

## PRÁCTICA VI.5

### ANÁLISIS DE RUTINA EN RUTA GRAVEOLENS O RUTA spp. , “ruda”, UTILIZANDO TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

### ANALYSIS OF RUTIN IN *RUTA GRAVEOLENS* OR *RUTA* SPECIES (“RUDA”) USING CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES

Carmen Ma. Alvarez, Victor H. Doroteo, Isabel Cabello, Olga Lock\*

Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Ciencias, Sección Química,  
Apartado 1761, Lima – Perú

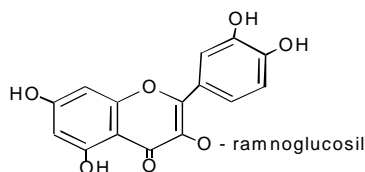
\* olock@pucp.edu.pe

#### 1. INTRODUCCIÓN

El género *Ruta* (Familia Rutaceae) comprende alrededor de 60 especies; etimológicamente *Ruta* deriva del griego ruomai, que significa refrenar, en alusión a la supuesta acción afrodisiaca.

Las especies de este género se conocen comunmente como “ruda”, y la *Ruta graveolens* L. es una antigua planta medicinal nativa del Sur de Europa; entre sus diversas aplicaciones encontramos que se utiliza la infusión de las hojas como digestivo, calmante nervioso, para gases intestinales y cólicos hepáticos y menstruales, así como en lavados para la inflamación de ojos y oídos. Otros usos son: contra el aire (frotar las sienes con las hojas), contra la fiebre (aplicar el cocimiento en aguardiente de la planta machacada sobre el vientre y cabeza), en prácticas de chamamismo para alejar los malos espíritus (poner un manojo en la puerta o en la casa), etc..

Las “rudas” se caracterizan por contener flavonoides, entre ellos la rutina, que se presenta como cristales color amarillo pálido, el que puede oscurecer gradualmente por exposición de la luz. Descompone con efervescencia a 214-215 °C, su rotación específica  $[\alpha]_D^{23}$  es + 13,82 (etanol) y dá color verde en solución diluída de cloruro férrico.



RUTINA

La rutina tiene importante uso en el tratamiento de la fragilidad capilar, encontrándose en formulaciones farmacéuticas con ese fin. En el presente experimento se describen los

ensayos para detectar y separar la rutina de la "ruda" a través de cromatografías de capa delgada y de columna; y un siguiente ensayo para su determinación cuantitativa por cromatografía líquida de alta eficiencia o rendimiento (CLAR, HPLC). El experimento puede ser hecho en dos sesiones, del 2.1 al 2.4 en la primera y la 2.5 en la segunda.

## 2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 2.1 Tratamiento de muestra

- Macere en un recipiente tapado 10 gramos de hojas secas y molidas con suficiente metanol por 48 horas con agitación constante.
- Filtre y evapore a sequedad en un evaporador rotatorio. Pese el extracto seco y calcule el rendimiento.

### 2.2 Análisis cualitativo por cromatografía de capa delgada, CCD

- Corra una CCD utilizando las siguientes condiciones:
  - Adsorbente: cromatofolios de sílica gel
  - Dimensión: 4 x 10 cm
  - Volumen aplicado: 5 uL (10 mg del extracto 1 en mL de metanol)
  - Sistema de elución: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH , 100:15
  - Revelador: luz UV 366 nm, y solución etanólica al 1% de FeCl<sub>3</sub>
- Corra paralelamente una muestra de rutina estándar.

### 2.3 Separación de rutina por cromatografía de columna (CC)

- Haga una CC utilizando 200 mg del extracto metanólico obtenido en 2.1, utilizando las siguientes condiciones:
  - Adsorbente: sílica gel 0,063 – 0,2 mm
  - Relación extracto: adsorbente 1: 30
  - Sistema de elución:

CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH (en proporciones)	Volumen total (mL)
100 15	30
100 20	30
100 30	30

- Proceda de la siguiente manera:
  - Aplique los sistemas de elución, recogiendo fracciones de 10 mL cada una.
  - Observe las fracciones colectadas bajo luz UV 366 nm.
  - Realice el análisis comparativo por CCD de las fracciones obtenidas, utilizando una muestra estándar de rutina, y el sistema eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH , 100 : 15.
  - Reúna las fracciones que contengan rutina, evapore a sequedad.
  - Si es necesario purifique por CCD preparativa usando el sistema eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (100 : 15). Recrystalice y pese el producto.
  - Obtenga los espectros IR y UV

#### 2.4 Análisis cuantitativo por cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR, HPLC)

(Para este análisis se prefiere preparar un nuevo extracto)

##### A. Extracción

- Haga una extracción de 200 mg (W) de material seco y molido con 7 mL de metanol (MeOH) durante 20 minutos, a temperatura ambiente y con agitación continua.
- Filtre la solución, recibéndola en la fiola de 25 mL directamente.
- Repita la extracción y la filtración por dos veces más, reuniendo todos los filtrados.
- Lleve a volumen con MeOH (solución A).

##### B. Pretratamiento del extracto (extracción en fase sólida)

- Acondicionamiento del cartucho (con fase estacionaria RP – 18, 500 mg): pase 1 mL de MeOH, y 1 mL de agua (en ese orden). NO DEJE SECAR.
- Limpieza: Coloque 0,15 mL de solución A en el cartucho, permitiendo su completo ingreso y eluya lentamente (aprox. 0,5 mL / min) con 1,0 mL de MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$ , 1:1, recibiendo el eluato (1 mL en total) en un recipiente adecuado. Esta es la solución a analizar por HPLC.

## C. Análisis por HPLC

- Columna: RP - 18, 5  $\mu$ m, 12,5 mm, con guarda columna RP – 18
- Fase móvil :
  - A: Acetonitrilo, con 0,05% de ácido fosfórico
  - B: Agua, con 0,05% de ácido fosfórico
- Programa de gradiente: 5% de A en B hasta 60% de A en B, por 15 minutos.
- Flujo: 1,0 mL / min
- Longitud de onda : 254 nm
- Tiempo de retención: entre 11 a 12 minutos
- Inyecte 10  $\mu$ L de la solución a analizar.

## D. Cálculos

- Prepare la curva de calibración utilizando soluciones etanólicas de rutina en concentraciones de 5,0; 15,0; 25,0; 35,0 y 50,0  $\mu$ g / mL.
- Halle el contenido de rutina, R, de la solución analizada en  $\mu$ g / mL.
- Exprese el contenido de rutina, según la siguiente fórmula:

$$\text{mg rutina / g muestra} = 25 \text{ R} / 150 \text{ W}$$

W: peso de muestra en gramos

## REFERENCIAS

- Soukup J. 1987. Nombres Vulgares de la Flora Peruana Ed. Salesianos. Lima, Perú, p. 358.
- Lock O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales, Fondo editorial, PUCP - Lima. pp. 141-143.
- Merck Index, 1983, An Encyclopedia of Chemical, Drugs and Biologicals, Merck & Co., Inc., N.J., USA. 10° Ed. p. 1196.
- Separatas CURSO – TALLER “Control de Calidad de Plantas Medicinales y de Fitofármacos: Métodos Químicos y Cromatográficos” PUCP, Lima, 21 - 25 de Setiembre de 1998

**Olga Lock**

olock@pucp.edu.pe

El trabajo en los laboratorios de Medicinal Chemistry debe mantener altos estándares de precaución y buen uso.

El manejo de instrumental eléctrico, la utilización de calor, el material de cristal y los disolventes no presentan un especial problema, si se siguen las instrucciones del supervisor.

Este documento ha sido supervisado por el Prof. OLGA LOCK SING ([olock@pucp.edu.pe](mailto:olock@pucp.edu.pe)) quien informa que no existen problemas específicos de seguridad en la realización de este ejercicio, incluyendo toxicidad, inflamabilidad y explosión, ni cualquier otro destacable, dentro de lo usual en un laboratorio de Medicinal Chemistry.

Se agradecerá comunicar al Editor cualquier posible incidencia.

## EXERCISE VI.5

ANALYSIS OF RUTIN IN *RUTA GRAVEOLENS* OR *RUTA* SPECIES  
("RUDA") USING CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES

Carmen Ma. Alvarez, Victor H. Doroteo, Isabel Cabello, and Olga Lock\*

Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Ciencias, Sección Química,  
Apartado 1761, Lima, Perú

\*E-mail: olock@pucp.edu.pe

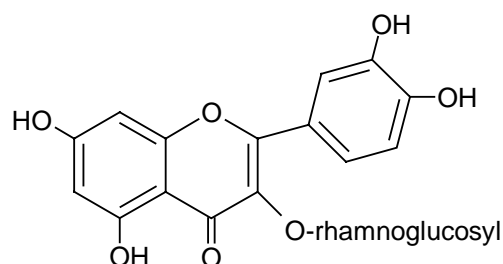
## 1. INTRODUCTION

*Ruta* genus (Rutaceae family) includes around 60 species; the name *Ruta* derives from the Greek word *ruomai*, which means "to restrain", related to its supposed aphrodisiac action.

Species of this genus are commonly known as "ruda" and, from these, *Ruta graveolens* L. is an old native medicinal plant from Southern Europe. Among its various applications, the infusion of leaves is used as digestive, nervous tranquilizer, for intestinal gases, for liver pains, as well as for eye and ear inflammations. Other uses found are: against "the air" (rub temple with the leaves), against the fever (extract the plant in hot alcoholic beverage like brandy and apply on the head). It is also used in "chamanismo" practices to throw away the "bad spirits" (put a handful on the door or the house), etc.

The "rudas" are characterized by their flavonoid content, mainly the rutin. Rutin shows up as pale yellow crystals that can gradually become dark on light exposure. It decomposes with effervescence at 214–215 °C, has a specific rotation  $[\alpha]_D^{23} + 13.82$  (ethanol), and reacts with a dilute ferric chloride solution, developing a green color.

Rutin has an important use in capillary fragility treatment, for this reason, it is being included in pharmaceutical formulations.



In this experiment, we describe the detection and separation of the rutin from the "ruda" by usual chromatography techniques such as thin-layer (TLC), column (CC), and high-

performance liquid chromatography (HPLC). The experiment is performed in two sessions, developing points 2.2 and 2.3 in the first session and 2.4 in the second one.

## 2. EXPERIMENTAL PROCEDURE

### 2.1 REAGENTS

- Rutin, >98 % (as standard)
- RP-18 Solid-phase extraction cartridge, 500 mg
- Silica gel for column chromatography (0.063–0.2 mm)
- Silica gel for TLC (chromatoplates)
- Ferric chloride 1 % in ethanol
- Methanol, analytical grade
- Dichloromethane, analytical grade
- Ethanol, analytical grade
- Methanol, HPLC grade
- Water, HPLC grade
- Orthophosphoric acid, analytical grade

**CAUTION: Exposure to dichloromethane vapors should be avoided, so its manipulation should be done in the fume hood.**

### 2.2 QUALITATIVE ANALYSIS

#### 2.2.1 Extract preparation

- a. Macerate 10 g of dried and ground leaves with enough methanol in a stoppered flask during 48 h with continuous agitation.
- b. Filter the solution and evaporate it to dryness, in a rotary evaporator. Weigh the dry extract (this solution is labelled as E) and obtain the yield.

#### 2.2.2 Analysis of E solution by TLC

Rutin standard is used for comparison

- Adsorbent: Silica gel 60 F<sub>254</sub>
- Dimension of the plate: 10 x 4 cm
- Volume: 5  $\mu$ L (10 mg of E is dissolved in 1 mL of methanol)

- Mobile phase: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (100:15)
- Detection: UV 366 nm, and 1 % FeCl<sub>3</sub> in ethanol

### 2.3 ISOLATION OF RUTIN BY COLUMN CHROMATOGRAPHY (CC)

#### 2.3.1 Sample preparation

- Dissolve 200 mg of E in approximately 5 mL of methanol.
- Add 1 g of silica gel (0.063–0.2 mm) and move it continuously until it is evaporated to dryness. This solid will be applied at the top of the column.

#### 2.3.2 Chromatographic conditions

- Adsorbent: Silica gel (0.063–0.2 mm, 70–230 mesh)
- Extract/adsorbent proportion (weight): 1/30
- Solvent composition for elution:

proportion		volume
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	MeOH	(mL)
100	15	30
100	20	30
100	30	30

#### 2.3.3 Column elution and analysis of fractions

- Apply the elute systems described in 2.3.2, collecting 10 mL volume fractions.
- Analyze all the fractions by TLC, with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (100/15) as developing system.
- Combine the fractions that contain rutin and evaporate to dryness.
- According to the TLC results, purify by preparative TLC, with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (100/15) as developing system.
- Recrystallize the solid and obtain the product yield.

#### 2.3.4 Spectral analysis

Obtain IR and UV spectra to analyze and/or compare with a standard or published data.



## 2.4 QUANTITATIVE ANALYSIS OF RUTIN BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

### 2.4.1 Calibration curve

Prepare a calibration curve with methanolic solutions containing 5.0, 15.0, 25.0, 35.0, and 50.0  $\mu\text{g}$  of rutin / mL.

### 2.4.2 Extract preparation

- a. Place 200 mg of the dried and ground plant material in a 20-mL Erlenmeyer flask.
- b. Add 7 mL of methanol and shake continuously for 20 min at room temperature.
- c. Filter the solution directly into a 25-mL volumetric flask.
- d. Repeat twice steps (b) and (c).
- e. Bring up to volume with methanol (this solution is labelled as X).

### 2.4.3 Solid-phase extraction (SPE)

- a. Condition the SPE column (RP-18 stationary phase) with 1 mL of methanol and then 1 mL of water. DO NOT DRY THE COLUMN.
- b. Apply 150  $\mu\text{L}$  of X solution into the column until the whole sample comes into the column.
- c. Elute at a rate of 0.5 mL/min (approximately) with 1.0 mL of MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1). Receive the eluate in an appropriate container. This solution is for HPLC analysis (this solution is labelled as Y).

### 2.4.4 HPLC Analysis

- Column: RP - 18 stationary phase, 5  $\mu\text{m}$ , 125 x 4.0 mm, with guardcolumn RP – 18
  - Mobile phase:
    - A: Acetonitrile, with 0.05 % orthophosphoric acid
    - B: Water, with 0.05 % orthophosphoric acid.
  - Gradient program: 5 % up to 60 % A in B for 15 min
  - Flow: 1.0 mL/min
  - Monitoring wavelength: 254 nm
  - Retention time: 11–12 min

- Volume injection: 10  $\mu$ L

#### 2.4.5 Results

- Calculate rutin content, R, on the Y solution ( $\mu$ g of rutin / mL), using the calibration curve.
- Express rutin content on the original sample ("Ruda") by the formula:

$$\text{mg rutin / g sample} = R / 6 W$$

W: sample weight ("Ruda") in grams.

#### REFERENCES

1. Soukup J. 1987. Nombres Vulgares de la Flora Peruana Ed. Salesianos. Lima, Perú.
2. Lock O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales, Fondo Editorial, PUCP - Lima.
3. Merck Index, 1983, An Encyclopedia of Chemical, Drugs and Biologicals, Merck & Co., Inc., N.J., USA. 10<sup>o</sup> Ed.
4. Notes: CURSO – TALLER "Control de Calidad de Plantas Medicinales y de Fitofármacos: Métodos Químicos y Cromatográficos" PUCP, Lima, 21 - 25 de Setiembre de 1998

**Olga Lock**

[olock@pucp.edu.pe](mailto:olock@pucp.edu.pe)

High standards in safety measures should be maintained in all work carried out in Medicinal Chemistry Laboratories. The handling of electrical instruments, heating elements, glass materials, dissolvents and other inflammable materials does not present a problem if the supervisor's instructions are carefully followed.

This document has been supervised by Prof. OLGA LOCK SING ([olock@pucp.edu.pe](mailto:olock@pucp.edu.pe)) who has informed that no special risk (regarding toxicity, inflammability, explosions), outside of the standard risks pertaining to a Medicinal Chemistry laboratory exist when performing this exercise.

If your exercise involves any "special" risks, please inform the editor.