

## Método Simple y Rápido para la Determinación de Ascaridol en Medio Acuoso Utilizando CLAE (RP-HPLC)

Lázaro F. R. CAFFERATA, René JEANDUPEUX y Rubén S. RIMADA\*

Laboratorio LADECOR (UNLP), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Calles 47 y 115, (1900) La Plata, República Argentina.

**RESUMEN.** Ascaridol es un endoperóxido cíclico que constituye el principal principio farmacológicamente activo de la planta medicinal conocida popularmente como "paico" (*Chenopodium ambrosioides* L.). Sus infusiones y decocciones continúan aplicándose como antihelmíntico aunque existen discrepancias sobre su efectividad terapéutica y grado de toxicidad. Dada la importancia de la estabilidad térmica de ascaridol en medio acuoso para su uso medicinal, se presenta aquí un procedimiento analítico simple y rápido basado en la cromatografía líquida de alta eficiencia en fase invertida (RP-HPLC) para su determinación en medio acuoso. La fase móvil utilizada es una mezcla de metanol y agua (65:35, v/v). El método emplea una columna Spherisorb Superpack C-18 (4,0 mm de d.i. y 100 mm de longitud, con partículas de 3 µm), flujo de 0,7 mL/min, con un detector de índice de refracción diferencial, operando a temperatura ambiente. La validación del método analítico produjo resultados con una desviación estándar relativa de 1,8% y exactitud del 96%. La curva de calibración presentó una linealidad satisfactoria (coeficiente de correlación  $\leq 0,9989$ ) en el ámbito de concentraciones de ascaridol comprendidas entre 10 y 120 µmoles/mL. La preparación y purificación del ascaridol utilizado como patrón, se realizó mediante una modificación de la reacción de fotooxigenación de  $\alpha$ -terpineno a temperaturas cercanas a 0 °C usando alcohol isopropílico como solvente. El método analítico se aplicó a la evaluación del contenido de ascaridol en decocciones, maceraciones e infusiones en agua destilada. de Paico recientemente cosechado.

**SUMMARY.** "A Simple and Rapid Method for Ascaridole Determination in Aqueous Solution using RP-HPLC". Ascaridole, a cyclic endoperoxide, is the main pharmacologically active constituent of the medicinal plant named "paico" (*Chenopodium ambrosioides* L.). The utilization of infusions and decoctions of the above mentioned vegetal as antihelmintic medicine in humans arouse a scientific debate on the toxic properties and therapeutic effect of ascaridole. The thermal stability of that substance in water is considered important to evaluate the above therapeutic action. A simple and rapid high-performance liquid chromatographic (RP-HPLC) assay for the ascaridole determination in water is here advanced. The mobile phase was a mixture of methanol and water (65:35, v/v). The chromatographic system employed a Spherisorb Superpack RP-18 column (100 mm length, 4.0 mm i.d., 3 µm of particle size), 0.7 mL/min flow rate and a differential refraction index detector, at room temperature. The validation method yielded a 1.8% relative standard deviation (RSD) and 96% accuracy. The calibration plot was practically linear between 10 and 120 µmoles / mL of ascaridole, with correlation coefficient  $\leq 0.9989$ . The preparation and purification of ascaridole employed as standard was performed by a modified photooxygenation reaction of  $\alpha$ -terpinene at temperatures near 0 °C using isopropyl alcohol as the reaction solvent. The analytical method was used to evaluate the ascaridole content in maceration, decoction and infusion of recently harvested paico, prepared in distilled water.

### INTRODUCCIÓN

Ascaridol (**I**) es un endoperóxido monoterpénico [(1-metil-4-(1-metiletil-2,3-dioxa-biciclo [2.2.2] oct-5-eno); 1,4-epidioxi-p-mentano ó 1,4-peróxido-p-ment-2-eno (Fig. 1), de fórmula molecular  $C_{10}H_{16}O_2$  (CAS N° 512-85-6), que consti-

tuye el principal (60-80%) principio farmacológicamente activo y relativamente volátil a temperatura ambiente, del aceite de quenopodio (*Chenopodium Ambrosioides* L.)<sup>1,2</sup>, vegetal comúnmente denominado "paico".

El paico es originario de Perú, y crece tam-

**PALABRAS CLAVE:** Ascaridol, CLAE, Solución acuosa  
**KEY WORDS:** Ascaridole, HPLC, Aqueous solution.

\* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: rubenrimada@hotmail.com

bién en regiones tropicales y subtropicales de nuestro país. A este vegetal se lo conoce con diferentes denominaciones ("pie de ganso", Epazote, Aritasou, Herb of Santa María o Wormseed), de acuerdo a los países donde se lo observa como una hierba silvestre <sup>3,4</sup>. Sus infusiones y decocciones, preparadas con diferentes líquidos, continúan aplicándose para el tratamiento popular de diferentes afecciones, principalmente como antiparasitario.

En la etnomedicina de la región chaqueña de la República Argentina, la infusión de hojas y flores de paico es utilizada como carminativo y digestivo, pero principalmente como antihelmíntico <sup>3-6</sup>. No obstante, existen discrepancias sobre su efectividad terapéutica y grado de toxicidad <sup>4</sup>.

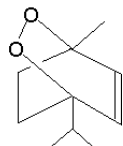


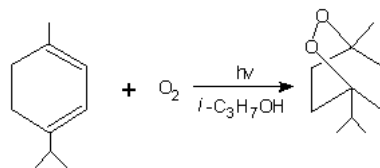
Figura 1. Ascaridol (I).

El ascaridol fue inicialmente aislado de "paico" mediante destilación por arrastre con vapor de agua por Nelson & Wallach <sup>7-9</sup>. Luego de un período de casi 40 años y continuando investigaciones sobre esa sustancia, Beckett *et al.* <sup>10</sup> aislaron y purificaron con excelentes rendimientos el principio activo del vegetal, usando una columna cromatográfica separadora rellena con gel de sílice e identificándolo como ascaridol. Estos autores también informaron las principales propiedades físicas de esa sustancia obtenida de la naturaleza ( $n_D^{20}$  °C 1,4733; punto de ebullición 37°-38 °C / 0,15 Torr); 39°-40 °C / 0,2 Torr; densidad<sub>20</sub> °C 1,0113; punto de congelamiento 3,3 °C), valores que resultan prácticamente coincidentes con los presentados luego en el Merck Index <sup>11</sup>.

Dado que ha sido realizado <sup>12</sup> un estudio cinético de la estabilidad térmica de ascaridol y el análisis de sus productos de descomposición en alcohol isopropílico, no registrándose antecedentes bibliográficos de la correspondiente reacción en agua, se describe en este artículo un método para el dosaje de ascaridol en solución acuosa, utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia en fase invertida (CLAE -FI).

## MATERIALES Y MÉTODOS

El metanol empleado para la preparación de la fase móvil de los análisis fue de grado HPLC (BDH, Inglaterra) como así también el agua



[Ecuación 1]

(Merck, Darmstadt, Alemania). El ascaridol fue sintetizado (Ecuación 1) mediante la fotooxigenación de  $\alpha$ -terpineno en medio de alcohol isopropílico a temperaturas cercanas a 0 °C, tomando como referencia el método de Schenck <sup>13-15</sup>. En este trabajo se han realizado modificaciones al método original <sup>16</sup>, principalmente en la etapa de purificación del producto, disminuyendo significativamente (TLC en gel de sílice) la formación de compuestos hidroperoxidicos, algunos de los cuales fueron ya identificados <sup>17</sup> y cuya razonable mayor reactividad que ascaridol podría ser responsable de la elevada toxicidad de algunas infusiones de paico. El procedimiento seguido aquí permite obtener un producto con excelente calidad (CG, 98% p/p) y rendimiento en su preparación. Se controló su pureza empleando cromatografía en capa delgada (TLC, CCD) utilizando cromatofolios de aluminio recubiertos con gel de sílice marca Merck N° de Catálogo 5553, empleando como fase móvil una mezcla de tolueno:acetato de etilo (97:3% v/v) y revelador de vainillina-ácido sulfúrico a 100 °C.

## Análisis cromatográficos en fase líquida

El análisis del ascaridol en las soluciones acuosas se realizó empleando un cromatógrafo marca LKB modelo 2942 (origen, Suecia), provisto de una columna Spherisorb Superpac RP-C18 (de 100 mm de longitud y 4 mm de diámetro interno, 3  $\mu$ m de tamaño promedio de partícula), operando a temperatura ambiente, conectado a un refractómetro diferencial marca LKB modelo 2142 como detector. La fase móvil utilizada, tanto en el canal de referencia del detector como de la muestra, consistió en una mezcla de metanol: agua (65-35%, v/v), la cual fue previamente filtrada a través de membranas de Teflon® de 0,2  $\mu$ m de porosidad y convenientemente desgasificada. Se utilizó un caudal de 0,7 mL/min, inyectando (válvula Rheodyne) 100  $\mu$ L de las diferentes muestras para su análisis.

## Validación del método analítico

### Preparación de la solución estándar

La solución patrón se preparó disolviendo 520,0 mg de ascaridol en un matraz aforado de

25,0 mL y agregando suficiente cantidad de agua, con agitación, de modo de obtener su disolución y llevarla finalmente a volumen. De este modo la concentración de ascaridol resultó 120 (moles/mL (ca. 20 mg/mL), conservándose a -10 °C.

#### *Linealidad de la calibración del sistema cromatográfico*

Volúmenes apropiados de la solución *stock* se diluyeron en agua de modo de obtener concentraciones de ascaridol de 12,0 ; 25,0 ; 50,0 ; 60,0 y 120  $\mu$ moles/mL. La linealidad de la representación gráfica de las áreas de los "picos" cromatográficos correspondientes se controló durante un período de por lo menos tres días de los análisis efectuados. En los cálculos se aplicó un método de regresión lineal por cuadrados mínimos, determinándose los errores correspondientes por un tratamiento computacional <sup>18</sup>.

#### *Valoración de ascaridol en las soluciones utilizadas para su calibración*

Se analizaron cinco muestras con diferentes concentraciones de ascaridol en agua. Previa filtración por membrana, se inyectaron (100  $\mu$ L) en el cromatógrafo (por triplicado). Los análisis de una misma solución, llevada a temperatura ambiente para su inyección, se concretaron en un período total de tres días, a fin de verificar su estabilidad, promediándose las áreas de los correspondientes "picos" cromatográficos y graficándose en función de las concentraciones de las soluciones analizadas.

#### *Determinación de la exactitud del método analítico*

Su verificación se realizó mediante la concreción de "ensayos de recuperación". Estos se efectuaron añadiendo diferentes volúmenes conocidos de la solución patrón de ascaridol (120  $\mu$ moles/mL) a volúmenes iguales de agua, procediéndose por quintuplicado. Luego se realizaron sucesivas extracciones de **I** de esas solucio-

nes con éter etílico como solvente, evaporándose a temperatura ambiente los extractos obtenidos y disolviendo el residuo en la fase móvil empleada en los análisis cromatográficos. Finalmente se inyectaron en el cromatógrafo, por triplicado, 100  $\mu$ L de cada muestra para su análisis, promediándose los valores de áreas obtenidos.

#### *Límite de detección del método*

La menor concentración empleada de ascaridol en las soluciones acuosas analizadas (12  $\mu$ moles/mL), originó un "pico cromatográfico" en todos los casos, por lo menos, 28 veces mayor que el ruido promedio observado en la línea de base del correspondiente cromatograma <sup>19</sup>. Por lo tanto, el límite de detección de **I** en las distintas soluciones acuosas resultó ca. 1 ppm (p/v).

#### **Análisis de los extractos provenientes de la maceración, decocción e infusiones de paico en agua**

Estos extractos se prepararon colocando paico (proveniente de la Provincia de Corrientes, República Argentina) recientemente recolectado en los meses de verano del año 2005) y convenientemente trozado con tijera, en contacto con agua destilada (Tabla 1) e inyectando en el sistema cromatográfico 100  $\mu$ L de los mismos, previamente filtrados por membrana de poliéster de 0,8  $\mu$ m de porosidad.

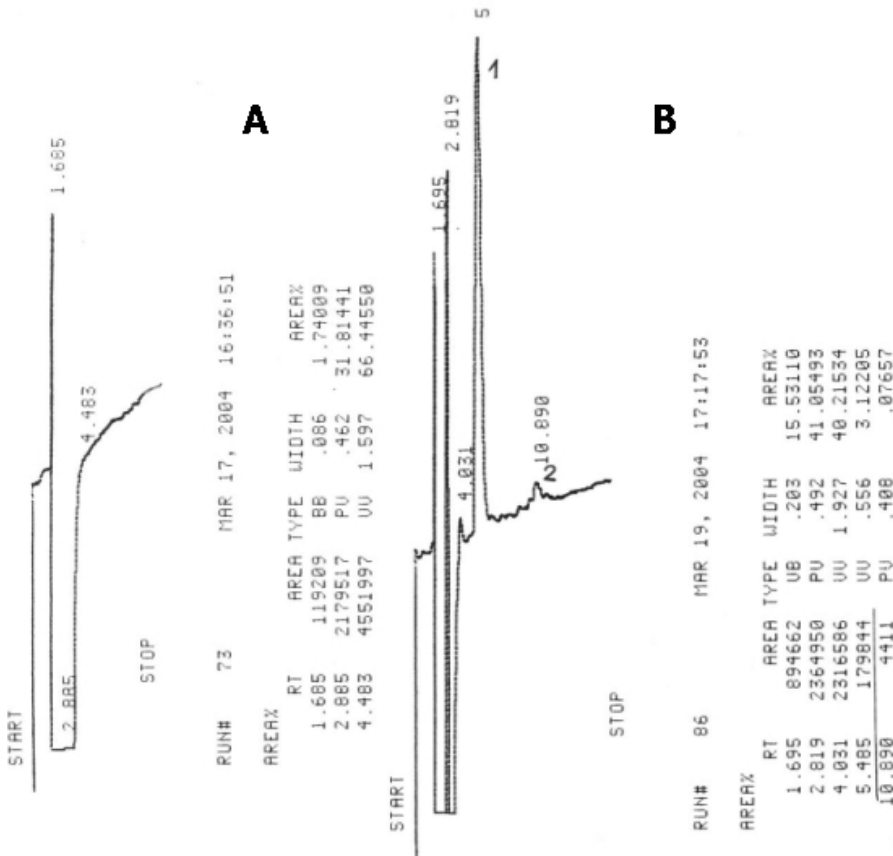
#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las características de los cromatogramas obtenidos por inyección de las soluciones de ascaridol en agua pura (Figura 2) demostraron ser útiles para la determinación cuantitativa de sus respectivas concentraciones en otro tipo de soluciones, resultando el tiempo de retención de ascaridol  $6,0 \pm 0,2$  min.

El "pico" cromatográfico observado en  $11,0 \pm 0,2$  min en las soluciones de ascaridol en agua pura (Figura 2), con un área ca. 0,3 % de la co-

| Tipo de solución       | Paico (gramos) | Agua destilada (mL) | Temperatura (°C) | Tiempo (minutos) |
|------------------------|----------------|---------------------|------------------|------------------|
| Maceración             | 20             | 200                 | 20 °C            | 180              |
| Extracción con Soxhlet | 9              | 200                 | 100              | 120              |
| Infusión               | 5              | ca. 100             | ca. 80           | 5                |

**Tabla 1.** Condiciones empleadas en la preparación de los extractos acuosos para el dosaje de ascaridol en *paico*.



**Figura 2.** Cromatogramas típicos de ascaridol en solución acuosa (CLAE).

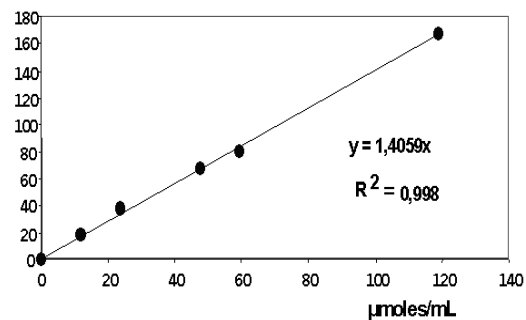
- A) Blanco de agua;
- B) Ascaridol (0,12 M) en agua).

respondiente a ascaridol, es razonable atribuirlo a una impureza que también es observada en el producto crudo proveniente de su síntesis. En las soluciones analizadas provenientes de los ensayos de maceración, decocción e infusión de Paico en agua destilada (Tabla 1), si bien se observa únicamente ascaridol (5,5 ppm, p/v) en la infusión, en los restantes extractos analizados se detectan otros “picos cromatográficos” que podrían corresponder a productos de su hidrólisis en las condiciones utilizadas para su preparación, los que justifican la ausencia de ascaridol en las mismas.

La curva de calibración de ascaridol (Figura 3) resultó razonablemente lineal ( $y = 1,4059x$ ) con un coeficiente de regresión lineal  $\leq 0,9989$

La precisión lograda en sucesivas inyecciones de las soluciones patrones en el sistema cromatográfico, evaluada mediante la determinación de la desviación estándar relativa de los resultados (RSD), está comprendida en el ámbito de 0,8%-2,1%. Por lo tanto, se puede concluir que la metodología aquí adoptada posee una aceptable reproducibilidad, evaluada en un período de varios días. El promedio del valor de ascaridol obtenido en los ensayos de recuperación resultó 97,5% (p/v) con un valor de RSD de 1,9%.

Unidades de Area x 10<sup>3</sup>



**Figura 3.** Curva de calibración para el análisis CLAE (RP-HPLC) de ascaridol en solución acuosa. Factor de respuesta para ascaridol:  $7,12 \times 10^{-4} \mu\text{moles} \times \text{mL}^{-1} \times \text{unidades de area}^{-1}$ .

### CONCLUSIONES

El método propuesto de análisis de ascaridol en solución acuosa, empleando cromatografía líquida de alta eficiencia en fase invertida, resulta simple y rápido en su ejecución, con aceptable precisión y exactitud. El mismo, además de su utilidad en estudios sobre la estabilidad térmica de ascaridol en agua pura <sup>12</sup>, puede también ser empleado para su determinación en maceraciones, decocciones e infusiones acuosas de paico

y en otras preparaciones análogas con aplicación farmacéutica.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Camponovo, L.E. & A.J. Bandoni (1955) *Farmacología* (Materia Médica y Terapéutica) Tomo I., 522-526. Ed. Lopez y Etchegoyen SRL, Buenos Aires.
2. Nájera, M.T. & E.D. Spegazzini (1984) *Rev. Farm.* **126**: 7-16.
3. Okuyama, E., K. Umeyama, Y. Saito, M. Yanazaki & M. Satake (1993) *Chem. Pharm. Bull.* **41**: 1309-16.
4. Torres, Ana M., G. Ricciardi, A. Agrelo de Nasif, A. Ricciardi & A. Bandoni (2003), "Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE (Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura, Corrientes)".
5. Millspaugh, C.F. (1974) "*American Medicinal Plants*", Dover Publications Inc., New York, Págs. 562-7.
6. Acero, C.G. & M.D. Rive (1989) "*Medicina Indígena-Cacha Chimborazo*", Abya Yala, Quito (Ecuador).
7. Nelson, E.B. (1911) *J. Am. Chem. Soc.* **33**: 1404-8.
8. Nelson, E.B. (1913) *J. Am. Chem. Soc.* **35**: 84-8.
9. Wallach, O. (1912) *Liebig Ann. Chem.* **392**: 59-63.
10. Beckett, A.H., M. Dowlow & G.U. Joliffe (1955) *J. Pharm. Pharmacol.* **7**: 55-64.
11. *The Merck Index*, 11<sup>th</sup> Edition (1992) substance N° 852, Rahway, N. J.
12. Jeandupeux, R., G. Romanelli & L.F.R. Cafferata (2002) *Bolivian J. Chem.* **19**: 63-6.
13. Schenck, G.O (1952) *Angew. Chem.* **64**: 12-15.
14. Schenck, G.O., K. G. Inkel & H. Mertens (1953) *J. Liebig Ann. Chem.* **584**: 123-7.
15. Schenck, G.O. & Z. Ziegler (1952) German Patent N° 752437, Schering A.G., Berlin.
16. Cafferata, L.F.R., R. Jeandupeux & A. Cañizo (2004) "*Kinetics of the Thermal Decomposition Reaction of Ascaridole in Solution*", Afinidad (en prensa).
17. Matusch, R. & G. Schmidt (1990) *Chem. Ztg.* **114**: 382-5.
18. Huyberecht, S., A. Halleux & P. Kruys (1955) *Bull. Soc. Chim. Belg.* **64**: 203-8.
19. ICH (1996) *Harmonise Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Geneve* (Switzerland) 1-8.