



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**“PURIFICACION MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE LOS GLICOLIPIDOS  
PRESENTES EN LAS SEMILLAS DE *IPOMOEA ALBA*”**

T E S I S  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. F. B. ALMA DELIA MENDOZA GARCIA



TUTOR: DR. ROGELIO PEREDA MIRANDA AÑO: 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente	Dra. Rachel Mata Essayag
Vocal	Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Secretario	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123.

Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Congreso QUIMIUNAM noviembre de 2010.

Asesor: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda.

Sustentante: Alma Delia Mendoza García.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

- M. en C. Atilano Gutiérrez de la Universidad Autónoma Metropolitana por el registro de los espectros de RMN.
- M. en C. Georgina Duarte y M. en C. Margarita Guzmán de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química por el registro de los espectros de masas.
- Q. F. B. Marisela Gutiérrez de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química por el registro de las rotaciones ópticas.
- Miembros del jurado por sus observaciones que me permitieron la corrección del presente manuscrito.
- Dr. Rogelio Pereda Miranda por su apoyo, confianza y sobre todo por brindarme la oportunidad de aprender.
- Dra. Mabel Fragoso Serrano por su apoyo y atención en la realización de la presente investigación.

*A Dios padre por su gracia infinita y misericordia derramados en mi vida y a mis papás*

*Eliseo y Juana.*

## INDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Antecedentes.</b>	<b>3</b>
2.1	Familia <i>Convolvulaceae</i> .	3
2.2	El género <i>Ipomoea</i> .	4
2.2.1	Aplicaciones medicinales.	4
2.3	Características químicas presentes en las resinas glicosídicas.	5
2.4	Núcleos glicosídicos característicos del género <i>Ipomoea</i> .	6
2.4	<i>Ipomoea alba</i> .	9
2.5	Métodos cromatográficos.	13
2.5.1	Aislamiento de glicolípidos mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).	15
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACION.</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
4.1	Objetivo general.	25
4.2	Objetivos específicos.	25
<b>5</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.</b>	<b>26</b>
5.1	Determinación de las constantes físicas.	26
5.2	Métodos cromatográficos.	26
5.3	Material vegetal.	27
5.4	Extracción del material vegetal.	27
5.5	Separación mediante CLAE.	27
5.5.1	Condiciones instrumentales a nivel analítico.	27
5.5.2	Fraccionamiento primario a nivel preparativo del extracto clorofórmico.	28
5.5.3	Separación y purificación del componente mayoritario de la fracción Mv-III.	29
5.5.3.1	Condiciones instrumentales a nivel analítico.	29
5.5.3.2	Condiciones instrumentales a nivel preparativo.	29
<b>6</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	<b>31</b>
6.1	Extracción y fraccionamiento.	31
6.2	Separación y purificación de la fracción Mv-III.	38
6.3	Identificación del compuesto aislado.	41
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>APENDICE.</b>	<b>46</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Pentasacárido aislado de la convolvulina de <i>Ipomoea tuberosa</i> .	6
<b>Figura 2.</b> Pentasacáridos aislados de <i>Ipomoea operculata</i> .	7
<b>Figura 3.</b> Pentasacáridos aislados de la raíz de <i>Ipomoea batatas</i> .	8
<b>Figura 4.</b> Partes aéreas, flores y semillas de <i>Ipomoea alba</i> .	10
<b>Figura 5.</b> Alcaloides aislados de las semillas de <i>Ipomoea alba</i> .	11
<b>Figura 6.</b> Glicósidos aislados de las hojas de <i>Ipomoea alba</i> .	12
<b>Figura 7.</b> Glicósidos aislados de las hojas de <i>Ipomoea alba</i> (continuación).	13
<b>Figura 8a.</b> Esquema general del reciclaje.	18
<b>Figura 8b.</b> Ejemplo de una válvula de reciclaje.	18
<b>Figura 9.</b> Reciclaje en columna alternativa.	19
<b>Figura 10.</b> Rasurado de pico (cuando se tienen dos picos).	20
<b>Figura 11.</b> Separación inicial de una mezcla de reacción.	20
<b>Figura 12.</b> Reciclaje que comprueba la pureza del óxido.	21
<b>Figura 13.</b> Reciclaje del ozono.	21
<b>Figura 14.</b> Cromatograma generado a nivel analítico. Fase móvil MeOH.	31
<b>Figura 15.</b> Cromatograma generado a nivel analítico utilizando como fase móvil MeOH-H <sub>2</sub> O (9.5:0.5).	32
<b>Figura 16.</b> Cromatograma generado al utilizar 1% de H <sub>2</sub> O en MeOH.	32
<b>Figura 17.</b> Perfil cromatográfico utilizando como fase móvil MeOH-CH <sub>3</sub> CN (8:2).	33
<b>Figura 18.</b> Perfil cromatográfico, empleando como fase móvil MeOH-CH <sub>3</sub> CN (1:1).	34
<b>Figura 19.</b> Perfil cromatográfico utilizando una fase ternaria constituida por MeOH-CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O (5:4.5:0.5).	35
<b>Figura 20.</b> Perfil cromatográfico a nivel analítico empleando como fase móvil MeOH-CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O (5:4:1).	36
<b>Figura 21.</b> Perfil cromatográfico a nivel preparativo, fase móvil: MeOH-CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O(5:4:1).	37
<b>Figura 22.</b> Cromatografía en capa fina que muestra cada una de las fracciones presentes en el extracto, sistema de elución CHCl <sub>3</sub> -MeOH (85:15).	38
<b>Figura 23.</b> Perfil cromatográfico a nivel analítico de la fracción III empleando como fase móvil MeOH-CH <sub>3</sub> CN (8:2).	39
<b>Figura 24.</b> Perfil cromatográfico a nivel analítico empleando como fase móvil MeOH-CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O (5:4:1).	39
<b>Figura 25.</b> Perfil cromatográfico de la fracción Mv-III empleando MeOH-CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O (5:3.5:1.5) como fase móvil.	40
<b>Figura 26.</b> Purificación del componente mayoritario presente en la fracción Mv-III, mediante la técnica de reciclaje de la muestra.	41
<b>Figura 27.</b> Cromatograma que muestra el rasurado de pico y corte de pico del compuesto mayoritario presente en la fracción Mv-III. Las líneas cortas punteadas representan el rasurado de pico y la las líneas grandes punteadas representan el corte de pico.	41
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del pentasacárido aislado.	42
<b>Figura 29.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C del pentasacárido aislado.	42
<b>Figura 30.</b> Espectro de masas modo FAB negativo del pentasacárido aislado.	43
<b>Figura 31.</b> Conjunto isotópico del ion pseudomolecular [M+Cl] <sup>-</sup>	43
<b>Figura 32.</b> Pentasacárido aislado de la fracción Mv-III del extracto lipofílico de <i>Ipomoea alba</i> .	44

<b>Figura 33.</b> Perfil cromatográfico del saponificado empleando como fase móvil MeOH-H <sub>2</sub> O (7:3).	46
<b>Figura 34.</b> Perfil cromatográfico del saponificado empleando como fase móvil MeOH-H <sub>2</sub> O (6:4).	47
<b>Figura 35.</b> Perfil cromatográfico del saponificado empleando como fase móvil MeOH-H <sub>2</sub> O (1:1).	48
<b>Figura 36.</b> CCF de la muestra saponificada (Mv-S) vs. muestra saponificada-acetilada (Mv-SA) y en la otra placa se puede observar la muestra saponificada-acetilada (Mv-SA) vs. muestra saponificada-acetilada-metilada (Mv-SAM).	48
<b>Figura 37.</b> Perfil cromatográfico de Mv-SAM a nivel analítico, empleando como fase móvil CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O (9:1).	49
<b>Figura 38.</b> Perfil cromatográfico de Mv-SAM a nivel preparativo empleando como fase móvil CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O (9:1).	49
<b>Figura 39.</b> Reciclaje de la fracción II de la muestra Mv-SAM, fase móvil CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O (9.5:0.5).	51
<b>Figura 40.</b> Perfil cromatográfico a nivel analítico Mv-SAM, fase móvil CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O (9:1).	52
<b>Figura 41.</b> Perfil cromatográfico a nivel analítico generado de la fracción V (SAM) empleando como fase móvil CH <sub>3</sub> CN.	53

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación de los métodos cromatográficos (Skoog, 2001).	15
<b>Cuadro 2.</b> Ejemplos de condiciones CLAE usadas para el aislamiento de glicolípidos y ácidos glicosídicos presentes en especies de <i>Ipomoea</i> .	22
<b>Cuadro 3.</b> Ejemplos de condiciones CLAE usadas para el aislamiento de glicolípidos y ácidos glicosídicos presentes en especies de <i>Ipomoea</i> (continuación).	23
<b>Cuadro 4.</b> Miligramos de muestra obtenidos de cada fracción a nivel preparativo.	37
<b>Cuadro 5.</b> Miligramos de Mv-SAM obtenidos del corte realizado a nivel preparativo.	50



## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Å	Angstrom.
CCF	Cromatografía en capa fina.
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
EC	Electroforesis capilar.
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo.
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo.
ELSD <sub>s</sub>	Evaporative Light scattering detectors
EM	Espectrometría de masas.
ESI	Electrospray ionization.
FAB	Fast Atom Bombardment.
CG	Cromatografía de gases.
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acido sulfúrico.
I. R.	Indice de refracción.
MeOH	Metanol.
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica.

# 1 INTRODUCCION

El uso tradicional de plantas con fines medicinales y rituales en varias comunidades indígenas ha dado lugar a una intensa investigación de principios activos que pueden ser rentables en la medicina moderna y su producción a nivel industrial. El tejido celular de las plantas, tiende a acumular una buena cantidad de metabolitos secundarios de valor farmacológico (Vivero *et al.*, 1996). Los carbohidratos son un importante grupo de compuestos debido a su rol como material estructural, fuente de energía, funciones biológicas; que además se caracterizan por su diversidad estructural y por la variedad de isómeros que presentan. La separación de los carbohidratos con el mismo peso molecular que sólo difieren en la composición de los monosacáridos o en la unión glicosídica, se convierte en una tarea difícil. Técnicas como CLAE, CG O EC se han empleado para el análisis de carbohidratos, dependiendo de las características de la muestra a analizar (monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos, etc.) (Sanz y Martínez-Castro, 2007).

Las resinas glicosídicas son glicolípidos de plantas aisladas de la familia *Convolvulaceae* (Kobayashi *et al.*, 2002; Tasdemir *et al.*, 2008). Numerosas resinas glicosídicas han sido aisladas y sus estructuras han sido determinadas por métodos espectroscópicos (Kobayashi *et al.*, 2002). El género *Ipomoea* en particular incluye un gran número de especies medicinales, económicamente importantes en el México moderno (Hernández-Carlos *et al.*, 1999). Muchas especies de *Ipomoea*, aún se utilizan en la medicina popular en diferentes partes del mundo, algunas de ellas como purgantes. Estudios farmacológicos de extractos de estas plantas han demostrado sus actividades antimicrobiana, analgésica, espasmolítica, hipotensiva y efectos anticancerígenos, por citar algunos (MacLeod y Ward, 1997). Las resinas glicosídicas del tipo jalapina están

compuestas por ácidos grasos mono y dihidroxilados ( $C_{14}$  y  $C_{16}$ ) que se encuentran unidos glicosídicamente a una cadena oligosacárida que contiene cuatro o seis unidades de azúcar, con una unión éster entre el ácido graso y la cadena oligosacárida para formar una lactona macrocíclica. Los azúcares se encuentran esterificados con variedad de numerosas estructuras de ácidos de bajo peso molecular (Hernández-Carlos *et al.*, 1999; MacLeod y Ward, 1997).

La complejidad de estas resinas se debe a las estructuras isoméricas de sus constituyentes individuales y a la presencia de residuos de ácidos que esterifican diferentes posiciones de los mismos, lo que justifica las dificultades asociadas con su aislamiento y purificación. El éxito en la purificación de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas ha dependido exclusivamente del empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) (Bah, 1997), que proporciona la máxima resolución en un tiempo de análisis corto (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

## 2 Antecedentes.

### 2.1 Familia *Convolvulaceae*.

Esta familia comprende aproximadamente de 50 a 60 géneros con 1600 a 1700 especies; presenta una rica diversidad de características morfológicas, son principalmente plantas trepadoras. Las especies ocupan un amplio rango de hábitats ecológicos. Más de un tercio de las especies están incluidas en dos géneros principales, *Ipomoea* y *Convolvulus*. La familia se encuentra distribuida en todo el mundo, con muchos géneros principalmente tropicales, endémicos de cada continente, aunque la familia es más conocida en las regiones templadas por representantes que son maleza (ej. *Calystegia* y *Convolvulus*). Muchas especies tropicales son plantas valiosas de uso ornamental, medicinal y alimentario (Stefanovic *et al.*, 2002; Galetto *et al.*, 2002).

En la República Mexicana, se reconocen quince géneros y aproximadamente 217 especies. El grado de diversidad de los caracteres primitivos y avanzados que se presentan en la familia es comparable con el de otras zonas tropicales en el mundo, como son África, Sudamérica, Malasia y Australia (Mc Donald, 1991).

El nombre de esta familia proviene del vocablo latino *convolvere* que significa entrelazarse y se refiere a su modo de crecimiento. (Pereda-Miranda y Bah, 2003). La característica anatómica más notable, es la presencia de células secretoras de resinas glicosídicas en los tejidos foliares, raíces y rizomas. Estas glicorresinas representan un importante marcador quimiotaxonómico de esta familia y son responsables de las propiedades purgantes y citotóxicas (Bah y Pereda-Miranda, 1996).

## **2.2 El género *Ipomoea*.**

Este género tiene usos medicinales, alucinógenos y ornamentales. *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (camote) es el más conocido de los tubérculos comestibles, probablemente originario de América Central. Actualmente, se cultiva en los trópicos como cultivo de subsistencia y de valor comercial, y en regiones templadas como cultivo comercial. Otro miembro de éste género de importancia alimenticia es *I. aquatica* (col china), cultivada por sus brotes comestibles en el sudeste asiático (Putz y Mooney, 1991). *I. tricolor* (*I. violacea*) es otra especie del género que se usa como cultivo de cobertura para impedir el crecimiento de otras plantas (Bah y Pereda-Miranda, 1997).

### **2.2.1 Aplicaciones medicinales.**

En África occidental, *I. batatas* se utiliza para el tratamiento de la disentería, la diabetes y la epilepsia, en tanto que *I. pes-caprae* se utiliza para los edemas y el reumatismo. En Indonesia, esta especie se usa para dolores y úlceras (Putz y Mooney, 1991). En México, la riñonina como se conoce a *I. pes-caprae* se utiliza para combatir el mal de orín y las infecciones del riñón y vías urinarias (Escobedo-Martínez y Pereda-Miranda, 2007). En Vietnam, *I. nil* es usada como un insecticida y antihelmíntico. Las raíces de *I. purga* se utilizan como purgante (Putz y Mooney, 1991). En algunas comunidades de México se emplea una infusión del tallo, hojas y flores del cazahuate (*I. murucoides*, *I. arborescens*, entre otras) contra la mordedura de serpientes y escorpiones, también es usada para evitar la pérdida de cabello. Una infusión acuosa de las hojas se emplea como antiinflamatorio y para el tratamiento de dolor de estómago (León *et al.*, 2005). Las flores de esta misma especie son usadas por sus propiedades antisépticas, se frotran directamente sobre infecciones de la piel, prurito y erupciones cutáneas. En forma de

infusiones y cataplasmas, las hojas, el tallo y la corteza del cazahuate se usan para el reumatismo, la inflamación y el dolor muscular (Chérigo y Pereda-Miranda, 2006).

### **2.3 Características químicas de las resinas glicosídicas.**

Las resinas glicosídicas son mezclas complejas constituidas por carbohidratos y ácidos grasos volátiles y no volátiles. Los residuos volátiles identificados con mayor frecuencia incluyen a los ácidos tíglico, isobutírico, metilbutírico (McLeod y Ward, 1997), nílico (Hernández-Carlos *et al.*, 1999) y cinámico (Noda *et al.*, 1992). Los ácidos grasos de mayor peso molecular caracterizados en las especies del género *Ipomoea* incluyen a los ácidos *n*-hexanoico, *n*-octanoico, *n*-decanoico y *n*-dodecanoico (Pereda-Miranda *et al.*, 2005; Chérigo y Pereda-Miranda, 2006). El ácido hexadecanoico hidroxilado en la posición C-11, conocido con el nombre de ácido jalapínico, representa la aglicona que con mayor frecuencia se presenta en las resinas del género *Ipomoea*. Los carbohidratos que pueden estar presentes son D-glucosa, D-fucosa, D-quinovosa y la L-ramnosa (Fürstner y Müller, 1999; Pereda-Miranda y Bah, 2003).

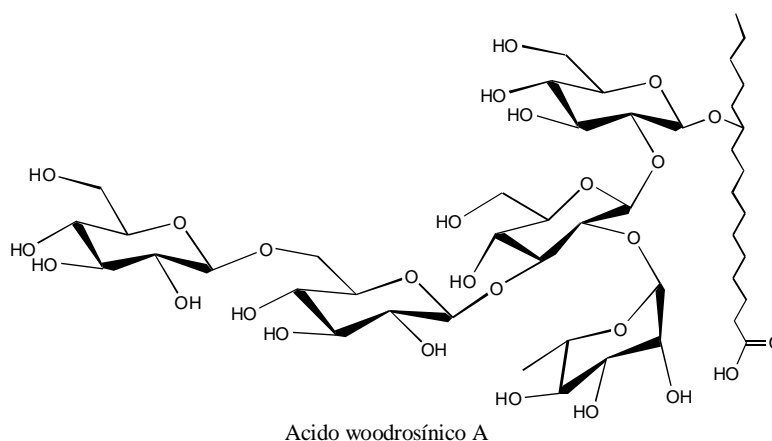
La complejidad de estas resinas se debe a la semejanza estructural de los constituyentes individuales, debido a que representan una mezcla de isómeros que involucran diferentes sitios de esterificación (Pereda-Miranda, *et al.* 2010).

Empleando un tratamiento alcalino, los glicolípidos liberan al ácido glicosídico estructural y a los ácidos que lo esterifican. A su vez, el ácido glicosídico al ser sometido a un tratamiento ácido, produce una mezcla de monosacáridos y la aglicona. Estos métodos de degradación han constituido una de las formas para lograr la identificación estructural de las resinas en conjunto con el análisis espectroscópico (RMN, 500 MHz) y espectrométrico (EM-FAB) de alta resolución de los oligosacáridos intactos (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

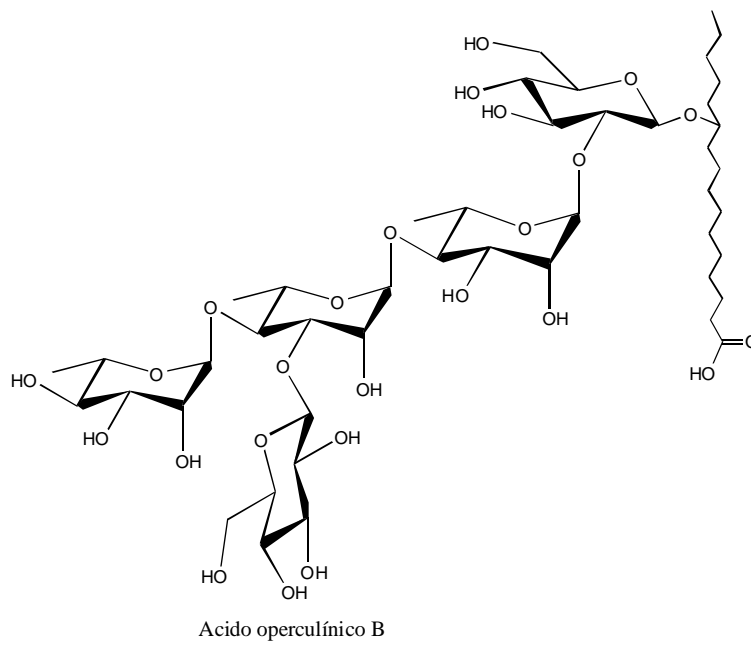
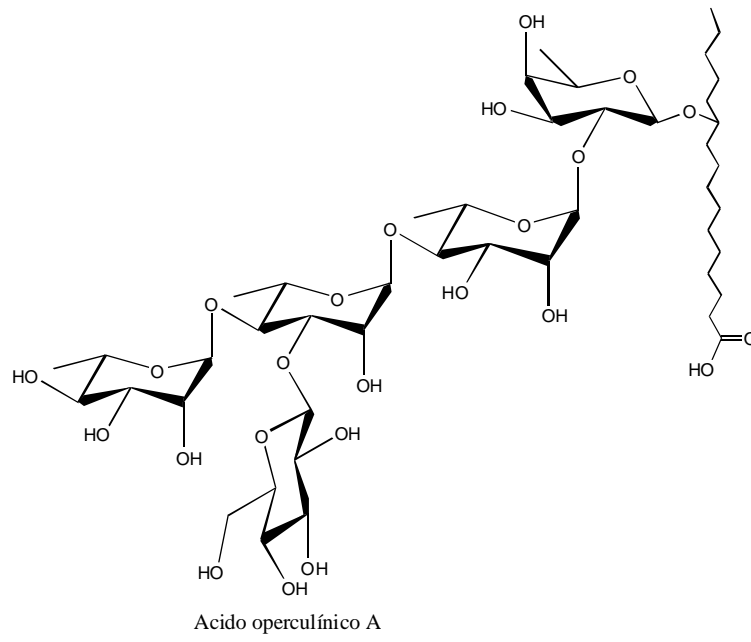
## 2.4 Núcleos glicosídicos característicos del género *Ipomoea*.

Los glicolípidos presentes en este género comparten como característica estructural un núcleo oligosacárido, que en la mayoría de los casos se encuentra acilado con el grupo carboxilo de la aglicona para formar un éster macrocíclico. Las agliconas presentes en estas resinas son los ácidos convolvulínico (C<sub>14</sub>) o jalapinólico (C<sub>16</sub>) que corresponden a C-11 hidroxiaácidos (Pereda-Miranda *et al.*, 2006).

La actividad biológica, en particular la actividad purgante, se encuentra asociada a la presencia de la lactona macrocíclica, ya que cuando se hidroliza el enlace éster disminuye o desaparece la actividad (Pereda-Miranda *et al.*, 2010). Algunos de estos glicolípidos presentan actividad biológica en líneas celulares de cáncer de mama humano y actividad antibacteriana (Kobayashi *et al.*, 2002). Se han identificado núcleos di, tri, tetra, penta y hexasacáridos, de los cuales sólo se ejemplifican en las figuras 1-3 los núcleos pentasacáridos, más comunes de este género.

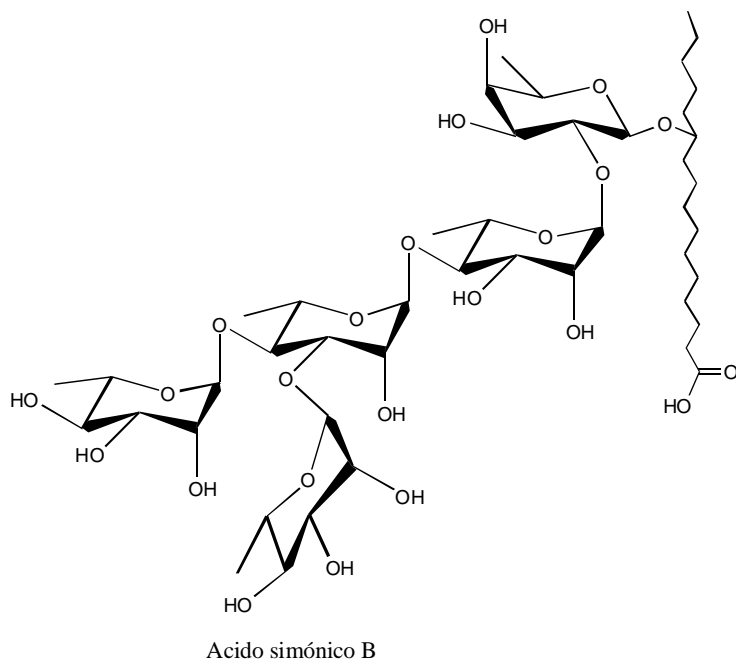
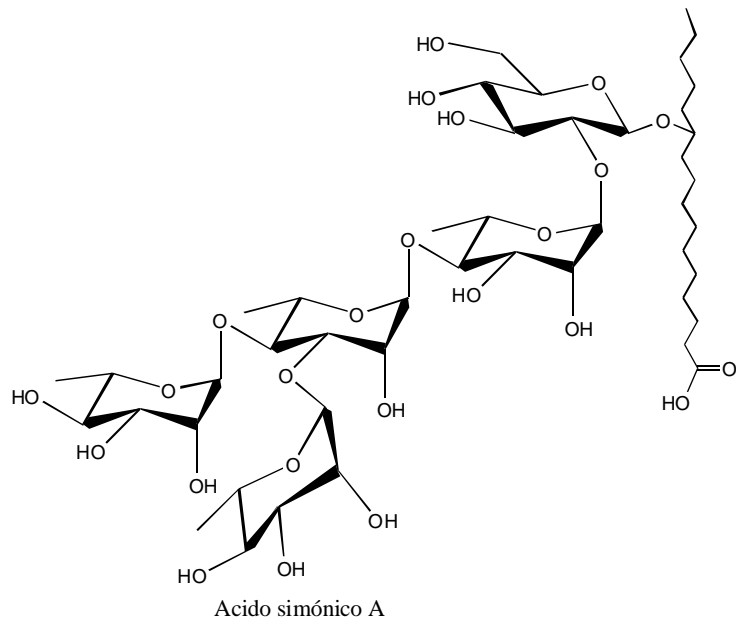


**Figura 1.** Pentasacárido aislado de la convolvulina de *Ipomoea tuberosa* (Ono *et al.*, 1993).



**Figura 2.** Pentasacáridos aislados de *Ipomoea operculata* (Ono, et al., 1989).





**Figura 3.** Pentasacáridos aislados de la jalapina de la raíz de *Ipomoea batatas* (Noda *et al.*, 1992).

#### 2.4 *Ipomoea alba*.

Esta especie presenta las siguientes sinonimias en la literatura: *Calonyction aculeatum* (L.) House (Furukawa *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 1993), *Ipomoea bona-nox* L., (Osadao, 1834) *Calonyction speciosum* Choisy, *Calonyction bona-nox* (L.) Bojer, *Convolvulus aculeatus* L. (<http://plants.jstor.org/flora/fz6048>; Gunn, 1972). Es una planta de vegetación silvestre, nativa de América tropical, a menudo cultivada como una especie ornamental, ampliamente distribuida en altitudes bajas y medianas en todo el trópico. Se presenta como una enredadera con tallos fuertes, de flores blancas lisas y grandes de 4 pulgadas, las semillas son de cubierta dura, ovoides, lisas, de color marrón ([http://plants.jstor.org/upwta/1\\_1089](http://plants.jstor.org/upwta/1_1089)).

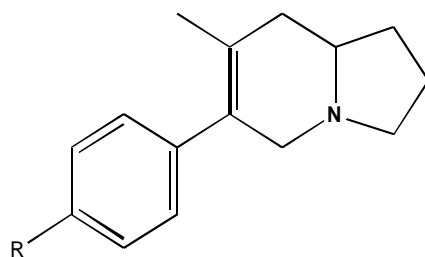
En Yucatán, Méx., la decocción de las hojas, corteza y flores, tomada en dosis de una cucharadita de café, una vez al día y el baño realizado con este preparado, curan la parálisis y la hidropesía (Osadao, 1834). En Sierra Leona, las hojas son utilizadas como alimento y, en Ghana, son un sustituto de jabón y empleadas para el baño. En la India, la planta se utiliza para tratar la mordedura de serpientes ([http://plants.jstor.org/upwta/\\_1089](http://plants.jstor.org/upwta/_1089)).

*I. alba* regula el crecimiento de otras plantas, incrementando el rendimiento de varios cultivos como ñame, maní, frijol y trigo (Furukawa *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 1993).

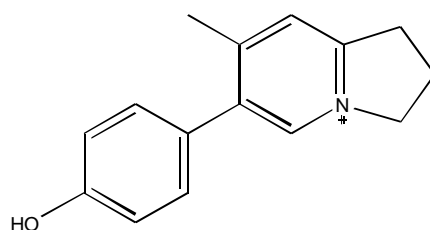


**Figura 4.** Partes aéreas, flores y semillas de *Ipomea alba*.

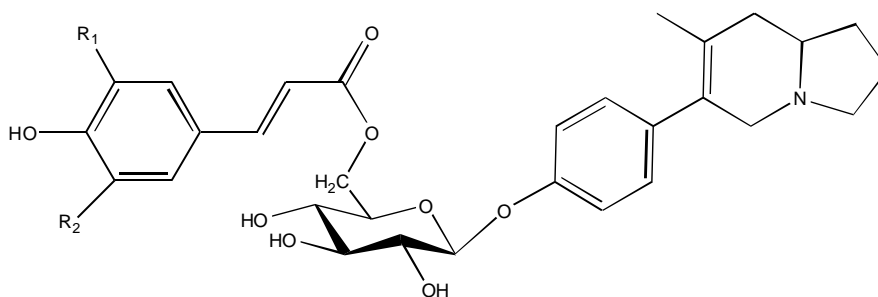
Existen estudios químicos que describen el aislamiento de alcaloides indolicídnicos a partir de las semillas de *I. alba* como la ipalbidina [1], la ipalbina [2], la ipomina [3], la isoipomina [4], la metoxi-isoipomina [5], la dimetoxi-isoipomina [6], y el ipalbidinium [7] (Ikhiri *et al.*, 1987; Howard *et al.*, 1979).



- 1** R= OH  
**2** R= O-Glu



**7**

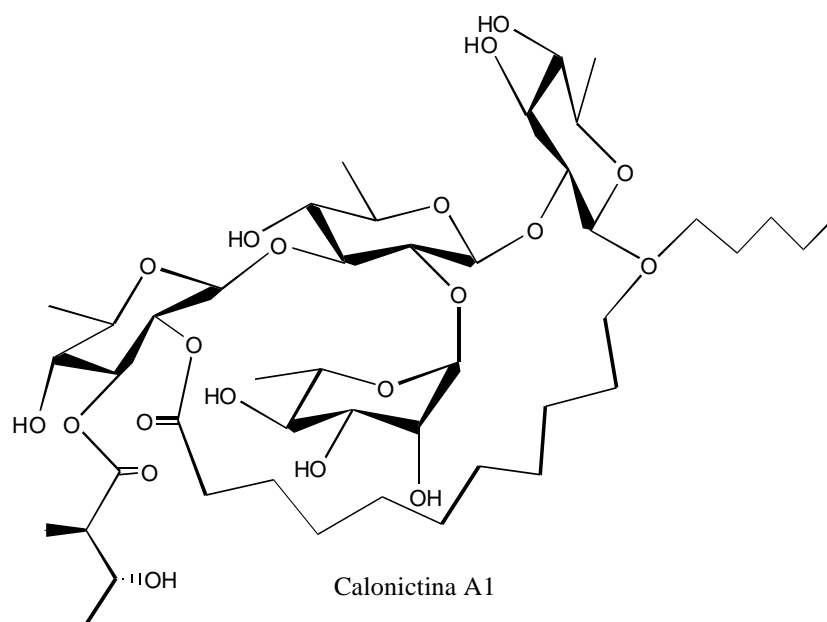


- 3** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>= H  
**4** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>= H  
**5** R<sub>1</sub>=H R<sub>2</sub>= OMe  
**6** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=OMe

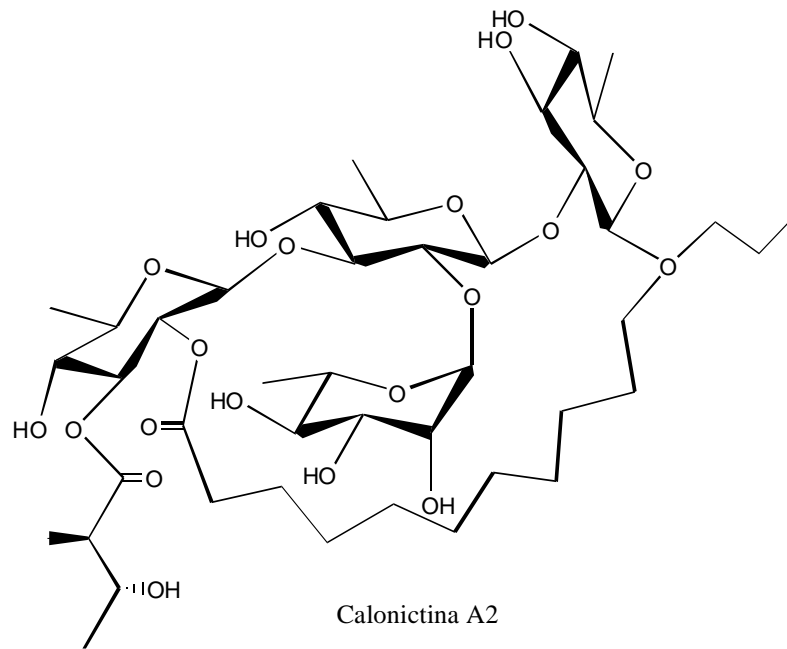
**Figura 5.** Alcaloides aislados de las semillas de *Ipomoea alba*.

Desde los años sesenta se ha demostrado la presencia de alcaloides ergolínicos en algunos miembros de la familia *Convolvulaceae*, así como la acumulación de estos compuestos en cultivo de tejidos de *I. alba* L. e *I. violacea* L. Vivero y colaboradores indujeron la formación de callos para la acumulación de ergometrina, la cual tiene gran valor terapéutico, pues es utilizada para la disminución de las hemorragias posparto y como coadyuvante en la contracción del útero de forma más rápida y eficiente (Vivero *et al.*, 1996).

Dos glicósidos con núcleo tetrasacárido conocidos como la calonictina A1 y un homólogo de éste, la calonictina A2 se aislaron de las hojas secas de *I. alba* (figura 6) (Furukawa *et al.*, 2000).



**Figura 6.** Glicósidos aislados de las hojas de *Ipomoea alba*.



**Figura 7.** Glicósidos aislados de las hojas de *Ipomoea alba* (continuación).

## 2.5 Métodos cromatográficos.

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente (Skoog, 2001).

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de dos modos distintos. El primero de ellos se basa en la forma en que las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto. En la cromatografía en columna, un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por presión. En la cromatografía en plano, la fase estacionaria se fija sobre una placa plana o a los intersticios de un papel; en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por gravedad. Otra clasificación, de los métodos cromatográficos se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases. Así se pueden citar tres clases generales de cromatografía: cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos; el siguiente cuadro muestra una clasificación correspondiente a cada tipo de cromatografía (Skoog, 2001).

**Cuadro 1.** Clasificación de los métodos cromatográficos (Skoog, 2001).

<b>Clasificación general</b>	<b>Método específico</b>	<b>Fase estacionaria</b>	<b>Tipo de equilibrio</b>
Cromatografía de líquidos (CL) (fase móvil: líquida)	Líquido-líquido, o reparto	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Líquido-sólido, o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución/exclusión
Cromatografía de gases (CG) (fase móvil: gas)	Gas-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un líquido
	Gas-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Gas-sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos (CFS) (fase móvil: fluido supercrítico)		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada

### **2.5.1 Aislamiento de glicolípidos mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).**

Actualmente, la cromatografía de líquidos de alta resolución se utiliza debido a su elevada sensibilidad, eficacia y rapidez. Consiste en hacer pasar, con alta presión, la fase móvil (líquida), en la que previamente se ha introducido la muestra mediante un sistema de inyección, por una columna empacada con la fase estacionaria (frecuentemente gel de sílice) (Kuklinski, 2000).

El gel de sílice tiene la ventaja de poseer estabilidad mecánica, además de su superficie de área específica y tamaño de poro el cual puede adaptarse para lograr el ajuste con la



cinética de transferencia de masa y la retención de los analitos en técnicas de separación cromatográfica. Una alta selectividad puede lograrse por unión de ligandos con alta capacidad de reconocimiento molecular (Gooding y Regnier, 2002). Así, las fases estacionarias ligadas se fijan mediante una reacción entre las partículas de sílice y un organoclorosilano de fórmula general  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{RCl}$ , donde R es un grupo alquilo o alquilo sustituido. Las propiedades de la fase estacionaria dependen de la naturaleza del grupo alquilo del organosilano. Ejemplos de fases estacionarias polares son aquellas en las que está presente un grupo funcional ciano ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{CN}$ ), diol ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ ) o amino ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$ ) (Madison, 1999).

Como la fase estacionaria es polar (e.g. gel de sílice), la fase móvil es un disolvente no polar o moderadamente polar. La combinación de una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar recibe el nombre de cromatografía de fase normal. En la cromatografía de fase inversa, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar. Las fases estacionarias no polares más utilizadas tienen un organoclorosilano en el que el grupo R es una cadena de hidrocarburo *n*-octilo (C8) o *n*-octadecilo (C18) (Madison, 1999).

Casi todos los sistemas de CLAE están equipados con un detector de UV. Los detectores de arreglo de diodos permiten la exploración de toda la gama UV-visible (210 a 650 nm) y son cada vez más populares para la separación de productos naturales (Cseke *et al.*, 2006). Para los azúcares naturales, que absorben en el rango del sistema de disolventes, se utilizan detectores de índice de refracción (I.R.) o detectores de evaporación por dispersión de luz (ELSDs) (Cseke *et al.*, 2006).

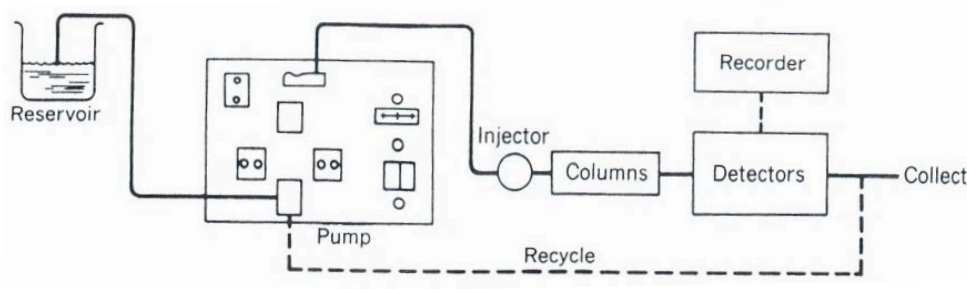
La separación cromatográfica se efectúa gracias a las interacciones de las fases móvil y estacionaria, tal y como se muestra en el cuadro 1. Sin embargo, en todos los casos los instrumentos básicos son esencialmente los mismos (Madison, 1999). La gran diferencia con la cromatografía líquida tradicional consiste en el empleo de grandes

presiones para impulsar la fase móvil, lo cual permite conseguir cromatogramas muy rápidos con una elevada resolución, (Kuklisnki, 2000).

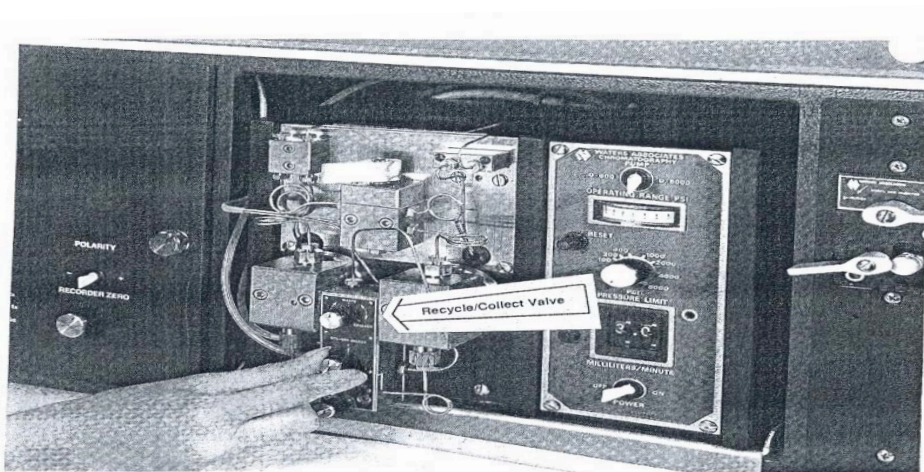
Los carbohidratos han sido objeto de análisis cromatográfico en diferentes campos: la agricultura, la química de alimentos, la medicina, la química orgánica, la biología, las ciencias del medio ambiente, entre los más importantes. El número y tipos de isómeros que muestran es mayor que el de cualquier otro grupo de compuestos (Sanz y Martínez-Castro, 2007).

Las resinas glicosídicas son compuestos anfifílicos que presentan grandes cadenas alifáticas unidos a una parte polar. No son fáciles de aislar y purificar ya que siempre están presentes en forma de mezclas complejas de homólogos que tienen la misma polaridad, pero con diferentes sustituyentes alquílicos en la cadena hidrocarbonada. La cromatografía de líquidos de alta resolución ofrece una resolución máxima en un análisis a corto plazo con la disponibilidad de tamaños de partículas pequeñas (<25 micras en las formas irregulares y esféricas), los tamaños de poro (60 y 130 Å), con modificaciones (gel de sílice químicamente enlazada) en la fase estacionaria (Pereda-Miranda *et al.*, 2010). Los carbohidratos que no se derivatizan se analizan por CLAE principalmente con columnas que presentan alguno de los siguientes materiales: un ácido fuerte que es intercambiador de iones en una matriz de poliestireno-divinilbenceno con contraiones de  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Ag}^+$ , una porción octadecilo químicamente unida a la sílice y una porción amino unida químicamente a la sílice (Nikolov *et al.*, 1985). La totalidad de los constituyentes descritos a partir del aislamiento de estos glicolípidos se han obtenido empleando una técnica conocida como “rasurado de pico”, seguida del reciclaje del pico (Bah, 1997). En la figura 8a se puede apreciar la operación de reciclaje y en la figura 8b se muestra un cromatógrafo de líquidos con válvula de

reciclaje. El reciclaje se logra girando una válvula destinada para este objetivo, como se muestra en dicha figura (Bidlingmeyer, 1992).



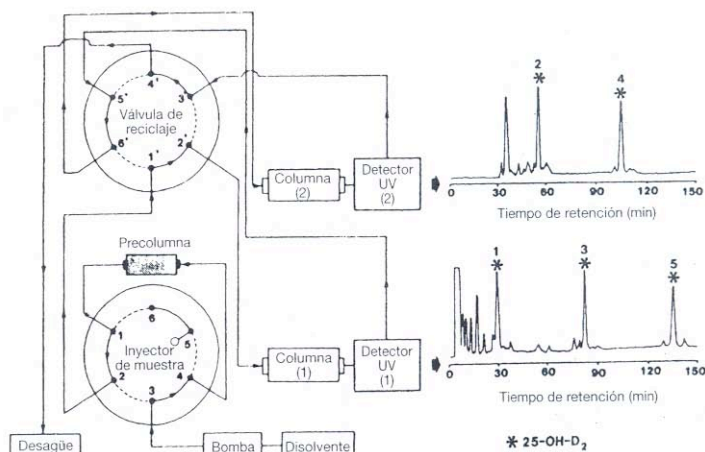
**Figura 8a.** Esquema general del reciclaje (Bidlingmeyer, 1992).



**Figura 8b.** Ejemplo de una válvula de reciclaje (Bidlingmeyer, 1992).

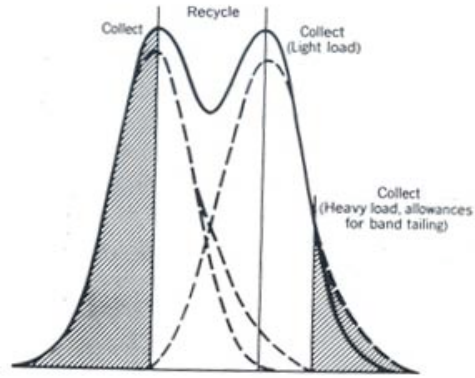
El cambio de la válvula a la posición de “reciclaje” se realiza cuando el pico ha sido registrado por el detector, como resultado de esto la muestra es enviada de vuelta a la bomba con el “loop” cerrado, a través de la línea de paso al inyector, después a la columna y al detector nuevamente (Bidlingmeyer, 1992). Otro sistema que permite llevar a cabo este procedimiento es el reciclaje en columna alternativa, en donde se hace uso de dos columnas, de tal forma que la fracción requerida se pasa directamente desde

la primera columna a la segunda. Si es necesario, la muestra cortada se puede transferir de nuevo a la primera columna desde la segunda (por medio de válvulas), antes de que se recoja el material puro figura 9. La ventaja del reciclaje en columna alternativa es que la muestra sólo pasa una vez a través de la bomba (Hostettman, 2001).



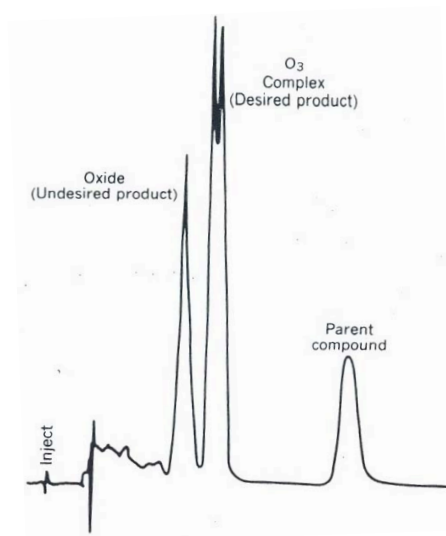
**Figura 9.** Reciclaje en columna alternativa (Hostettman, 2001).

Después de optimizar las condiciones de separación analíticas, la separación se lleva a escala preparativa, compuestos como el que se observa en la figura 10 pueden obtenerse como material puro de picos parcialmente resueltos en el primer paso de una separación en el modo de reciclar. Esta técnica es conocida como “rasurado de pico”. En el rasurado de pico, el material se recoge por separado de los picos iniciales y finales en cada paso de reciclaje. Esto da lugar a la máxima resolución en el siguiente paso y maximiza la recuperación de la muestra incluso para los componentes de menor importancia y reduce al mínimo el consumo de disolventes. En la figura 10, los puntos de colecta óptima están indicados con líneas verticales sólidas mientras que las líneas punteadas muestran picos hipotéticamente puros contenidos bajo la curva observada (Bidlingmeyer, 1992; Hostettman, 2001). El método de rasurado es útil para disminuir el tiempo de separación y el número de ciclos (Kubo y Nakatsu, 1990).



**Figura 10.** Rasurado de pico (cuando se tienen dos picos) (Bidleingmeyer, 1992).

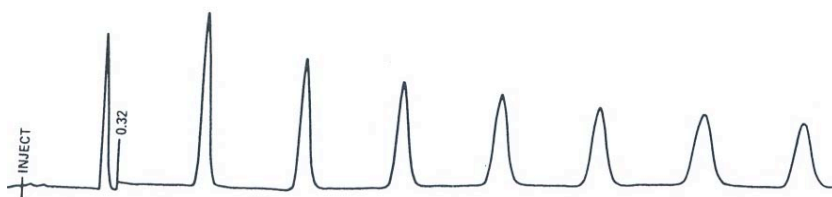
Para ejemplificar el reciclaje, en la figura 11 se muestra la separación inicial de una mezcla de reacción (óxido y ozono).



**Figura 11.** Separación inicial de una mezcla de reacción (Bidleingmeyer, 1992).

Se lleva a reciclaje el óxido y no se observa más separación de los componentes, figura 12 (esto no significa necesariamente que sólo existe un compuesto en este pico, pero sí significa que se tiene más confianza de que es un compuesto). Después de ocho ciclos a

través de la columna, el compuesto ha experimentado aproximadamente 64,000 platos y se puede tener la certeza de su pureza (Bidleingmeyer, 1992).



**Figura 12.** Reciclaje que comprueba la pureza del óxido (Bidleingmeyer, 1992).

Sobre el reciclaje del ozono figura 13, se observa que en el primer ciclo lo que parecía ser un solo compuesto finalmente se desdobló en varios picos como resultado de la influencia del aumento en el número de platos por aproximadamente 8,000 platos por paso en cada reciclaje (Bidleingmeyer, 1992). Reciclar tiene un efecto similar a aumentar la longitud de la columna (Hostettman, 2001). Después de seis ciclos (48,000 platos), cada uno de los picos fueron colectados, se encontró que estaban puros y su estructura fue determinada (Bidleingmeyer, 1992).



**Figura 13.** Reciclaje del ozono (Bidleingmeyer, 1992).

El reciclaje puede lograrse manualmente mediante la recolecta del pico de interés durante el rasurado y su reinyección tantas veces como sea necesario para obtenerlo en estado puro. El acomplamiento de una válvula de reciclaje al circuito cromatográfico

constituye la mejor opción para alcanzar la separación del componente de interés de los contaminantes que lo acompañan (Bah, 1997). Reciclar tiene resultados en el incremento del rendimiento, reduce el tiempo de separación, disminuye el consumo de disolventes y se tiene una completa recuperación de los compuestos (deseados) en el modo preparativo (Bidlingmeyer, 1992). Los retos técnicos más importantes son encontrar los elementos de análisis más favorables (fases estacionarias y móviles, modos de elución isocrático o por gradiente, y la carga máxima de muestra) y luego llevarlas a una escala en condiciones preparativas, manteniendo la resolución (Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002; Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

La mayoría de las separaciones de las resinas glicosídicas y sus núcleos sacáridos se han realizado utilizando la modalidad de cromatografía de fase inversa (cabe mencionar que previo a esto, se han realizado fraccionamientos en columna abierta de gel de sílice y en algunos casos la obtención de derivados peracetilados y metilados) para la separación de los compuestos de interés (Ono *et al.*, 1993; Bah y Pereda-Miranda, 1997; Bah, 1997; Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002; Chérigo, 2004; Escalante-Sánchez, 2004; Escobedo-Martínez, 2007). En el cuadro 2 y 3 se enlistan algunos ejemplos de las condiciones utilizadas para la separación de resinas glicosídicas.

**Cuadro 2.** Ejemplos de condiciones por CLAE usadas para el aislamiento de glicolípidos y ácidos glicosídicos presentes en especies de *Ipomoea*.

Compuestos	Muestra	Condiciones CLAE	Detección
Orizabina IX–XXI (Hernández-Carlos <i>et al.</i> , 1999)	Raíz de <i>Ipomoea orizabensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spherisorb C<sub>18</sub> (19 × 250mm, 10 μm); fase móvil CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (88:12); velocidad de flujo 8 mL/min; elución isocrática.</li> <li>• μBondapak (19 × 150 mm, 10 μm); fase móvil CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (95:5); velocidad de flujo 4 mL/min; elución isocrática.</li> </ul>	Índice de refracción.

**Cuadro 3.** Ejemplos de condiciones por CLAE usadas para el aislamiento de glicolípidos y ácidos glicosídicos presentes en especies de *Ipomoea* (continuación).

Compuestos	Muestra	Condiciones CLAE	Detección
Orizabina I-VIII (Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002)	Raíz de <i>Ipomoea orizabensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ISCO C<sub>18</sub> (10 × 250mm, 10µm); fase móvil CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (22:3); velocidad de flujo 4 mL/min; elución isocrática.</li> <li>• µBondapak (columna de gel de sílice enlazada a grupos aminopropilmetilsil; 19 × 150mm, 10 µm); fase móvil CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (92:8); velocidad de flujo 4 mL/min; elución isocrática.</li> </ul>	Índice de refracción.
Tricolorinas A-E (Bah y Pereda-Miranda, 1996)	Extracto CHCl <sub>3</sub> de <i>Ipomoea tricolor</i>	µBondapak (19 × 150 mm, 10 µm); fase móvil CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O (92:8); velocidad de flujo 6 mL/min; elución isocrática.	Índice de refracción.
Batatósidos H-P (Yin <i>et al.</i> , 2009)	Tubérculos de <i>Ipomoea batatas</i>	Shim-Park RP-C <sub>18</sub> (20 × 200 mm); fase móvil MeOH 90%, MeOH 96% y MeOH 98%	UV 280 nm
Pescaprosído A Pescapreínas I-IV (Pereda-Miranda <i>et al.</i> , 2005)	Partes aéreas de <i>Ipomoea pescaprae</i>	Symmetry C <sub>18</sub> (19 × 300mm, 7µm); fase móvil CH <sub>3</sub> CN-MeOH (9:1); velocidad de flujo 9 mL/min; elución isocrática.	Índice de refracción
Murucoidina I-II  Murucoidina III Estoloniferina I (Chérigo, 2004)	Flores de <i>Ipomoea murucoides</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Symmetry C<sub>18</sub> (19 × 300 mm, 7µm); fase móvil CH<sub>3</sub>CN-MeOH (9:1) y CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (7:3); velocidad de flujo 9 y 7 mL/min; elución isocrática.</li> <li>• Symmetry C<sub>18</sub> (19 × 300 mm, 7µm); fase móvil CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (7:3); velocidad de flujo 7 mL/min; elución isocrática.</li> </ul>	Índice de refracción
Acido púrgico A Acido púrgico B Acido escamónico A Acido operculínico B (Pereda-Miranda <i>et al.</i> , 2006)	Raíz de <i>Ipomoea purga</i>	µBondapak Amino (7.8 × 300 mm, 10 µm); fase móvil CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O (4:1); velocidad de flujo 3 mL/min; elución isocrática.	Índice de refracción



### **3 JUSTIFICACION.**

Diversas especies pertenecientes al género *Ipomoea* se han usado en la medicina tradicional alrededor del mundo especialmente como purgantes (Bieber *et. al.*, 1986; Pereda-Miranda *et al.* 2010). Los principios responsables de esta actividad biológica son las resinas glicosídicas. Numerosos lipooligosacáridos se han obtenido de la purificación de extractos. Sin embargo, en la literatura no se han descrito los procedimientos instrumentales para la resolución de la compleja mezcla de glicósidos acilados que constituyen los principios mayoritarios de los extractos orgánicos preparados a partir de las semillas de *Ipomoea alba*. En el presente estudio se plantea la búsqueda de las mejores condiciones de separación de los constituyentes glicosídicos individuales presentes en la porción lipofílica (soluble en cloroformo) mediante el empleo de la cromatografía líquida.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general.

Separar los glicolípidos presentes en la mezcla compleja de resinas glicosídicas del extracto clorofórmico de la especie *Ipomoea alba*, haciendo uso de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).

### 4.2 Objetivos específicos.

- Establecer las condiciones instrumentales a nivel analítico en la cromatografía de líquidos para lograr la resolución de la mezcla de resinas glicosídicas en estudio.
- Realizar el escalamiento de las condiciones instrumentales analíticas óptimas a nivel preparativo.
- Purificar mediante las técnicas de corte de núcleo y reciclaje de la muestra uno de los constituyentes mayoritarios presentes en la mezcla de resinas.
- Verificar la pureza del constituyente aislado mediante el registro de las propiedades espectroscópicas (RMN) y espectrométricas (EM-FAB).

## **5 PARTE EXPERIMENTAL.**

### **5.1 Determinación de las constantes físicas.**

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrógeno ( $^1\text{H}$ ) y carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ) se determinaron en los equipos Varian VXL-500 y Bruker AMX-500, operando a una frecuencia de 500 MHz para  $^1\text{H}$  y 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Se utilizó piridina deuterada ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) y los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm utilizando como referencia interna el tetrametilsilano (TMS). La rotación óptica se determinó en un polarímetro Perkin-Elmer 241 utilizando metanol como disolvente.

Los espectros de masas fueron registrados en un espectrómetro JEOL SX-102A, utilizando como método de ionización el bombardeo rápido de átomos (EM-FAB) en el modo negativo y trietanolamina como matriz. El punto de fusión se determinó en un aparato Fisher-Johns.

### **5.2 Métodos cromatográficos.**

El análisis en CCF se efectuó en cromatoplasmas cubiertas de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> Merck, utilizando cloroformo-metanol (85:15) como eluyente; posteriormente se asperjaron con un agente cromógeno (mezcla  $\text{H}_2\text{SO}_4$ - sulfato cérico) y se revelaron por calentamiento. El análisis y la separación por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAE) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA) equipado con un sistema de entrega de disolventes (modelo 600E) y un refractómetro diferencial modelo 410. El control del equipo, la adquisición de datos, así como el procesamiento y el manejo de la información cromatográfica se realizó con el programa Empower 2 (Waters) en una computadora personal (Optiflex 466/LE, DELL).

### **5.3 Material vegetal.**

El material vegetal analizado consistió en semillas de *Ipomoea alba* de la marca comercial Park Seed adquiridas en EE.UU en enero del 2008.

### **5.4 Extracción del material vegetal.**

Las semillas fueron trituradas (363.83 g) y sometidas a maceración exhaustiva preliminar con hexano para obtener constituyentes de baja polaridad. Se preparó subsecuentemente el extracto clorofórmico, se filtró y concentró a sequedad y presión reducida (cada extracto fue preparado por un periodo de 3 días durante dos semanas). Posteriormente, se filtró y concentró el disolvente a sequedad y presión reducida. De esta forma, se obtuvo el extracto hexánico con un peso de 8 g y el extracto clorofórmico con un peso de 6 g. Este último se sometió a un proceso de precipitación de las resinas glicosídicas con MeOH para obtener un sobrenadante que fue filtrado y concentrado a sequedad y presión reducida obteniéndose 5 g de un sólido para su posterior fraccionamiento por CLAE.

### **5.5 Separación mediante CLAE.**

#### **5.5.1 Condiciones instrumentales a nivel analítico.**

Se ensayaron diversas condiciones analíticas para obtener el mejor perfil cromatográfico. Aunque la muestra procedía de un extracto de mediana polaridad la separación no fue sencilla debido a las propiedades anfipáticas de las resinas glicosídicas, para ello se realizaron variaciones de la fase móvil y velocidad de flujo de elución. Las condiciones instrumentales consistieron en una columna Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 × 250 mm, 5 µm), utilizando como fase móvil MeOH 100% (como primer ensayo) aplicando un flujo de 0.2 mL/min, haciendo uso de un detector de índice de refracción con sensibilidad de 256; para las inyecciones analíticas se utilizó un volumen de

inyección de 10  $\mu\text{L}$  para tener una concentración de muestra de 0.1 mg/ $\mu\text{L}$ . Para las subsecuentes pruebas, sólo se cambió la fase móvil (conservando las condiciones antes descritas) y se variaron las proporciones de la siguiente forma: MeOH-H<sub>2</sub>O (9.5:0.5), MeOH-H<sub>2</sub>O (9:1), MeOH-CH<sub>3</sub>CN (8:2), MeOH-CH<sub>3</sub>CN (1:1), MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (5:4.5:0.5) y MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (5:4:1).

### **5.5.2 Fraccionamiento primario a nivel preparativo del extracto clorofórmico.**

La fase móvil que mejor se ajustó a las condiciones de separación fue MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (5:4:1). Se realizó el escalamiento de la velocidad de flujo a nivel preparativo del modo siguiente:

$$F_p = F_a (L_p/L_a) (d_p^2/d_a^2)$$

En donde:

F<sub>p</sub>= flujo a nivel preparativo.

F<sub>a</sub>= flujo a nivel analítico.

L<sub>p</sub>= longitud de la columna preparativa (mm).

L<sub>a</sub>= longitud de la columna analítica (mm).

d<sub>p</sub>= diámetro interno de la columna analítica.

d<sub>a</sub>= diámetro interno de la columna preparativa.

Se fraccionaron 2 g de la mezcla de resinas obteniéndose 13 fracciones (Mv-I - Mv-XIII), para ello se empleó una columna de fase inversa Symmetry C<sub>18</sub> (19 × 300 mm, 7  $\mu\text{m}$ ), utilizando como fase móvil MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (5:4:1), empleando una velocidad de flujo de 4 mL/min, haciendo uso de un detector de índice de refracción con sensibilidad de 256; se utilizó un volumen de inyección de 500  $\mu\text{L}$  para tener una concentración de muestra de 0.1 mg/ $\mu\text{L}$ . Aplicando las técnicas de sobrecarga de

columna y corte de núcleo (Bidlemeier, 1992; Hostettman, 2001) se reunieron las siguientes fracciones: Mv-I ( $t_R = 10.3$  min), Mv-II ( $t_R = 14.7$  min.), Mv-III ( $t_R = 20.6$  min), Mv-IV ( $t_R = 26.4$  min), Mv-V ( $t_R = 32.8$  min), Mv-VI ( $t_R = 37.9$  min), Mv-VII ( $t_R = 41.5$  min), Mv-VIII ( $t_R = 51.9$  min), Mv-IX ( $t_R = 67.5$  min), Mv-X ( $t_R = 79.1$  min), Mv-XI ( $t_R = 86.1$  min), Mv-XII ( $t_R = 99.6$  min), Mv-XIII ( $t_R = 116.5$  min).

### **5.5.3 Separación y Purificación del componente mayoritario de la Fracción Mv-III.**

#### **5.5.3.1 Condiciones instrumentales a nivel analítico.**

Para la obtención del mejor perfil cromatográfico se realizaron ensayos que permitieron obtener la mejor condición analítica de separación, como primer ensayo, se emplearon las siguientes condiciones instrumentales: una columna Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m), utilizando una fase móvil compuesta por MeOH:CH<sub>3</sub>CN (8:2), con una velocidad de flujo de 0.2 mL/min, utilizando un detector de índice de refracción con sensibilidad de 256 y trabajando con un volumen de inyección de 10  $\mu$ L, para tener una concentración de muestra de 0.1 mg/ $\mu$ L. Para las siguientes condiciones ensayadas únicamente se realizó la variación de la composición de la fase móvil y la velocidad de flujo, de esta forma se empleó: MeOH:CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (5:4:1) con velocidad de flujo de 0.3 mL/min y MeOH:CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (5:3.5:1.5) con velocidad de flujo de 0.3 mL/min.

#### **5.5.3.2 Condiciones instrumentales a nivel preparativo.**

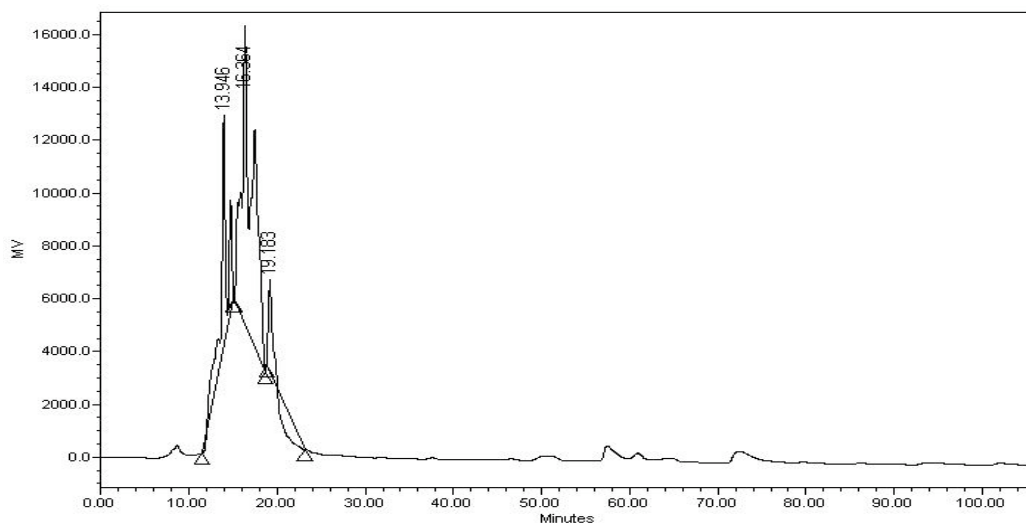
Se inyectaron 50 mg de la fracción Mv-III para obtener el pico mayoritario. Aplicando las técnicas de sobrecarga de columna y corte de núcleo (Bidlemeier, 1992; Hostettman, 2001). Para esto se empleó una columna Symmetry C<sub>18</sub> (19 x 300 mm, 7  $\mu$ m), con una fase móvil compuesta por MeOH:CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (5:3.5:1.5) empleando una velocidad de flujo de 6.1 mL/min, haciendo uso de un detector de índice de refracción

con sensibilidad de 256 y volumen de inyección de 500  $\mu\text{L}$  para tener una concentración de muestra de 0.1  $\text{mg}/\mu\text{L}$ .

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 6.1 Extracción y fraccionamiento.

La extracción realizada a las semillas de *I. alba* permitió obtener 8 g de extracto hexánico y 5 g de extracto clorofórmico (después de precipitarlo con metanol) a partir del cual se realizó un fraccionamiento primario mediante CLAE (las condiciones instrumentales se muestran en la parte experimental, sección 5.5.1). Estas pruebas se realizaron a nivel analítico, hasta obtener los parámetros de CLAE idóneos para la separación de los componentes presentes en la muestra. El primer ensayo realizado consistió en la utilización de MeOH como fase móvil que produjo un cromatograma con una pobre separación de la muestra problema (figura 14).

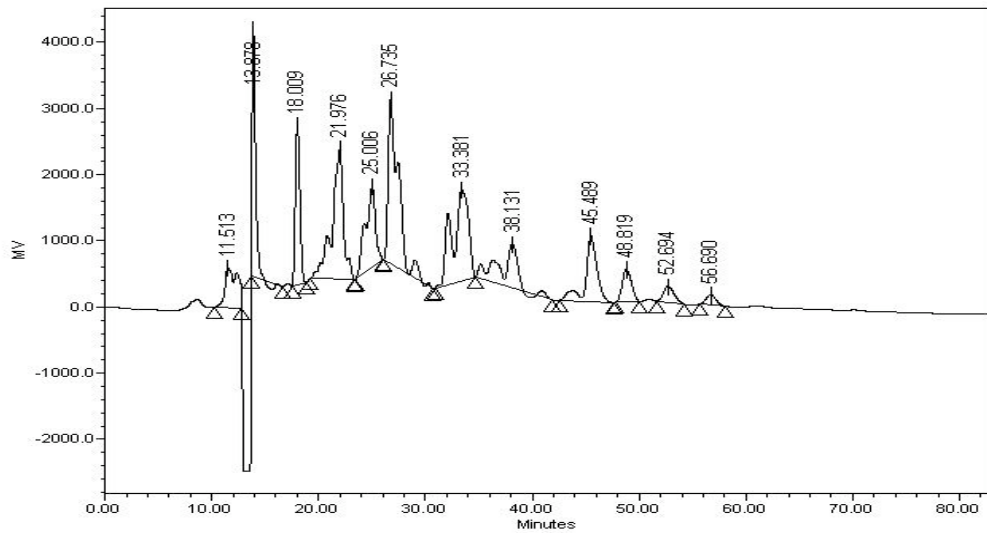


**Figura 14.** Cromatograma generado a nivel analítico. Fase móvil MeOH.

La siguiente condición ensayada fue una mezcla binaria como fase móvil, constituida por MeOH-H<sub>2</sub>O (9.5:0.5), empleando el mismo flujo sólo que ahora con una pequeña proporción de agua para que se permitiera la retención de los componentes más

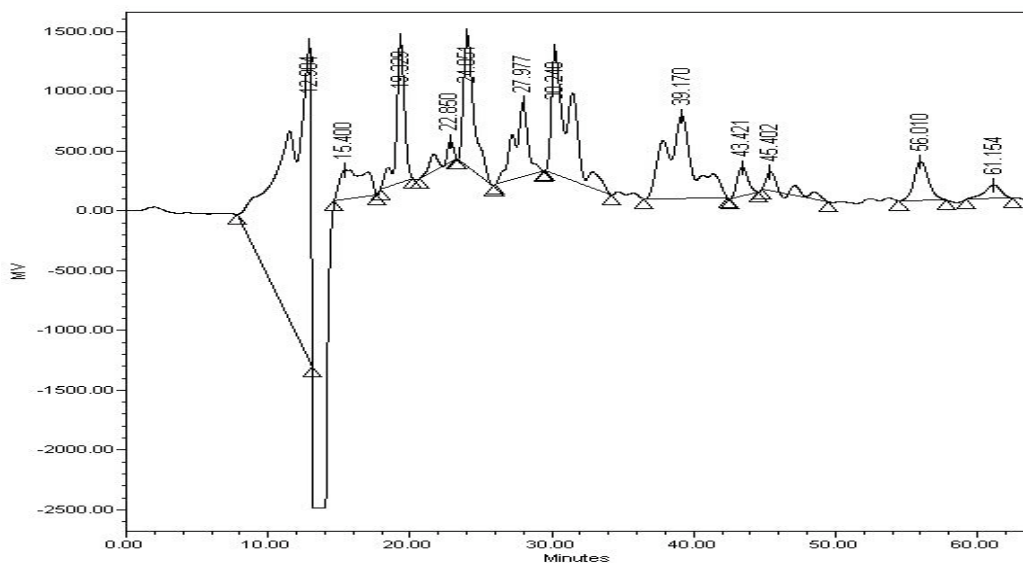


lipofílicos presentes en la muestra y, de esta forma, la resolución obtenida fue mayor, (figura 15).



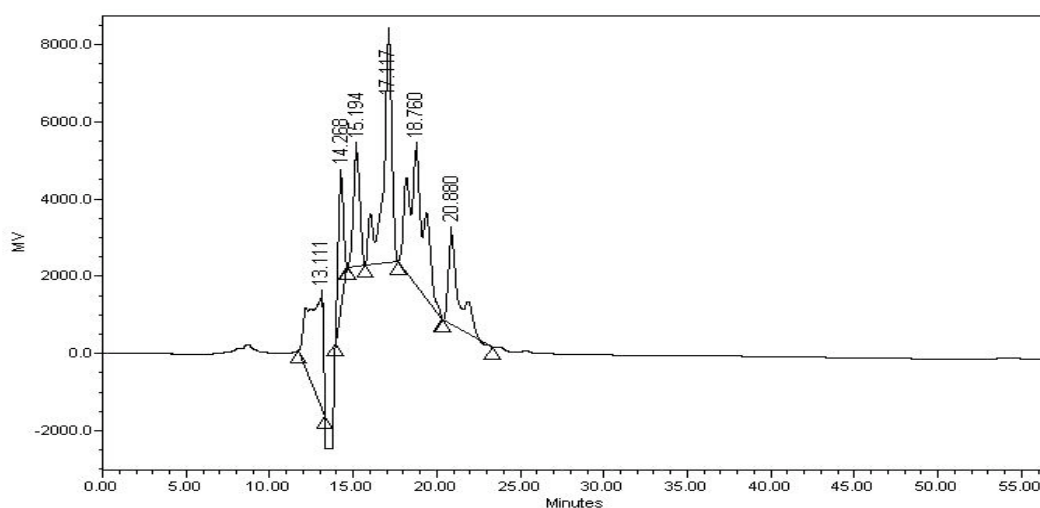
**Figura 15.** Cromatograma generado a nivel analítico utilizando como fase móvil MeOH-H<sub>2</sub>O (9.5:0.5).

Sin embargo, al recuperar la muestra inyectada ésta correspondió a la mitad de la concentración que inicialmente se ingresó a la columna de separación, lo que sugirió que el resto se quedaba adsorbido en la columna. Se realizó un cambio en la fase móvil incrementando la proporción de agua en 0.5% con respecto a la fase anterior teniendo así una fase móvil constituida por MeOH-H<sub>2</sub>O (9:1) (figura 16).



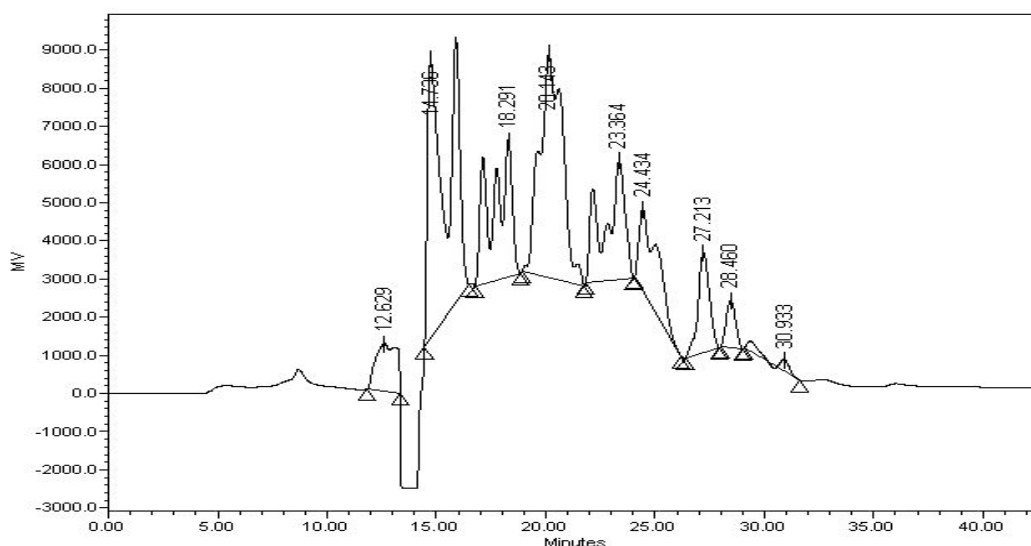
**Figura 16.** Cromatograma generado al utilizar 1% de H<sub>2</sub>O en MeOH.

Aunque la separación parecía buena, nuevamente la recuperación de la muestra no lo fue ya que se perdía más de la mitad de la muestra. Así que se optó por cambiar de fase y emplear CH<sub>3</sub>CN en vez de MeOH, este cambio se realizó debido a que la muestra en estudio era completamente soluble en MeOH y MeOH-H<sub>2</sub>O únicamente en la proporción 9.5:0.5 y 9:1. Al incrementar la proporción de H<sub>2</sub>O, se observó la precipitación de la muestra. Así que la siguiente fase a probar fue MeOH-CH<sub>3</sub>CN (8:2), obteniendo el siguiente perfil cromatográfico (figura 17).



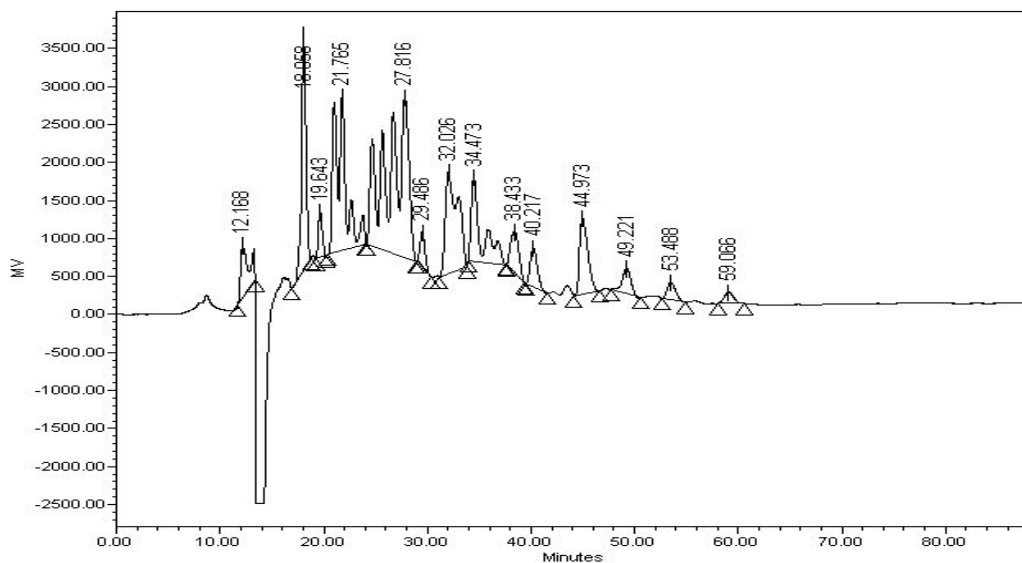
**Figura 17.** Perfil cromatográfico utilizando como fase móvil MeOH-CH<sub>3</sub>CN (8:2).

La separación no fue la deseada, por lo que se incrementó la proporción de CH<sub>3</sub>CN en un 50% con respecto al MeOH, obteniéndose un cromatograma con mayor separación (con respecto a la fase móvil anterior), ver figura 18. A pesar de haberse obtenido una mejor separación de la muestra problema, siempre se recuperó la mitad de la concentración inyectada en la columna.



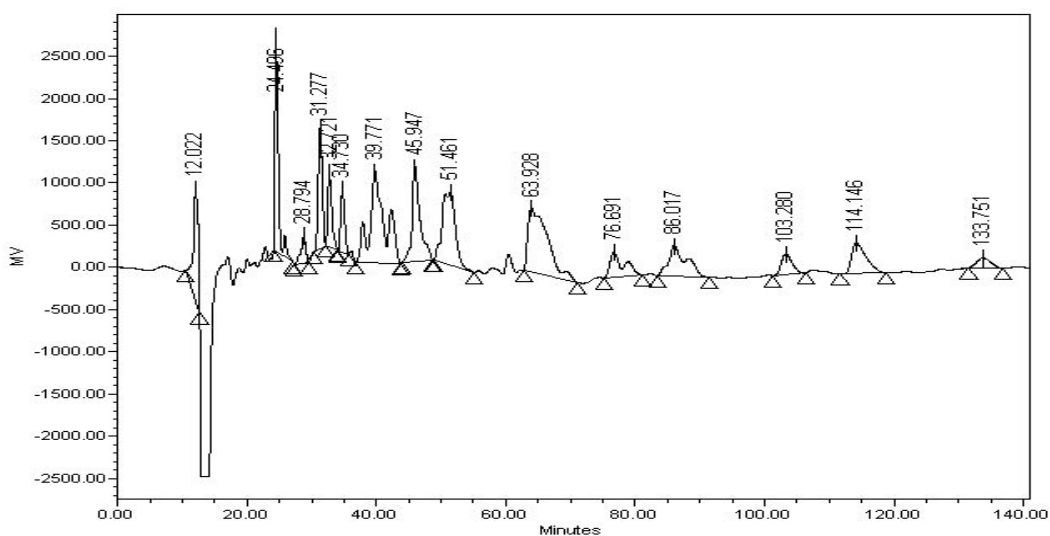
**Figura18.** Perfil cromatografico, empleando como fase móvil MeOH-CH<sub>3</sub>CN (1:1).

Las condiciones analíticas que se habían ensayado hasta este momento no habían permitido recuperar la cantidad total de la muestra inyectada o la separación era tan pobre que hacía imposible la separación. Debido a esto se decidió emplear una fase ternaria en la que se incluyera una pequeña proporción de H<sub>2</sub>O con la finalidad de separar los componentes de la muestra y que además los tiempos de retención de cada uno fueran mayores a los observados hasta ahora, aumentando así, la afinidad de la fase estacionaria por los componentes de la mezcla y que la cantidad de muestra inyectada se recuperara en su totalidad. De lo contrario, al extrapolar dichas condiciones a nivel preparativo se tendría gran pérdida de muestra, quedando ésta adsorbida en la columna. Para esto se ensayó la siguiente fase móvil MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (5:4.5:0.5) obteniéndose el siguiente cromatograma (figura 19).



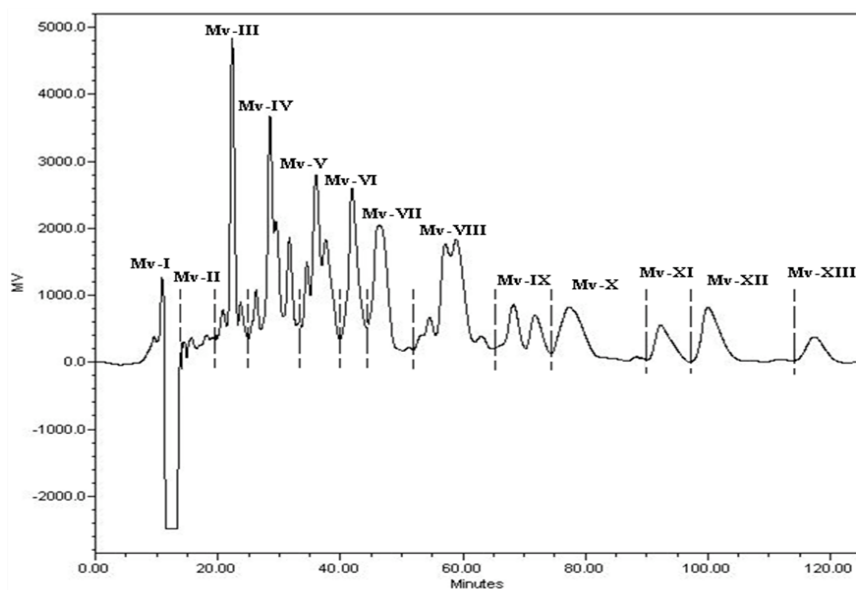
**Figura 19.** Perfil cromatográfico utilizando una fase ternaria constituida por MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (5:4.5:0.5).

Con esta fase se obtuvo mejor separación, sin embargo, el problema principal como en las anteriores pruebas analíticas, fue la recuperación de la muestra, ya que sólo se recuperó la mitad de lo que se inyectaba. Cabe resaltar que todas las pruebas analíticas se realizaron por duplicado, la sensibilidad utilizada en el equipo para todos los ensayos llevados a cabo en el presente estudio fue de 256, esto permitió detectar los picos de menor intensidad los cuales también corresponden, a resinas glicosídicas. El siguiente cromatograma se obtuvo al emplear MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (5:4:1) como fase móvil (figura 20), el cual mostró mejor resolución con tiempos de retención largos y, lo más importante, la recuperación de la muestra inyectada en su totalidad.



**Figura 20.** Perfil cromatográfico a nivel analítico empleando como fase móvil MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (5:4:1).

A partir de éste último perfil cromatográfico se realizó su escalamiento a nivel preparativo para realizar el fraccionamiento de la mezcla de resinas. Se empleó una fase ternaria compuesta por MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (5:4:1), las condiciones instrumentales se describen en la sección 5.5.2. Las inyecciones realizadas correspondieron a un volumen de 60 mg/500 µL. De esta forma, se fraccionó un total de 2 g de extracto. En la siguiente figura se muestra el perfil cromatográfico a nivel preparativo (figura 21) el cual es muy similar al ensayado a nivel analítico, también se muestra una CCF de las fracciones obtenidas (figura 22).

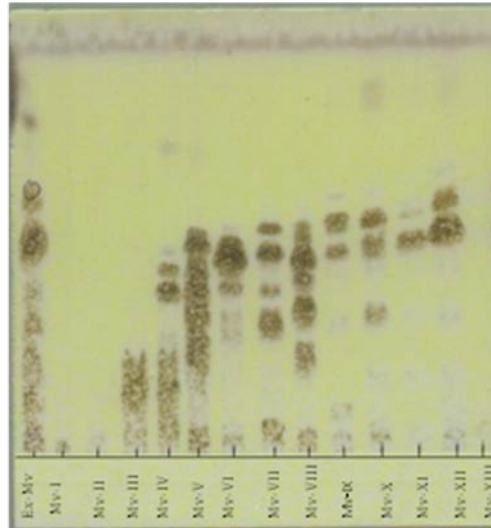


**Figura 21.** Perfil cromatográfico a nivel preparativo, fase móvil: MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (5:4:1).

Las fracciones obtenidas se enumeran en el siguiente cuadro.

**Cuadro 4.** Miligramos de muestra obtenidos de cada fracción a nivel preparativo.

<b>Fracciones</b>	<b>Muestra en mg</b>
Mv-I	94.6
Mv-II	66.36
Mv-III	155.6
Mv-IV	262.8
Mv-V	224.9
Mv-VI	133.0
Mv-VII	198.1
Mv-VIII	257.9
Mv-IX	258.5
Mv-X	62.1
Mv-XI	112.4
Mv-XII	74.53
Mv-XIII	36.9

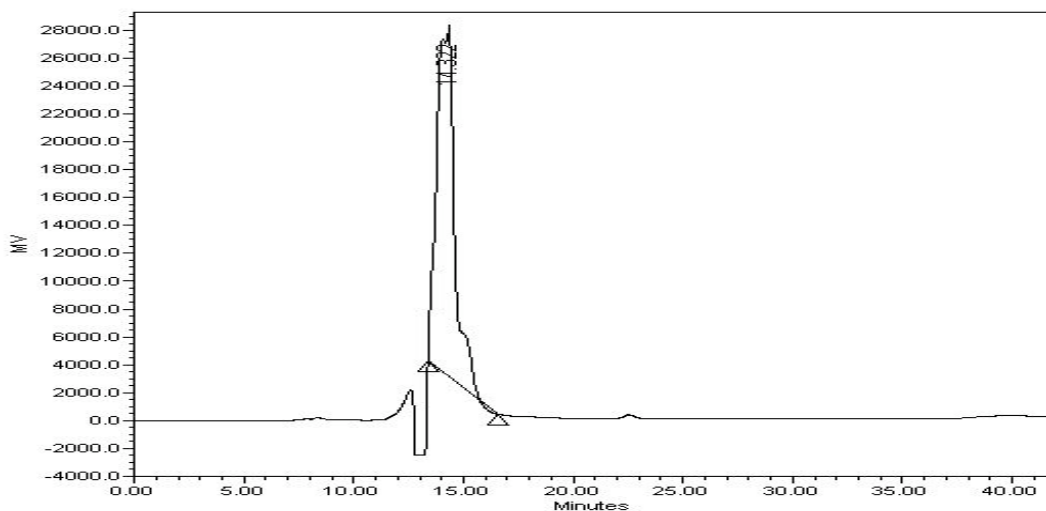


**Figura 22.** Cromatografía en capa fina que muestra cada una de las fracciones presentes en el extracto, sistema de elución  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (85:15)

## 6.2 Separación y purificación de la fracción Mv-III.

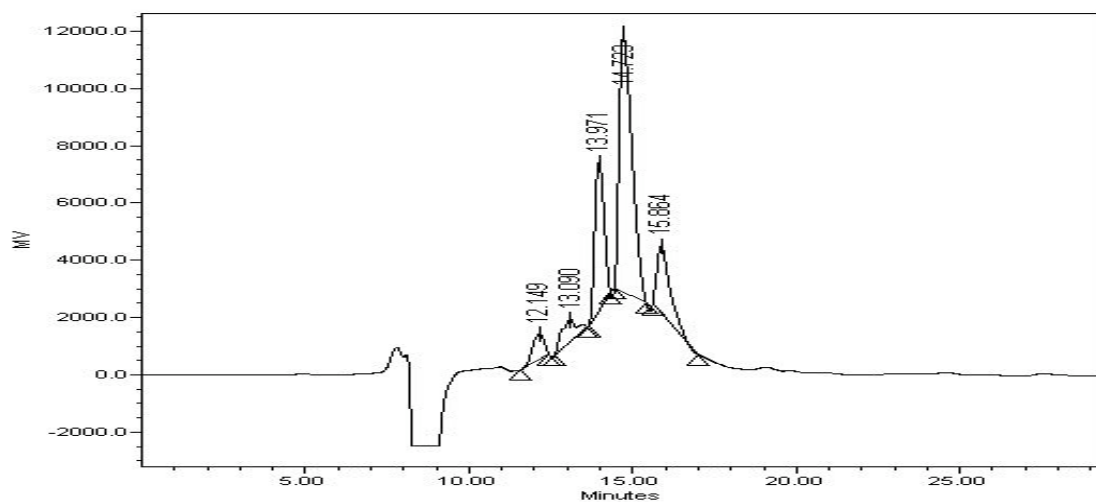
Para continuar ejemplificando el empleo de la cromatografía líquida para la separación de complejas mezclas de oligosacáridos anfipáticos, se decidió separar la fracción Mv-III porque se observó con una menor complejidad cromatográfica y por ser una de las fracciones de mayor rendimiento (cuadro 4). Por lo que se ensayaron condiciones analíticas para la búsqueda del mejor perfil cromatográfico que permitieran la separación del compuesto mayoritario presente en dicha fracción.

El primer ensayo consistió en la utilización de una fase móvil compuesta por  $\text{MeOH-CH}_3\text{CN}$  (8:2), generando el cromatograma que se ilustra en la (figura 23), las condiciones instrumentales se describen en la sección 5.5.3.1.



**Figura 23.** Perfil cromatográfico a nivel analítico de la fracción III empleando como fase móvil MeOH-CH<sub>3</sub>CN (8:2).

Debido a la falta de separación, se realizó un cambio en la fase móvil, ahora con MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (5:4:1) se observó una mejor separación de los componentes de la fracción Mv-III, tal y como se observa en la (figura 24). Las condiciones instrumentales se describen en la sección 5.5.3.1.

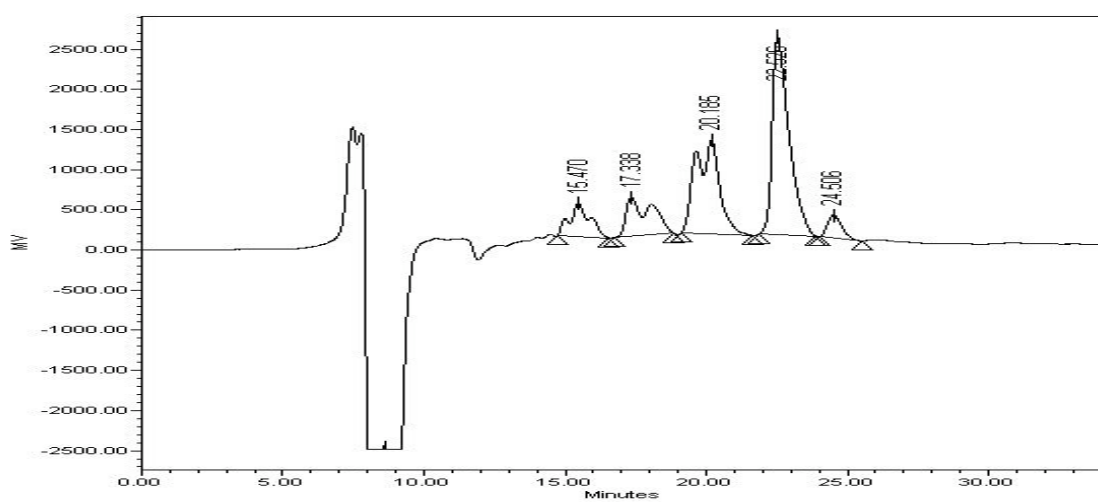


**Figura 24.** Perfil cromatográfico a nivel analítico de la fracción Mv-III empleando como fase móvil MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (5:4:1).

El cromatograma resultante indicó la separación de los picos, sin embargo, se decidió ensayar otra fase que permitiera incrementar los tiempos de retención de cada componente ya que, de no ser así, al realizar su escalamiento a nivel preparativo y al

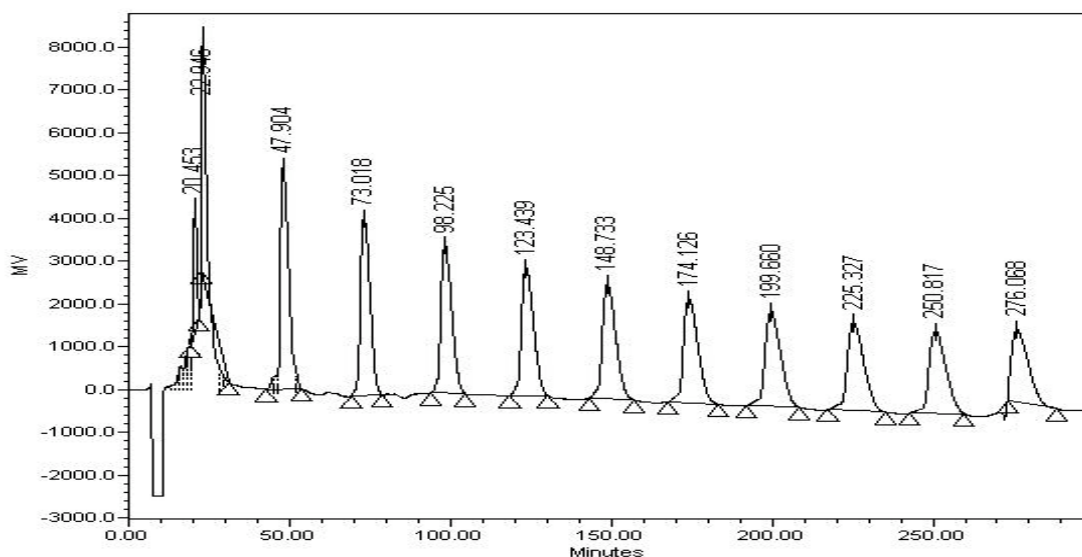


incrementar la concentración de la muestra, se perdería la resolución por la sobreposición de los picos debido a que sus tiempos de retención son muy cercanos. La figura 25 ilustra el cromatograma obtenido con el cambio en la fase móvil (las condiciones instrumentales utilizadas se describen en la sección 5.5.3.1) y se muestra una mejor separación de los componentes presentes en la fracción Mv-III con el empleo de una fase móvil compuesta por MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (5:3.5:1.5).

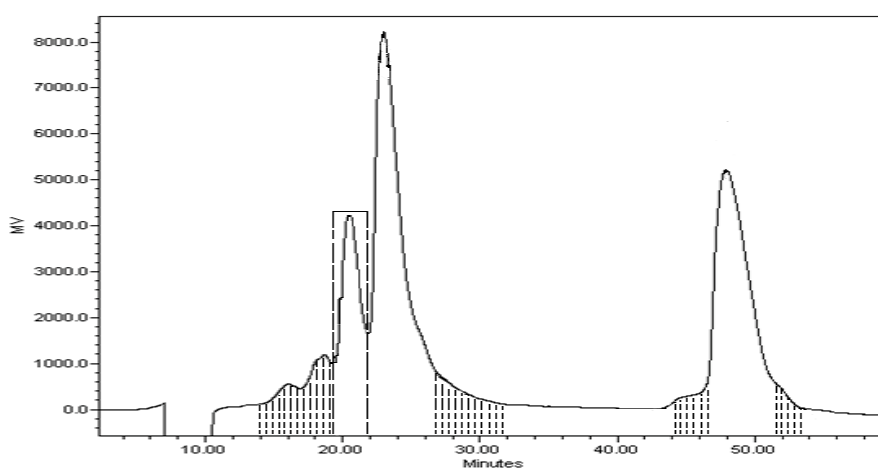


**Figura 25.** Perfil cromatográfico de la fracción Mv-III empleando MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (5:3.5:1.5) como fase móvil.

El escalamiento a nivel preparativo permitió la separación y la purificación del componente mayoritario presente en la fracción Mv-III. Se hizo pasar la muestra por la columna en un número de 10 ciclos para asegurar su pureza (figura 26), esto fue posible mediante la aplicación de las técnicas de rasurado y corte de pico, como puede observarse en la (figura 27).



**Figura 26.** Purificación del componente mayoritario presente en la fracción Mv-III, mediante la técnica de reciclaje de la muestra.

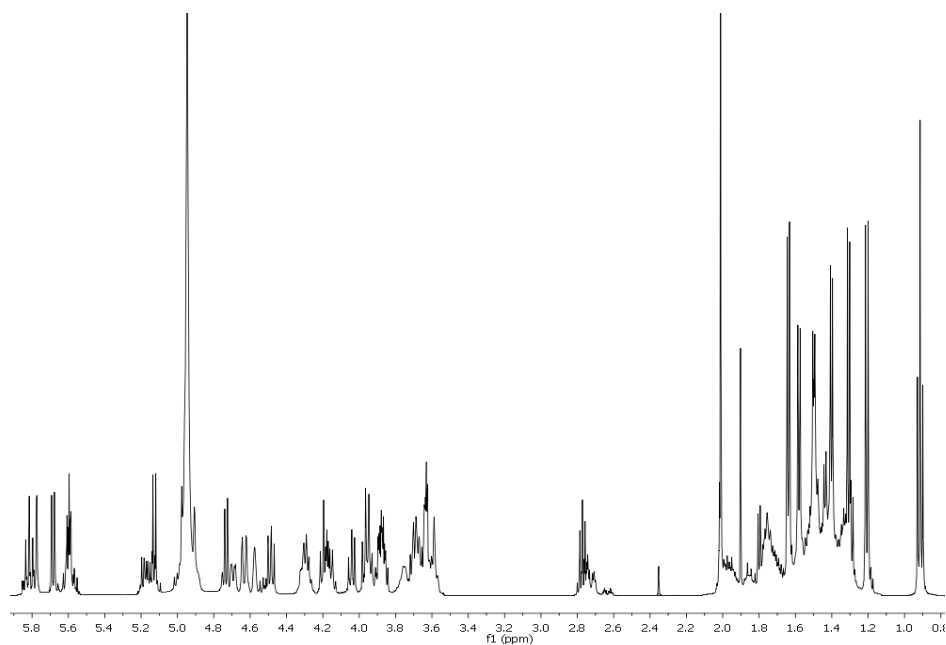


**Figura 27.** Cromatograma que muestra el rasurado de pico y corte de pico del compuesto mayoritario presente en la fracción Mv-III. Las líneas cortas punteadas, representan el rasurado de pico y las líneas grandes punteadas representan el corte de pico.

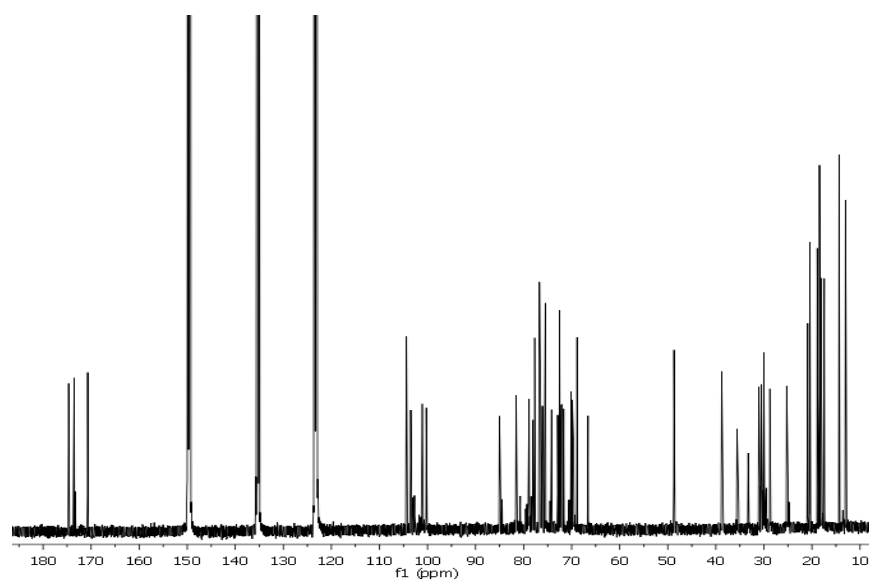
### 6.3 Identificación del compuesto aislado.

La identificación del compuesto aislado se realizó mediante técnicas espectroscópicas (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) (figura 28 y 29) y espectrométricas (EM-FAB, ESI). El espectro de masas en la modalidad FAB negativo mostró un ion pseudomolecular  $[\text{M} - \text{H}]^-$  de  $m/z$  1113 (figura 30) y en el espectro de alta resolución obtenido mediante la técnica de electrospray modalidad negativa (figura 31) se observó el ion  $[\text{M} + \text{Cl}]^-$  a una  $m/z$

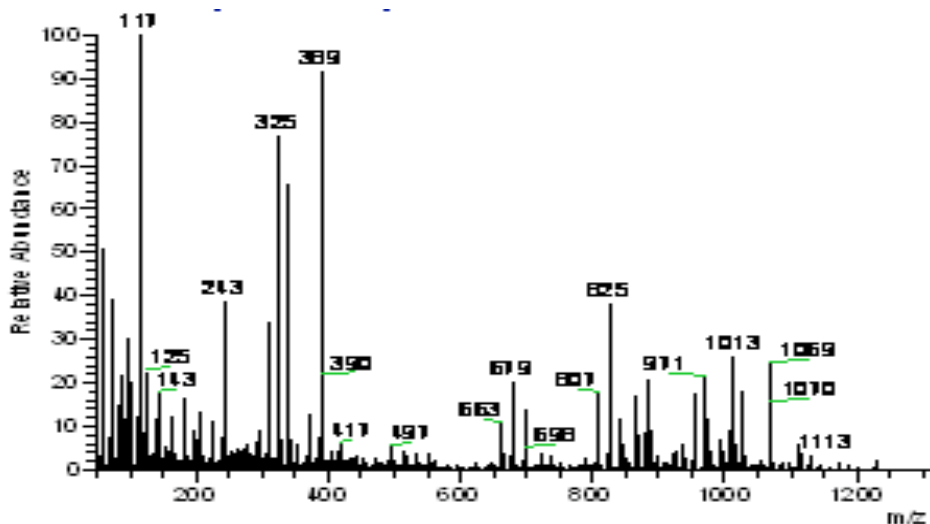
1149.5129 que permitió el establecimiento de la fórmula molecular como  $C_{51}H_{86}O_{26}$  (requiere 1149.5096 error calculado + 2.8707).



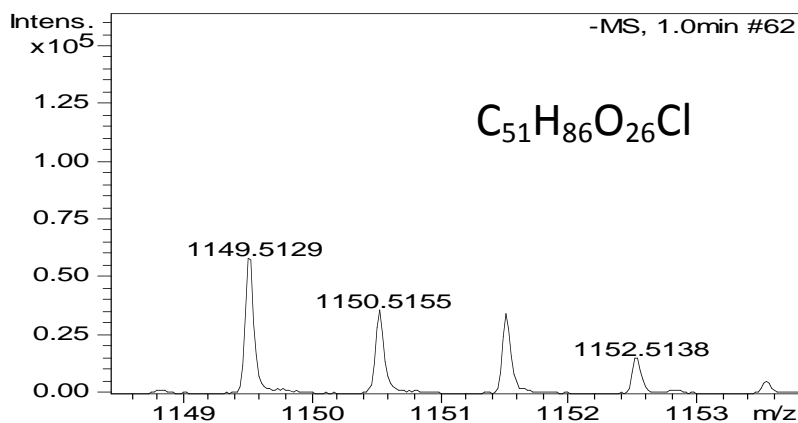
**Figura 28.** Espectro de RMN  $^1H$  del pentasacárido aislado.



**Figura 29.** Espectro de RMN  $^{13}C$  del pentasacárido aislado.

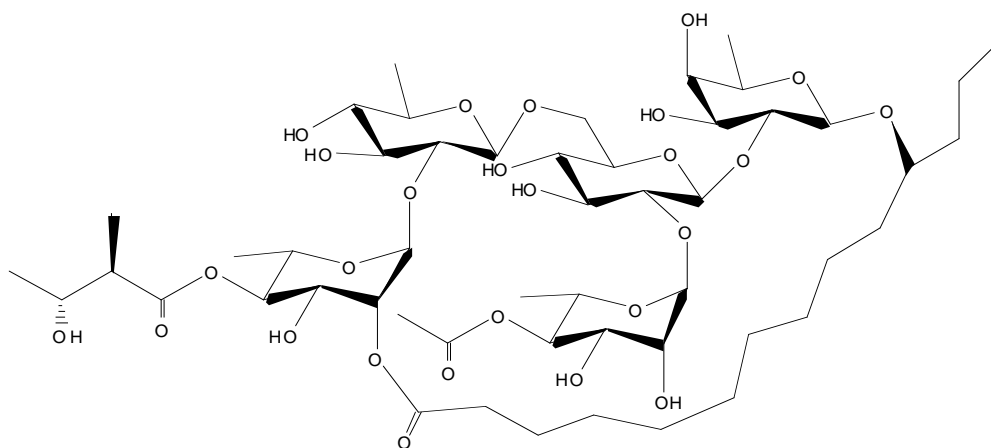


**Figura 30.** Espectro de masas modo FAB negativo del pentasacárido aislado.



**Figura 31.** Conjunto isotópico del ion pseudomolecular  $[M+Cl]^-$

De esta forma, se caracterizó la estructura del compuesto aislado como un éster intramolecular 1,2''''-11-O-6-deoxi-(4-O-1-oxonilil)- $\alpha$ -L-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-O-[6-deoxi-(4-O-1-oxoacetil)- $\alpha$ -L-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O-6-deoxi- $\beta$ -D-galactopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxitetradecanoico, un pentasacárido del ácido convolvulínico (figura 32), el cual presenta una secuencia de glicosidación novedosa para el grupo de pentasacáridos del género *Ipomoea* (Cruz-Morales, 2011).



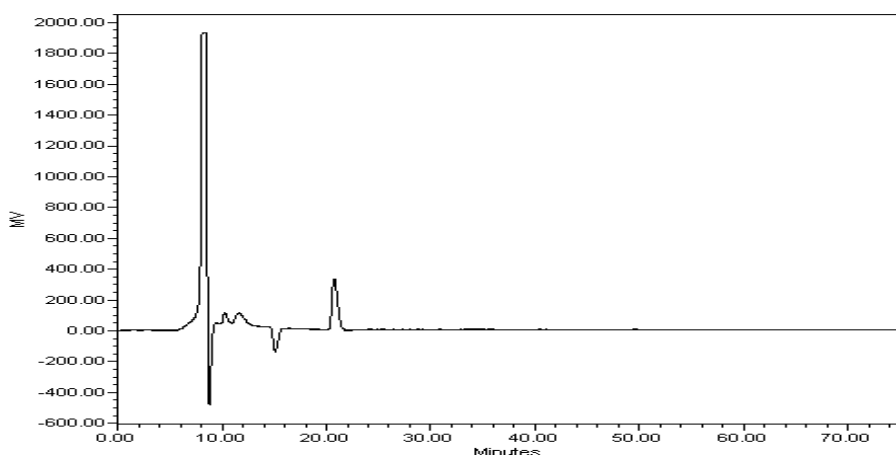
**Figura 32.** Pentasacárido aislado de la fracción Mv-III del extracto lipofílico de *Ipomoea alba*.

## 7 CONCLUSIONES.

- Se estandarizaron las condiciones instrumentales a nivel analítico en la cromatografía de líquidos para la resolución de la mezcla de oligosacáridos presentes en el extracto lipofílico de *Ipomoea alba*.
- El escalamiento a nivel preparativo con las mejores condiciones analíticas permitió la purificación de un glicolípido mayoritario mediante la aplicación de las técnicas de corte, rasurado y reciclaje de la muestra en la cromatografía líquida. Obteniendo así un compuesto de estructura novedosa dentro del grupo de pentasacáridos del género *Ipomoea* hasta ahora conocidos.
- El registro de las propiedades espectroscópicas (RMN y EM) del principio aislado permitió verificar la pureza del compuesto y, de esta forma, confirmar que el procedimiento analítico instrumental permitirá la purificación de los glicolípidos presentes en el extracto en estudio.
- Se contribuyó al conocimiento de la diversidad estructural de glicolípidos presentes en la familia de las convolvuláceas.

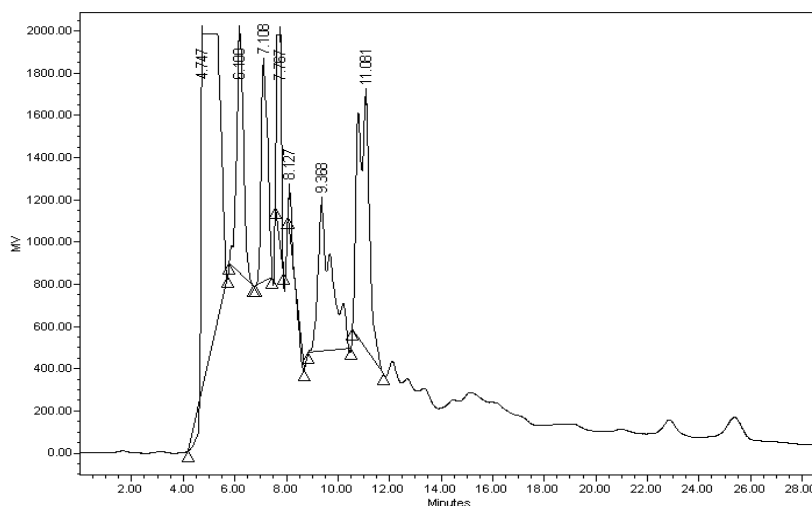
## 8 APENDICE

Previo al trabajo que aquí se presenta, se ensayaron condiciones de búsqueda en CLAE para obtener los núcleos sacáridos mayoritarios presentes en la especie en estudio. Para ello se realizó como primer paso, la saponificación de 200 mg de extracto obteniendo 120 mg de saponificado, posteriormente se ensayaron las siguientes condiciones analíticas para la separación de los ácidos glicosídicos presentes en el saponificado, se inyectó 1 mg del saponificado (todas las inyecciones analíticas se realizaron con 1 mg de muestra, loop de 10  $\mu$ L y se realizaron por duplicado), se empleó una fase móvil compuesta por MeOH-H<sub>2</sub>O (7:3), una columna Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m), flujo de 0.15 mL/min y detector de IR figura 33.



**Figura 33.** Perfil cromatográfico del saponificado empleando como fase móvil MeOH-H<sub>2</sub>O (7:3).

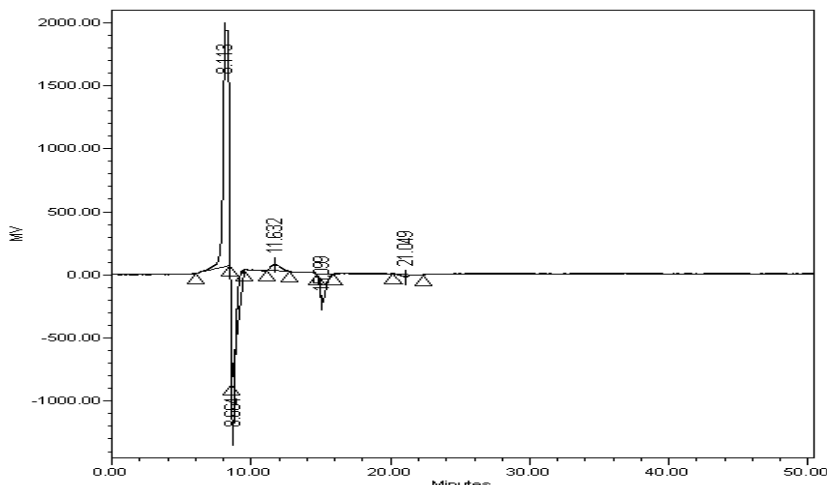
Como no se observó separación de los componentes presentes en el saponificado se cambiaron las condiciones cromatográficas de separación, fase móvil MeOH-H<sub>2</sub>O (6:4), flujo de 0.3 mL/min, se inyectó 1 mg de muestra, conservando la misma columna y el mismo detector, figura 34.



**Figura 34.** Perfil cromatográfico del saponificado empleando como fase móvil MeOH-H<sub>2</sub>O (6:4).

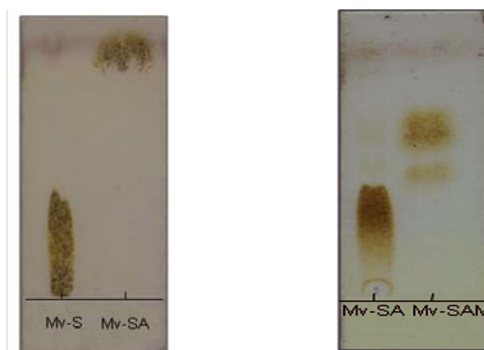
Aunque la separación que se observada en este último cromatograma era mejor que el mostrado en la figura 33 el problema era que no se recuperaba lo que se inyectaba de muestra, una parte se estaba quedando en la columna. Probar otra condición de separación fue difícil debido a la solubilidad de la muestra ya que esta era insoluble en CH<sub>3</sub>CN, soluble en MeOH, soluble en la proporción de MeOH-H<sub>2</sub>O 9:1, 8:2, 7:3 y parcialmente soluble en la proporción 1:1. La figura 35, es resultado de emplear esta última fase móvil, para ello se utilizó un flujo de 0.15 mL/min. No hubo separación y la muestra recuperada correspondió a la mitad de lo que inicialmente se inyectó.



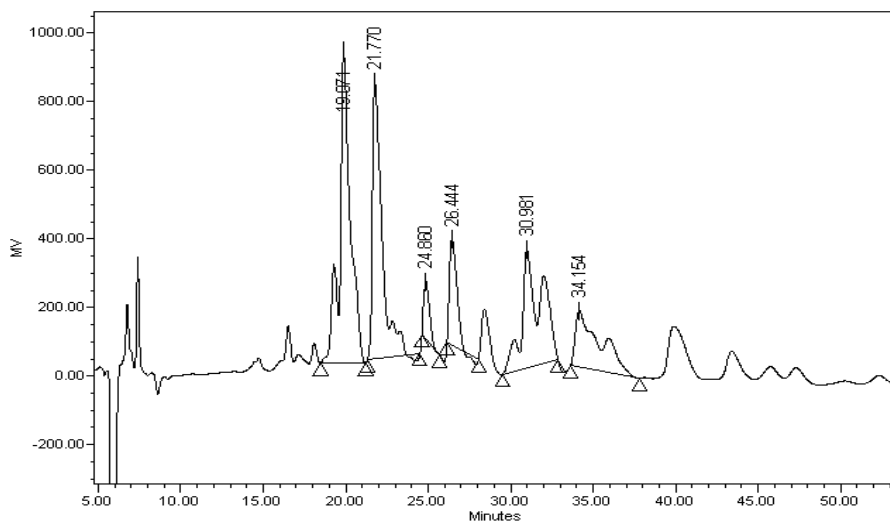


**Figura 35.** Perfil cromatográfico del saponificado empleando como fase móvil MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1).

Al no observar separación se decidió acetilar y metilar el saponificado, esto permitiría disminuir la polaridad de la muestra saponificada, se emplearon 57.3 mg del producto saponificado para acetilar y posteriormente metilar. Obteniendo así, del producto acetilado-metilado (SAM) 44.1 mg, las placas (CCF) realizadas para corroborar la acetilación y metilación se muestran en la figura 36. El ensayo realizado a nivel analítico para separar este producto fue posible bajo las siguientes condiciones cromatográficas: columna Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 x 250 mm, 5 μm), fase móvil CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (9:1), flujo de 0.4 mL/min, detector de IR y sensibilidad de 254; se inyectó 1 mg de muestra (Mv-SAM) (figura 37).

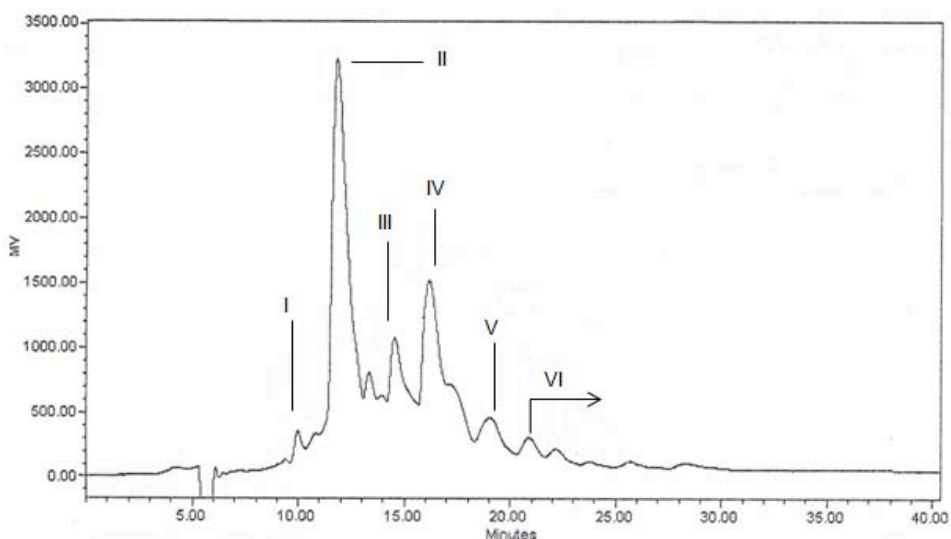


**Figura 36.** CCF de la muestra saponificada (Mv-S) vs. muestra saponificada-acetilada (Mv-SA) y en la otra placa se puede observar la muestra saponificada-acetilada (Mv-SA) vs. muestra saponificada-acetilada-metilada (Mv-SAM).



**Figura 37.** Perfil cromatográfico de Mv-SAM a nivel analítico, empleando como fase móvil  $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$  (9:1).

A partir de estas últimas condiciones de separación (figura 37) se llevó a escala preparativa la separación de Mv-SAM, bajo las siguientes condiciones cromatográficas: columna Symmetry  $\text{C}_{18}$  (19 x 300 mm, 7  $\mu\text{m}$ ), fase móvil  $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$  (9:1), flujo de 8.18 mL/min, detector de IR, sensibilidad de 254, volumen de inyección 500  $\mu\text{L}$ , cantidad de muestra inyectada 35.4 mg. Obteniendo el cromatograma de la figura 38.



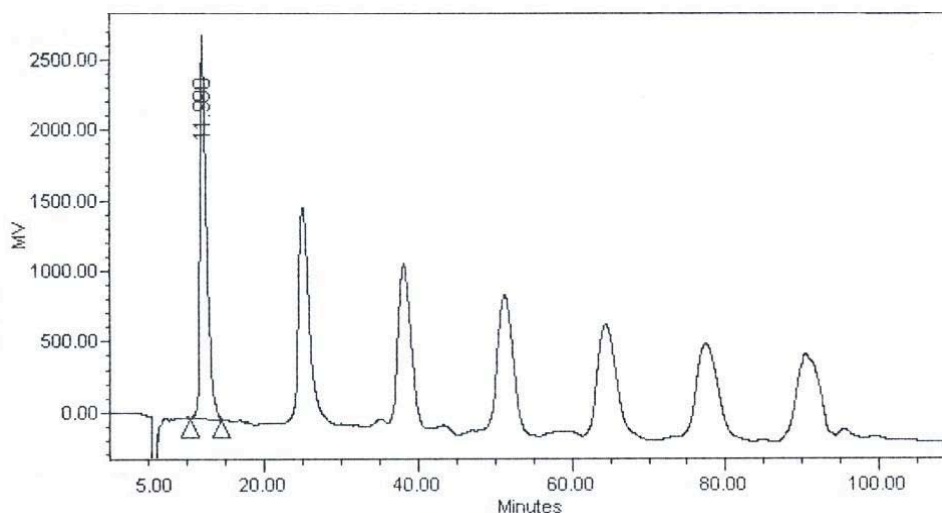
**Figura 38.** Perfil cromatográfico de Mv-SAM a nivel preparativo empleando como fase móvil  $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$  (9:1).

Los mg. de muestra obtenidos se muestran en el siguiente cuadro junto con los tiempos de retención de cada pico (los tiempos de retención se presentan en el cuadro 5).

**Cuadro 5.** Miligramos de Mv-SAM obtenidos del corte realizado a nivel preparativo .

<b>Fracciones</b>	<b>Muestra en mg</b>	<b>tr (min)</b>
I	2.1	10.06
II	13.3	11.77
III	1.8	14.24
IV	3.5	16.85
V	7.4	18.34
VI	2.6	21.8
VII	3.4	22.17

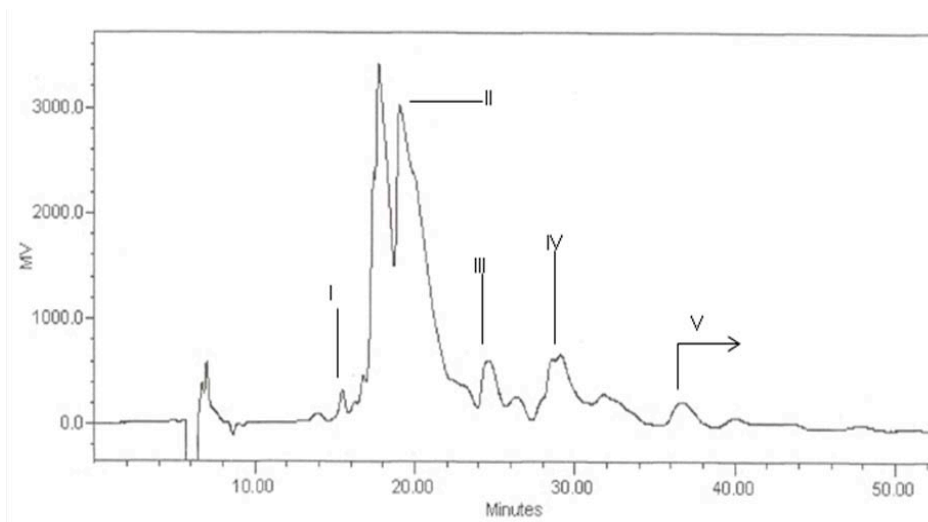
Se llevó a reciclaje el pico II, ya que de éste se obtuvo mayor cantidad de muestra (figura 39). Las condiciones cromatográficas consistieron en: columna Symmetry C<sub>18</sub> (19 x 300 mm, 7 µm), fase móvil CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (9.5:0.5), flujo de 8.18 mL/min, detector de IR, sensibilidad de 254, volumen de inyección 500 µL, cantidad de muestra inyectada 13.3 mg. Obteniendo del reciclaje 7 mg, de donde se tomó 1 mg para ser analizados por EM.



**Figura 39.** Reciclaje de la fracción II de la muestra Mv-SAM, fase móvil  $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$  (9.5:0.5).

El espectro generado en EM mostró fragmentos que indicaban la presencia de otro compuesto más, que en el reciclaje no pudo ser separado.

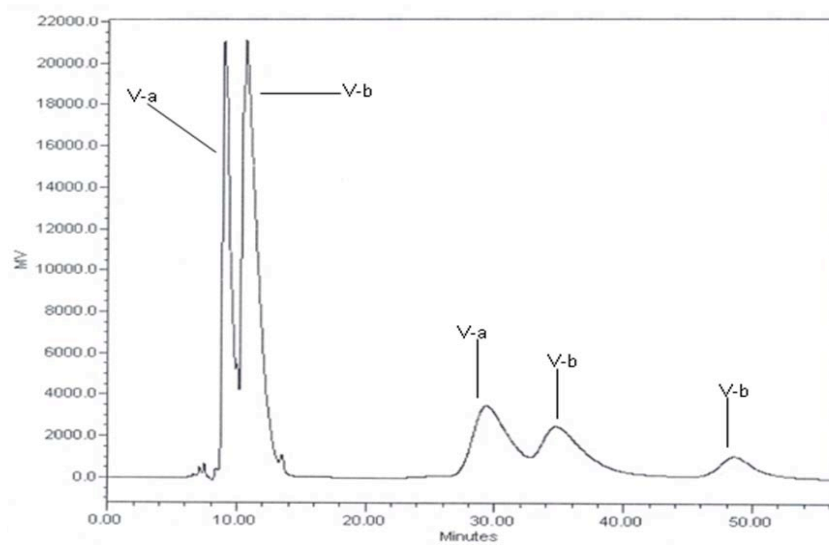
Después de las anteriores condiciones se realizó el cambio de fase móvil incrementando la proporción de  $\text{H}_2\text{O}$  para realizar la separación de Mv-SAM a nivel analítico, teniendo como fase móvil  $\text{CH}_3\text{CN:H}_2\text{O}$  (9:1), columna Symmetry  $\text{C}_{18}$  (4.6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) flujo de 0.4 mL/min, detector de IR, sensibilidad de 254, volumen de inyección 50  $\mu\text{L}$ , cantidad de muestra inyectada 9.5 mg, esto generó el siguiente cromatograma (figura 40).



**Figura 40.** Perfil cromatográfico a nivel analítico Mv-SAM, fase móvil CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (9:1).

Esta separación se realizó a nivel analítico colectando cada pico tal como se muestra en el cromatograma de la figura 40, la inyección se realizó en 4 ocasiones, obteniendo las siguientes cantidades de muestra para cada fracción: fracción I- 3.4 mg, fracción II- 2 mg, fracción III- 7.2 mg, fracción IV- 12.4 mg, fracción V- 10.7 mg.

Se llevó a reciclaje la fracción V, se inyectaron 10.1 mg de muestra, las condiciones cromatográficas empleadas fueron similares a las realizadas para la obtención del cromatograma de la figura 40, excepto que se cambió la fase móvil empleando solo CH<sub>3</sub>CN. La separación no fue posible ya que en el segundo ciclo el pico se ensanchó y para que no lo perdiera de “vista”, se colectó en el tercer ciclo, obteniendo 0.7 mg, (figura 41).



**Figura 41.** Perfil cromatográfico a nivel analítico generado de la fracción V (SAM) empleando como fase móvil  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

## 9 BIBLIOGRAFIA

- Bah, M. (1997). Aplicación de la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas (FAB) de alta resolución en la elucidación estructural de las tricolorinas A-J, oligosacáridos aislados de las resinas de *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). Tesis Doctoral. Facultad de Química, UNAM, México, p. 31.
- Bah, M. y Pereda-Miranda, R. (1996). Detailed FAB-Mass Spectrometry and high resolution NMR investigations of Tricolorins A-E, individual oligosaccharides from the resins of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron* **52**, 13063-13080.
- Bah, M., y Pereda-Miranda, R. (1997). Isolation and structural characterization of new glycolipid ester type dimers from the resin of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron* **53**, 19007- 9022.
- Bah, M. y Pereda-Miranda, R. (1999). Detailed FAB-Mass Spectrometry and High Resolution NMR investigations of tricolorins A-E, Individual oligosaccharides from the resins of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron* **52**, 13063-13080.
- Bieber, L., Da Silva Filho, A., Lima, R. y Chiappeta, A., Do Nascimento, S., De Souza I., De Mello J. y Veith H. (1986). Anticancer and antimicrobial glycosides from *Ipomea bahiensis*. *Phytochemistry* **25**, 1077-1081.
- Bidlingmeyer, B. A. (1992). Practical HPLC methodology and applications. John Wiley, Nueva York, 220-224.
- Chérigo, L. (2004). Caracterización estructural de los lipopentasacáridos mayoritarios de *Ipomoea murucoides*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México, p. 40.
- Chérigo, L. y Pereda-Miranda, R. (2006). Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. *Journal of Natural Products*. **69**, 595-599.
- Cruz-Morales, S. (2011). Tesis de Doctorado en curso.

- Cseke, L., Kiratosyan A., Kaufman P., Warber S., Duke J. y Briemann H. (2006). Natural Products from Plants, edit. Taylor & Francis, Broken Sound Parkway NW, pp. 291-292.
- Escobedo-Martínez C. (2007). Resinas glicosídicas de la planta medicinal *Ipomoea pes-caprae*. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM, México, pp. 54-60.
- Escobedo-Martínez, C. y Pereda-Miranda, R. (2007). Resin Glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. *Journal of Natural Products* **70**, 974-978.
- Escalante Sánchez E. (2004). Aislamiento y caracterización estructural de cuatro lipopentasacáridos de *Ipomoea pes-caprae*. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM, México, pp. 28-34.
- Fang, Y., Chai, W., Chen, S., He Y., Zhao, L., Peng, J., Huang, H. y Xin, B. (1993). On the structure of calonyctin A, a plant growth regulator. *Carbohydrate Research* **245**, 259-270.
- Fürstner, A. y Müller, T. (1999). Efficient total syntheses of resin glycosides and analogues by ring-closing olefin metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7814-7821.
- Furukawa, J., Kobayashi, S., Nomizu, M., Nishi, N. y Sakairi, N. (2000) Total synthesis of calonyctin A2, a macrolidic glycolipid with plant growth-promoting activity. *Tetrahedron Letters* **41**, 3453-3457.
- Galetto L., Fioni A. y Caviño A. (2002). Éxito reproductivo y calidad de los frutos en poblaciones del extremo sur de la distribución de *Ipomoea purpurea* (*Convolvulaceae*). *Darwiniana* **40**, 25-32.
- Gooding K. y Regnier F. (2000). HPLC of biological macromolecules chromatographic science series Volume **87**, edit. Marcel Dekker, United States of America, p 1.
- Gunn C. (1972). Moon flowers, *Ipomoea* section *Calonyction*, in temperate North America. *Brittonia* **24**, 150-168.
- Hernández-Carlos, B., Bye, R. y Pereda-Miranda, R. (1999). Orizabins V-VIII, tetrasaccharide glycolipids from the mexican scammony root (*Ipomoea orizabensis*). *Journal of Natural Products* **62**, 1096-1100.



- Hostettmann, K., Hostettman, M. y Marston A. (2001). Técnicas de cromatografía preparativa. Aplicaciones en el aislamiento de productos naturales, edit. Springer-Verlag, Barcelona, pp. 60-64.
- Howard, A., Gerrans, G. y Michael, J. (1979). Use of vinylogous urethanes in alkaloid synthesis: formal síntesis of ipalbidina **45**, 1713-1715.
- Ikhiri, K., Dan Koulodo, D., Garba, M. y Mamane, S. (1987). Nouveaux alcaloides indolizínicos aislés de *Ipomoea alba*. *Journal of Natural Products* **50**, 152-156.
- JSTOR Plant Science: <http://plants.jstor.org/flora/fz6048>
- JSTOR Plant Science: [http://plants.jstor.org/upwta/1\\_1089](http://plants.jstor.org/upwta/1_1089)
- Kobayashi, S., Furukawa, J., Sakai, T. y Sakairi, N. (2002). Preparation and diastereomeric separation of an (S)- and (R)-1-(metoxycarbonyl)tridec-10-yl glucoside derivative, a precursor for a monosaccharide constituent of resin glycosides. *Carbohydrate Research* **337**, 1047-1053.
- Kubo, I. y Nakatsu T. (1990). Recent examples of Preparative scale recycling high performance liquid chromatography in natural products chemistry. *LC-GC* **8**, 933-939.
- Kuklinski C. (2000) Farmacognosia, edit. Omega, Barcelona España, pp 39, 40.
- León, I., Enríquez, R., Nieto, D., Alonso, D., Reynolds, W., Aranda, E. y Villa, J. (2005). Pentasaccharide glycosides from the roots of *Ipomoea murucoides*. *Journal of Natural Products* **68**, 1141-1146.
- Madison (1999), Química Analítica, edit. Mc Graw Hill, pp. 402,403.
- McDonald, A. (1991). Origin and diversity of mexican *Convolvulaceae*. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot.* **62**, 65-82.
- McLeod, J. y Ward, A. (1997). Structural Investigation of Resin Glycosides from *Ipomoea lonchophylla*. *Journal of Natural Products* **60**, 467-471.

- Nikolov, Z., Meagher, M. y Reilly, P. (1985). High-performance liquid chromatography of disaccharides on amine-bonded silica column **319**, 51-57.
- Noda, N., Yoda, S., Kawasaki, T. y Miyahara, K., (1992). Resin glycosides XV. Simonins I-V, ether-soluble resin glycosides (Jalapins) from the roots of *Ipomoea batatas* (cv. Simon). *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 3163-3168.
- Ono, M., Kubo, K., Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1989). Operculin I and II, new ether soluble resin glycosides ("jalapin") with fatty acid ester groups from *Rhizoma jalapae braziliensis* (roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 3163-3168.
- Ono, M., Nakagawa, K., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1993). Resin glycosides XIX. Woodrosins I and II, ether-insoluble resin glycosides from the stems of *Ipomoea tuberosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **41**, 1925-1932.
- Osadao, R. (1834). El libro Judío o Medicina Doméstica, descripción de las virtudes de las yerbas medicinales de Yucatán, Mérida Yucatán, México, pp. 100, 208.
- Pereda-Miranda, R. y Hernández-Carlos, B. (2002). HPLC isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. *Tetrahedron* **58**, 3145-3154.
- Pereda-Miranda, R. y Bah, M. (2003). Biodynamic constituents in mexican Morning Glories: purgative remedies transcending boundaries. *Curr. Top. Med. Chem.* **3**, 111-131.
- Pereda-Miranda, R., Escalante-Sánchez, E. y Escobedo-Martínez, C. (2005). Characterization of lipophilic pentasaccharides from beach Morning Glory (*Ipomoea pescaprae*). *Journal of Natural Products* **68**, 226-230.
- Pereda-Miranda, R., Fragoso-Serrano, M., Escalante-Sánchez, E. y Hernández-Carlos, B. (2006). Profiling of the resin glycoside content of Mexican jalap roots with purgative activity. *Journal of Natural Products* **69**, 1460-1466.
- Pereda-Miranda, R., Rosas-Ramírez, D. y Castañeda-Gómez, J. (2010). Resin glycosides from the morning glory family. In Kinghorn, A. D. Falk H., Kobayashi J. edit. *Progress in the Chemistry of Natural Products*, vol. **92**, Springer, New York, pp. 77-153.

- Putz, F. y Money, H. (1991). The Biology of vines, edit. Cambridge University Press, Great Britain, pp. 441,1442.
- Sanz, M. y Martínez-Castro, I. (2007). Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography A* **1153**, 74-89.
- Skoog, D., Holler, F. y Nieman, T. (2001). Principios de análisis instrumental, edit. McGraw-Hill, Madrid España, pp. 731-736.
- Stefanovic´, S., Krueger, L. y Olmtead, R. (2002). Monophylly of the *Convolvulaceae* and circumscription of their major lineales based on DNA sequences of multiple chloro-plast loci. *American Journal of Botany* **89**, 1510-1522.
- Tasdemir, D., Brun, R., Franzblau, S., Sezgin, Y. y Calis, I. (2008). Evaluation of antiprotozoal and antimycobacterial activities of the resin glycosides and the other metabolites of *Scrophularia cryptophila*. *Phytomedicine* **15**, 209-215.
- Vivero, J., Castorena-Cortés, G., Meneses-Acosta, A., Montero-Molina L. y Sánchez-García L. (1996). Effect of 2,4-D Concentration on ergometrine accumulation in *Ipomoea alba* L. (Convolvulaceae) cell suspension culture. *Biotecnología Aplicada* **13**, 98-100.
- Yin, Y., Wang, J., Lou, J. y Kong, L. (2009). Novel acylated lipo-oligosaccharides from the tubers of *Ipomoea batatas*. *Carbohydrate Research* **344**, 466-473.