma casi pura lo que

resulta de enorme utilidad para su posterior determinación estructural o su empleo como testigos.

Principales parámetros a tener en cuenta

1) Tipo de Columna: La utilización de columnas de fase reversa es lo más indicado para trabajar con flavonoides. En general se emplean rellenos microporosos del tipo C-18 (Daigle y Conkerton, 1982; Wulf y Nagel, 1979; Lardy y col., 1978) o C-8 (entre otros: Harborne y Boardley, 1984; Niemann y Brederode, 1978). El tamaño de partícula adecuado es de 10 µm, o 5 µm para separaciones más finas. Las dimensiones de la columna se eligen en base al equipo disponible y al tipo de trabajo a realizar (analítico o preparativo). Salvo que se disponga de una bomba de alta capacidad se utilizarán columnas analíticas o semipreparativas con un diámetro entre 5 y 15 mm y un largo de 150 a 300 mm.

La vida útil de una columna RP de fase unida es de 3 a 6 meses de uso continuo apropiado. Deben evitarse el uso de álcalis (pH > 8) o sales pues disminuyen la estabilidad de la fase fija. El rango de trabajo se fija para valores de pH entre 2 y 8.

2) Fase Móvil: Al trabajar con columnas de fase reversa el solvente de máxima polaridad disponible es el agua. Se utiliza en mezclas de proporciones variables con un solvente miscible menos polar tal como Metanol o Acetonitrilo. La Tabla 1 muestra una serie eluotrópica de polaridad decreciente con los solventes más usualmente empleados en CLAR.

Dado que la selectividad y por ende la resolución dependen del solvente al buscar las condiciones de mejor resolución cromatográfica se debe tener en cuenta que, en fase reversa, variaciones

crecientes en la composición de la mezcla para el solvente menos polar determinan un aumento de la fuerza de elución. Se logran cambios significativos aumentando su concentración o reemplazándolo por otro de polaridad decreciente que le siga en la lista. Para la separación de flavonoides, trabajando con una columna RP C-18 se obtendrán buenos resultados con mezclas Metanol: Agua en un rango de 35: 65 a 70:30 según el grado de glicosidación, pudiéndose agregar de 1 a 5% de Acido Acético (Harborne y Boardley, 1984; Daigle y Conkerton, 1982; Wulf y Nagel, 1976) o Acido Fórmico (Castele, Geiger y Van Sumere, 1982) lo que en algunos casos mejora el ancho de las bandas, debido a la disminución o anulación de la ionización de los grupos —OH fenólicos ácidos.

También puede utilizarse Acetonitrilo en lugar de Metanol prácticamente con los mismos porcentajes.

La utilización de variaciones de la composición de la mezcla de elución a lo largo del desarrollo cromatográfico, o gradiente de solventes, permite reducir el tiempo total de corrida y mejorar la resolución.

En general se irá variando la polaridad en forma decreciente a fin de disminuir los t_R de los compuestos más retenidos, aunque en definitiva la estrategia a seguir depende de la naturaleza de cada muestra en particular.

3) Velocidad de Flujo: En general se trabaja a valores de flujo entre 0.5 y 2 ml/minuto, lo que implica ubicarse en un rango de presión de trabajo de entre 500 y 3000 psi (14 psi equivalen aproximadamente a 1 atm).

4) Temperatura: La temperatura afecta la resolución porque al incrementarse disminuye la retención. Asimismo disminuye la viscosidad de la fase móvil mejorando la eficiencia de la separación y aumenta la solubilidad de las sustancias en la fase móvil. En fase reversa el máximo rendimiento se obtiene trabajando a temperaturas entre 40 y 60 grados, aunque si no se cuenta con un sistema capaz de termostatar los solventes se puede bajar perfectamente a temperatura ambiente.

5) Desgasificación de solventes: Luego de proceder al filtrado de los solventes o mezcla a emplear (lo que evita que penetren partículas a la bomba o al sistema de conductos que pueden llegar a obstruir la columna) se deben eliminar los gases disueltos en la fase móvil por calentamiento y agitación en vacío (o usando gas inerte).

Es importante en el proceso de desgasificación no alterar la composición de la mezcla. En general

Tabla 1.— Serie eluotrópica de polaridad decreciente

Solvente	E. (Fuerza del 5V)
Agua	muy alta
Metanol	0,95
Etanol	0,88
n-Propanolol	0,82
Acetonitrilo	0,65
Acetato de etilo	0,58
Acetona	0,56
Dioxano	0,56
THF	0,45
Benceno*	0,32
Tolueno*	0,29
n-Pentano*	0,00

* No se utilizan en fase reversa

es conveniente preparar la cantidad de eluyente necesaria poco antes de usarlo, sin mantenerlo en el reservorio por períodos de tiempo prolongados.

6) Volumen de muestra inyectado: La muestra se debe disolver en el solvente con menor fuerza de elución para lograr el menor volumen final que sea posible. Del mismo modo, la concentración (cantidad) de muestra es un factor muy importante pues afecta la resolución por saturación de la columna, provocando bandas asimétricas y con colas pronunciadas resultando tiempos de retención menores.

El control adecuado de los parámetros de corrida permite alcanzar con esta técnica una reproducibilidad que es muy superior respecto a cualquier otra disponible para flavonoides. Su resolución y sensibilidad permiten detectar hasta cantidades del orden de los 50 ng (Wulf y Nagel, 1976).

Aplicaciones de la C.L.A.R. en quimiota-xonomía

La inclusión de la CLAR en trabajos quimiota-xonómicos no es nueva dado que se ha aplicado a diversos estudios de flavonoides en diferentes especies (Daigle y Conkerton, 1982 citan varios ejemplos; Asen y Griesbach, 1983) y otros de tipo filogenético (Meurer, Wiermann y Strack, 1988) aunque la mayoría se han efectuado con fines fitoquímicos, y muchos de estos corresponden a la familia *Leguminosae* (Carlson y Dolphin, 1980; West, Birac y Pratt, 1978; Dorr y Guest, 1987).

De acuerdo a nuestra experiencia existen varias aplicaciones de la CLAR que facilitan y permiten lograr una mayor exactitud en las determinaciones quimiota-xonómicas:

1) Caracterización de patrones específicos: A partir de extractos de material vegetal se puede obtener el patrón cromatográfico específico correspondiente a los flavonoides presentes con la finalidad de realizar un estudio quimiosistemático. La información obtenida permite una rápida correlación entre las diversas muestras en estudio dado que cada flavonoide está caracterizado por un sólo parámetro que es el Tiempo de Retención (t_R).

2) Co-cromatografía contra testigo: Un compuesto aislado previamente puede ser corrido en forma conjunta con un testigo conocido, o bien un segundo compuesto proveniente de otra fuente, cuando quiera corroborarse que se trata de la misma sustancia. Esto será fácil de evidenciar cuando se observa un único pico en el cromatograma obtenido a partir de su inyección conjunta. Ambas muestras se preparan por separado y pueden in-

yectarse a la vez, o bien se efectúan dos corridas sucesivas y se comparan los t_R respectivos.

3) Aislamiento de sustancias de interés: Se puede trabajar en forma preparativa para el aislamiento masivo de un compuesto en particular. Se puede disponer de una columna preparativa adecuada a la masa de la muestra, o bien utilizar una columna semipreparativa y repetir la corrida un número suficiente de veces. Las fracciones correspondientes al o los picos de interés se recogen a la salida del detector en recipientes adecuados o bien mediante un colector automático de fracciones. Una vez reunida la muestra se procede a eliminar el solvente en un evaporador rotativo o bien por liofilización del agua, obteniéndose la sustancia pura, la cual puede ser analizada por espectroscopía UV, RMN protónico y de carbono 13 , hidrólisis ácida y espectrometría de masa, determinándose la estructura del flavonoide.

4) Elución y análisis de manchas de cromatogramas en papel: Se puede proceder a un análisis de eluidos de manchas de cromatogramas en papel, ya sea con fines comparativos o bien para purificación. Es importante para esto un correcto filtrado (por lo menos dos veces) del eluido para evitar el ingreso de fibras de celulosa a la bomba o columna del cromatógrafo. En general, una mancha dada presentará más de un componente cuando se analiza por CLAR, lo que demuestra la mayor resolución de este método. De este modo podrán separarse y caracterizarse estos compuestos.

MATERIALES Y METODOS

El material vegetal seco y molido, preferentemente de origen foliar o tallos no leñosos fue extraído en un extractor Soxhlet con un solvente no polar (éter de petróleo, fracción 60-80 grados) durante 24 hs a reflujo. Se realizó a continuación de modo similar una segunda extracción empleando metanol como solvente con la finalidad de separar las sustancias polares. En general en este extracto se obtendrán los flavonoides (salvo algunos muy metilados o con sustituyentes lineales que los tornan muy poco polares y que son más afines al solvente inicial).

Dado que este extracto crudo resulta una mezcla muy compleja y enriquecida en otros compuestos de poco interés para el quimiota-xonomo (como por ej. clorofilas) y que impedirían una identificación y separación apropiada de los flavonoides (generalmente no tan mayoritarios), se procedió a efectuar un fraccionamiento apropiado para ir obteniendo subfracciones enriquecidas en flavonoi-

des con el fin de lograr un máximo aprovechamiento en el proceso de CLAR.

Se realizó este fraccionamiento en dos pasos sucesivos: en primer lugar se procedió a utilizar cromatografía de permeación por geles, usando Sephadex LH-20 como soporte y metanol como eluyente. Posteriormente se reunieron las fracciones con flavonoides y se cromatografiaron en columna de silicagel 60-H usando mezclas de cloruro de metileno-metanol de polaridad creciente. Se obtuvieron así entre 4 y 7 fracciones con flavonoides para cada extracto, algunas de las cuales se representan en los cromatogramas de la Figura 2.

Las muestras así obtenidas fueron recristalizadas en metanol de grado espectroscópico y filtradas.

El proceso de filtrado de la muestra previo a su inyección a un cromatógrafo líquido es imprescindible para lograr un adecuado funcionamiento de las columnas. Se utilizó un filtro microporoso de membrana Millipore tipo FG de 0,2 μm conectado en serie a un cartucho de filtrado Sep-Pak Waters-Millipore N° 51910 con relleno de fase reversa C-18.

Las corridas fueron efectuadas en un equipo Waters utilizando una columna uBondapack RP C-18 analítica (diámetro: 5 mm, largo: 240 mm). Se utilizó un detector UV de onda variable en una longitud de onda de 291 nm.

La mezcla de elución fue Metanol-Agua (58:42), trabajándose en condiciones isocráticas. La corriente de flujo fue de 0,7 ml/min.

Material de la Argentina analizado:

Vigna luteola (Jacq.) Benth

Pcia. de Entre Ríos, Depto. Gualeguaychú, Ceibas- 15/V/1984 - R. A. Palacios 1378 (BAFC).

Vigna longifolia (Benth) Verdcourt:

Pcia. de Corrientes, Depto. Paso de los Libres, Paso de los Libres - 28/II/1984 - R. A. Palacios 1297 (BAFC).

Vigna adenantha (G. F. Meyer) Marechal, Mascherpa & Stainier:

Pcia. de Entre Ríos, Depto. Uruguay, Concepción del Uruguay, Banco Pelay - 5/VII/1985 - R. A. Palacios 1380 (BAFC).

Vigna candida (Vellozo) Marechal, Mascherpa & Stainier:

Pcia. de Misiones, Depto. San Javier, ruta 14, bifurcación S. Javier-Itacaruré - 25/II/1984 - R. A. Palacios 1289 (BAFC).

Macroptilium prostratum (Benth) Urban:

Pcia. de Entre Ríos, Depto. Colón, cruce ruta 14 y arroyo El Palmal - 25/II/1982 - R. A. Palacios 1205 (BAFC).

Phaseolus vulgaris L. var *aborigineus* (Burkart) Baudet:

Pcia. de Salta, Depto. La Caldera, Finca La Angostura - 28/III/1982 - R. A. Palacios 1043 (BAFC).

RESULTADOS OBTENIDOS

A partir de las condiciones previamente obtenidas para las muestras con flavonoides se procede a efectuar las corridas para las diversas especies en forma estandarizada.

La Figura 2 presenta algunos de los cromatogramas de alta resolución obtenidos correspondientes a las subfracciones más representativas de cada especie.

Con los tiempos de retención obtenidos para cada muestra se confecciona una matriz bidimensional de datos, considerando la presencia o no de cada uno de los flavonoides detectados (caracterizados por sus respectivos t_R) para cada uno de los taxa involucrados.

La Tabla 2 presenta los datos correspondientes a las seis especies de los géneros *Vigna*, *Phaseolus* y *Macroptilium* (*Phaseoleae*, *Leguminosae*) que fueron analizadas por cromatografía líquida de alta resolución.

Comparación con otras técnicas cromatográficas

Resulta interesante, y necesario como punto de referencia, la comparación de esta metodología con la tradicionalmente empleada en botánica para los estudios quimiotaxonómicos, es decir la Cromatografía de Partición L-L bidimensional en papel.

Se ha realizado paralelamente un estudio para los extractos metanólicos de las seis especies previamente consideradas. Se procedió a sembrar sobre papel Whatman 3 MM una muestra de dicho extracto y se corrió (en forma descendente) en una dirección con una mezcla de Terbutanol-Agua-Acido Acético (3:1:1), para luego repetir el procedimiento en el otro sentido usando como solvente Acido Acético al 15% (Mabry, Markham y Thomas 1970).

Los cromatogramas así obtenidos se presentan en la Figura 3.

A partir del análisis de los mismos bajo luz UV en presencia de vapores de NH_3 se han caracterizado las manchas correspondientes a flavonoides por sus respectivos R_f (Tabla 3).

La Tabla 4 presenta en forma comparativa los resultados correspondientes al número de flavonoides detectados por cada uno de los métodos para cada especie. Asimismo se muestran en la Tabla 5 los valores correspondientes al número de flavonoides en común entre cada par de especies que pudieron correlacionarse utilizando cada método en forma independiente.

Tabla 2.— Flavonoides determinados por CLAR para 6 especies argentinas de la Tribu PHASEOLEAE

FLAVONOIDES	1	2	3	4	5	6	
Nº	t _R (min)	<i>Vigna</i> <i>luteola</i>	<i>Vigna</i> <i>longifolia</i>	<i>Vigna</i> <i>adenantha</i>	<i>Vigna</i> <i>candida</i>	<i>Macroptilium</i> <i>prostratum</i>	<i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i>
I	5,00	—	+	+	+	+	—
II	5,56	+	+	+	+	+	+
III	6,10	—	—	—	+	—	—
IV	6,51	+	+	+	+	+	+
V	7,00	+	—	—	+	—	—
VI	7,35	—	+	+	+	+	—
VII	7,83	+	+	+	+	—	+
VIII	8,40	+	—	—	—	+	—
IX	9,60	—	+	+	—	+	+
X	10,50	+	+	—	+	—	—
XI	11,10	+	—	—	+	—	—

+ = presente; — = ausente

Tabla 3.— Flavonoides identificados por Cromatografía de partición L-L

SP	MANCHA	RF x 100	UV	UV/NH ₃	SP	MANCHA	RF X 100	UV	UV/NH ₃
1	1	19/78	PR	PA	4	1	41/79	Vp	V
	2	35/36	BV	Vb		2	45/40	PR	PA
	3	54/80	PA	A		3	63/57	Vp	VA
	4	56/60	BA	A		4	65/49	PR	PA
	5	59/40	V	Vb		5	74/72	B	BV
	6	58/15	V	Vb		6	84/54	I	Ap
	7	74/41	V	Vb		7	88/36	V	Vb
2	1	13/72	BV	VA	5	1	13/68	BV	Vb
	2	39/84	PR	PA		2	21/72	P	PA
	3	44/63	BV	VA		3	28/83	PA	A
	4	40/28	P	VA		4	30/77	P	PA
	5	27/17	BV	VA		5	35/90	B	V
	6	87/32	PV	Vb		6	90/38	VA	Vb
	7	92/11	Ap	VA					
3	1	14/68	B	V	6	1	11/69	I	Vp
	2	41/57	PR	PA		2	41/61	PR	PA
	3	72/44	Vp	VA		3	86/57	I	Ap
	4	84/48	B	BV		4	87/38	B	Vb
	5	39/38	BV	Vp					

A = amarillo; B = blanco; b = brillante; I = incoloro; P = pardo; p = pálido; R = rojizo; V = verde

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

La CLAR resulta un excelente método para la determinación de perfiles y el aislamiento de flavonoides. En la práctica se han podido resolver muestras con más de 30 flavonoides glicosidados o

metilados (Castele, Geiger y Van Sumere, 1982). En nuestro caso, se procesaron muestras con un promedio de entre 4 y 7 flavonoides por especie, tratándose en todos los casos de O-glicósidos, observándose de acuerdo a los tiempos de retención obtenidos por Harborne y Boardley (1984) y consi-

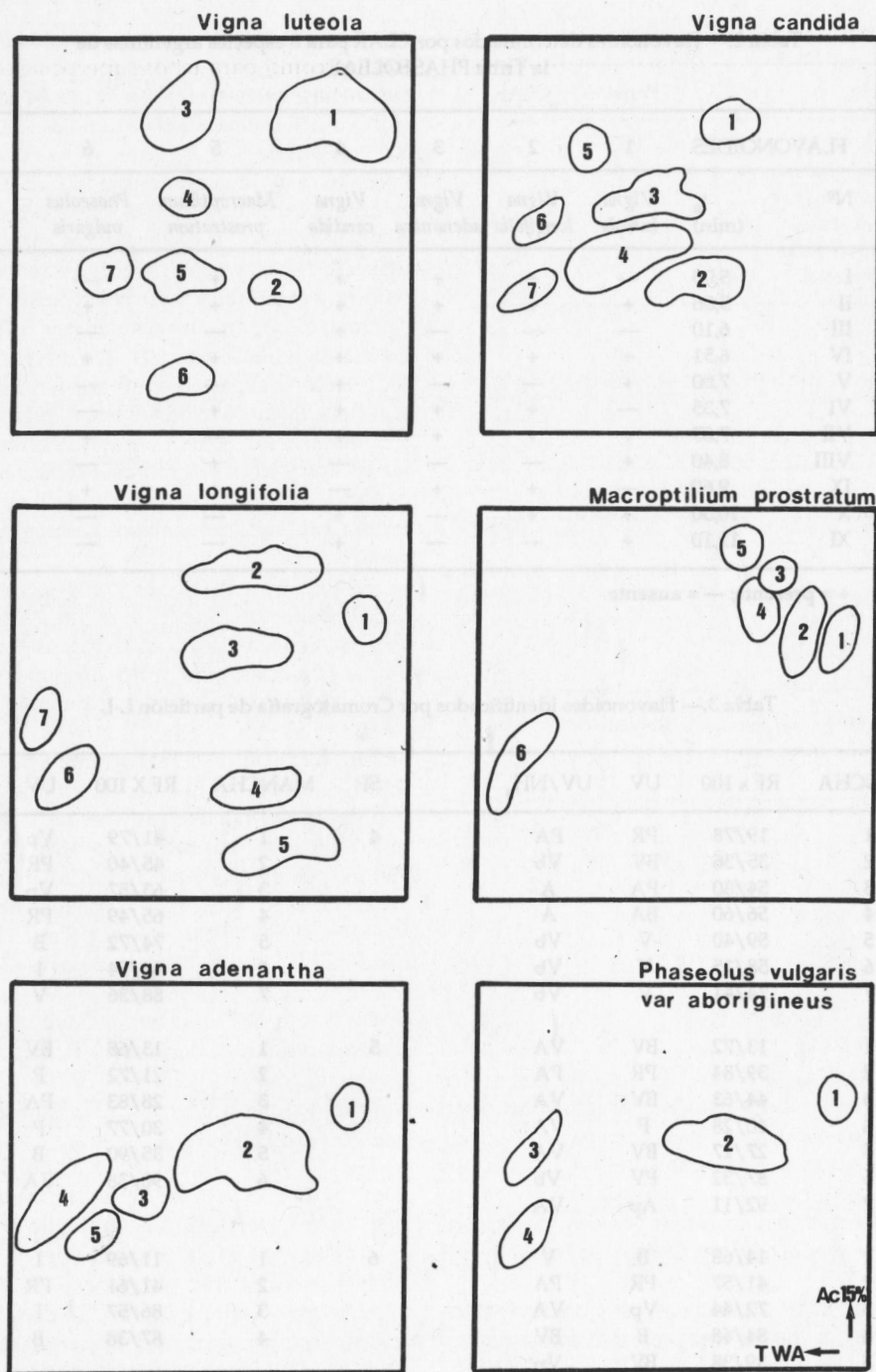


Fig. 3.— Cromatogramas bidimensionales en papel para seis especies de la Tribu Phaseoleae (Papilionoideae-Leguminosae).

derando que no se utilizaron exactamente las mismas condiciones que nos hallamos en el rango de mono, di y triglicósidos, pues el grado de glicosidación está directamente relacionado con el tiempo de retención (Harborne y Boardley, 1984).

Cada flavonoide queda caracterizado por el tiempo de retención. Este valor es constante para cada compuesto en las condiciones experimentales fijadas. Este parámetro de lectura inmediata permite un manejo simple de la información obtenida

Tabla 4.— Cantidad de Flavonoides Detectados

Especie	Papel	CLAR
1 (<i>V. luteola</i>)	7	7
2 (<i>V. longifolia</i>)	7	7
3 (<i>V. adenantha</i>)	5	6
4 (<i>V. candida</i>)	7	9
5 (<i>M. prostratum</i>)	6	6
6 (<i>P. vulgaris</i>)	4	4

Tabla 5.— Correlación de flavonoides entre especies

a) Cromatografía de partición L-L

Especie	1	2	3	4	5	6
1	—	3	3	4	3	2
2		—	4	4	4	2
3			—	4	4	3
4				—	3	3
5					—	2
6						—

b) Cromatografía líquida de Alta Resolución

Especie	1	2	3	4	5	6
1	—	4	3	6	3	3
2		—	6	6	5	4
3			—	5	5	4
4				—	4	3
5					—	3
6						—

y una pronta caracterización de cada especie, facilitando el análisis numérico estadístico inter o intraespecífico.

La utilización de columnas de fase reversa nos permitió encarar un estudio comparativo y relativamente sencillo, bajo condiciones estandarizadas, de muestras vegetales con fines quimiotaxonómicos.

Si bien la CLAR presenta un alto grado de resolución cromatográfica una vez determinadas las condiciones de trabajo, no se hallaron diferencias demasiado significativas respecto a la técnica tradicional de cromatografía líquida de partición L-L sobre papel en cuanto al número de flavonoides detectados por ambos métodos para cada una de las seis especies estudiadas, aunque en dos de ellas el número fue inferior cuando se usó este último método.

Sin embargo, en el primer caso (CLAR) la correlación entre cromatogramas es inmediata pues los

rangos de t_R característicos son suficientemente estrechos como para tener superposiciones en otras sustancias, pues se trabaja en la banda de absorción característica de flavonoides en la detección del compuesto.

En el caso de la cromatografía en papel la identificación es menos precisa y sujeta a mayor error, pues el proceso de detección es más engorroso e inexacto (observación de color, mediciones de R_F , recorte y elución de manchas, cálculo de superposición, etc.). Asimismo resulta más difícil controlar las condiciones de corrida (temperatura, grado de hidratación del papel, sembrado de muestras, saturación de la cuba) lo que afecta la relación de frente y el tamaño de las manchas, dificultando la correlación-entre cromatogramas. Este aspecto crea dificultades de gran magnitud a medida que crece el número de especies consideradas que buscan correlacionarse.

En nuestro caso se logró una certeza de correlación inmediata superior en un 30 a un 50%, según las especies, para la CLAR (4-9 compuestos) respecto a la cromatografía en papel como se observa a partir de la comparación entre las tablas 5a y 5b.

Otro aspecto muy importante a favor de la cromatografía de alta resolución está dado por el hecho de que es posible caracterizar los compuestos en cuanto a su naturaleza química en base a su t_R . Así es posible diferenciar isoflavonas (Carlson y Dolphin, 1980), glicoflavonas isoméricas (Becker y Wilking, 1977; West, Birac y Pratt, 1978; Lardy, Boulliant y Chopin, 1984) que no pueden separarse por otros métodos, flavonas polimetoxiladas (Rousseff y Ting, 1979; Bianchini y Gaydou, 1980), flavonoides sulfatados (Harborne y Boardley, 1984), isoflavonoides (Dorr y Guest, 1987) o diversos compuestos fenólicos (Court, 1977; Vanhaelen y Vanhaelen-Fastré, 1980).

Debe tenerse en cuenta que muchos de estos compuestos no pueden diferenciarse en el papel, o bien su caracterización es ambigua (basada en su coloración) y obliga a una serie de eluciones y nuevas corridas cromatográficas.

Una gran ventaja de la CLAR es que permite trabajar además en forma preparativa, obteniéndose al fin del proceso sustancias prácticamente puras y en cantidades necesarias para encarar los análisis químicos y espectroscópicos para una exacta determinación estructural del compuesto (Pomilio y Zallocchi, 1989).

CONCLUSIONES

La relación de costo del equipamiento básico es uno de los factores de mayor peso en contra de la

introducción de esta técnica, pero debe tenerse en cuenta que los gastos de funcionamiento son relativamente similares a los de los otros métodos si se cuenta o puede conseguirse el equipo básico.

Otro aspecto desfavorable está dado por el necesario proceso de preparación previa a que deben someterse las muestras antes de efectuar la corrida (purificación, filtrado, etc.) lo que requiere un cierto tiempo de trabajo, aunque permite a su vez un aumento de la resolución final lograda y es de fácil estandarización.

A favor cuenta el alto grado de resolución que puede alcanzarse, que se pone de manifiesto cuando se tratan mezclas más complejas que las aquí presentadas, o bien para la separación de compuestos muy semejantes estructuralmente, tal como se mencionó anteriormente. Asimismo la inmediata caracterización de los perfiles es ideal en estudios quimiotaxonómicos dado que la elucidación estructural es el paso más engoroso respecto a la obtención de los patrones específicos, que en este caso resultan claros y de fácil correlación.

En última instancia creemos que ambos métodos pueden complementarse bien dado que la cromatografía en papel podría emplearse alternativamente como un primer paso de separación a partir del cual las manchas sean eluidas para luego caracterizarlas por CLAR. Del mismo modo los productos de hidrólisis pueden determinarse junto con testigos puros disponibles mediante co-cromatografía, o bien empleando flavonoides previamente aislados a partir de otras especies.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro reconocimiento a la Universidad de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - CONICET - de la República Argentina (PID 3053200 y PID 3063700) por el sostenido apoyo económico e institucional brindado para el desarrollo de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- ASENS, S. & R. GRIESBACH. 1983. HPLC analysis of flavonoid in geranium florets: an adjunct for cultivar identification *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 108 (5): 845-850.
- BECKER, H. & G. WILKING. 1977. Separation of glycoflavones by high-pressure liquid chromatography *J. Chromatogr.* 136: 174-175.
- BIANCHINI, J. P. 1980. Separation of polymethoxylated flavones by straight-phase high-performance liquid chromatography *J. Chromatogr.* 190: 233-236.
- CARLSON, R. E. & D. DOLPHIN. 1980. High-performance liquid chromatography method for the analysis of isoflavones *J. Chromatogr.* 198: 193-197.
- CASTELE, K. V., H. GEIGER & C. F. VAN SUMERE. 1982. Separation of flavonoids by reversed-phase high-performance compounds *J. Chromatogr.* 130: 287-291.
- DAIGLE, D. J. & E. J. CONKERTON. 1982. High-performance liquid chromatography of 34 selected flavonoids *J. Chromatogr.* 240: 202-205.
- DORR, K. K. & D. I. GUEST. 1987. Rapid, sensitive high-performance liquid chromatography assay for isoflavonoids from cowpea (*Vigna unguiculata*) *J. Chromatogr.* 387: 536-540.
- ENGELHARDT, H. 1979. *High performance liquid chromatography* (Chemical laboratory practice) - 248 pp - Springer Verlag (Berlin-Heidelberg-N. York).
- GALENSA, R. & K. HERRMAN. 1980. Analysis of flavonoids by high-performance liquid chromatography *J. Chromatogr.* 189: 217-224.
- HARBORNE, J. B. & M. BOARDLEY. 1984. Use of high-performance liquid chromatography in the separation of flavonol glycosides and flavonol sulphates *J. Chromatogr.* 299: 377-385.
- HAMILTON, R. J. & P. A. SEWELL. 1982. *Introduction to high performance liquid chromatography* - 248 pp. - 2nd Ed. Chapman & Hall (N. York-London).
- LARDY, C., M. L. BOULLIANT & J. CHOPIN. 1984. Separation de C-glucosylflavones isomeres par chromatographie liquide a haute performance en phase inverse *J. Chromatogr.* 291: 307-315.
- LUNTE, S. M. 1987. Structural classification of flavonoids in beverages by liquid chromatography with ultraviolet-visible and electrochemical detection *J. Chromatogr.* 387: 371-382.
- MABRY, T. J., K. B. MARKHAM & M. R. THOMAS. 1970. *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag.
- MARKHAM, K. R. 1975. In J. B. Harborne, T. J. Mabry & H. M. Mabry (Ed.) *The flavonoids*. Champan & Hall. pag. 37.
- MEURER, B., R. WIERMANN & D. STRACK. 1988. Phenylpropanoid patterns in *Fagales* and their phylogenetic relevance. *Phytochemistry* 27 (3): 823-828.
- NIEMANN, G. J. & J. V. BREDERODE. 1978. Separation of glycoflavones and their glycosides by high-performance liquid chromatography *J. Chromatogr.* 152: 523-527.
- POMILIO, A. B. & E. M. ZALLOCHI. 1989. Two new isorhamnosides from *Vigna luteola* *J. Nat. Prod.* 52 (3): 511-515.
- ROUSSEF, R. L. & S. V. TING. 1979. Quantitation of polymethoxylated flavones in orange juice by high-performance liquid chromatography *J. Chromatogr.* 176: 75-87.
- VANHAELEN, M. & R. VANHAELEN-FASTRE. 1980. High-performance liquid, gas-liquid and thin-layer chromatography of naturally occurring flavonoids, phenolic and related compounds *J. Chromatogr.* 187: 255-260.
- WEST, L. G., P. M. BIRAC & D. E. PRATT. 1978. Separation of the isomeric isoflavones from soybeans by high-performance liquid chromatography *J. Chromatogr.* 150: 266-268.
- WULF, L. W. & C. W. NAGEL. 1976. Analysis of phenolic acids and flavonoids by high-pressure liquid chromatography *J. Chromatogr.* 116: 271-279.