

89



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"AISLAMIENTO MEDIANTE HPLC DE LAS TRICOLORINAS A y B, CONSTITUYENTES MAYORITARIOS DE LA RESINA DE IPOMOEA TRICOLOR CAV." (CONVOLVULACEAE)



EXAMENES PROFESIONALES FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

A D O L F O P E R E Z D I A Z



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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
PRIMER VOCAL	DR. ROGELIO G. PEREDA MIRANDA
SECRETARIO	M. en C. JOSE DE JESUS GARCIA VALDES
PRIMER SUPLENTE	M. en C. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LOPEZ
SEGUNDO SUPLENTE	M. en C. FRANCISCO HERNANDEZ LUIS

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE FARMACIA, DIVISION DE BIOQUIMICA Y
FARMACIA.
FACULTAD DE QUIMICA.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

ASESOR


DR. ROGELIO G. PEREDA MIRANDA

SUSTENTANTE


APOLFO PEREZ DIAZ

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a mis padres, Gloria y Nabor, ya que sin su apoyo me hubiera sido imposible realizarlo. Para ellos, me faltan palabras para expresar mi más profundo reconocimiento; con respeto hoy simplemente les digo GRACIAS: gracias por darme la vida; gracias por los innumerables sacrificios realizados; gracias por el apoyo moral y económico; gracias por guiarme por el mejor camino; gracias por darme la mejor herencia que existe en la vida la educación; gracias por sus consejos, gracias por su cariño, y en fin, por darme siempre lo mejor de ustedes.

A mis hermanos: Claudia, Irma y Víctor, por compartir juntos, logros, sueños y alegrías.

A los dos pequeños traviesos de la casa, Gerardo Iván y Jeannine.

A la Familia Díaz y a la Familia Pérez, porque con su ejemplo me hicieron comprender que las cosas que valen la pena sólo se obtienen con sacrificio y trabajo. De manera especial, a mi tío Victor.

A todos mis maestros de la vida, porque de alguna manera dejaron una huella en mí y porque sin su ayuda no me hubiera sido posible llegar hasta aquí.

Al H. grupo de eruditos de la Facultad de Química: Adriana, Carlos, Carmen, Claudia, David, Gustavo, Omar, Pablo, Rigel, Tere y Tommy. En recuerdo de todas las veladas que pasamos juntos.

A mis compañeros de la Generación 89 de QFB's de la Facultad de Química, por todo lo que vivimos juntos. Especialmente a Irma y Ernesto.

A mis amigos y compañeros de los laboratorios N° 123 y 124. En especial, al M. en C. Moustapha Bah, por todo su apoyo y por su calidad humana.

A mis amigos de la Secundaria N° 139, por compartir juntos una de las mejores etapas de la vida. En particular, a Pedro Gudiño C., gracias por ser siempre mi amigo.

Finalmente, a tí Aurora, por ser mi amiga y confidente, gracias por compartir estos momentos juntos.

*El futuro tiene muchos nombres.
Para los débiles es lo inalcanzable;
Para los timoratos es lo desconocido;
Para los valientes es la oportunidad.*

Victor Hugo (1802-1885)

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS	XIV
AGRADECIMIENTOS	XV
1.0 ANTECEDENTES	
1.1 Generalidades sobre las resinas glicosídicas de la Familia de las Convolvuláceas.	1
1.2 Generalidades sobre el género <i>Ipomoea</i> e importancia agronómica de <i>Ipomoea tricolor</i> .	1-3
1.3 Generalidades sobre la separación mediante HPLC de las resinas glicosídicas de las Convolvuláceas.	3-6
1.4 Generalidades del desarrollo de un método de separación en HPLC.	7-11
2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
2.1 Consideraciones generales	12-14
2.2 Objetivo general	15
2.3 Objetivos específicos	15
3.0 PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Obtención de la resina	16
3.2 Cromatografía en columna flash	16
3.2.1 Condiciones cromatográficas generales (Nº 1)	16
3.2.2 Condiciones cromatográficas generales (Nº 2)	16
Experimento Nº 1	16
Experimento Nº 2	19
Experimento Nº 3	21

	Página
3.3 Obtención de los ácidos glicosídicos	23
3.3.1 Hidrólisis en medio alcalino	23
3.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Condiciones instrumentales generales	24
3.4.1 Condiciones Instrumentales Generales a Nivel Analítico (análisis preliminares N° 1)	25
3.4.2 Condiciones Instrumentales Generales a Nivel Analítico (análisis preliminares N° 2)	25
3.4.3 Condiciones Instrumentales Generales a Nivel Analítico (análisis preliminares N° 3)	25
3.4.4 Condiciones Instrumentales Generales a Nivel Analítico (análisis preliminares N° 4)	26
Experimento N° 1	26
Experimentos N° 2 y 3	27
Experimento N° 4	27-28
Experimento N° 5	28
Experimento N° 6	28-29
Experimentos N° 7 y 8	29
Experimentos N° 9 y 10	30
Experimentos N° 11 y 12	31
Experimentos N° 13 al 15	32
Experimento N° 16	33
3.5 Desarrollo del método analítico de separación de compuestos estructuralmente relacionados mediante (HPLC)	33
Experimento N° 17.0	33-34
Experimentos N° 17.1 al 17.5	34-35

	Página
3.6 Experimentos sobre la confirmación de la homogeneidad de los picos	36
Experimentos N° 18 al 21	36
3.7 Aislamiento y purificación de las tricolorinas A y B	41
3.7.1 Condiciones cromatográficas semipreparativas	41
3.7.1.1 Condiciones instrumentales generales a nivel semipreparativo (N° 1)	41
3.7.1.2 Condiciones instrumentales generales a nivel semipreparativo (N° 2)	42
Experimentos N° 22 al 24	42
Experimentos N° 25 y 26	43
3.7.2 Condiciones cromatográficas preparativas	43-44
3.7.2.1 Condiciones instrumentales generales a nivel preparativo (N° 1)	44
3.7.2.2 Condiciones instrumentales generales a nivel preparativo (N° 2)	44
Experimentos N° 29 y 30	45
3.8 Hidrólisis alcalina de la tricolorina B	48
3.8.1 Obtención del ácido tricolórico	48
3.9 Determinación de las constantes físicas	48
3.9.1 Caracterización de la tricolorina A	48
3.9.2 Caracterización de la tricolorina B	49
3.9.3 Caracterización del ácido tricolórico	50
4.0 DISCUSION DE RESULTADOS	
4.1 Análisis de la glicorresina mediante cromatografía en columna flash y cromatografía en capa fina (CCF)	53
4.2 Análisis mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)	54-55
4.2.1 Selección básica del sistema de cromatografía de líquidos: modo cromatográfico, tipo de funcionalidad y condiciones de elución	55-57
4.2.2 Optimización de la separación analítica	57
4.2.2.1 Análisis numérico de los parámetros cromatográficos	58

	Página
4.2.2.2 Análisis para las columnas de fase enlazada moderadamente polar NH ₂ y de fase poco polar C ₁₈ y CN operando en condiciones de fase reversa	61-81
4.2.2.3 Análisis para la columna de fase normal-adsorción	81
4.2.2.4 Justificación de los parámetros químicos y mecánicos empleados en la optimización de la separación	81-83
4.2.3 Escalamiento a nivel preparativo	83
4.2.3.1 Método de sobrecarga de la columna y corte del núcleo	83
4.2.3.2 Método del rasurado y reciclado de picos	84-85
4.2.4 Recuperación del material purificado	85
4.2.5 Análisis de las sustancias obtenidas	86
4.2.6 Estructura de la tricolorina A	86
4.2.7 Estructura del ácido tricolórico	86
5.0 CONCLUSIONES	87-90
BIBLIOGRAFIA	91-99
ANEXO I (Espectros de Masas, RMN, ¹ H, ¹³ C)	100-109
GLOSARIO	110-111

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura N° 1	Estructura química de la tricolorina A	3
Figura N° 2	Diagrama de flujo que ilustra un desarrollo sistemático de un método en HPLC	7
Figura N° 3	Cromatografía en capa fina de cada una de las fracciones eluidas de la columna original	17
Figura N° 4	Cromatografía en capa fina de la resolución en columna de cada una de las fracciones obtenidas de la fracción III	19
Figura N° 5	Cromatografía en capa fina de cada una de las fracciones obtenidas durante la resolución en columna de la fracción XXVI	21
Figura N° 6	Cromatografía en capa fina de cada una de las fracciones obtenidas durante la resolución en columna de la fracción 38-40	22
Figura N° 7	Cromatografía en capa fina de la reacción de saponificación de las fracciones 156-162 y 142-145 de la columna original	23
Figura N° 8	Cromatogramas de algunas fracciones obtenidas mediante la resolución en columna flash	26
Figura N° 9	Cromatogramas de algunas fracciones obtenidas mediante la resolución en columna flash	27
Figura N° 10	Cromatogramas de algunas fracciones obtenidas mediante la resolución en columna flash	27

		Página
Figura N° 11	Cromatograma de la fracción XXIII obtenido mediante la resolución en columna flash	28
Figura N° 12	Cromatogramas de algunas fracciones obtenidas mediante la resolución en columna flash	28
Figura N° 13	Cromatogramas de las fracciones X, XXIII y XXV obtenidos mediante la resolución en columna flash	29
Figura N° 14	Cromatogramas de la fracción XXV obtenidos mediante la resolución en columna flash	29
Figura N° 15	Cromatograma de la fracción XXV obtenido mediante la resolución en columna flash	30
Figura N° 16	Cromatogramas de las fracciones XXIII y X obtenidos mediante la resolución en columna flash	30
Figura N° 17	Cromatogramas de la fracción XXXVII obtenidos mediante la resolución en columna flash	31
Figura N° 18	Cromatogramas de las fracciones 143 y 143A	31
Figura N° 19	Cromatogramas de las fracciones XXIV y XXV obtenidos mediante la resolución en columna flash	31
Figura N° 20	Cromatogramas de la fracción XXV obtenidos mediante la resolución en columna flash	32
Figura N° 21	Cromatogramas de las fracciones XXIII y XXIV obtenidos mediante la resolución en columna flash	32
Figura N° 22	Cromatogramas de la fracción XXIII obtenidos mediante la resolución en columna flash	33
Figura N° 23	Cromatogramas de la fracción XXIII obtenidos mediante la resolución en columna flash	33

	Página	
Figura N° 24	Relación de las respuestas cromatográficas mediante "Ratio plotting" a dos longitudes de onda (206 nm y 216 nm) para la detección de los constituyentes individuales del crudo resinoso total. Columna C₁₈.	37
Figura N° 25	Relación de las respuestas cromatográficas mediante "Ratio plotting" a dos longitudes de onda (206 nm y 216 nm) para la detección de los constituyentes individuales del crudo resinoso total. Columna CN.	38
Figura N° 26	Relación de las respuestas cromatográficas mediante "Ratio plotting" a dos longitudes de onda (206 nm y 216 nm) para la detección de los constituyentes individuales del crudo resinoso total. Columna C₁₈.	39
Figura N° 27	Relación de las respuestas cromatográficas mediante "Ratio plotting" a dos longitudes de onda (206 nm y 216 nm) para la detección de los constituyentes individuales del crudo resinoso total. Columna NH₂.	40
Figura N° 28	Cromatograma de la fracción XXIV obtenido mediante la resolución en columna flash	42
Figura N° 29	Cromatograma de la fracción XXIII obtenido mediante la resolución en columna flash	42
Figura N° 30	Cromatograma de la fracción F₆ obtenido mediante el fraccionamiento en columna HPLC	43

		Página
Figura N° 31	Cromatograma de la fracción F ₄ obtenido mediante el fraccionamiento en columna HPLC	43
Figura N° 32	Cromatograma de la fracción 143A	43
Figura N° 33	Separación de las tricolorinas A y B a partir de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> mediante HPLC a nivel preparativo. Columna C ₁₈ .	46
Figura N° 34	Separación de las tricolorinas A y B a partir de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> mediante HPLC a nivel preparativo. Columna NH ₂ .	47
Figura N° 35	Análisis mediante cromatografía en capa fina de la fracción XXVIII	54
Figura N° 36	Guía para la elección del modo y selección del tipo de empaque en la cromatografía líquida de alta resolución.	56
Cromatograma Múltiple N° 1	Resumen de los análisis más importantes para el crudo resinoso total de <i>Ipomoea tricolor</i> recopilados en el transcurso de la optimización de las condiciones cromatográficas analíticas. Columna CN.	63
Figura N° 37	Relación entre el tiempo de retención de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (H ₂ O-CH ₃ CN)	64

	Página	
Figura N° 38	Relación entre el factor de capacidad (k') de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃CN)	64
Figura N° 39	Relación entre los factores de selectividad (α) de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃CN)	65
Figura N° 40	Relación entre la resolución (R_s) de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃CN)	65
Figura N° 41	Relación entre la altura equivalente de platos teóricos (HEPT) de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃CN)	66
Cromatograma Múltiple N° 2	Resumen de los análisis más importantes para el crudo resinoso total de <i>Ipomoea tricolor</i> recopilados en el transcurso de la optimización de las condiciones cromatográficas analíticas. Columna C₁₈.	68
Figura N° 42	Relación entre el tiempo de retención de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃CN)	69

	Página
Figura N° 43	69
Relación entre el factor de capacidad (k') de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (H ₂ O-CH ₃ CN)	
Figura N° 44	70
Relación entre los factores de selectividad (α) de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (H ₂ O-CH ₃ CN)	
Figura N° 45	70
Relación entre la resolución (R_s) de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (H ₂ O-CH ₃ CN)	
Figura N° 46	71
Relación entre la altura equivalente de platos teóricos (HEPT) de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (H ₂ O-CH ₃ CN)	
Figura N° 47	72
Relación entre la eficiencia cromatográfica (N) y la velocidad de flujo de distintas fases móviles en la HPLC de fase reversa	
Cromatograma Múltiple N° 3	73
Resumen de los análisis más importantes para el crudo resinoso total de <i>Ipomoea tricolor</i> recopilados en el transcurso de la optimización de las condiciones cromatográficas analíticas. Columna C ₁₈ .	

		Página
Figura N° 48	Relación entre el tiempo de retención de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (H ₂ O-CH ₃ OH)	74
Figura N° 49	Relación entre el factor de capacidad (k') de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (H ₂ O-CH ₃ OH)	74
Figura N° 50	Relación entre los factores de selectividad (α) de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (H ₂ O-CH ₃ OH)	75
Figura N° 51	Relación entre la resolución (R _s) de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (H ₂ O-CH ₃ OH)	75
Figura N° 52	Relación entre la altura equivalente de platos teóricos (HEPT) de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (H ₂ O-CH ₃ OH)	76
Cromatograma Múltiple N° 4	Resumen de los análisis más importantes para el crudo resinoso total de <i>Ipomoea tricolor</i> recopilados en el transcurso de la optimización de las condiciones cromatográficas analíticas. Columna NH ₂ .	78

	Página
Figura N° 53	79
Relación entre el tiempo de retención de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (CH ₃ CN-H ₂ O)	
Figura N° 54	79
Relación entre el factor de capacidad (k') de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (CH ₃ CN-H ₂ O)	
Figura N° 55	80
Relación entre los factores de selectividad (α) de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (CH ₃ CN-H ₂ O)	
Figura N° 56	80
Relación entre la resolución (R _s) de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (CH ₃ CN-H ₂ O)	
Figura N° 57	81
Relación entre la altura equivalente de platos teóricos (HEPT) de los constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> y la polaridad del sistema de elución (CH ₃ CN-H ₂ O)	
Figura N° 58	84
Separación de las tricolorinas A y B mediante las técnicas de sobrecarga de la columna y corte del núcleo en HPLC a nivel preparativo. Columna C ₁₈ .	

	Página	
Figura N° 59	Separación de las tricolorinas A y B mediante las técnicas de rasurado y reciclado de picos en HPLC a nivel preparativo. Columna NH₂.	85
Figura N° 60	Factores químicos y mecánicos que conforman una columna de HPLC y su contribución a la optimización cromatográfica.	89

LISTA DE TABLAS

		Página
TABLA N° 1	Ejemplos selectos de condiciones cromatográficas empleadas para el aislamiento de algunos glicolípidos individuales de las resinas de las Convolvuláceas	5-6
TABLA N° 2	Factores de compensación en la compresibilidad usados en los análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución	24
TABLA N° 3	Valores numéricos de los parámetros cromatográficos analizados en cada uno de los experimentos realizados durante la optimización de la separación analítica	60
TABLA N° 4	Estandarización de los parámetros que describen a las columnas analíticas y preparativas utilizadas en cada uno de los análisis de optimización del método	82

AGRADECIMIENTOS

1) Al Dr. Rogelio Pereda Miranda deseo expresar mi más profundo agradecimiento, por su excelente dirección, aportación de ideas y consejos para la realización de este trabajo así como por ser un ejemplo de la superación académica y personal. De igual manera, deseo agradecer a la Dra. Rachel Mata por brindarme todo su apoyo y por su constante interés en la formación de recursos humanos de calidad. Para ellos dos, mi reconocimiento.

2) A todos los miembros del jurado comisionado para la revisión de este manuscrito, por sus observaciones, comentarios y consejos, los cuales mejoraron sustancialmente el presente trabajo.

3) A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM, por el financiamiento otorgado a través de los proyectos IN 202493 e IN 203494.

4) Al Subprograma N° 127 "Formación Básica para la Investigación" y a la DGAPA por las becas otorgadas las que incondicionalmente apoyaron la realización del presente estudio.

5) Al Instituto de Química por las facilidades proporcionadas para el registro de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear y, en especial a la M. en C. Isabel Chávez por su asistencia técnica.

1.0 ANTECEDENTES

1.1 Generalidades sobre las resinas glicosídicas de la Familia de las Convolvuláceas.

Las resinas son productos terminales del metabolismo de las plantas, son sólidos amorfos de naturaleza química compleja, usualmente sintetizados y acumulados en estructuras vegetales especializadas; físicamente las resinas son duras, transparentes o translúcidas cuando se calientan tienden a ablandarse y fundir; desde el punto de vista químico, las resinas son mezclas complejas de ácidos resínicos, resinoalcoholes, resinotanoles, ésteres y compuestos químicamente inertes denominados resenos. Las resinas son insolubles en agua y se cree que biosintéticamente provienen de la oxidación de los terpenos. Las resinas de las Convolvuláceas se encuentran en combinaciones glicosídicas con diversos azúcares y por lo tanto se conocen como glicorresinas o resinas glicosídicas. La existencia de las glicorresinas dentro de esta familia se pone de manifiesto por su fuerte efecto purgante de amplio uso en la medicina tradicional de diversas regiones del mundo y mediante el aislamiento de las resinas crudas y la identificación de sus productos de hidrólisis. La complejidad en la composición de estas glicorresinas y su alto peso molecular han dificultado el aislamiento de los constituyentes individuales; de tal suerte que la identidad química de muchos de los constituyentes en estas mezclas glicosídicas, así como la información relacionada con su posible biosíntesis se desconoce. En el año de 1987 el grupo japonés encabezado por el Dr. Miyahara describió el primer aislamiento, así como la elucidación estructural de un conjunto de glicolípidos íntegros, a partir de una resina glicosídica de las Convolvuláceas (Noda et al., 1987). Estas resinas constituyen un razgo quiniotaxonomico de los géneros *Convolvulus*, *Exogonium*, *Ipomoea*, *Merremia* y *Operculina*.

Las resinas glicosídicas de las Convolvuláceas constituyen los principios biodinámicos responsables de los efectos purgantes de algunas de las especies medicinales de esta familia. Se han descrito diversas actividades biológicas de posible interés terapéutico para estos compuestos como son sus efectos antimicrobianos (Bieber et al., 1986 y Pereda-Miranda et al., 1993) antiinflamatorios y antitumorales (Bieber et al., 1986).

1.2 Generalidades sobre el género *Ipomoea* e importancia agronómica de *Ipomoea tricolor*.

Ipomoea es el género más grande de la familia de las Convolvuláceas, comprendiendo al menos 500 especies en el mundo, con su mayor diversidad en los trópicos. Aproximadamente 170 especies se reportan para México, las cuales representan una gran variabilidad morfológica que quizá no es superada por ningún otro género del país. La

mayoría de las especies son enredaderas herbáceas o leñosas, pero también pueden presentarse en forma de árboles, arbustos, arbustivas sufruticasas, hierbas escandentes o erectas. Las especies arborescentes frecuentemente predominan en bosques tropicales caducifolios del suroeste de la República Mexicana. En cuanto a su hábitat, el género se encuentra preferentemente en bosques tropicales caducifolios o perennifolios, encinares, pinares, pantanos, dunas, costeras y matorrales, a una altitud de 0-3200 m. La especie más importante es *Ipomoea batatas* (L.) Lam., el camote, una planta cultivada a escala mundial. Esta especie es originaria del Nuevo Mundo, quizá de procedencia Mexicana, aunque varios autores se inclinan en asignarle un origen Sudamericano. Varias especies proveen una fuente de medicamentos purgativos, tal como la "purga de Xalapa", *Ipomoea purga* (Wender.) Hayne, la cual tiene una larga historia comercial y es usada desde los tiempos precolombinos. Varias especies de México producen semillas que al ingerirse son alucinógenas debido a la presencia de alcaloides del ergot (i.e., *Ipomoea tricolor* Cav.), y aún se usan como un medio adivinatorio en las tradiciones indígenas. Probablemente más de la mitad de las especies de las Convolvuláceas tienen potencial hortícola, muchas de las cuales se encuentran cultivadas en jardines y huertos familiares en gran parte de México, i.e., el quiebraplato, *Ipomoea purpurea* (L.). La diversidad estructural de los glicolípidos presentes en las resinas del género *Ipomoea* fue objeto de una revisión reciente (Pereda-Miranda, 1994).

La planta *Ipomoea tricolor* Cav. (*I. violaceae*) se utiliza ampliamente como un cultivo de cobertura en los meses de agosto a octubre, especialmente durante el periodo del barbecho de los campos de caña de azúcar en el estado de Morelos. El potencial alelopático de esta especie se demostró previamente midiendo la actividad inhibitoria de lixiviados acuosos y extractos orgánicos sobre la germinación de semillas y el crecimiento radicular de *Amaranthus leucarpus* Watts. y *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. El fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico activo permitió el aislamiento del principio inhibitorio del crecimiento vegetal que resultó ser una mezcla de resinas glicosídicas. El componente mayoritario presente en esta mezcla, la tricolorina A (1) presenta un amplio rango de actividades biológicas que incluyen entre otros, efectos antimicrobianos, citotóxicos e inhibidores de la proteína cinasa C. Debido a su potencial de aplicación agroquímico, resulta de interés aislar y caracterizar a los constituyentes individuales minoritarios presentes en las resinas alelopáticas. De tal suerte que para conseguir este objetivo deberán implementarse las condiciones instrumentales en HPLC necesarias para purificar en una escala preparativa cantidades suficientes de estos constituyentes biodinámicos y continuar con la evaluación de sus efectos alelopáticos y con estudios enfocados a su completa caracterización estructural.

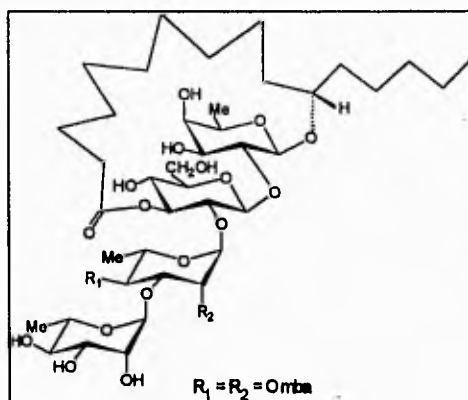


Figura 1.0 Estructura química de la tricolorina A (1)

1.3 Generalidades sobre la separación mediante HPLC de las resinas glicosídicas de las Convolvuláceas.

El éxito en la purificación de los constituyentes individuales de las glicorresinas de las Convolvuláceas ha dependido exclusivamente del empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia. La Tabla N° 1.0 resume las condiciones instrumentales empleadas para lograr la completa resolución de los crudos resinosos analizados, hasta este momento por, el grupo del Dr. Miyahara de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Setsunan en Osaka, Japón.

Es importante destacar que en ninguno de los artículos que tratan sobre la elucidación estructural de los glicolípidos de las Convolvuláceas se hace mención a la estandarización de las condiciones instrumentales mediante la HPLC para la obtención de la máxima resolución de los crudos resinosos analizados tanto a nivel analítico como en su posterior escalamiento a condiciones preparativas. Sin embargo, la comparación de las condiciones instrumentales descritas en la literatura permite emitir los siguientes comentarios:

Dada la insolubilidad de las resinas en agua y su moderada polaridad que les proporciona una solubilidad parcial en disolventes orgánicos como CHCl_3 , AcOEt y acetona, entre otros, el empleo de la fase normal-adsorción representó la primera alternativa ensayada para la resolución de las resinas de *I. orizabensis* (Noda et al., 1987). Esta selección en el modo cromatográfico resultó, evidentemente, en tiempos de retención con valores elevados ($T_r > 40$ min) para las orizabinas, constituyentes de esta resina, y limitó la

Antecedentes

detección únicamente al empleo del detector de índice de refracción. Por lo tanto, la baja resolución obtenida sólo permitió la purificación de las orizabinas mayoritarias. De tal suerte que en las metodologías posteriores que este grupo de investigación ha descrito en la literatura se ha recurrido al empleo de la fase reversa (C_{18} o C_8) para la completa separación de los constituyentes individuales de las resinas de las Convolvuláceas.

Estos soportes cromatográficos han permitido la completa separación de mezclas complejas de oligosacáridos constituidos por tetrasacáridos y pentasacáridos (i.e., operculinas). La separación en columnas de fase reversa C_{18} o C_8 resulta eficiente para los glicolípidos que presentan el núcleo oligosacárido acilado por ácidos alifáticos de cadena corta, i.e., ácido isobutírico, 2-metil-butanoico, 3-hidroxi-2-metilbutanoico y ácido tíglico, entre otros. (Noda et al., 1988; Noda et al., 1987; Noda et al., 1994 y Ono et al., 1993). En tanto que el empleo de estas columnas para la resolución de glicolípidos con el núcleo oligosacárido acilado por ácidos alifáticos de cadena larga como el ácido palmítico, esteárico, mirístico y araquidónico de las tuguajalpinas, se dificultó debido a la alta retención que sufren en los soportes cromatográficos antes mencionados y, por lo tanto, se describieron las condiciones que emplearon columnas de fase reversa enlazada con grupos fenilo Ø (Noda et al., 1994).

Grupo de Resinas	Tipo de Soporte y Configuración de la Columna	Velocidad de Flujo y Sistema de Elución	Tipo de Detector	Tipo de Pretratamiento de la Muestra	Referencia	Comentarios Particulares
1) Orizabinas I-IV	Silica-gel (5µm, 22x300 mm)	3 ml/min CHCl ₃ -MeOH (9:1)	I.R.	CC: Gel de sílice →Lobar Kusano gel de sílice	(Noda et al, 1987; Ono, 1993)	HPLC a nivel preparativo
2) Muricatinas I-VIII	Silica-gel (5µm, 22x300 mm)	CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (9:1:0.1; 8:2:0.1 y 8:2:0)	I.R.	CC: Gel de sílice →Sephadex LH- 20→Lobar Kusano gel de sílice	(Noda et al., 1988)	HPLC a nivel preparativo
3) Operculinas I-XVIII	Silica gel (22x100 mm), Inertsil ODS-2 (20x250 mm), Hibar RP-8 (25x250 mm), Tosoh TSK gel ODS 120T (21.5 x300 mm), Fuji gel ODS G3 (36x220 mm), Merck RP-8 (25x250 mm)	92→100 % MeOH para los soportes tipo C ₁₈ y C ₈ en diversos %; y CHCl ₃ -MeOH para la fase normal	Jasco, Twincle Shodex SE-11, I.R.	CC: Gel de sílice →Gel de sílice→ Fuji gel ODS G3	(Ono et al., 1989-1992)	HPLC a nivel preparativo. Las fracciones resultantes fueron reinyectadas para efectuar el reciclaje de los picos durante 6 ciclos consecutivos
4) Escamoninas III-VIII	Silica gel (5µm, 20x250 mm), Tosoh TSK gel ODS 120 T (21.5 x300 mm), RP-8, Prep.Chemcosorb Si ⁶⁰ (20x500 mm)	n-Hexano-EtOAc (3:2 y 7:3), MeOH (4 ml/min, 90→100 %), CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (9:1.5:0.1)	Knaver I.R. operando a 0°C durante 24 hrs	Ninguno, se procedió por una parte con el crudo de acetilación y por la otra con la mezcla de glicorresinas libres	(Kogetsu et al., 1991)	HPLC a nivel preparativo. Las fracciones resultantes fueron reinyectadas para efectuar el reciclaje de picos durante (22→28 ciclos)

Tabla 1.0 Ejemplos selectos de condiciones cromatograficas empleadas para el aislamiento de algunos glicolípidos individuales de las resinas de las convulvaceas

Grupo de Resinas	Tipo de Soporte y Configuración de la Columna	Velocidad de Flujo y Sistema de Elución	Tipo de Detector	Tipo de Pretratamiento de la Muestra	Referencia	Comentarios Particulares
5) Quamoclinas I-IV	Inertsil ODS-2 (20×250 mm), Cosmosil 5 C ₁₈ Ar (6.0×250 mm)	MeOH 95 y 100 %	Shodex I.R. SE-11, Jasco UVIDEC 100-IV	1.-CC: Gel de sílice 2.-CC: Gel de sílice→Cosmosil 140 C ₁₈ -OPN	(Ono et al., 1992)	HPLC a nivel preparativo
6) Simoninas I-V	Inertsil ODS-2 (6.0×250 mm) Hibar RP-18 (4.0×250 mm)	87 y 100 % MeOH	Jasco UVIDEC 100-IV	CC: Sephadex LH-20→Gel de sílice	(Noda et al., 1992)	HPLC a nivel preparativo
7) Marubajalapinas I-VII	Inertsil ODS-2 y Cosmosil ODS 5 C ₁₈ -Ar (6.0×250 mm), Tosoh TSK gel ODS-80 (21.5×300 mm)	99→100 % MeOH	Shodex I.R. SE-11, Jasco UVIDEC 100-IV	CC: Gel de sílice	(Ono et al., 1992)	Fraccionamiento de la mezcla en HPLC a nivel preparativo en el soporte TSK
8) Woodrosinas I-II	Inertsil Prep. ODS-2 (20µm, 20×250 mm)	96 % MeOH	I.R.	CC: Sephadex LH-20→Gel de Sílice	(Ono et al., 1993)	HPLC a nivel preparativo
9) Estoloniferinas I-VII	Inertsil Prep. ODS-2 (20µm, 20×250 mm)	95 y 100 % MeOH	I.R.	CC: Gel de sílice →Sephadex LH-20→Cosmosil 140 C ₁₈ OPN	(Noda et al., 1994)	HPLC a nivel preparativo
10) Tugujalapinas I-X	Unisil Q, Ø (10µm, 16.7×250 mm)	98 y 100 % MeOH	Jasco 830 I.R.	CC: Gel de sílice →Cosmosil 140 C ₁₈ OPN→ Sephadex LH-20 →Gel de sílice	(Noda et al., 1994)	HPLC a nivel preparativo

Tabla 1.0 Ejemplos selectos de condiciones cromatográficas empleadas para el aislamiento de algunos glicolípidos individuales de las resinas de las convulváceas.

1.4 Generalidades del desarrollo de un método de separación en HPLC.

El desarrollo y diseño de un método cromatográfico conducente a la optimización de las condiciones instrumentales para la obtención de la máxima resolución de cualquier muestra problema incluye la consideración de los siguientes parámetros: la selección de los modos en cromatografía de líquidos, las dimensiones de la columna, el tipo de fase estacionaria (material de empaque) y el sistema de detección, entre otros. La figura N° 2.0 ilustra en forma de un diagrama de flujo los pasos necesarios para un desarrollo sistemático de un método de separación mediante el empleo de la HPLC.

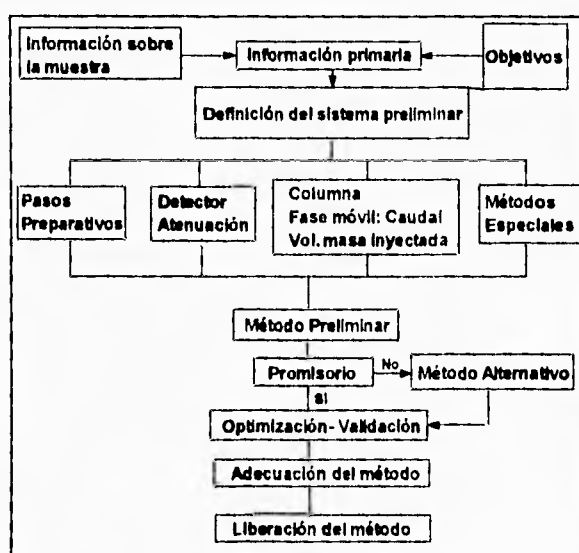


Figura 2.0 Diagrama de flujo que ilustra un desarrollo sistemático de un método en HPLC.

A continuación, se describen brevemente cada paso de esta secuencia y su posible aplicación a la resolución de la resina glicosídica de *Ipomoea tricolor*, que constituye el problema fundamental de la presente disertación.

Los parámetros cromatográficos descritos en la literatura para efectuar el análisis cuantitativo de carbohidratos (Snyder, 1988; Macherey-Nagel Applications, 1993; Blanken et al., 1985; Zsandon et al., 1979; Yang et al., 1981 y Nikolov et al., 1985) permiten proponer las siguientes condiciones generales: la detección mediante el empleo de I.R. o

Antecedentes

UV-visible con perfiles de elución isocráticos; o bien el uso del detector electroquímico o de U.V.-visible con perfiles de elución en gradiente (Waters Chromatography Systems and Chemistries for Food and Agricultural Product Analysis, 1989). De manera adicional, se ha descrito el análisis cuantitativo a nivel analítico de oligosacáridos con un grado de polimerización (G.P.) menor a 10 mediante el empleo del detector de masa "Evaporative Light Scattering Detector" (Alltech Manual Chromatography, 1991 y Macrae et al., 1982); pero su alto costo de adquisición, inestabilidad con fases móviles acuosas, exclusividad de venta y nivel de operación hace que su empleo de manera rutinaria sea prácticamente imposible. En este sentido, también el sistema de detección mediante destrucción de la muestra, la necesidad de tener fases móviles con una buena conductividad y nivel de operación hacen en nuestro caso inoperante al detector electroquímico debido a la necesidad de recuperación de la muestra íntegra en sus constituyentes individuales a nivel preparativo. Por otra parte, la total separación de oligosacáridos de G.P. menor a 8 es posible, ya que existe evidencia documental para la separación total de cada uno de los componentes mediante una aplicación específica de la columna de análisis de carbohidratos (Waters Chromatography Handbook, 1993-1994 y Macherey-Nagel HPLC Applications, 1993). También, el análisis mediante HPLC de una mezcla de oligosacáridos de G.P. menor a 50 es factible; en este caso se utiliza una secuencia de tratamiento en soportes poliméricos Glyco-Pak DEAE→Columna de Análisis de Carbohidratos→ Columna Glyco-Pak N (Waters Chromatography Handbook, 1993-1994). Además, existen técnicas de aplicación general para el análisis de carbohidratos, las cuales se seleccionan con base en las características de la muestra problema, i.e., G.P., tipo de oligosacáridos: neutros o ácidos. Los métodos anteriores, emplean básicamente como modos de separación la cromatografía de intercambio iónico, de exclusión por tamaño molecular, de partición, e inclusive utilizan también la de fase reversa con diversas funcionalidades químicas (Chaplin y Kennedy, 1986; Waters Chromatography Handbook, 1993-1994; Biermann y Mc Ginnis, 1989; Macherey-Nagel HPLC Applications, 1993, Blanken et al., 1985; Eggert y Jones, 1985; Blumberg et al., 1982; Bergh et al., 1983; Dua y Bush, 1983 y Boersma et al., 1981).

Desafortunadamente, no existe hasta la fecha teoría para la selección del modo cromatográfico y de las columnas que sea de aplicación universal para todos los trabajos y en todas las aplicaciones, y también no existe ninguna guía que pueda ser consultada, y que su uso garantice la selección de las condiciones cromatográficas más eficientes (Quattrochi et al., 1990 y Snyder, 1988). En este sentido, la selección del tipo de columna así como su configuración, resultará ser un paso importante durante los procedimientos analíticos involucrados en el desarrollo del método de separación. De esta manera, la adecuada selección de los mejores modos cromatográficos, involucrará el recorrido por un largo

Antecedentes

proceso empírico de ensayo y error para determinar la mejor combinación entre los modos en cromatografía de líquidos, las dimensiones de la columna y la fase estacionaria (material de empaque). En relación con la muestra problema, es importante o conveniente conocer:

- la identidad de los componentes de interés
- el rango de pesos moleculares
- las estructuras químicas y, propiedades físicas y espectroscópicas, i.e., pKa's, solubilidad, espectros de U.V.
- la concentración aproximada de los componentes de interés, es decir el nivel presente en la muestra problema (macro, microcomponentes o ambos)
- la naturaleza de la matriz presente, i.e., investigación primaria en: extractos vegetales y fracciones, extractos de órganos de animales, mezclas de fermentación; investigación de intermediarios y productos crudos: intermediarios de síntesis orgánica, mezclas de reacción, productos secundarios; investigación de ingredientes activos: pruebas de pureza, ensayos rutinarios, separación de compuestos químicamente relacionados, pruebas de estabilidad; investigación en productos formulados: ensayos rutinarios, pruebas de pureza, uniformidad de contenido, prueba de estabilidad, farmacocinética y estudios metabólicos.

Una vez recopilada la información primaria, i.e., antecedentes bibliográficos e información sobre la muestra, podrá definirse un sistema preliminar para efectuar los ensayos analíticos (ver Figura N° 2). El primer punto a evaluar consiste en determinar los procesos físicos o químicos que permitirán la preparación de la muestra problema para mantenerla en solución y, al mismo tiempo, en una concentración adecuada para su análisis. Estos pasos preparativos resultan ser un factor de trascendencia crucial especialmente, cuando se emplean columnas de HPLC que poseen un alto costo monetario. En muchos casos, la preparación puede ser tan simple como una extracción líquido-líquido o líquido-sólido y, en otros, pueden necesitarse pasos sucesivos de preconcentración de la muestra antes de realizar una inyección. El pretratamiento adecuado de la muestra problema ahorra tiempo, dinero y esfuerzo. Las resinas glicosídicas de las Convolvuláceas representan mezclas complejas de glicolípidos oligosacáridos contenidos en una matriz constituida por aceites esenciales, almidón, gomas y azúcares. Así que la complejidad de la matriz, y los compuestos no relacionados con los glicolípidos de la glicorresina, interfieren y acrecentan su grado de complejidad (Szepesi et al., 1989) y, por lo tanto, se requiere de un pretratamiento para la eliminación del material indeseable mediante el empleo de alguno de los métodos ampliamente conocidos para efectuar tal finalidad (Waters Notas del curso de cromatografía de líquidos, 1995; Quattrochi et al., 1990 y Snyder, 1988):

Antecedentes

1.-Centrifugación 2.-Filtración 3.-Ultrafiltración 4.-Precipitación simple y selectiva
5.-Extracción líquido-líquido 7.-Dilución o concentración 8.-Derivatización
(Post- y Precolumna) 9.-Cromatografía en columna (abierta, flash, de baja y alta
presión) 10.- Cromatografía de intercambio de columnas comprendiendo técnicas
como; on-line clean-up, column selection, sample enrichment, column backflush,
multidimensional chromatography 11.- Extracción en fase sólida (SPE).

El objetivo de mencionar los métodos anteriores es conocer mejor la versatilidad que puede obtenerse durante el desarrollo y optimización del método de separación y así, contribuir de manera benéfica al pretratamiento de la muestra problema dentro o fuera del mismo cromatógrafo de líquidos.

El siguiente punto a considerar en la definición del sistema preliminar (ver Figura N° 2.0) es la selección del detector. El detector de primera elección y el más empleado es el U.V., por su simplicidad de uso, robustez y confiabilidad (Mc Nair, 1974; Beckman, s/año; Biermann y Mc Ginnis, 1989; Perkin Elmer, 1979; Maldener, 1989 y Deyl, 1984). De esta manera, cuando no es posible su empleo debido a la falta de grupos cromóforos en la muestra problema o porque la respuesta del detector es baja, es factible emplear otro tipo de detectores como el índice de refracción y de fluorescencia. O bien, emplear métodos de derivatización pre- o postcolumna y, de esta manera amplificar el grado de respuesta (Chaplin y Kennedy, 1986; Quattrochi et al., 1990 y Snyder, 1988). La definición del sistema preliminar en HPLC involucra también la adecuada selección de la fase móvil, ya que por sí misma modifica completamente la selectividad en las separaciones y representa el verdadero motor de las separaciones en fase normal y en fase reversa. En HPLC, es posible lograr una gran diversidad en las separaciones de una muestra problema al variar la composición de la fase móvil y utilizando exclusivamente un tipo de columna.

Una vez, que el método propuesto ha probado exitosamente su eficiencia de acuerdo con la configuración generada por los parámetros: columna-solventes-condiciones instrumentales, estaremos en presencia de un método preliminar (ver Figura N° 2.0). Este método debe optimizarse con la finalidad de mejorar al máximo la separación cromatográfica. El primer paso en el proceso de optimización es el ajuste de los parámetros cromatográficos k' , HEPT, α y R_S ; es decir, el factor de capacidad (k') dentro del rango de 2-10 para muestras sencillas y de 0.5-20 para muestras complejas, la obtención de los valores menores para la HEPT (más eficientes), la selectividad (α) mayor a 1.2 (Hostettman et al., 1986) y, finalmente la resolución (R_S) mayor a 1.25 para asegurar al menos una pureza del 99.4 % en aquellas relaciones de hasta 1:1 entre dos componentes (Snyder, 1988;

Quattrochi et al., 1990 e Isco tables and handbook, 1987). De esta manera, la selectividad (α) dependerá del tipo de interacciones entre la fase estacionaria, fase móvil y la muestra problema (tipo dispersivo, dipolar, por puentes de hidrógeno, interacciones dieléctricas, o bien una combinación de ellas). No sólo la polaridad, sino la suma total de todas estas propiedades son las que definen la afinidad de la fase móvil por la muestra problema.

La optimización de la separación de los constituyentes individuales de la resina de *I. tricolor* se concentrará globalmente sobre el sistema cromatográfico al considerar modificaciones en el tipo de columna y el cambio en la fuerza de elución de la fase móvil (mezcla de disolventes). Los cromatogramas resultantes serán comparados utilizando un diagrama de ventanas para analizar las tendencias observadas en función del cambio en el parámetro cromatográfico seleccionado (Quattrochi et al., 1990, Gazdag y Szepesi, 1989). Resulta claro que la calidad de un cromatograma puede ser juzgada por simple apreciación visual. Sin embargo, la evaluación cuantitativa de la calidad de la separación, considerada en términos de resolución y tiempo de análisis, es indudablemente menos subjetiva, y permite aplicar evaluaciones globales en estos experimentos de optimización.

Para finalizar, el desarrollo del método de separación se dará por concluido en el nivel de método promisorio aún susceptible a sufrir una segunda etapa de optimización (ver Figura N° 2.0). En este sentido, se incluirán concepciones y recomendaciones teóricas para su aplicación en un posterior estudio que permitan maximizar las condiciones de separación. De esta manera, queda fuera del alcance de este trabajo, los pasos subsiguientes en el adecuado desarrollo de métodos: la validación, la adecuación y finalmente la liberación del método (ver Figura N° 2.0).

2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Consideraciones generales

El presente trabajo forma parte de un proyecto de investigación multidisciplinario cuyo objetivo general se enfoca al aislamiento de principios bioactivos de utilidad medicinal y económica del género *Ipomoea*. Este programa a largo plazo contribuirá al conocimiento de la composición química y la actividad biológica de la Familia Convolvulaceae y al mismo tiempo permitirá el desarrollo de nuevos agentes de interés terapéutico y agroquímico (Pereda-Miranda, 1994). La planta *Ipomoea tricolor* Cav. (*I. violaceae*) se utiliza ampliamente como un cultivo de cobertura en los meses de agosto a octubre, especialmente durante el periodo del barbecho de los campos de caña de azúcar en el estado de Morelos. El potencial alelopático de esta especie se demostró previamente midiendo la actividad inhibidora de lixiviados acuosos y extractos orgánicos sobre la germinación de semillas y el crecimiento radicular de *Amaranthus leucarpus* Watts. y *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. El fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico activo permitió el aislamiento del principio inhibidor del crecimiento vegetal que resultó ser una mezcla de resinas glicosídicas.

Sin embargo, hasta el momento no se había realizado ningún estudio analítico de investigación química con el propósito general de estandarizar las condiciones cromatográficas instrumentales que permitieran la completa separación a nivel preparativo de los constituyentes de la glicoresina (jalapina) de *Ipomoea tricolor*. Por lo tanto, esta tesis se enfocará al desarrollo de un método de análisis utilizando procedimientos comunes de separación como son la cromatografía en columna abierta, la cromatografía en columna flash, la cromatografía en capa fina a nivel preparativo y la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). Esta última técnica cromatográfica permitirá realizar un conjunto de ensayos para optimizar y así completar el desarrollo de una metodología adecuada para la resolución de la muestra problema. Estos últimos ensayos permitirán monitorear e interpretar mediante un análisis numérico detallado la calidad de la separación del crudo total de resinas glicosídicas; utilizando para ello el modelo cromatográfico teórico que se fundamenta en los parámetros de selectividad (α), resolución (R_s), eficiencia (HEPT) y capacidad (k'). A partir de estos últimos parámetros y de algunos otros adicionales como el Rango (R_k), el costo de operación, el tiempo de separación, el consumo de disolventes y el grado de sensibilidad, se propondrá una metodología adecuada para que su empleo en forma rutinaria sea redituable. El correcto desarrollo de una metodología involucra enfocar ampliamente el problema y considerar factores como las propiedades físicas y químicas de la muestra problema, el modo de separación, el soporte cromatográfico así como la fase

Planteamiento del Problema

estacionaria, entre otros. Esta selección deberá considerar las siguientes propiedades de la resina de *Ipomoea tricolor*:

1.-las resinas son un producto sólido amorfo de estructura química compleja constituida por una mezcla de glicolípidos (oligosacáridos de alto peso molecular aprox. 1000 g/mol) (Pereda-Miranda et al., 1993).

2.-estas resinas son solubles en MeOH, MeCN y otros disolventes orgánicos (i.e., alcoholes), parcialmente solubles en CHCl₃, e insolubles en agua y en otros disolventes orgánicos poco polares, como el hexano (Tyler et al., 1988; Pereda-Miranda et al., 1993).

3.-las condiciones de elución y preparación de la muestra en cromatografía de líquidos se seleccionarán de manera tal que los grupos funcionales potencialmente ionizables o hidrolizables presentes en la glicorresina no sufran ninguna alteración (Quattrochi et al., 1990).

4.-la glicorresina en estudio se presenta como parte de una matriz rica en colorido que requiere de un pretratamiento capaz de eliminar su pigmentación café oscuro, así como su consistencia pegajosa (Pereda-Miranda et al., 1993).

5.-en esta mezcla problema existe al menos un compuesto en una alta proporción llamado tricolorina A, que puede ser aislado en cantidad suficiente mediante una metodología fundamentada en recristalizaciones sucesivas de MeOH, y cromatografía de partición centrífuga (Pereda-Miranda et al., 1993).

6.-el máximo de absorción en el U.V. registrado para la mezcla en estudio correspondió a 217 nm y se asoció con la presencia de grupos carbonilos de ésteres. Estos grupos aparentemente son los únicos cromóforos presentes y no existe otro tipo de grupo funcional que permita el empleo de otro sistema de detección aparte del U.V. e I.R., por ejemplo, grupos fluorescentes (fluoróforos).

7.-el conjunto de glicorresinas estructuralmente se diferencian en número y tipo de monosacáridos, secuencia y posición de glicosidación, número posición y tipo de sustituyentes, tipo (s) de ácido (s) glicosídico (s) presente (s), posición de unión de la aglicona lipídica (Wagner, 1973; Pereda-Miranda et al., 1993).

8.-las glicorresinas de las Convolvuláceas sufren procesos de degradación química, como la hidrólisis en medio básico para proporcionar mezclas de ácidos volátiles y ácidos glicosídicos. Estos últimos son susceptibles de sufrir hidrólisis ácida para proporcionar mezclas de monosacáridos y liberar a la aglicona correspondiente. La hidrólisis ácida de la glicorresina de *I. tricolor*, liberó glucosa, fucosa y ramosa como los carbohidratos presentes en los oligosacáridos y, la aglicona caracterizada correspondió exclusivamente al ácido jalapínico (Anaya et al., 1990; Pereda-Miranda et al., 1993).

Planteamiento del Problema

9.-se han descrito procesos de transesterificación para estas glicorresinas (Noda et al., 1987).

10.-el conjunto de las características anteriores hacen de las resinas glicosídicas de las Convolvuláceas sujetos atractivos para la separación y el aislamiento de sus constituyentes individuales. En este sentido, representan un buen reto, puesto que poseen un gran número de variaciones estructurales y diferentes tipos de enlaces de acuerdo a su naturaleza oligosacárida (Waters Chromatography Handbook, 1993-1994; Chaplin y Kennedy, 1986).

Considerando los puntos citados con anterioridad se requiere de una alta pureza (mayor al 96 %) que permita la aplicación de técnicas de RMN y EM para efectuar satisfactoriamente la elucidación estructural y, posteriormente determinar una actividad específica para cada uno de los compuestos. En este sentido, la cromatografía de líquidos de alta eficiencia a nivel analítico simplificará el análisis cualitativo y cuantitativo; mientras, que la cromatografía en columna flash combinada con la CCF a nivel preparativo y la HPLC a nivel preparativo proveerán cantidades suficientes de material puro. Por lo tanto, la resolución del problema requiere de la aplicación de análisis cualitativos y cuantitativos que permitan determinar el número de componentes individuales, la identidad y la proporción de cada uno de ellos en el crudo resinoso total. Por todo lo anterior, el empleo de la técnica de HPLC a nivel analítico y preparativo resultará imprescindible.

Por otra parte, se sabe de antemano que en la mezcla problema existe al menos un componente mayoritario responsable de la actividad biológica. Por lo tanto, el grado de sensibilidad empleado en estos análisis será menor; así como también el esfuerzo requerido para aislar cantidades suficientes de este compuesto. El monitoreo del grado de pureza empleará una de las herramientas del software del equipo de HPLC Isco Inc., la relación de respuestas cromatográficas a dos longitudes de onda diferentes -Ratio plotting- (Chemresearch chromatographic data management/system controller, instruction manual, Isco Inc., 1988) con la finalidad de dar identidad a cada uno de los picos resultantes. De esta manera, se podrá detectar y eliminar la contaminación de picos por coelución (uno de los mayores problemas que se presentan en cromatografía de líquidos) y, se tomarán las precauciones necesarias para no efectuar separaciones en el volumen muerto del sistema cromatográfico (Snyder, 1988).

Por su parte, las actividades biológicas se determinarán hasta el final y, los resultados proporcionados por estas pruebas quedan fuera de los objetivos de este trabajo.

2.2 Objetivo general

El objetivo fundamental de la presente investigación fue el desarrollo y la estandarización de un método de separación mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia que permita la máxima resolución de la glicorresina (jalapina) de *Ipomoea tricolor* en sus constituyentes individuales para proceder con el aislamiento a nivel preparativo de cada uno de ellos.

2.3 Objetivos específicos

- 1) Desarrollar una metodología cromatográfica adecuada mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia para el aislamiento a nivel preparativo de los componentes individuales de la glicorresina de *Ipomoea tricolor*.
- 2) Lograr el escalamiento a nivel preparativo de las condiciones instrumentales analíticas para proceder con el aislamiento de los constituyentes mayoritarios presentes en la glicorresina.

3.0 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Obtención de la resina

La extracción del material vegetal (1.2 Kg), la preparación de los extractos orgánicos (hexánico, clorofórmico y metanólico) y el fraccionamiento del extracto clorofórmico para la obtención de la glicoresina (jalapina) de *Ipomoea tricolor* se describieron anteriormente (Pereda-Miranda, 1994). La Figura N° 3 muestra la cromatografía en capa fina (10 × 20 cm) de cada uno de los eluatos obtenidos a partir del fraccionamiento del extracto clorofórmico de *Ipomoea tricolor*.

3.2 Cromatografía en columna flash

3.2.1. Condiciones cromatográficas generales (N° 1):

Diámetro de la columna: 50 mm; volumen total del eluyente: 1000 ml; altura de la fase estacionaria: 15 cm (gel de sílice, Baker® 40 µm); volumen de cada eluato: 50 ml.

3.2.2. Condiciones cromatográficas generales (N° 2):

Diámetro de la columna: 10 mm; volumen total del eluyente: 100 ml; altura de la fase estacionaria: 15 cm (gel de sílice, Baker® 40 µm); volumen de cada eluato: 5 ml.

Experimento 1.- Se disolvió en un vaso de precipitado 1.0 g de la fracción 156-162 de la columna original (ver Figura N° 3) en un volumen de aproximadamente 2.4 ml de MeOH (R.A.). Esta solución se adsorbió en la mínima cantidad posible de gel de sílice (10 g) y, posteriormente, se evaporó el exceso de disolvente mediante agitación constante en una campana de extracción. La columna se empacó en CHCl₃ (100 %) y se emplearon las condiciones cromatográficas generales N° 1 (Sección 3.2.1). La elución se inició con sistemas binarios constituidos por CHCl₃-MeOH y se finalizó con sistemas ternarios constituidos por CHCl₃-MeOH-H₂O. A continuación se resume la correspondencia entre cada una de las fracciones eluidas, el sistema de elución empleado y las fracciones reunidas de acuerdo a su homogeneidad cromatográfica en capa fina (semejanza en R_f).

Parte Experimental

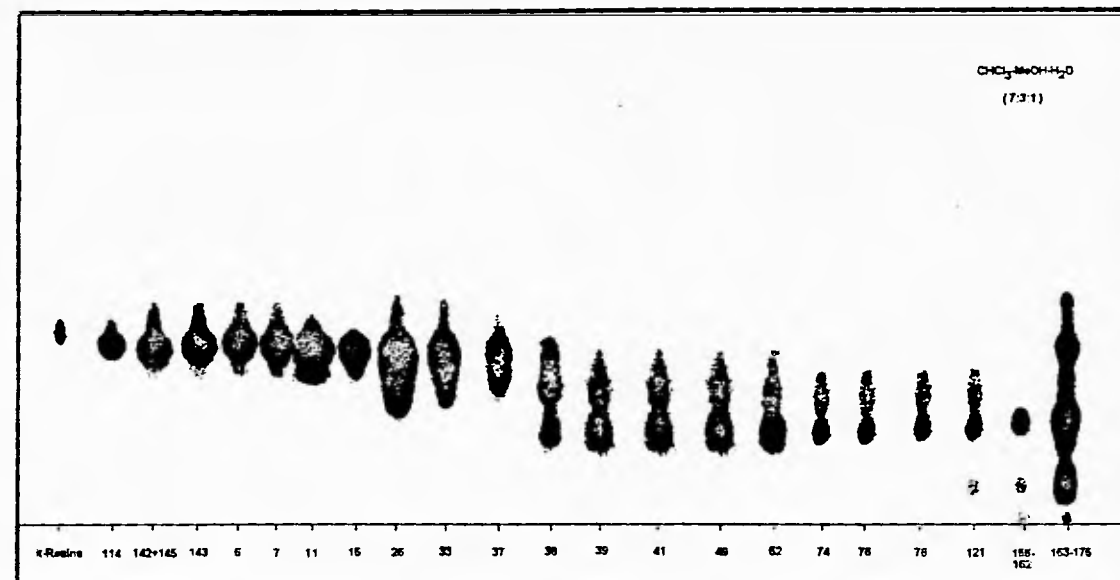


Figura 3.0 Cromatografía en capa fina de cada una de las fracciones eluidas de la columna original. Condiciones analíticas: gel de sílice 60 F₂₅₄ (10 × 20 cm, 0.2 mm de espesor, E. Merck); sistema de elución, CHCl₃-MeOH-H₂O (7:3:1).

Parte Experimental

Sistema de elución	Fracciones eluidas	Fracciones reunidas	Clave asignada
CHCl ₃ -MeOH (96.2:3.8)	1 - 10	1 - 25	I
CHCl ₃ -MeOH (94:6)	11 - 21	26	II
CHCl ₃ -MeOH (81.2:18.8)	22 - 33	27 - 33	III
CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (7:3:1)	34 - 54	34 - 53	IV
		54	V

La fracción III (554 mg) se recromatografió en una segunda columna, se utilizaron las mismas condiciones cromatográficas de la columna anterior. A continuación se resume la correspondencia entre cada una de las fracciones eluidas, el sistema de elución empleado y las fracciones reunidas de acuerdo a su semejanza y homogeneidad cromatográfica en capa fina (ver Figura N° 4).

Sistema de elución	Fracciones eluidas	Fracciones reunidas	Clave asignada
CHCl ₃ -MeOH (95:5)	1 - 10	1 - 35	VI
CHCl ₃ -MeOH (9:1)	11 - 21	36 - 37	VII
CHCl ₃ -MeOH (85:15)	22 - 33	38	VIII
CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (7:3:1)	34 - 45	39 - 40	IX
CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (6:4:1)	46 - 71	41 - 44	X
		45 - 47	XI
		48 - 61	XII ^a
		62 - 71	XIII ^a

^a Muestras analizadas mediante RMN

La Figura N° 4 muestra la cromatografía en capa fina (10 × 10 cm) de cada una de las fracciones eluidas como resultado de la repurificación de la fracción III.

Parte Experimental

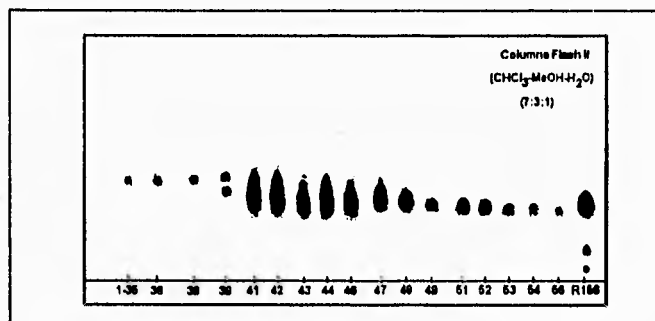


Figura 4.0. Cromatografía en capa fina de la resolución en columna de cada una de las fracciones obtenidas de la fracción III. Condiciones analíticas: gel de sílice 60 F₂₅₄ (10 × 10 cm, 0.2 mm de espesor, E. Merck); sistema de elución, CHCl₃-MeOH-H₂O (7:3:1).

Experimento 2.-Se disolvieron 2.13 g de la fracción 156-162 de la columna original en un volumen de 150 ml de MeOH (R.A.) (ver Figura N° 3). Esta solución se adsorbió en 21 g de gel de sílice y, posteriormente se utilizó el mismo tratamiento descrito anteriormente en el experimento N° 1 de esta misma Sección. En este caso, la elución de la columna se inició con un sistema ternario constituido por CHCl₃-MeOH-H₂O (6:4:1) y se colectaron un total de 23 fracciones. A continuación se resume la correspondencia entre cada una de las fracciones eluidas, el sistema de elución empleado y las fracciones reunidas de acuerdo a su semejanza en R_f (homogeneidad cromatográfica en capa fina).

Sistema de elución	Fracciones eluidas	Fracciones reunidas	Clave asignada
CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (7:3:1)	1-23	1 - 4	XIV
		5 - 8	XV
		9 - 10	XVI
		11 - 14	XVII
		15 - 23	XVIII

La fracción XV (1.0 g) se recromatografió empleando las condiciones cromatográficas generales N° 2 (ver Sección 3.2.2), se colectaron un total de 52 fracciones.

Parte Experimental

A continuación se resume la correspondencia entre cada una de las fracciones eluidas, el sistema de elución empleado y las fracciones reunidas de acuerdo a su semejanza en R_f (homogeneidad cromatográfica en capa fina).

Sistema de elución	Fracciones eluidas	Fracciones reunidas	Clave asignada
CHCl ₃ -MeOH (95:5)	1 - 13	1 - 21	XIX
CHCl ₃ -MeOH (85:15)	14 - 21	22 - 23	XX
CHCl ₃ -MeOH (7:3)	22 - 29	24 - 25	XXI
CHCl ₃ -MeOH (3:2)	30 - 38	26	XXII
CHCl ₃ -MeOH (3:2)	39 - 47	27	XXIII ^b
MeOH	48 - 52	28 - 29	XXIV ^b
		30	XXV ^b
		31 - 38	XXVI
		39 - 52	XXVII

^b Muestras sometidas a purificaciones en HPLC a nivel semipreparativo

La fracción XXVI (89.2 mg) se recromatografió utilizando las mismas condiciones descritas en el párrafo anterior. Se colectaron un total de 44 fracciones (ver Figura N° 5). A continuación se resume la correspondencia entre cada una de las fracciones eluidas, el sistema de elución empleado y las fracciones reunidas de acuerdo a su semejanza en R_f (homogeneidad cromatográfica en capa fina).

Sistema de elución	Fracciones eluidas	Fracciones reunidas	Clave asignada
CHCl ₃ -MeOH (4:1)	1 - 16	1 - 4	XXVIII ^c
CHCl ₃ -MeOH (7:3)	17 - 23	5	XXIX ^a
CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (7:3:0.6)	24 - 36	6 - 15	XXX ^c
CHCl ₃ -MeOH-H ₂ O (6:4:0.5)	37 - 40	16 - 44	XXXI
MeOH	41 - 44		

^a Muestra analizada mediante RMN

^c Muestras sometidas a repurificación en CCF a nivel preparativo

La Figura N° 5 muestra la cromatografía en capa fina (10 × 10 cm) de cada una de las fracciones eluidas como resultado de la repurificación de la fracción XXVI.

Parte Experimental

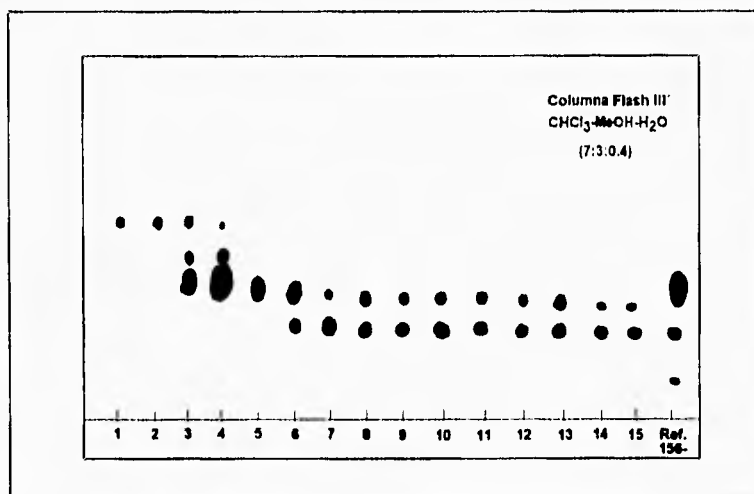


Figura 5.0 Cromatografía en capa fina de cada una de las fracciones obtenidas durante la resolución en columna de la fracción XXVI. Condiciones analíticas: gel de sílice 60 F₂₅₄ (10 × 10 cm, 0.2 mm de espesor, E. Merck); sistema de elución, CHCl₃-MeOH-H₂O (7:3:0.4).

Experimento 3.-Se disolvió 1.0 g de sólido precipitado a partir de las fracciones 38-40 en un volumen de 2.4 ml de MeOH (R.A.) de la columna original (ver Sección 3.1) y, se recromatografió utilizando las condiciones cromatográficas generales N° 1 (ver Sección 3.2.1). En este caso, la elución se inició con el sistema binario constituido por CHCl₃-MeOH (4:1) y se obtuvo un total de 39 fracciones. A continuación, se resume la correspondencia entre cada una de las fracciones eluidas, el sistema de elución empleado y las fracciones reunidas de acuerdo a su semejanza en R_f (homogeneidad cromatográfica en capa fina), (Figura N° 6).

Parte Experimental

Sistema de elución	Fracciones eluidas	Fracciones reunidas	Clave asignada
CHCl ₃ -MeOH (4:1)	1 - 39	1 - 7	XXXII ^a
		8	XXXIII
		9	XXXIV
		10 - 12	XXXV
		13 - 14	XXXVI
		15 - 18	XXXVII
		19 - 25	XXXVIII
		26 - 30	XXXIX
		31	XL ^a
		32 - 39	XLI ^a

^a Muestras analizadas mediante RMN

La Figura N° 6 muestra la cromatografía en capa fina (10 × 10 cm) de cada una de las fracciones eluidas como resultado de la resolución de la fracción 38-40.

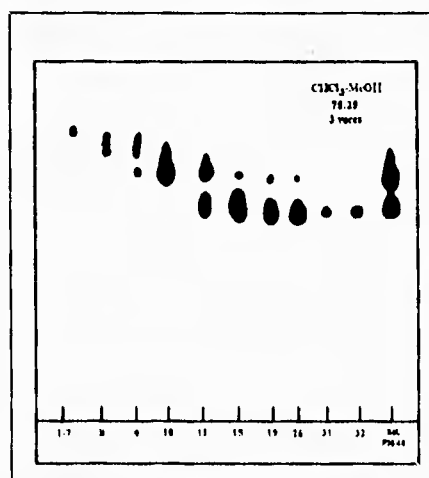


Figura 6.0 Cromatografía en capa fina de cada una de las fracciones obtenidas durante la resolución en columna de la fracción 38-40. Condiciones analíticas: gel de sílice 60 F₂₅₄ (10 × 15 cm, 0.2 mm de espesor, E. Merck); sistema de elución CHCl₃-MeOH (75:25) eluida en tres ocasiones.

3.3 Obtención de los ácidos glicosídicos

3.3.1 Hidrólisis en medio alcalino

La fracción 156-162 y la fracción reunida 142-145 de la columna original (ver Sección 3.1, Figura N° 3), se sometieron por separado a una reacción de saponificación con el propósito de obtener los ácidos glicosídicos correspondientes.

Técnica.- Aproximadamente 200 mg de cada fracción se pusieron a reaccionar en un matraz bola de 50 ml con 20 ml de KOH al 10 % en condiciones de reflujo y, con agitación constante durante 2 hrs. Una vez transcurrido este tiempo, se ajustó el pH de la mezcla de reacción con HCl 4N (pH 4) y se extrajo con Et₂O (2 × 10 ml). La capa orgánica se lavó con H₂O, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó bajo presión reducida. La fase acuosa se extrajo con n-BuOH (2 × 10 ml) y, la capa orgánica se evaporó al vacío para proporcionar 180 mg de un polvo cristalino incoloro. Este residuo se analizó directamente mediante CCF (ver Figura N° 7).

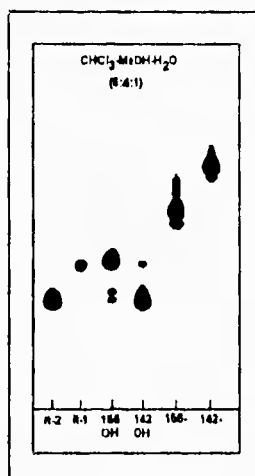


Figura 7.0. Cromatografía en capa fina de la reacción de saponificación de las fracciones 156-162 y 142-145 de la columna original (ver Sección 3.1, Figura N° 3). Condiciones analíticas: gel de sílice, 60 F₂₅₄ (5 × 10 cm, 0.2 mm de espesor, E. Merck); sistema de elución CHCl₃-MeOH-H₂O (6:4:1). De izquierda a derecha los estándares de ácidos glicosídicos puros it-2 e it-1 continuando con cada una de las fracciones que fueron sometidas a la reacción de saponificación 156-OH y 142-OH y para finalizar las muestras de materia prima 156-162 y 142-145, respectivamente.

3.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Condiciones instrumentales generales.

El cromatógrafo de líquidos utilizado consta de un sistema de entrega de disolventes binario de bombeo recíproco de alta presión ISCO (modelo 2350), una válvula de inyección (Valco Co. Inc. C6W) conectada a una línea de inyección (juego de bucles -loops- de capacidad variable (volumen de inyección: 10-500 μ l), un detector ISCO V⁴ de UV-visible acoplado en serie a un detector de índice de refracción (I.R., Erma Erc-7522). Ambos detectores se conectaron en paralelo a un graficador de plumilla de doble canal (Servogor 120 NGI), así como también a un sistema controlador y de análisis de datos IBM-PC (ChemResearch Chromatographic Software, version 2.4).

Disolventes: Metanol, acetonitrilo, hexano y cloroformo grado HPLC (Mallinckrodt); agua ultrapura obtenida a través de un sistema Milli-Q Plus (Millipore). Todos los disolventes se filtraron a través de una membrana Millipore (0.22 μ m, fluoruro de polivinilideno) y se desgasificaron mediante exposición a ondas ultrasónicas durante 20 min en un equipo Branson 8200.

Cada disolvente posee un factor de compensación en la compresibilidad que ajusta de manera adecuada la velocidad de flujo total del sistema cromatográfico (Tabla N° 2).

La Tabla N° 2 muestra algunos factores de compensación en la compresibilidad que fueron utilizados durante los análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC pump instruction manual, Isco Inc., 1988).

Disolvente	Factor
Acetonitrilo	6
Cloroformo	8
Hexano	9
Metanol	7
Agua y soluciones salinas acuosas	1
Acetonitrilo-Agua (1:1)	1
Metanol-Agua (1:1)	1

Tabla 2.0 Factores de compensación en la compresibilidad usados en los análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

Muestras: La mayoría de las soluciones se prepararon a una concentración aproximada de 20 µg/µl empleando como disolvente la misma fase móvil y, posteriormente se filtraron sobre una membrana Millipore (0.45 µm, fluoruro de polivinilideno), con la ayuda de una unidad de filtración de acero inoxidable de diámetro 13 mm.

3.4.1 Condiciones Instrumentales Generales a Nivel Analítico (Análisis preliminares N° 1)

Columna: 4.6 × 250 mm, fase reversa enlazada-C₁₈ (5 µm); velocidad de flujo total: 0.5 ml/min; fase móvil: CH₃CN-H₂O (4:1); detectores: UV-visible/I.R.; longitud de onda: 216 nm; lámpara: deuterio; sensibilidad: 0.05 A.U.F.S.; tiempo de deflexión del 10-90 % de la escala total: 0.8 seg.; factores que optimizan la separación de los picos, duración de la anchura máxima: 1 min, grado de deflexión respecto al tipo de pendiente: alta; velocidad del papel: 5 mm/min; polaridad: (+); rango: 8 × 10⁻⁵ RIU/F.S.; celda de flujo, longitud: 5 mm, volumen iluminado: 7.6 µl; mezclado de la fase móvil: automático; volumen de la línea de inyección: 10 µl; temp.: 25 °C; concentración: 17 µg/µl.

3.4.2 Condiciones Instrumentales Generales a Nivel Analítico (Análisis preliminares N° 2)

Columna: 3.9 × 300 mm, fase normal gel de sílice (10 µm); velocidad de flujo total: 0.5 ml/min; fase móvil: CH₃OH (100 %); detectores: UV-visible/I.R.; longitud de onda: 216 nm; lámpara: deuterio; sensibilidad: 0.1 A.U.F.S.; tiempo de deflexión del 10-90 % de la escala total: 0.8 seg.; factores que optimizan la separación de los picos, duración de la anchura máxima: 1 min, grado de deflexión respecto al tipo de pendiente: alta; velocidad del papel: 5 mm/min; polaridad: (+); rango: 32 × 10⁻⁵ RIU/F.S.; celda de flujo, longitud: 5 mm, volumen iluminado: 7.6 µl; mezclado de la fase móvil: automático; volumen de la línea de inyección: 10 µl; temp.: 25 °C; concentración: 17 µg/µl.

3.4.3 Condiciones Instrumentales Generales a Nivel Analítico (Análisis preliminares N° 3)

Columna: 3.9 × 150 mm, fase reversa enlazada-CN (10 µm); velocidad de flujo total: 0.5 ml/min; fase móvil: CH₃CN-H₂O; detectores: UV-visible/I.R.; longitud de onda: 216 nm; lámpara: deuterio; sensibilidad: 0.1 A.U.F.S.; tiempo de deflexión del 10-90 % de la escala total: 0.8 seg.; factores que optimizan la separación de los picos, duración de la anchura máxima: 1 min, grado de deflexión respecto al tipo de pendiente: alta; velocidad del papel: 5 mm/min; polaridad: (+); rango: 32 × 10⁻⁵ RIU/F.S.; celda de flujo, longitud: 5 mm, volumen iluminado: 7.6 µl; mezclado de la fase móvil: automático; volumen de la línea de inyección: 10 µl; temp.: 25 °C; concentración: 18 µg/µl.

3.4.4 Condiciones Instrumentales Generales a Nivel Analítico (Análisis preliminares N° 4)

Columna: 3.9×150 mm, fase normal enlazada-NH₂ (10 μ m); velocidad de flujo total: 0.5 ml/min; fase móvil: CH₃OH-H₂O (9:1); detectores: UV-visible/I.R.; longitud de onda: 216 nm; lámpara: deuterio; sensibilidad: 0.1 A.U.F.S.; tiempo de deflexión del 10-90 % de la escala total: 0.8 seg.; factores que optimizan la separación de los picos, duración de la anchura máxima: 1 min, grado de deflexión respecto al tipo de pendiente: alta; velocidad del papel: 5 mm/min; polaridad: (+); rango: 8×10^{-5} RIU/F.S.; celda de flujo, longitud: 5 mm, volumen iluminado: 7.6 μ l; mezclado de la fase móvil: automático; volumen de la línea de inyección: 10 μ l; temp.: 25 °C; concentración: 18 μ g/ μ l.

Muestra problema: Las fracciones 143A, 143B, y 143C fueron obtenidas mediante ciclos consecutivos de recrystalización en MeOH de una parte de la fracción 143 (ver Pereda-Miranda, 1994).

Experimento 1.-Se realizó el análisis del crudo total de las resinas glicosídicas y de las siguientes fracciones: XXIV, XXV, XXIII, X, XXXVII, fracción 143 A, fracción 143 B, fracción 143 C, fracción 143, fracción 142-145, XXXVIII y XX, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel analítico N° 1 (ver Sección 3.4.1) y sólo se registraron los cromatogramas generados mediante la detección con luz UV. La Figura N° 8 ilustra los registros obtenidos para cada uno de estos análisis.

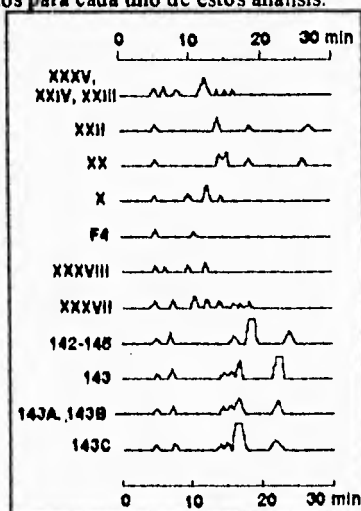


Figura 8.0 Cromatogramas de algunas fracciones obtenidas mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.4.1).

Parte Experimental

Experimento 2.-Se realizó el análisis del crudo total de las resinas glicosídicas y de las siguientes fracciones: **143 A, XXXIX, XL y XLI** utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel analítico N° 1 (ver Sección 3.4.1). Sin embargo, en estos análisis se usó el detector de UV-visible se ajustó a una sensibilidad de 0.1 A.U.F.S., y la composición de la fase móvil correspondió a una mezcla binaria de $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (96:4). Los cromatogramas obtenidos para cada uno de estos análisis se ilustran en la Figura N° 9.

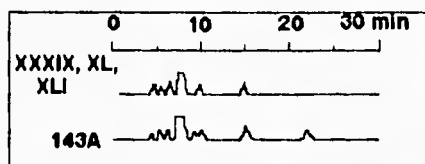


Figura 9.0 Cromatogramas de algunas fracciones obtenidas mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.4.1).

Experimento 3.-Se realizó el análisis del crudo de resinas glicosídicas y de las siguientes fracciones: **143, XXIII, subfracción F₁₋₅ obtenida a partir de la XXIV y, la fracción 142-145**, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel analítico N° 1 (ver Sección 3.4.1), modificando únicamente la composición de la fase móvil que consistió en la mezcla binaria de $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (9:1). Los cromatogramas obtenidos para cada uno de estos análisis se ilustran en la Figura N° 10.

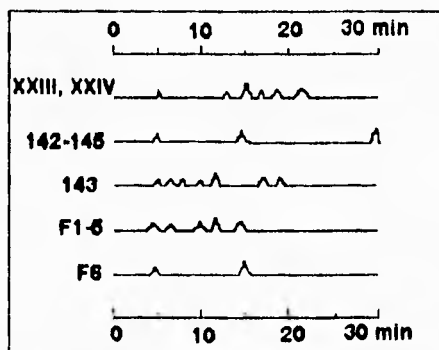


Figura 10.0 Cromatogramas de algunas fracciones obtenidas mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.4.1).

Experimento 4.-Se realizó el análisis de la fracción **XXIII**, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel analítico N° 1 (ver Sección 3.4.1). En este experimento se

Parte Experimental

modificó la composición de la fase móvil utilizando la mezcla binaria de $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (9:1), así como la sensibilidad de los detectores, el de UV-visible se ajustó a 0.1 A.U.F.S., mientras que el de I.R. a 64×10^{-5} RIU/F.S. El cromatograma obtenido se ilustra en la Figura N° 11.

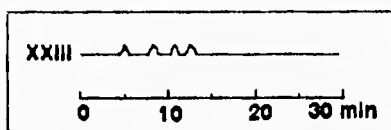


Figura 11.0 Cromatograma de la fracción **XXIII** obtenida mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.4.1).

Experimento 5.-Se realizó el análisis de las siguientes fracciones: **XXIV**, fracción **143 A**, fracción **143**, y las subfracciones **1A**, **2A**, **3A** obtenidas a partir de **143 A**, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel analítico N° 1 (ver Sección 3.4.1). En este experimento, el detector de UV-visible se ajustó a una sensibilidad de 0.1 A.U.F.S. y, se utilizó CH_3OH (100 %) como la fase móvil. Los cromatogramas obtenidos para cada uno de estos análisis se ilustran en la Figura N° 12.

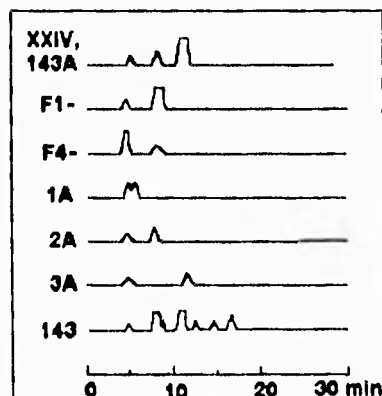


Figura 12.0 Cromatogramas de algunas fracciones obtenidas mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.4.1).

Experimento 6.-Se realizó el análisis de las siguientes fracciones: **X**, **XXV** y **XXIII**, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel analítico N° 1 (ver Sección 3.4.1). En este experimento el detector UV-visible se ajustó a una sensibilidad de 0.1 A.U.F.S., y se

Parte Experimental

utilizó CH_3CN (100 %) como la fase móvil. Los cromatogramas obtenidos para cada uno de estos análisis se ilustran en la Figura N° 13.

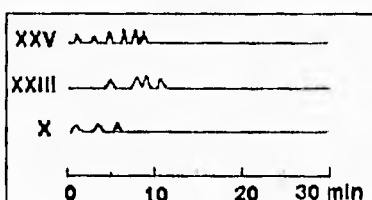


Figura 13.0 Cromatogramas de las fracciones X, XXIII y XXV obtenidas mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.4.1).

Experimento 7.-Se realizó el análisis de la fracción XXIV, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel analítico N° 1 (ver Sección 3.4.1). Se usó el detector UV-visible, la velocidad del papel fue de 2 mm/min, la concentración de la muestra fue de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y la composición de la fase móvil, constituida por $\text{CH}_3\text{CN}-\text{CH}_3\text{OH}$, correspondió a una relación 1:1 de los disolventes en el primer análisis, y de 1:4 en el segundo. Cada uno de los cromatogramas obtenidos se ilustran en la Figura N° 14.

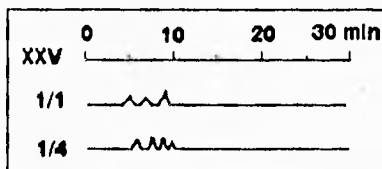


Figura 14.0 Cromatogramas de la fracción XXV obtenidos mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.4.1).

Experimento 8.-Se realizó el análisis de la fracción XXV, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel analítico N° 1 (ver Sección 3.4.1) y, se modificaron las siguientes condiciones de análisis: el detector de UV-visible se ajustó a una sensibilidad de 0.02 A.U.F.S., la concentración de la muestra fue de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y la composición de la fase móvil constituida por $\text{CH}_3\text{CN}-\text{CH}_3\text{OH}$ correspondió a una relación 1:1. El cromatograma obtenido se ilustra en la Figura N° 15.

Parte Experimental

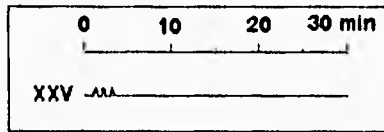


Figura 15.0 Cromatograma de la fracción XXV obtenido mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.4.1).

Experimento 9.-Se realizó el análisis de la fracción XXIII, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel analítico N° 1 (ver Sección 3.4.1). Estos análisis utilizaron por una parte una fase móvil constituida por CH₃CN-H₂O en las siguientes proporciones 1:1, 6:4, 7:3, 75:25 y 83:17. De manera adicional, se realizó un análisis para la fracción X en el sistema isocrático 75:25. Cada uno de los cromatogramas obtenidos se ilustran en la Figura N° 16.

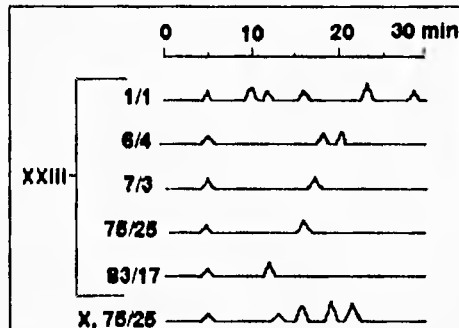


Figura 16.0 Cromatogramas de las fracciones XXIII y X obtenidos mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.4.1).

Experimento 10.-Se realizó el análisis de la fracción XXXVII, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel analítico N° 1 (ver Sección 3.4.1) y un gradiente lineal de la fase móvil constituida por CH₃CN-H₂O (iniciando con una proporción de 80 % MeCN hasta alcanzar un 100 % de este disolvente). Los cromatogramas obtenidos se ilustran en la Figura N° 17.

Parte Experimental

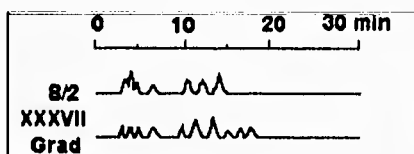


Figura 17.0 Cromatogramas de la fracción XXXVII obtenidos mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.4.1).

Experimento 11.-Se realizó el análisis de la fracción 143, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel analítico N° 1 (ver Sección 3.4.1). Estos análisis utilizaron el detector de UV-visible se ajustó a una sensibilidad de 0.1 A.U.F.S., y la composición de la fase móvil constituida por CH₃OH-H₂O correspondió a un 93 %, 95 %, 96 % y 97 % de MeOH. De manera adicional, se realizó un experimento con la fracción 143A empleando una proporción de 96% MeOH. Cada uno de los cromatogramas obtenidos se ilustran en la Figura N° 18.

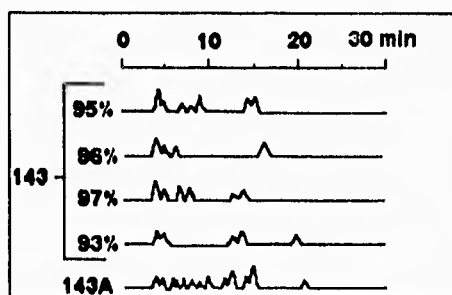


Figura 18.0 Cromatogramas de las fracciones 143 y 143A. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.4.1).

Experimento 12.-Se realizó el análisis de las siguientes fracciones: XXV y XXIV, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel analítico N° 2 (ver Sección 3.4.2). Para el registro de los cromatogramas sólo se utilizó el detector de UV-visible. Los cromatogramas obtenidos para cada uno de estos análisis se ilustran en la Figura N° 19.

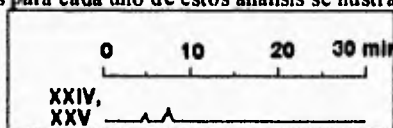


Figura 19.0 Cromatogramas de las fracciones XXIV y XXV obtenidos mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.4.2).

Parte Experimental

Experimento 13.-Se realizó el análisis de la fracción XXV, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel analítico N° 2 (ver Sección 3.4.2). La sensibilidad del detector de UV-visible se ajustó a 0.05 A.U.F.S., y la del I.R. a 64 RIU/F.S. y, se utilizó como fase móvil los siguientes sistemas de elución: Hexano-MeOH (95:5), CHCl₃-CH₃OH (9:1) y CHCl₃-CH₃OH-H₂O (7:3:0.1). Los cromatogramas obtenidos para cada uno de estos análisis se ilustran en la Figura N° 20.

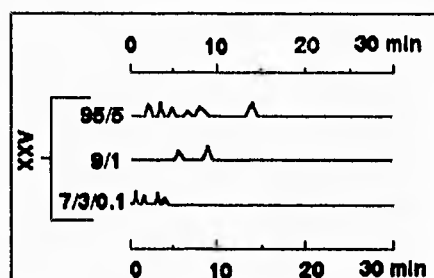


Figura 20.0 Cromatogramas de las fracción XXV obtenidos mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.4.2).

Experimento 14.-Se realizó el análisis de la fracción XXIII y XXIV, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel analítico N° 2 (ver sección 3.4.2). Se utilizó el sistema de eluyentes: CHCl₃-CH₃OH-H₂O (7:3:0.1). El cromatograma obtenido para cada uno de estos análisis se ilustra en la Figura N° 21.

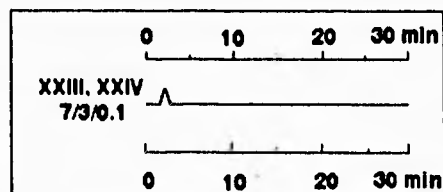


Figura 21.0 Cromatogramas de las fracciones XXIII y XXIV obtenidos mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.4.2).

Experimento 15.-Se realizó el análisis de la fracción XXIII, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel analítico N° 3 (ver sección 3.4.3), y se utilizó el sistema binario constituido por CH₃CN-H₂O como la fase móvil en las siguientes proporciones: 3:7, 1:1, 55:45, 3:2, 7:3, 9:1, 95:5, y 100 % AcN. Cada uno de los cromatogramas obtenidos se ilustran en la Figura N° 22.

Parte Experimental

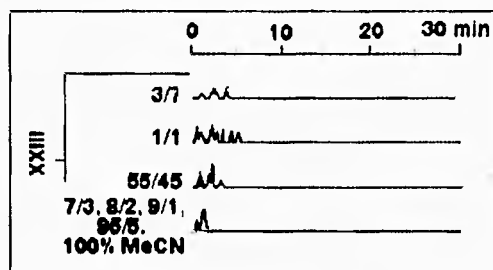


Figura 22.0 Cromatogramas de la fracción XXIII obtenidos mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.4.3).

Experimento 16.-Se realizó el análisis de la fracción XXIII, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel analítico N° 4 (ver sección 3.4.4). En esta ocasión la composición de la fase móvil utilizada fue CH₃OH-H₂O (9:1). Los cromatogramas obtenidos para cada uno de estos experimentos se ilustran en la Figura N° 23.

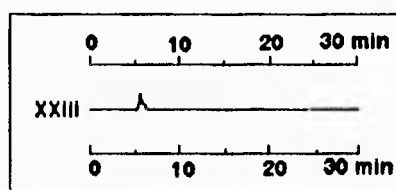


Figura 23.0 Cromatogramas de la fracción XXIII obtenidos mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.4.4).

3.5 Desarrollo del método analítico de separación de compuestos estructuralmente relacionados mediante (HPLC)

Experimento 17.-Una muestra con una masa equivalente a 2.5 g de la mezcla total de resinas obtenida a partir de la fracción 142-145 de la columna original (ver Sección 3.1, Figura N° 3) se sometió a un fraccionamiento mediante cromatografía en columna flash para eliminar su consistencia viscosa, utilizando las siguientes condiciones: Columna de vidrio con un diámetro de 50 mm, empacada con gel de sílice hasta una altura de 10 cm, el volumen colectado de cada eluato fue de 50 ml. El soporte se empacó en una fase móvil constituida por la mezcla binaria CHCl₃-acetona (3:1). La elución se inició con el sistema CHCl₃-acetona (1:1) hasta la fracción número 6, para proseguir con CHCl₃-acetona-MeOH

Parte Experimental

(5:5:1) hasta la fracción número 13 y, por último, se eluyó con MeOH hasta completar 20 eluatos. Las fracciones 8-11 que presentaron el mismo R_f del crudo original se reunieron y concentraron al vacío (-15 pulg. de Hg) hasta su completa sequedad. Posteriormente, se prepararon soluciones a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, las cuales se obtuvieron disolviendo 4.0 mg de la muestra problema en 200 μl de la mezcla de disolventes seleccionada como la fase móvil a ensayar. Las cantidades de cada disolvente fueron medidas con micro-pipetas automáticas **Rainin Edp 2™**, con capacidades de 10, 25, 100, 250 y 1000 μl , seleccionando aquella pipeta que posea un mayor grado de exactitud y precisión para proporcionar el volumen calculado (Edp 2™ Instructions, 1991). Cada una de estas soluciones fueron preparadas empleando como disolvente la composición respectiva de fase móvil para cada experimento y, posteriormente, se filtraron sobre una membrana Millipore (0.45 μm , fluoruro de polivinilideno) con la ayuda de una unidad de filtración de acero inoxidable con un diámetro de 13 mm.

Para entonces el sistema instrumental cromatográfico debía estar completamente estabilizado colocando entre la línea de inyección y la columna la guarda columna o precolumna correspondiente a cada material de empaque para proceder con la inyección de la solución problema mediante el método de carga máxima de la línea de inyección, "Full Loop Loading" (HPLC injector instruction manual, Valco Inc., 1989). Cada uno de los análisis se registró mediante un graficador de plumilla de doble canal y estos registros se almacenaron permanentemente en discos 3^{1/2} pulgadas, mediante el Software del sistema de cómputo acoplado al cromatógrafo. Este procedimiento se repitió de manera sucesiva hasta completar con el barrido de polaridad programado para la fase móvil ensayada.

Se realizaron seis experimentos generales en los cuales se modificó la proporción de la fase móvil; es decir, se efectuó una optimización por fuerza de elución, y en algunos casos optimización por tipo de solventes (Gazdag et al., 1988; Snyder, 1988). En cuatro de ellos se utilizó la mezcla binaria MeCN-H₂O (experimentos N° 17.1-17.4), en un único experimento (N° 17.5) se empleó MeOH-H₂O y, por último, en un experimento adicional (N° 17.6) se empleó la mezcla binaria CHCl₃-MeOH.

Experimento 17.1.-A continuación se resumen los ensayos realizados para la fracción 142-145, se emplearon las condiciones cromatográficas generales analíticas N° 1 (ver Sección 3.4.1) y sólo se utilizó el detector de UV-visible a una sensibilidad de 0.1 A.U.F.S. para el registro de los cromatogramas.

Parte Experimental

Número de Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fase móvil (MeCN- H ₂ O)	100-0	95-5	90-10	85-15	80-20	75-25	70-30	65-35	60-40

Experimento 17.2.-A continuación se resumen los ensayos realizados para la fracción 142-145, se emplearon las condiciones cromatográficas generales analíticas N° 4 (ver Sección 3.4.4) y sólo se utilizó el detector de UV-visible para el registro de los cromatogramas.

Número de Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fase móvil (MeCN- H ₂ O)	100-0	95-5	94-6	93-7	92-8	90-10	88-12	86-14	84-16	82-18

Experimento 17.3.-A continuación se resumen los ensayos realizados para la fracción 142-145, se emplearon las condiciones cromatográficas generales analíticas N° 3 (ver Sección 3.4.3) y sólo se utilizó el detector de UV-visible para el registro de los cromatogramas.

Número de Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fase móvil (MeCN- H ₂ O)	100-0	90-10	80-20	70-30	60-40	50-50	40-60	35-65	33-67	32-68

Experimento 17.4.-A continuación se resumen los ensayos realizados para la fracción 142-145, se emplearon las condiciones cromatográficas generales analíticas N° 1 (ver Sección 3.4.1) y sólo se utilizó el detector de UV-visible para el registro de los cromatogramas.

Número de Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8
Fase móvil (MeOH- H ₂ O)	100-0	98-2	96-4	94-6	92-8	90-10	88-12	86-14

Experimento 17.5.-A continuación se resumen los ensayos realizados para la fracción 142-145, se emplearon las condiciones cromatográficas generales analíticas N° 2 (ver Sección 3.4.2) y sólo se utilizó el detector de I.R. para el registro de los cromatogramas.

Número de Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8
Fase móvil (MeOH-CHCl ₃)	100-0	90-10	80-20	70-30	60-40	50-50	40-60	30-70

3.6 Experimentos sobre la confirmación de la homogeneidad de los picos

Los ensayos agrupados en los experimentos N° 18-21 se realizaron utilizando dos longitudes de onda, 216 y 206 nm para la detección de los constituyentes individuales del crudo resinoso total. En todos los casos se estandarizaron las mismas condiciones instrumentales.

Experimento 18.-Se realizó el análisis del crudo total de las resinas glicosídicas, fracción 142-145, retomando las condiciones instrumentales mencionadas en la sección 3.5: experimento 17.1, ensayo N° 7. El cromatograma obtenido para este análisis se ilustra en la Figura N° 24.

Experimento 19.-Se realizó el análisis del crudo total de las resinas glicosídicas, fracción 142-145, retomando las condiciones instrumentales mencionadas en la sección 3.5: experimento 17.3, ensayo N° 8. El cromatograma obtenido para este análisis se ilustra en la Figura N° 25.

Experimento 20.-Se realizó el análisis del crudo total de las resinas glicosídicas, fracción 142-145, retomando las condiciones instrumentales mencionadas en la sección 3.5: experimento 17.4, ensayo N° 6. El cromatograma obtenido para este análisis se ilustra en la Figura N° 26.

Experimento 21.-Se realizó el análisis del crudo total de las resinas glicosídicas, fracción 142-145, retomando las condiciones instrumentales mencionadas en la sección 3.5: experimento 17.2, ensayo N° 4. El cromatograma obtenido para este análisis se ilustra en la Figura N° 27.

Isco ChemResearch

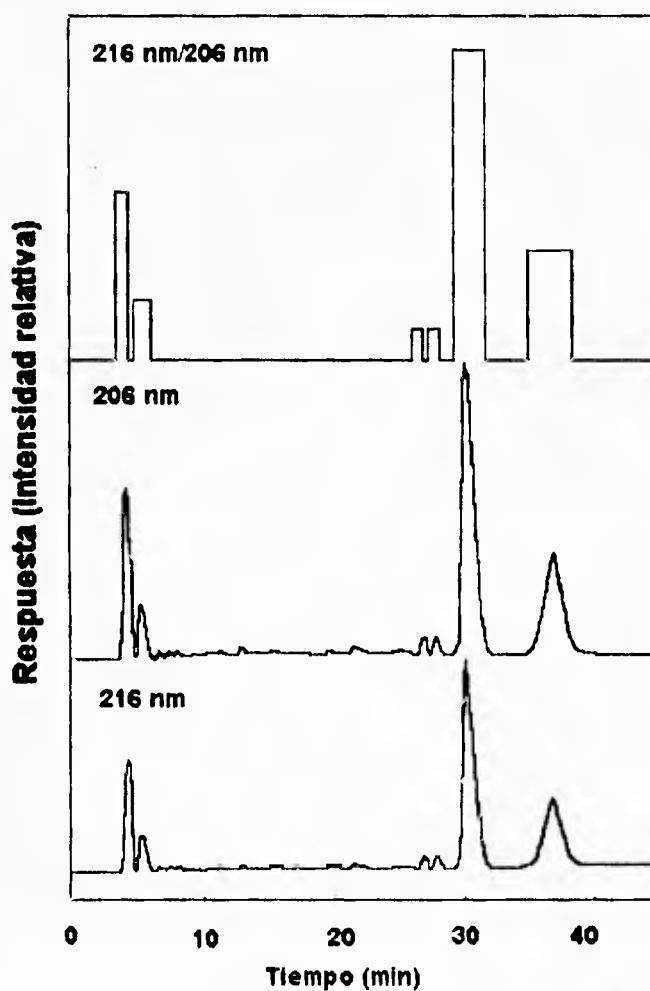


Figura N° 24.0 Relación de las respuestas cromatográficas mediante "Ratio plotting" a dos longitudes de onda (206 nm y 216 nm) para la detección de los constituyentes mayoritarios del crudo resinoso total. Condiciones Instrumentales (ver Sección 3.6, Experimento N° 18).

Isco ChemResearch

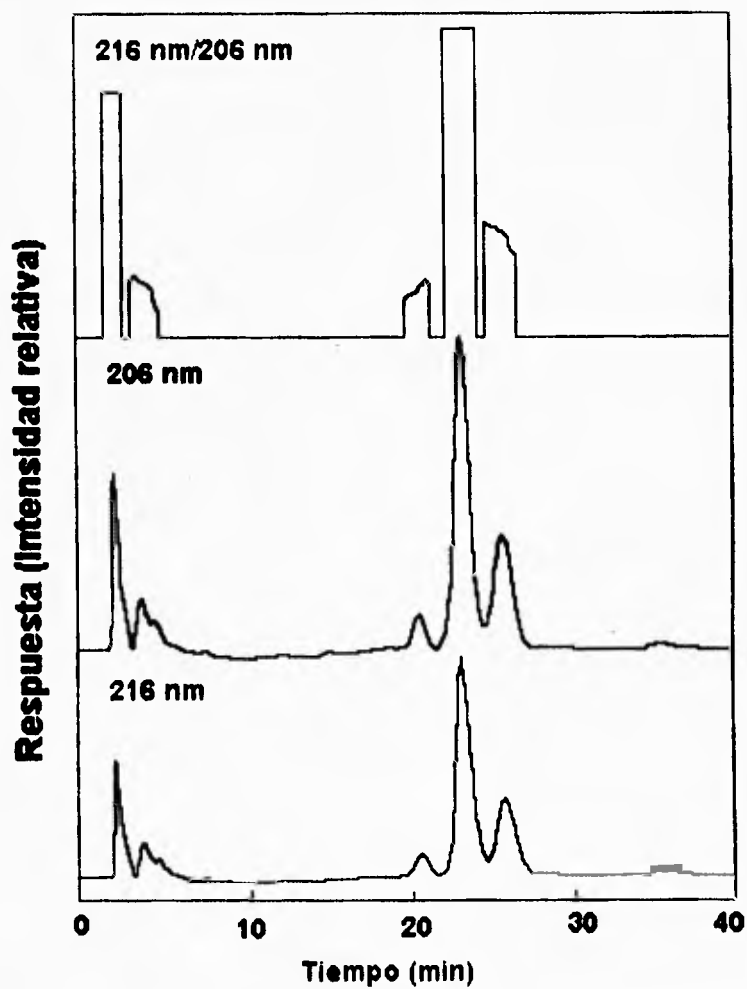


Figura N° 25.0 Relación de las respuestas cromatográficas mediante "Ratio plotting" a dos longitudes de onda (206 nm y 216 nm) para la detección de los constituyentes mayoritarios del crudo resinoso total. Condiciones Instrumentales (ver Sección 3.6, Experimento N° 19).

Isco ChemResearch

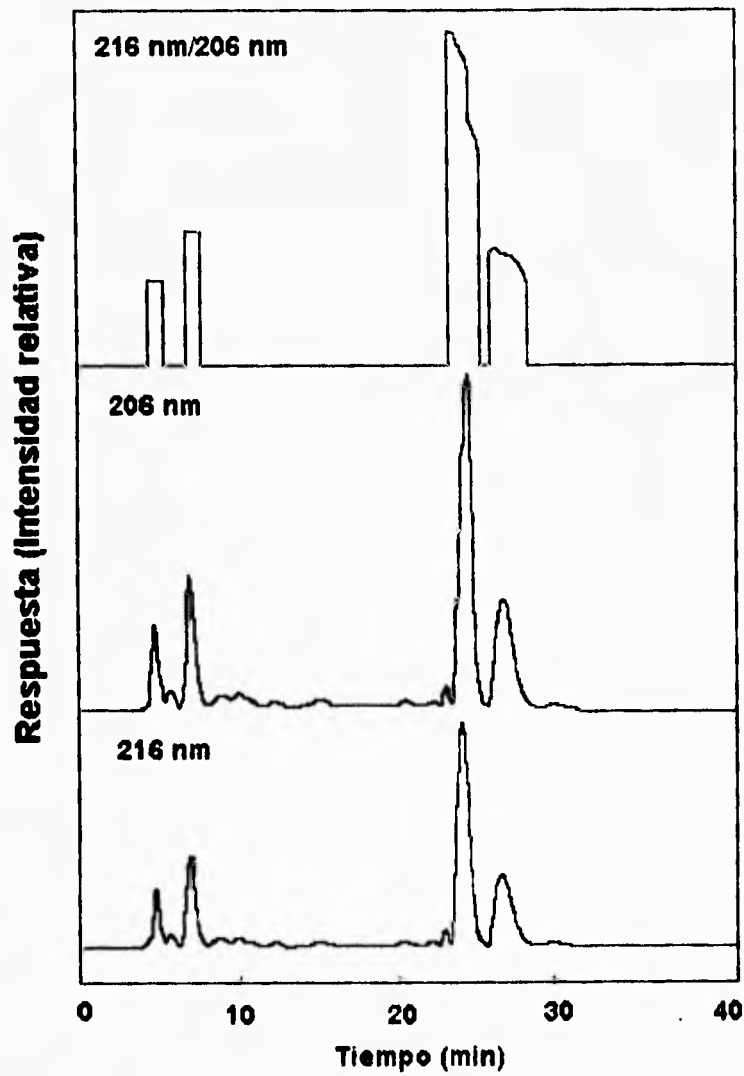


Figura N° 26.0 Relación de las respuestas cromatográficas mediante "Ratio plotting" a dos longitudes de onda (206 nm y 216 nm) para la detección de los constituyentes mayoritarios del crudo resinoso total. Condiciones Instrumentales (ver Sección 3.6, Experimento N° 20).

Isco ChemResearch

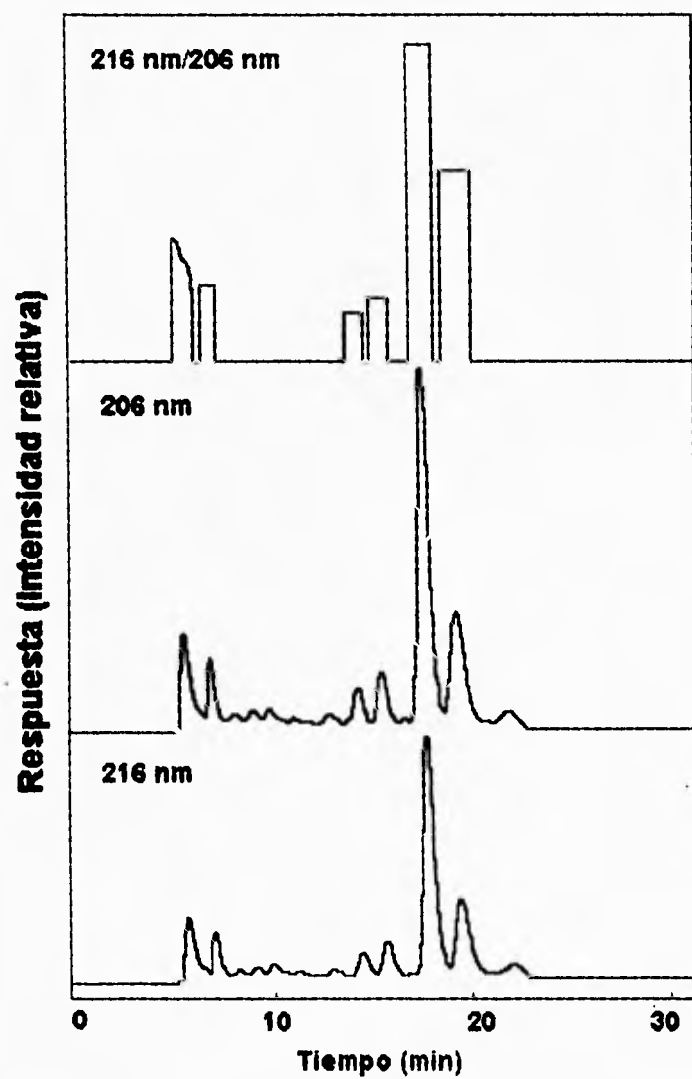


Figura N° 27.0 Relación de las respuestas cromatográficas mediante "Ratio plotting" a dos longitudes de onda (206 nm y 216 nm) para la detección de los constituyentes mayoritarios del crudo resinoso total. Condiciones Instrumentales (ver Sección 3.6, Experimento N° 21).

3.7 Aislamiento y purificación de las tricolorinas A y B

3.7.1 Condiciones cromatográficas semipreparativas

A partir de los valores experimentales de carga máxima soportada y, de las condiciones cromatográficas establecidas en los experimentos N° 1 y 5 (ver Sección 3.4), así como de la aplicación de las ecuaciones generales N° 1 y 2, se efectuaron los cálculos necesarios que permitieron realizar el escalamiento a nivel semipreparativo de las condiciones analíticas que resultaron en la mejor resolución de la mezcla problema.

Ecuación 1

$$\frac{\text{Flujo Escalamiento}}{\text{Flujo Analítico}} = \frac{\text{Volumen Escalamiento}}{\text{Volumen Analítico}} = \frac{(\text{Longitud Escalamiento})(r^2 \text{ Escalamiento})}{(\text{Longitud Analítico})(r^2 \text{ Analítico})}$$

Ecuación 2

$$\frac{\text{Masa Escalamiento}}{\text{Masa Analítica}} = \frac{(\text{Longitud Escalamiento})(r^2 \text{ Escalamiento})}{(\text{Longitud Analítico})(r^2 \text{ Analítico})}$$

Los cálculos efectuados fueron los siguientes:

$$\text{Flujo de Escalamiento} = (0.5 \text{ ml/min}) \frac{(250 \text{ mm})(5.0^2)}{(250 \text{ mm})(2.3^2)} = 2.4 \text{ ml/min}$$

$$\text{Masa de Escalamiento} = (5 \text{ mg}) \frac{(250 \text{ mm})(5.0^2)}{(250 \text{ mm})(2.3^2)} = 23.6 \text{ mg}$$

3.7.1.1 Condiciones instrumentales generales a nivel semipreparativo (N° 1)

Columna: 10 × 250 mm, fase reversa enlazada-C₁₈ (10 μm); velocidad de flujo total: 2.4 ml/min; fase móvil: CH₃OH (100 %); detector: UV-visible; longitud de onda: 216 nm; lámpara: deuterio; sensibilidad: 0.1 A.U.F.S.; tiempo de deflexión del 10-90 % de la escala total: 0.8 seg.; factores que optimizan la separación de los picos, duración de la anchura máxima: 1 min, grado de deflexión respecto al tipo de pendiente: alta; velocidad del papel: 5 mm/min; celda de flujo, longitud: 5 mm, volumen iluminado: 10.0 μl; mezclado de la fase móvil: automático; volumen de la línea de inyección: 100 μl; temp.: 25 °C; concentración: 236 μg/μl.

3.7.1.2 Condiciones instrumentales generales a nivel semipreparativo (N° 2)

Columna: 10 × 250 mm, fase reversa enlazada-C₁₈ (10 μm); velocidad de flujo total: 2.4 ml/min; fase móvil: CH₃CN-H₂O (4:1); detector: UV-visible; longitud de onda: 216 nm; lámpara: deuterio; sensibilidad: 0.1 A.U.F.S.; tiempo de deflexión del 10-90 % de la escala total: 0.8 seg.; factores que optimizan la separación de los picos, duración de la anchura máxima: 1 min, grado de deflexión respecto al tipo de pendiente: alta; velocidad del papel: 5 mm/min; celda de flujo, longitud: 5 mm, volumen iluminado: 10.0 μl; mezclado de la fase móvil: automático; volumen de la línea de inyección: 100 μl; temp.: 25 °C; concentración: 236 μg/μl.

Experimento 22.-Se procesaron 142 mg de la fracción XXIV, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel semipreparativo N° 1 (ver Sección 3.7.1.1). El cromatograma obtenido se ilustra en la Figura N° 28.

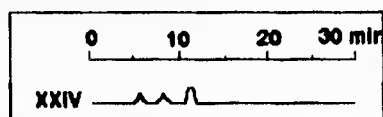


Figura 28.0 Cromatograma de la fracción XXIV obtenido mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.7.1.1).

Experimento 23.-Se procesaron 107 mg de la fracción XXIII y 67 mg de la fracción XXV, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel semipreparativo N° 2 (ver Sección 3.7.1.2). Los cromatogramas obtenidos para cada una de las fracciones se ilustran en la Figura N° 29.

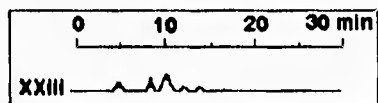


Figura 29.0 Cromatograma de la fracción XXIII obtenido mediante la resolución en columna flash. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.7.1.1).

Experimento 24.-Se repurificaron 7 mg de la subfracción mayoritaria F₆ obtenida en el experimento N° 23, utilizando de la misma manera idénticas condiciones instrumentales. El cromatograma obtenido se ilustra en la Figura N° 30.

Parte Experimental

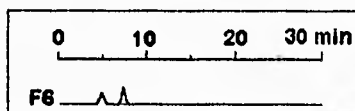


Figura 30.0 Cromatograma de la fracción F6 obtenido mediante el fraccionamiento en columna HPLC. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.7.1.2).

Experimento 25.-Se repurificaron 38 mg de la fracción F4, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel semipreparativo N° 2 (ver Sección 3.7.1.2). El cromatograma obtenido se ilustra en la Figura N° 31.

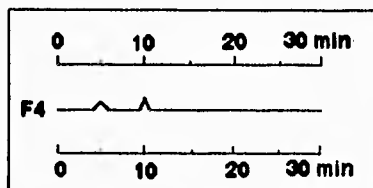


Figura 31.0 Cromatograma de la fracción F4 obtenido mediante el fraccionamiento en columna HPLC. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.7.1.2).

Experimento 26.-Se procesaron de manera repetitiva (169 mg) de la fracción 143 A, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel semipreparativo N° 2 (ver Sección 3.7.1.2). Este procedimiento permitió la obtención de 71 mg de la tricolorina A ($T_r=22.9$ min, 30 %, 100 % pureza), así como de 56 mg de tricolorina B ($T_r=19.8$ min, 59 %, 100 % pureza). El cromatograma obtenido se ilustra en la Figura N° 32.

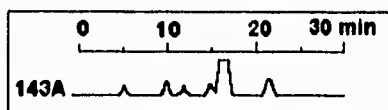


Figura 32.0 Cromatograma de la fracción 143A. Condiciones instrumentales (ver Sección 3.7.1.1).

3.7.2 Condiciones cromatográficas preparativas

A partir de los valores experimentales de carga máxima soportada en las condiciones instrumentales generales seleccionadas en los experimentos N° 18 y N° 21 (ver sección 3.6, ensayos N° 7 y N° 4 respectivamente) y mediante la aplicación de las ecuaciones generales 1 y 2 (ver Sección 3.7.1), se efectuaron los cálculos necesarios que permitieron realizar el

Parte Experimental

escalamiento a nivel preparativo de las condiciones analíticas que resultaron en la mejor resolución de la mezcla problema.

Los cálculos efectuados fueron los siguientes:

1) Para la columna de fase reversa enlazada-C₁₈,

$$\text{Flujo de Escalamiento} = (0.5 \text{ ml/min}) \frac{(250 \text{ mm})(10.6^2)}{(250 \text{ mm})(2.32^2)} = 10.6 \text{ ml/min}$$

$$\text{Masa de Escalamiento} = (5 \text{ mg}) \frac{(250 \text{ mm})(10.6^2)}{(250 \text{ mm})(2.32^2)} = 106 \text{ mg}$$

2) Para la columna de fase polar enlazada NH₂

$$\text{Flujo de Escalamiento} = (0.5 \text{ ml/min}) \frac{(150 \text{ mm})(9.52^2)}{(300 \text{ mm})(1.952^2)} = 5.9 \text{ ml/min}$$

$$\text{Masa de Escalamiento} = (4.2 \text{ mg}) \frac{(150 \text{ mm})(9.52^2)}{(300 \text{ mm})(1.952^2)} = 50 \text{ mg}$$

3.7.2.1 Condiciones instrumentales generales a nivel preparativo (N° 1)

Columna: 21.2 × 250 mm, fase reversa enlazada-C₁₈ (10 μm); velocidad de flujo total: 10.6 ml/min; fase móvil: CH₃CN-H₂O (7:3); detector: UV-visible; longitud de onda: 216 nm; lámpara: deuterio; sensibilidad: 0.1 A.U.F.S.; tiempo de deflexión del 10-90 % de la escala total: 0.8 seg.; factores que optimizan la separación de los picos: duración de la anchura máxima (1 min), grado de deflexión respecto al tipo de pendiente (alta); velocidad del papel: 5 mm/min; celda de flujo, longitud: 5 mm, volumen iluminado: 10.0 μl; mezclado de la fase móvil: automático; volumen de la línea de inyección: 500 μl; temp.: 25 °C; concentración: 212 μg/μl.

3.7.2.2 Condiciones instrumentales generales a nivel preparativo (N° 2)

Columna: 19 × 150 mm, fase moderadamente polar enlazada-NH₂ (10 μm); velocidad de flujo total: 5.9 ml/min; fase móvil: CH₃CN-H₂O (93:7); detector: UV-visible; longitud de onda: 216 nm; lámpara: deuterio; sensibilidad: 0.1 A.U.F.S.; tiempo de deflexión del 10-90 % de la escala total: 0.8 seg.; factores que optimizan la separación de los picos, duración de la anchura máxima (1 min), grado de deflexión respecto al tipo de pendiente (alta); velocidad del papel: 5 mm/min; celda de flujo, longitud: 5 mm, volumen iluminado: 10.0 μl; mezclado de la fase móvil: automático; volumen de la línea de inyección: 500 μl; temp.: 25 °C; concentración: 100 μg/μl.

Parte Experimental

Experimento 29.-Se procesó un total de 174 mg del crudo total de las resinas glicosídicas 142-145 y de las siguientes fracciones 143A, 143B, 143C y 143, utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel preparativo N° 1 (ver Sección 3.7.2.1). Los cromatogramas obtenidos en diversas etapas de la purificación se ilustran en la Figura N° 33 y, a menos de que se indique lo contrario, las condiciones instrumentales utilizadas permanecieron constantes.

Experimento 30.-Se realizó una purificación final para cada uno de los componentes individuales mayoritarios denominados con los nombres triviales de **tricolorina A** (38 mg) y, **tricolorina B** (77 mg), utilizando las condiciones instrumentales generales a nivel preparativo N° 2 (ver Sección 3.7.2.2). Los cromatogramas obtenidos para cada uno de los componentes individuales se ilustran en la Figura N° 34 y, a menos de que se indique lo contrario, las condiciones instrumentales utilizadas permanecieron constantes.

Parte Experimental

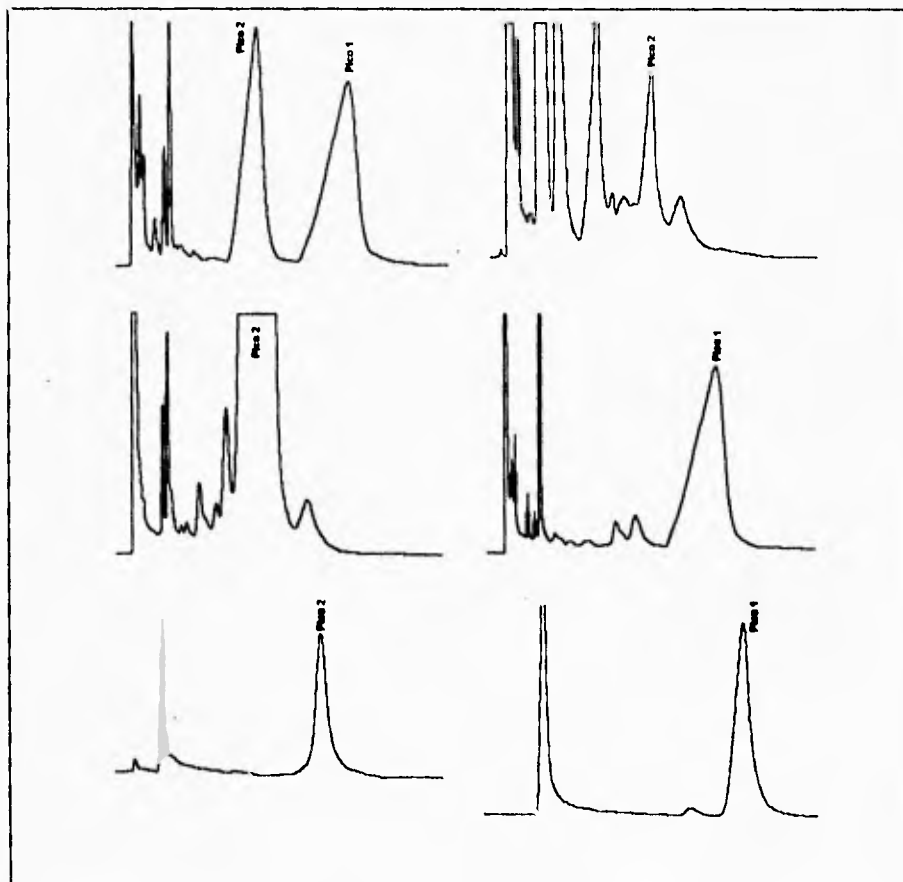


Figura 33.0 Separación de las tricolorinas A y B a partir de la resina de *Ipomoea tricolor* mediante HPLC a nivel preparativo. Condiciones instrumentales: Columna 21.2 × 250 mm, fase reversa enlazada-C₁₈ (10 μm); velocidad de flujo total: 10.6 ml/min; fase móvil: CH₃CN-H₂O (7:3); detector: UV-visible; longitud de onda: 216 nm; lámpara: deuterio; sensibilidad: 0.1 A.U.F.S.; tiempo de deflexión del 10-90 % de la escala total: 0.8 seg.; factores que optimizan la separación de los picos, duración de la anchura máxima: 1 min, grado de deflexión respecto al tipo de pendiente: alta; velocidad del papel: 5 mm/min; celda de flujo, longitud: 5 mm, volumen iluminado: 10.0 μl; mezclado de la fase móvil: automático; volumen de la línea de inyección: 500 μl; temp.: 25 °C; concentración: 212 mg/ml. Pico 1, tricolorina A (T_r 36.9 min); Pico 2, tricolorina B (T_r 30.2 min).

Parte Experimental

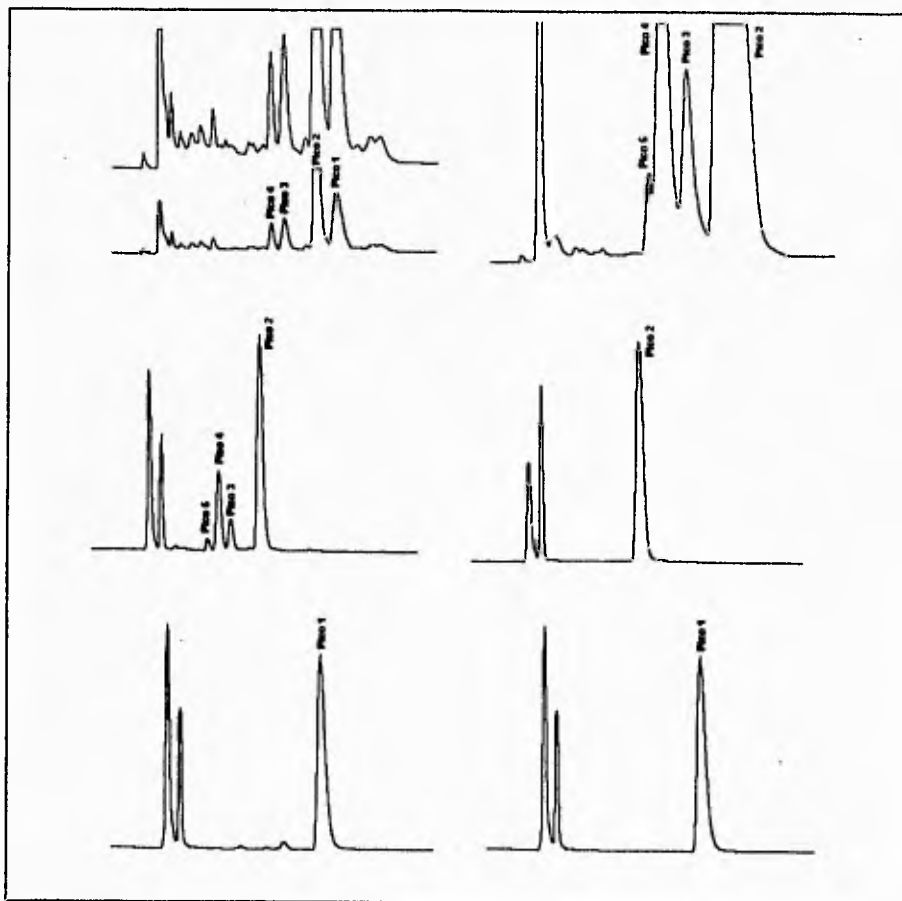


Figura 34.0 Separación de las tricolorinas A y B a partir de la resina de *Ipomoea tricolor* mediante HPLC a nivel preparativo. Columna: 19 × 150 mm, fase moderadamente polar enlazada-NH₂ (10 μm); velocidad de flujo total: 5.9 ml/min; fase móvil: CH₃CN-H₂O (93:7); detector: UV-visible; longitud de onda: 216 nm; lámpara: deuterio; sensibilidad: 0.1 A.U.F.S.; tiempo de deflexión del 10-90 % de la escala total: 0.8 seg.; factores que optimizan la separación de los picos, duración de la anchura máxima: 1 min, grado de deflexión respecto al tipo de pendiente: alta; velocidad del papel: 5 mm/min; celda de flujo, longitud: 5 mm, volumen iluminado: 10.0 μl; mezclado de la fase móvil: automático; volumen de la línea de inyección: 500 μl; temp.: 25 °C; concentración: 100 mg/ml. Pico 1, tricolorina A (T_r 27.9 min); Pico 2, tricolorina B (T_r 25.3 min); Pico 3 al 5, compuestos aún no caracterizados.

3.8 Hidrólisis alcalina de la tricolorina B

Una solución de la tricolorina B (2) (10.0 mg) en 5 % KOH (10 ml) se sometió a un calentamiento a reflujo durante una hora a una temperatura de 95 °C. Posteriormente, se ajustó el pH de la mezcla de reacción con HCl 4N (pH = 4) y se extrajo con Et₂O (2 x 10 ml).

3.8.1 Obtención del ácido tricolórico

La fase acuosa resultante de la hidrólisis básica de la tricolorina B se extrajo con n-BuOH (2 x 10 ml) y la capa orgánica se evaporó al vacío para proporcionar 9.0 mg de un polvo cristalino incoloro de naturaleza oligosacárida, al cual se le asignó el nombre de ácido tricolórico (3).

3.9 Determinación de las constantes físicas

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones. Los espectros de IR se corrieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 337 o en un aparato Nicolet FT-5X. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) protónica (¹H) y de carbono-13 (¹³C) se generaron en un aparato Varian XL-300, el cual se operó a una frecuencia de 300 MHz y 75.44 MHz respectivamente. Todos los espectros se obtuvieron en C₅D₅N y los desplazamientos químicos se asignaron en unidades δ (ppm) referidos al tetrametilsilano (TMS) como una referencia interna. Se utilizaron secuencias de pulso estándares Varian para el registro de los espectros de RMN bidimensional homonuclear (¹H-¹H COSY) y heteronuclear (¹³C-¹H HETCOR y ¹H-¹³C COLOC). Los espectros de masas generados mediante bombardeo rápido de átomos (FAB) se obtuvieron en un aparato Finnigan MAT-90. Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 241.

3.9.1 Caracterización de la tricolorina A (1)

El primer constituyente mayoritario aislado de la resina de *Ipomoea tricolor* con un T_r = 27.9 min (ver Sección 3.5, experimento N° 17.2, ensayo N° 4) se obtuvo como un sólido blanco cristalino en forma de agujas: pf 118-120 °C; (α)_D -30.32° (c = 1.5, MeOH); cuyas constantes espectroscópicas correspondieron a las descritas previamente para la tricolorina A (Pereda-Miranda et al; 1993). RMN ¹H (300 MHz, C₅D₅N, TMS): δ 5.85 (1H, dd, Glc-3), 5.85 (1H, dd, Ram-2), 5.81 (1H, d, J = 7.2 Hz, Glc-1), 5.74 (1H, dd, J = (9.9) Hz, Ram-4), 5.58 (1H, d, J = 1.2 Hz, Ram-1), 5.54 (1H, d, J = 1.2 Hz, Ram'-1), 4.98 (1H, dc, J = 6.3, 9.9 Hz, Ram-5), 4.81 (1H, dd, J = 3.3, 9.9 Hz, Ram-3), 4.78 (1H, dd, J = 8.7, 9.3 Hz, Fuc-2), 4.68 (1H, d, J = 7.8 Hz, Fuc-1), 4.55 (1H, dd, J = 1.2, 3.0 Hz, Ram'-2), 4.44 (1H, dd, J = 3.0, 10.0 Hz, Ram'-3), 4.38 (1H, dd, J = (9.9) Hz, Glc-4), 4.26-4.28 (1H,

Parte Experimental

m, Fuc-3), 4.26-4.28 (1H, m, Ram'-4), 4.26-4.28 (1H, m, Ram'-5), 4.16 (1H, dd, J= (7.5, 8.1) Hz, Glc-2), 4.06 (1H, d, J= 3.3 Hz, Fuc-4), 3.93 (1H, dd, J= 1.9, 11.0 Hz, Glc-6), 3.84-3.86 (1H, m, Fuc-5), 3.84-3.86 (1H, m, Aglicona-11), 3.5 (1H, dt, J= 2.1, 9.6 Hz, Glc-5), 3.02 (1H, ddd, J= 3.0, 8.1, 16.2 Hz, Aglicona-2'), 2.48 (1H, ddd, J= 3.0, 10.0, 16.0 Hz, Aglicona-2), 2.25-2.45 (1H, m, Ib-2), 2.25-2.45 (1H, m, Mb-2), 1.7 (1H, d, J= 6.0 Hz, Ram'-6), 1.68 (1H, d, J= 6.0 Hz, Ram-6), 1.60 (1H, d, J= 6.0 Hz, Fuc-6), 1.22 (1H, d, J= 7.0 Hz, 2-Me), 0.95 (1H, t, J= 7.0 Hz, 3-Me), 0.87 (1H, t, J= 7.0 Hz, Aglicona-16), 0.85 (1H, t, J= 7.0 Hz, 3-Me). **RMN 13-C (75.4 MHz, C₅D₅N, TMS):** δ 175.55 (Amb-1), 175.42 (Amb'-1), 172.13 (Aglicona-1), 104.49 (Ram'-1), 103.09 (Fuc-1), 99.76 (Glc-1), 98.2 (Ram-1), 81 (Aglicona-11), 80.6 (Glc-2), 78.96 (Glc-3), 76.25 (Glc-5), 76.16 (Fuc-3), 75.84 (Ram-3), 74.62 (Fuc-2), 73.34 (Ram'-4), 73.3 (Ram-4), 73.12 (Fuc-4), 72.74 (Ram-2), 72.46 (Ram'-3), 72.25 (Ram'-2), 71.24 (Fuc-5), 70.44 (Ram'-5), 69.62 (Glc-4), 67.23 (Ram-5), 61.31 (Glc-6), 41.53 (Amb-2), 41.37 (Amb'-2), 34.36 (Aglicona-2), 27.92 (Amb-3), 27.06 (Amb'-3), 18.48 (Ram'-6), 18.25 (Ram-6), 17.24 (Fuc-6), 16.91 (2-Me), 16.91 (2-Me), 14.15 (Aglicona-16), 11.76 (Amb-4), 11.76 (Amb'-4); **EM-FAB positivo m/z (int. rel.):** 1023 {M+H}⁺ (100); **EM-FAB negativo m/z (int. rel.):** 1021 {M-H}⁻ (100), 875 {M-146}⁻ (15), 736 {M-285}⁻ (X), 561 {M-460}⁻ (70), 546 {M-475}⁻ (X), 417 {M-604}⁻ (85), 271 {M-750}⁻ (18); **Fórmula molecular** C₅₀H₈₆O₂₁.

3.9.2 Caracterización de la tricolorina B (2)

El constituyente de la resina de *Ipomoea tricolor* con un T_r= 25.3 min (ver Sección 3.5, experimento N° 17.2, ensayo N° 4) se obtuvo como un sólido blanco cristalino en forma de agujas; y presentó las siguientes propiedades físicas y espectroscópicas: pf 110-111 °C; $\{\alpha\}_D -31.03^\circ$ (c= 1.6, MeOH); IR ν_{max} (KBr) 3420, 2930, 1740, 1470, 1390, 1240, 1130, 1060 cm⁻¹; **RMN 1H (300 MHz, C₅D₅N, TMS):** δ 5.836 (1H, dd, Glc-3), 5.822 (1H, dd, Ram-2), 5.799 (1H, d, J= 7.2 Hz, Glc-1), 5.709 (1H, dd, J= (9.9) Hz, Ram-4), 5.563 (1H, d, J= 1.2 Hz, Ram-1), 5.512 (1H, d, J= 1.2 Hz, Ram'-1), 4.9605 (1H, dc, J= 6.3, 9.9 Hz, Ram-5), 4.779 (1H, dd, J= 3.3, 9.9 Hz, Ram-3), 4.715 (1H, dd, J= 8.7, 9.3 Hz, Fuc-2), 4.673 (1H, d, J= 7.8 Hz, Fuc-1), 4.511 (1H, dd, J= 1.2, 3.0 Hz, Ram'-2), 4.418 (1H, dd, J= 3.0, 10.0 Hz, Ram'-3), 4.384 (1H, dd, J= (9.9) Hz, Glc-4), 4.253-4.271 (1H, m, Fuc-3), 4.253-4.271 (1H, m, Ram'-4), 4.253-4.271 (1H, m, Ram'-5), 4.135 (1H, dd, J= (7.5, 8.1) Hz, Glc-2), 4.034 (1H, d, J= 3.3 Hz, Fuc-4), 3.899 (1H, dd, J= 1.9, 11.0 Hz, Glc-6), 3.825-3.846 (1H, m, Fuc-5), 3.825-3.846 (1H, m, Aglicona-11), 3.491 (1H, dt, J= 2.1, 9.6 Hz, Glc-5), 3.015 (1H, ddd, J= 3.0, 8.1, 16.2 Hz, Aglicona-2'), 2.509 (1H, ddd, J= 3.0, 10.0, 16.0 Hz, Aglicona-2), 2.297-2.453 (1H, m, Ib-2), 2.297-2.453 (1H, m, Mb-2), 1.73 (1H, d, J= 6.0 Hz, Ram'-6), 1.652 (1H, d, J= 6.0 Hz, Ram-6), 1.584 (1H, d, J= 6.0 Hz, Fuc-6), 1.4615

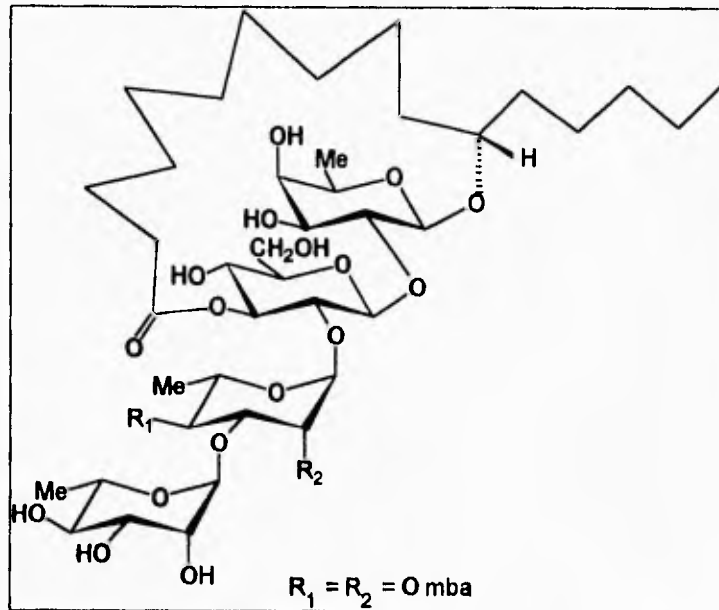
Parte Experimental

(1H, d, J= 7.0 Hz, 2-Me), 1.189 (1H, t, J= 7.0 Hz, Mb-4), 1.108 (1H, t, J= 7.0 Hz, Aglicona-16), 1.106 (1H, t, J= 7.0 Hz, Ib-3). RMN 13-C (75.4 MHz, C₅D₅N, TMS): δ 176.172 (Ib-1), 175.814 (Mb-1), 172.395 (Aglicona-1), 104.705 (Ram'-1), 103.12 (Fuc-1), 99.862 (Glc-1), 98.534 (Ram-1), 80.87 (Aglicona-11), 80.87 (Glc-2), 79.027 (Glc-3), 76.31 (Glc-5), 76.078 (Fuc-3), 76.027 (Ram-3), 74.741 (Fuc-2), 73.468 (Ram'-4), 73.294 (Ram-4), 73.236 (Fuc-4), 72.794 (Ram-2), 72.453 (Ram'-3), 72.424 (Ram'-2), 71.337 (Fuc-5), 70.587 (Ram'-5), 69.575 (Glc-4), 67.319 (Ram-5), 61.234 (Glc-6), 41.463 (Mb-2), 35.169 (Aglicona-2), 34.399 (Ib-2), 27.96 (Mb-3), 19.104 (Ram'-6), 18.418 (Ram-6), 18.418 (Ib-3), 17.406 (Fuc-6), 17.032 (2-Me), 14.28 (Aglicona-16), 11.895 (Mb-4); EM-FAB positivo m/z (int. rel.): 1009 {M+H}⁺ (100), 863 {M-146}⁺ (2); EM-FAB negativo m/z (int. rel.): 1007 {M-H}⁻ (100), 861 {M-146}⁻ (2), 736 {M-271}⁻ (2), 563 {M-445+H⁺}⁻ (14), 545 {M-462}⁻ (3), 418 {M-590+H⁺} (10), 271 {M-736} (100); Fórmula molecular C₄₉H₈₄O₂₁.

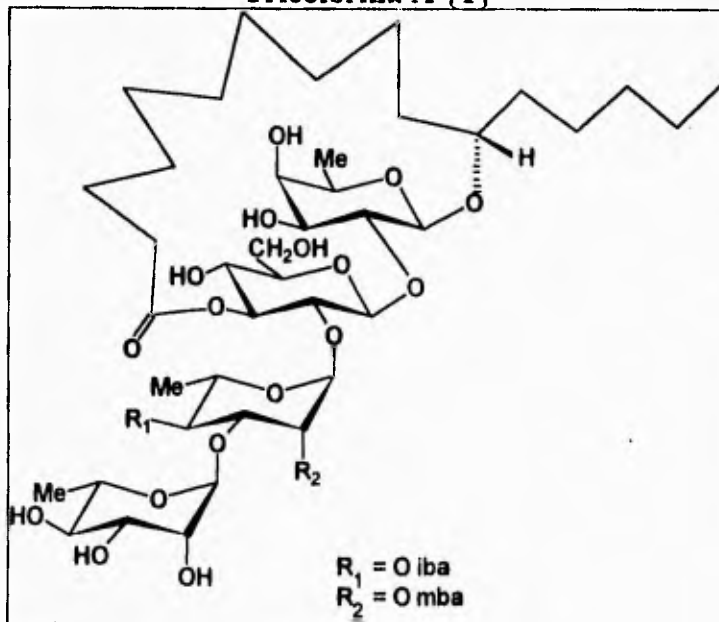
3.9.3 Caracterización del ácido tricolórico {3}

pf 104-106 °C; $[\alpha]_D$ -61.92° (c= 0.9, MeOH); IR ν_{max} (KBr) 3400, 1710, 1130, 1060 cm⁻¹; RMN 1H (300 MHz, C₅D₅N, TMS): δ 6.41 (1H, d, J=1.3 Hz, Ram-1), 6.07 (1H, d, J=1.0 Hz, Ram'-1), 5.65 (1H, d, J= 7.6 Hz, Glc-1), 5.16 (1H, dc, J= 6.0, 9.4 Hz, Ram-5), 5.03 (1H, dd, J= 1.3, 2.9 Hz, Ram-2), 4.94 (1H, dd, J= 2.9, 9.4 Hz, Ram-3), 4.85 (1H, d, J= 7.4 Hz, Fuc-1), 4.78 (2H, m, Ram'-2, -5), 4.67 (1H, dd, J= 3.4, 9.2 Hz, Ram'-3), 4.59 (1H, dd, J= 7.4, 9.0 Hz, Fuc-2), 4.52 (1H, dd, J= 9.4, 9.4 Hz, Ram-4), 4.45 (1H, dd, J= 3.4, 9.0 Hz, Fuc-3), 4.33 (1H, dd, J= 2.7, 12.0 Hz, Glc-6'), 4.30 (1H, dd, J= 7.6, 9.0 Hz, Glc-2), 4.29 (1H, dd, J= 9.2, 9.2 Hz, Ram'-4), 4.23 (1H, dd, J= 5.0, 12.0 Hz, Glc-6), 4.19 (1H, dd, J= 9.0, 9.0 Hz, Glc-3), 4.09 (1H, dd, J= 9.0, 9.0 Hz, Glc-4), 3.94 (1H, m, Jla-11), 3.92 (1H, d, J= 3.4 Hz, Fuc-4), 3.80 (1H, c, J= 6.5 Hz, Fuc-5), 3.66 (1H, ddd, J= 2.7, 5.0, 9.0 Hz, Glc-5), 2.52 (2H, t, J= 7.0 Hz, Jla-2), 1.85 (3H, d, J= 6.0 Hz, Ram-6), 1.55 (3H, d, J= 6.2 Hz, Ram'-6), 1.48 (3H, d, J= 6.5 Hz, Fuc-6), 0.84 (3H, t, J= 7.0 Hz, Jla-16); 13-C (75.4 MHz, C₅D₅N, TMS): δ 102.71 (Fuc-1), 78.32 (Fuc-2), 76.00 (Fuc-3), 72.82 (Fuc-4), 71.18 (Fuc-6), 70.91 (Fuc-5), 102.35 (Glc-1), 78.38 (Glc-2), 79.10 (Glc-3), 72.59 (Glc-4), 76.94 (Glc-5), 63.13 (Glc-6), 101.93 (Ram-1), 71.93 (Ram-2), 80.47 (Ram-3), 72.96 (Ram-4), 69.68 (Ram-5), 18.89 (Ram-6), 104.17 (Ram'-1), 72.36 (Ram'-2), 72.66 (Ram'-3), 74.17 (Ram'-4), 69.88 (Ram'-5), 18.50 (Ram'-6), 176.15 (Jla-1), 34.92 (Jla-2), 80.55 (Jla-11), 14.20 (Jla-16); EM-FAB negativo m/z (int. rel.): {M-H}⁻ 871 (100), 725 (18), 579 (16), 417 (19), 271 (5), 268 (9), 142 (8); Fórmula molecular C₄₀H₇₂O₂₀.

Parte Experimental

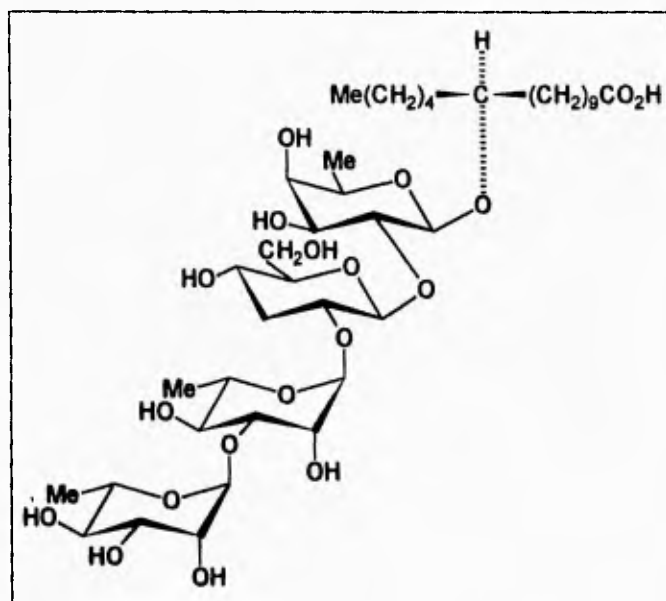


Tricolorina A {1}



Tricolorina B {2}

Parte Experimental



Acido Tricolórico {3}

4.0 DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Análisis de la glicorresina mediante cromatografía en columna flash y cromatografía en capa fina (CCF).

Las glicorresinas sufren procesos de transesterificación promovidos por los soportes cromatográficos en especial por la gel de sílice (March, 1985; Noda et al; 1987). Estos compuestos son inestables, en consecuencia la separación a nivel preparativo utilizando CCF o CC abierta resulta poco eficiente, lo anterior es quizás una consecuencia del mayor tiempo de interacción (adsorción) entre la glicorresina y la gel de sílice. Estas transformaciones explican los resultados observados en los experimentos realizados en la cromatografía en columna flash y la CCF a nivel preparativo. Por una parte, la cromatografía en columna flash permitió observar que al someter a este proceso de purificación cada una de las fracciones enriquecidas con los compuestos de mayor polaridad, fracción 156-162 y de menor polaridad, fracción 38-40, aparentemente se lograba efectuar la separación del componente mayoritario respectivo (ver Parte Experimental, Sección 3.2, Figuras N° 4, 5 y 6). El empleo de la cromatografía en columna flash permitió reducir el tiempo de interacción entre la glicorresina y el soporte de gel de sílice y, así, disminuir la posibilidad de descomposición de la mezcla original. Posteriores análisis mediante RMN de las fracciones XII, XIII, XXIX, XXXII, XL y XLI revelaron de manera inequívoca que éstas fracciones, a pesar de presentar una homogeneidad cromatográfica en capa fina (semejanza en R_f), continuaban siendo mezclas de constituyentes estructuralmente emparentados, lo cual se corroboró en algunos casos de manera adicional mediante la serie de análisis preliminares en cromatografía de líquidos de alta eficiencia (ver Parte Experimental, Sección 3.4, experimentos N° 1 al 16). Por otra parte, la CCF a nivel analítico de las fracciones finales XXVIII y XXX evidenció claramente las reacciones de descomposición que sufrieron las glicorresinas en estudio cuando se sometieron a procedimientos cromatográficos en capa fina a nivel preparativo ya que al finalizar la etapa de repurificación se observaban mezclas con una mayor complejidad que las obtenidas en la muestra original (Figura N° 35).

La Figura N° 35 muestra la cromatografía en capa fina de la fracción mayoritaria obtenida a partir de la purificación de la fracción XXVIII. En los casos de las fracciones XXIX y XXX se obtuvieron perfiles cromatográficos idénticos.

Discusión de Resultados

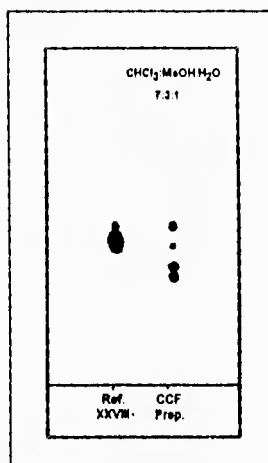


Figura 35.0 Análisis mediante cromatografía en capa fina de la fracción XXVIII. Condiciones analíticas: Fase estacionaria, gel de sílice 60 F₂₅₄ (5 × 10 cm, 0.2 mm de espesor, E. Merck); sistema de elución, CHCl₃-MeOH-H₂O (7:3:1).

Por último, el análisis mediante CCF de los productos de la reacción de saponificación de las fracciones 156-162 y 142-145 (ver Parte Experimental, Sección 3.3, Figura N° 7) evidenció, por una parte, que las fracciones 156-162 se encontraban enriquecidas en los componentes de mayor polaridad (ver Parte Experimental, Sección 3.1, Figura N° 3) y que están constituidas por tres ácidos glicosídicos (R_f 0.29, 0.32 y 0.39) (ver Parte Experimental, Sección 3.3, Figura N° 7). El constituyente de mayor polaridad presentó el mismo valor de R_f (0.29), que el desarrollado por el ácido tricolórico o "it-2" obtenido de la saponificación de la tricolorina A. La fracción 142-145 enriquecida con los componentes de menor polaridad (ver Parte Experimental, Sección 3.1, Figura N° 3) rindió, de manera predominante, un producto con un R_f 0.29 similar al previamente descrito como ácido tricolórico A (R_f 0.29) (Pereda-Miranda et al., 1993).

4.2 Análisis mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

De acuerdo con los resultados hasta ahora discutidos y tomando en consideración las características de la muestra problema (ver Planteamiento del Problema, Sección 2.0). El pretratamiento de la muestra mediante cromatografía en columna fue la que se seleccionó. A

pesar de que presentan algunas desventajas como un mayor consumo de tiempo en cada tratamiento, irreproducibilidad de una columna a otra y la evaporación de los disolventes a sequedad antes de efectuar cada análisis. Por el contrario, posee como ventajas, una mayor capacidad de carga de la muestra problema, manipulación sencilla, y además ser una técnica que se fundamenta en tamaño o adsorción y, a la vez se eliminó la consistencia viscosa del crudo resinoso total. En nuestro caso se empleó una sola vez para tratar a una gran cantidad de la muestra problema y, se agilizó mediante el empleo de la cromatografía en columna flash (Hostettmann et al., 1986; Clark et al., 1978). Si bien el empleo de esta técnica no posee la suficiente resolución para separar totalmente a las glicorresinas en estudio, si permitió realizar un fraccionamiento de la glicorresina obteniéndose de esta manera una fracción enriquecida con los componentes de mayor polaridad y una segunda fracción rica en los componentes de menor polaridad (ver Parte Experimental, Sección 3.2).

4.2.1 Selección básica del sistema de cromatografía de líquidos: modo cromatográfico, tipo de funcionalidad y condiciones de elución

En un inicio, los análisis preliminares de la muestra problema mediante CCF se utilizaron como un primer indicador para la selección de las condiciones óptimas de operación en cromatografía de líquidos. En la CCF se emplearon placas recubiertas con gel de sílice para desarrollar gran parte de los análisis con la muestra problema. De esta manera, se seleccionaron columnas de HPLC fase normal (adsorción) como modo cromatográfico con grupos silanol libres como funcionalidad, empleando como posibles fases móviles mezclas de disolventes constituidas por CHCl_3 - MeOH - H_2O y, que en teoría, proporcionarían al igual que en la CCF la mejor resolución para la glicorresina total.

Por otra parte, se efectuó un análisis paralelo basado en las características generales de la muestra problema (ver Planteamiento del Problema, Sección 2.0) y, de esta manera, fueron seleccionados como candidatos los modos cromatográficos de fase reversa poco polar-enlazada (C_{18} , octadecilmethylsililo enlazado a sílica amorfa y CN, cianopropilmethylsililo enlazado a sílica amorfa) y moderadamente polar enlazada (NH_2 , aminopropilmethylsililo enlazado a sílica amorfa) para los análisis en la cromatografía de líquidos. También, se seleccionaron como posibles fases móviles a los disolventes CH_3CN y CH_3OH , con sus correspondientes mezclas acuosas. La Figura N° 36 ilustra la guía general para la selección básica del sistema preliminar en la cromatografía de líquidos, misma que se utilizó para la selección del modo cromatográfico y funcionalidad para la resolución de la resina de *I. tricolor* (Waters Sourcebook of Chromatography, 1992).

Discusión de Resultados

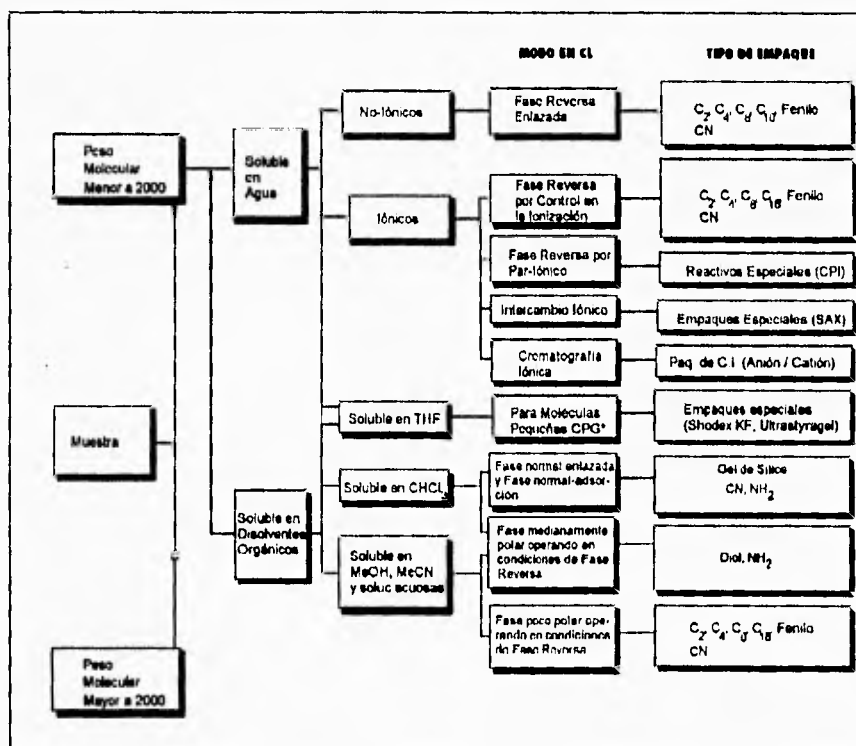


Figura 36.0 Guía para la elección del modo y selección del tipo de empaque en la cromatografía líquida de alta resolución.

En primer lugar, las mejores condiciones de separación de la muestra problema en la CCF de la fracción 142-145 se extrapolaron a una columna analítica de fase normal de adsorción como el modo cromatográfico seleccionado. La fase móvil correspondió a mezclas de disolventes constituidas por CHCl₃-MeOH-H₂O y CHCl₃-MeOH (ver Parte Experimental, Sección 3.4, experimentos N° 12-15). De esta manera, los análisis preliminares que involucraron la extrapolación de las condiciones óptimas en CCF proporcionaron resultados poco satisfactorios en HPLC ya que la mezcla problema eluyó conjuntamente con el pico correspondiente a la mezcla de disolventes (Volumen muerto del

sistema cromatográfico, V_0). Posiblemente la ausencia de resolución de la muestra problema en las condiciones de fase normal se deba al mecanismo de separación en las partículas de gel de sílice sin recubrimiento, en donde aparentemente predominan interacciones de repulsión entre la cadena lipídica de la muestra problema y los grupos hidroxilos presentes en la superficie del soporte cromatográfico. Este resultado en HPLC fue de alguna manera comparable al obtenido en los experimentos realizados en CCF y CC (ver Discusión de Resultados, Sección 5.0.1). La pobre resolución de la mezcla problema en sus constituyentes individuales posiblemente sea consecuencia de la disminución en un 50 % en el área de superficie total del soporte en una columna analítica con respecto a un análisis realizado en CCF (Hostettmann et al., 1986), a la pobre interacción entre el soporte y la muestra problema consecuencia de un valor elevado en la fuerza de elución de la fase móvil y, finalmente; la pérdida de sensibilidad en la detección por el empleo del detector de I.R.; puesto que el empleo del detector de U.V.-visible se imposibilita debido a la interferencia en la absorción a 217 nm con los máximos de absorción de los grupos cromóforos presentes y el inicio del intervalo de absorción de los disolventes empleados como fase móvil consecuencia de las transiciones electrónicas ($n \rightarrow \sigma$, $n \rightarrow \pi^*$) de los disolventes orgánicos empleados para la fase normal, i.e., CHCl_3 , CH_2Cl_2 y AcOEt .

Debido a estos resultados poco satisfactorios y a la insolubilidad de la muestra problema en fases de menor polaridad, i.e., Hexano- CHCl_3 y Hexano-Alcohol Isopropílico se optó por transferir la separación de la mezcla total de glicorresinas a los soportes cromatográficos de fase poco polar enlazada C_{18} y CN, y de fase moderadamente polar enlazada NH_2 , operando en condiciones de fase reversa.

4.2.2 Optimización de la separación analítica

La optimización de la separación a nivel analítico se efectuó en columnas de fase enlazada moderadamente polar NH_2 y de fase poco polar C_{18} y CN operando en condiciones de fase reversa. Esta etapa fue necesaria por dos razones principales: 1) el escalamiento a un sistema preparativo se acompaña por pérdidas en la eficiencia de separación; 2) un valor pequeño para el factor de capacidad (k') implica efectuar una separación rápida con el empleo de un mínimo volumen de elución para cada pico y, así, ahorrar el consumo de disolventes.

Una buena separación mediante HPLC a nivel analítico es un prerrequisito para efectuar escalamientos a nivel preparativo con la finalidad de utilizar las óptimas condiciones de análisis en sucesivas repeticiones, que permitan acumular la cantidad de muestra necesaria ($\mu\text{g-g}$) para posteriores estudios. Una vez que la separación a nivel analítico se ha probado, es necesario optimizar la resolución ya que se requiere a nivel preparativo de una sobrecarga

de la columna durante la separación. Un camino para lograr esta optimización es aumentar el grado de retención entre el soporte y la muestra problema mediante el cambio de las condiciones de elución.

Para el desarrollo de la optimización de las condiciones cromatográficas a nivel analítico sólo se consideró como única (s) variable (s) la composición del eluyente y el tipo de Columna. Los factores de configuración de la columna y del empaque de la misma; el perfil de elución: isocrático, gradiente, lineal, cóncavo, convexo, en etapas; la velocidad de flujo y la temperatura también contribuyen a la eficiencia del análisis y se discutirán al final de este capítulo como un complemento para una futura segunda optimización de la metodología de separación implementada en la presente disertación.

4.2.2.1 Análisis numérico de los parámetros cromatográficos

La experimentación resultó ser el mejor camino para reunir el conjunto óptimo de variables que permitieron monitorear la optimización de la separación cromatográfica de la glicorresina en estudio, debido a que las condiciones instrumentales descritas en la literatura para la resolución de otras resinas de la Familia Convolvulacea representan ejemplos individuales dada la diversidad estructural y diferencias en la polaridad de los glicolípidos que las constituyen y, de esta manera, imposibilitan su aplicación general (ver Tabla N° 1.0). En este sentido, la correlación con un modelo teórico ideal ayudó de manera decisiva a la evaluación cuantitativa de la separación mediante el análisis de los siguientes parámetros cromatográficos: el factor de capacidad (k'), el factor de selectividad (α), la resolución (R_s), la altura equivalente de un plato teórico (HEPT) y el rango (R_L). A continuación se definen estos factores (Zsardon et al., 1979; Nikolov et al., 1985; Mandal et al., 1991; USP 23, 1995).

El Factor de Capacidad, $k'_i = (T_{ri} - T_{r0}) / T_{r0}$, fue calculado a partir de los tiempos de retención (T_r) y de los valores de tiempo muerto de la columna (T_{r0}). Este último valor se determinó a partir del tiempo de retención que correspondió al pico del disolvente y cuyo valor es el resultado del efecto global de la configuración entre las conexiones ó efectos extracolumnares.

La Selectividad, $\alpha = (k'_2 / k'_1)$, entre dos picos adyacentes se calculó a partir de los factores de capacidad previamente calculados. Donde el subíndice 2 significa el valor de k' del pico con mayor tiempo de retención.

Discusión de Resultados

La Resolución, $R_s = 2(T_{r2} - T_{r1}) / (w_1 + w_2)$, entre dos picos adyacentes se calculó a partir de los tiempos de retención, así como de las anchuras medias correspondientes ($W_{1/2}$).

Altura Equivalente de un Plato Teórico, (HEPT) = L/N ; $N_i = 16(T_{ri} / W_b)^2$, N se calculó empleando el valor de la anchura W_b (medida mediante el método de la tangente, 4σ) y L es la longitud en mm que corresponde a cada una de las columnas ensayadas.

El Rango, $R_k = (k'_n/k'_1)$, se calculó a partir del cociente existente entre el valor máximo de k' correspondiente al último pico (k'_n) y el valor inicial (k'_1) (Quattrochi et al., 1990).

NOTA 1: Los valores de T_{r1} y T_{r2} así como T_{ri} para el caso del cálculo de HEPT son en realidad tiempos de retención relativos (T'_{ri}); es decir tiempos de retención corregidos por el tiempo muerto del sistema.

La Tabla N° 3 resume los valores numéricos para cada uno de los parámetros cromatográficos analizados durante la optimización de la separación analítica en fase reversa.

Discusión de Resultados

Parámetro	Paso 1				Paso 2				Paso 3				Paso 4				Tipo de respuesta
	Cr	Pa	SE	SE	Cr	Pa	SE	SE	Cr	Pa	SE	SE	Cr	Pa	SE	SE	
Paso 1	114	31	0	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	0	0.0000	114	31	0	0.0000	Tipo de respuesta Fase para poder Estimar CI
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	0	0.0000	114	31	0	0.0000	
	212	112	31	0.0000	212	112	1.00	0.0000	212	112	0	0.0000	212	112	0	0.0000	
	31	112	24	0.0000	31	112	24	0.0000	31	112	24	0.0000	31	112	24	0.0000	
	413	212	31	0.0000	413	212	31	0.0000	413	212	31	0.0000	413	212	31	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	0	0.0000	114	31	0	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	0	0.0000	114	31	0	0.0000	
Paso 2	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	Tipo de respuesta Fase para poder Estimar CI
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
Paso 3	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	Tipo de respuesta Fase para poder Estimar CI
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
Paso 4	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	Tipo de respuesta Fase para poder Estimar CI
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	
	114	31	1	0.0000	114	31	1.00	0.0000	114	31	1	0.0000	114	31	1	0.0000	

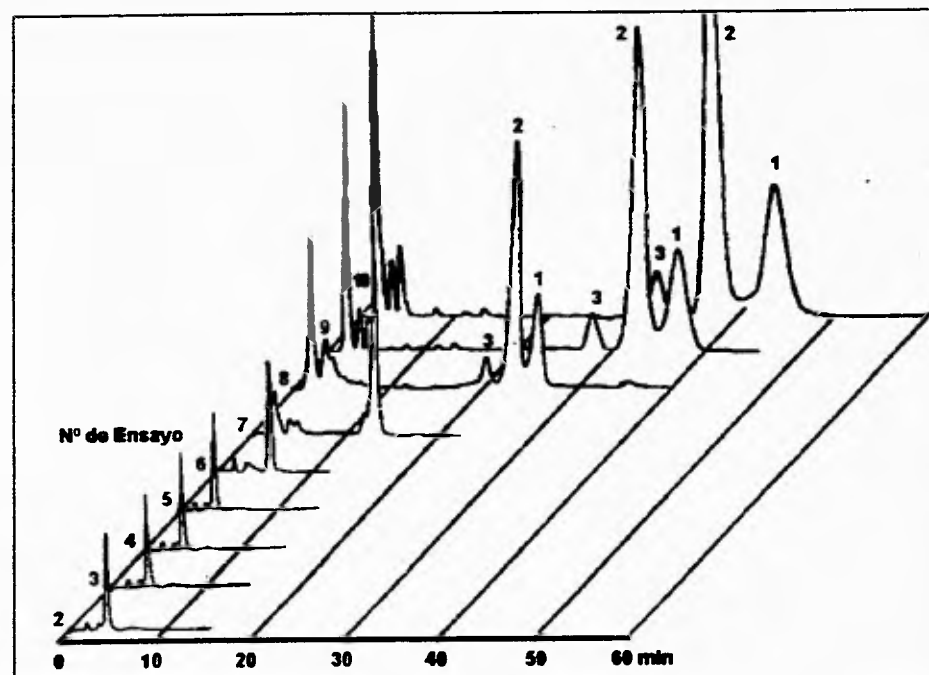
Tabla 3.0 Valores numéricos de los parámetros cromatográficos analizados en cada uno de los experimentos realizados durante la optimización de la separación analítica

4.2.2.2 Análisis para las columnas de fase enlazada moderadamente polar NH₂ y de fase poco polar C₁₈ y CN operando en condiciones de fase reversa

La representación gráfica de los parámetros cromatográficos muestra los cambios graduales que sufren los factores de capacidad, selectividad, eficiencia y resolución debido al efecto provocado por el cambio de la fuerza de elución de la fase móvil (composición del eluyente) y, en algunos casos, debido al cambio en el tipo de disolvente (Figuras N° 37-57). La comparación entre las Figuras N° 37-38 y el cromatograma múltiple N° 1 permitió concluir en primera instancia que a partir de una relación del 60 % de H₂O en CH₃CN se obtenía la separación de los constituyentes de la resina al utilizar la columna de fase reversa enlazada (CN). Estas condiciones permitieron observar diferentes tiempos de retención para cada uno de los constituyentes mayoritarios de la mezcla en estudio y, por lo tanto, se procedió a calcular el parámetro del factor de capacidad (k') correspondiente. El empleo de un sistema de elución de menor polaridad provocó la elución de todos los constituyentes de manera conjunta en el volumen muerto del sistema y, por lo tanto, no fue posible el análisis numérico en estos ensayos. Por último, el tiempo consumido para cada análisis parece ser adecuado, es decir, menor a 60 min, con un rango entre los componentes mayoritarios $R_k = 1.39$; es decir no se requieren de más de 60 minutos para conseguir una buena separación al utilizar un 32 % de CH₃CN acuoso. El análisis de las tendencias observadas para los parámetros cromatográficos representados gráficamente en la figuras N° 37-41 permitió seleccionar las mejores condiciones de análisis, que resultaron ser, las ilustradas en el cromatograma múltiple N° 1 (ensayo N° 8) teniendo un valor de $R_k = 1.27$. Este ensayo permitió establecer los valores de máxima eficiencia en la separación de la mezcla problema mediante el empleo de la columna de fase reversa enlazada ciano (65% H₂O-CH₃CN) en comparación con las restantes proporciones para este mismo soporte. La altura equivalente de platos teóricos (HEPT) para los tres constituyentes mayoritarios detectados con los tiempos de retención de T_r de 25.7 min (Pico 1), 23.2 min (Pico 2) y 20.5 min (Pico 3) correspondió a 150/7981, 150/8453 y 150/11744, respectivamente. La selectividad calculada (α) correspondió a 1.12 (Pico 2/Pico 1), 1.14 (Pico 3/Pico 2) entre cada uno de estos componentes. Estos valores de selectividad describen una medida relativa de afinidad por la fase estacionaria con base a una distinción estructural que efectúa el soporte por cada uno de los constituyentes que componen la muestra problema. También, este análisis cromatográfico permitió la obtención de valores para el factor de capacidad (k') 13.3 (Pico 1), 11.9 (Pico 2) y 10.4 (Pico 3). Este factor de capacidad representa una medida de la retención total del sistema y el incremento de su valor repercute de manera significativa en una mejor resolución (R_s). En nuestro caso, el valor de (R_s) correspondió a 3.25 entre el par de componentes mayoritarios (Pico 1/Pico 2) con un T_r de 25.7 y 23.2 min,

Discusión de Resultados

respectivamente y una resolución (Pico 2/Pico 3) de 3.13 para el siguiente par de componentes con T_r de 23.2 min y 20.5 min, sin que esto contribuyera a un incremento en el tiempo necesario para desarrollar cada análisis. No se procedió con el escalamiento a nivel preparativo de estas condiciones cromatográficas debido a que el análisis mediante "ratio plotting" (ver Parte Experimental, Sección 3.6, Figura N° 25) demostró la existencia de una mezcla de constituyentes que coeluyeron en los picos 1 a 3. Por otra parte, se suman las dificultades provocadas por la insolubilidad de la muestra problema empleando una proporción al 30 % de CH_3CN en solución acuosa. Por lo tanto, esta característica disminuye la cantidad de muestra disuelta que puede ser procesada mediante HPLC a nivel preparativo.



Cromatograma múltiple N° 1.0. Resumen de los análisis más importantes para el crudo resinoso total de *Ipomoea tricolor* recopilados en el transcurso de la optimización de las condiciones cromatográficas analíticas. **Condiciones de análisis:** Columna: 3.9 × 150 mm, fase poco polar enlazada-CN (10 μm); velocidad de flujo total: 0.5 ml/min; fase móvil: CH₃CN acuoso, 10) 32 % 9) 33 % 8) 35 % 7) 40 % 6) 50 % 5) 60 % 4) 70 % 3) 80 % 2) 90 %; detector: UV-visible; longitud de onda: 216 nm; lámpara: deuterio; sensibilidad: 0.10 A.U.F.S.; volumen de la línea de inyección: 10 μl; temp.: 25 °C; concentración: 20 μg/μl. Pico 1, Tricolorina A; Pico 2, Tricolorina B.

Discusión de Resultados

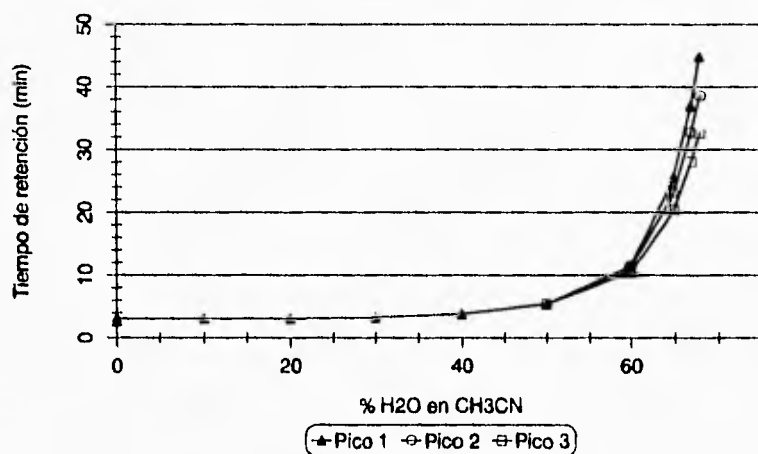


Figura 37.0 Relación entre el tiempo de retención de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃CN). Columna de fase poco polar CN. Pico 1, tricolorina A; Pico 2, tricolorina B y; Pico 3, constituyente aún no caracterizado. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.3).

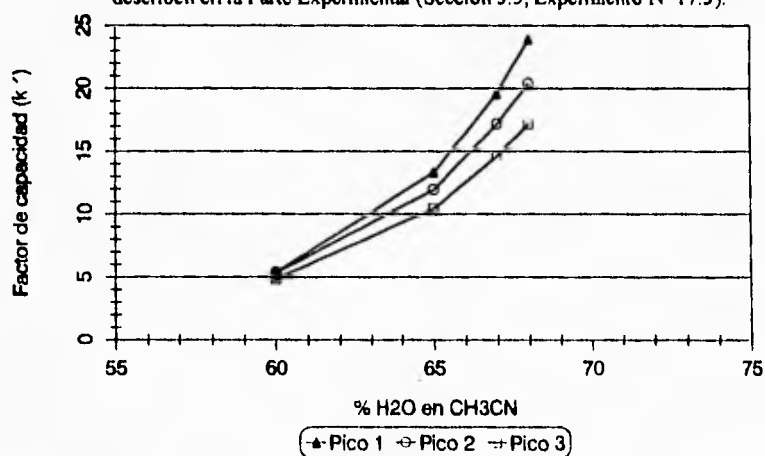


Figura 38.0 Relación entre el factor de capacidad (k') de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃CN). Columna de fase poco polar CN. Pico 1, tricolorina A; Pico 2, tricolorina B y; Pico 3, constituyente aún no caracterizado. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.3).

Discusión de Resultados

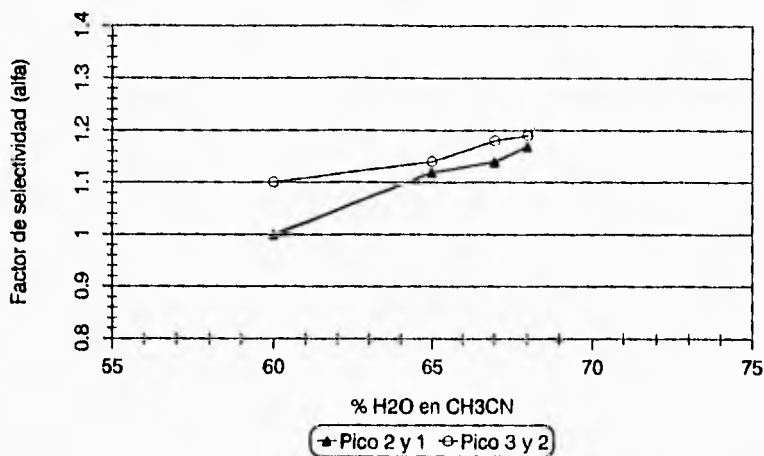


Figura 39.0 Relación entre los factores de selectividad (α) de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃CN). Columna de fase poco polar CN. Picos 2 y 1, tricolorina B-tricolorina A; Picos 3 y 2, Constit. s/caract.-tricolorina B. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.3).

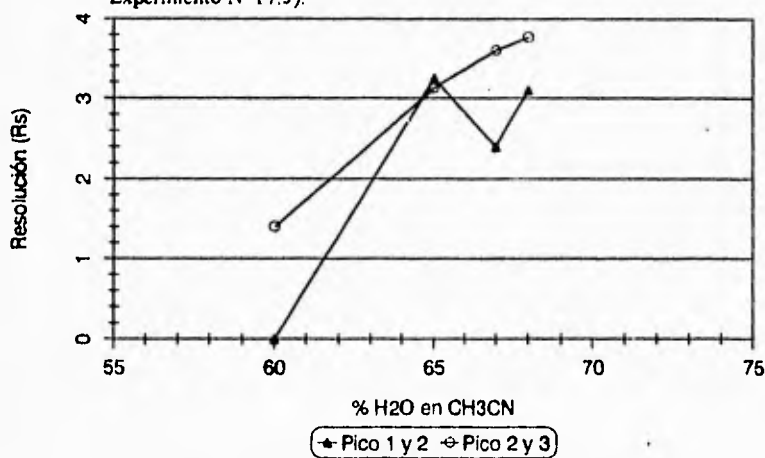


Figura 40.0 Relación entre la resolución (Rs) de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃CN). Columna de fase poco polar CN. Picos 1 y 2, tricolorina A-tricolorina B; Picos 2 y 3, tricolorina B-Constit. s/caract. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.3).

Discusión de Resultados

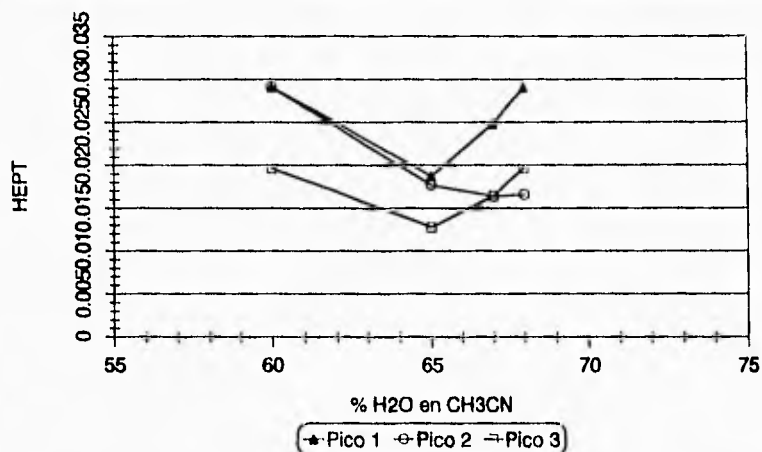
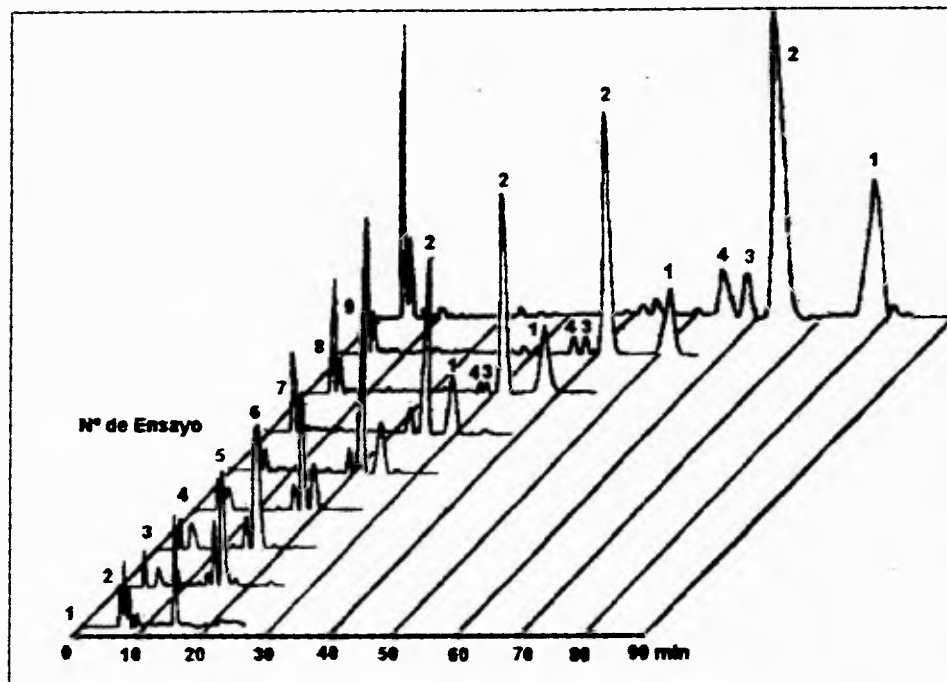


Figura 41.0 Relación entre la altura equivalente de platos teóricos (HEPT) de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃CN). Columna de fase poco polar CN. Pico 1, tricolorina A; Pico 2, tricolorina B y; Pico 3, constituyente aún no caracterizado. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.3).

El análisis numérico efectuado con la columna ciano se realizó de igual manera para la columna de fase reversa C₁₈. La comparación entre las Figuras N° 42-46 y el cromatograma múltiple N° 2 permitió concluir que el empleo de una mezcla de CH₃CN acuoso en una proporción mayor al 10 % provoca la separación de los constituyentes de la resina; es decir, se obtuvieron diferentes tiempos de retención (T_r) para cada uno de ellos y, por lo tanto, también factores de capacidad (k') definidos. El tiempo empleado en cada análisis fue menor a 80 min. El cromatograma múltiple N° 2, ensayo N° 7 corresponde a las mejores condiciones de análisis obtenidas para una proporción de 70 % CH₃CN-H₂O para los análisis en donde se empleó la columna de fase reversa C₁₈, con un rango (R_k) correspondiente a 1.44. Estas condiciones superaron en eficiencia a las obtenidas utilizando la columna de fase reversa ciano, el (HEPT) para los cuatro constituyentes detectados con los T_r de 36.9 min (Pico 1), 30.2 min (Pico 2), 27.9 min (Pico 3) y 26.9 min (Pico 4) fue de 250/9946, 250/17240, 250/34338 y 250/59802, respectivamente. La selectividad (α) correspondió a 1.25 (Pico 2/ Pico 1), 1.1 (Pico 3/ Pico 2) y 1.1 (Pico 4/ Pico 3) entre cada uno de estos componentes. Este análisis permitió la obtención de valores menores para (k'), 8.97 (Pico 1), 7.16 (Pico 2), 6.5 (Pico 3) y 6.2 (Pico 4) respectivamente, con respecto a los generados en la columna de fase poco polar CN. Estos valores, repercuten en una mayor

Discusión de Resultados

resolución para los constituyentes mayoritarios y de esta manera, se logró calcular un valor de (R_s) 5.6 para el par (Pico 1/Pico 2) con T_r de 36.9 y 30.2 min, una (R_s) 3.17 para el par (Pico 2/Pico 3) con T_r de 30.2 min y 27.9 min y finalmente una (R_s) 2.06 para los componentes (Pico 3/Pico 4) con T_r 27.9 in y T_r 26.9 min, respectivamente. La mejor resolución cromatográfica obtenida en este análisis de fase reversa C_{18} provocó un incremento en el tiempo necesario para realizarlo, 90 min, teniendo este ensayo un valor en el rango (R_k) de 1.47 para la proporción de 60 % MeCN/H₂O. Los factores que influyeron de manera decisiva para continuar con el escalamiento a nivel preparativo de estas condiciones de separación fueron los siguientes: La resolución total de la mezcla problema en comparación con la obtenida para la columna ciano; el análisis mediante "ratio plotting" de cada uno de los constituyentes mayoritarios (ver Parte Experimental, Sección 3.6, experimento 19, Figura N° 24) que demostró su homogeneidad cromatográfica, en especial de aquellos picos cuya separación en la fase reversa enlazada con ciano no fue posible.



Cromatograma múltiple N° 2.0. Resumen de los análisis más importantes para el crudo resinoso total de *Ipomoea tricolor* recopilados en el transcurso de la optimización de las condiciones cromatográficas analíticas. Condiciones de análisis: Columna: 4.6 × 250 mm, fase reversa enlazada-C₁₈ (5 μm); velocidad de flujo total: 0.5 ml/min; fase móvil: CH₃CN acuoso, 9) 60 % 8) 65 % 7) 70 % 6) 75 % 5) 80 % 4) 85 % 3) 90 % 2) 95 % 1) 100 %; detectores: UV-visible; longitud de onda: 216 nm; volumen de la línea de inyección: 10 μl; temp.: 25 °C; concentración: 20 μg/μl. Pico 1, Tricolorina A; Pico 2, Tricolorina B.

Discusión de Resultados

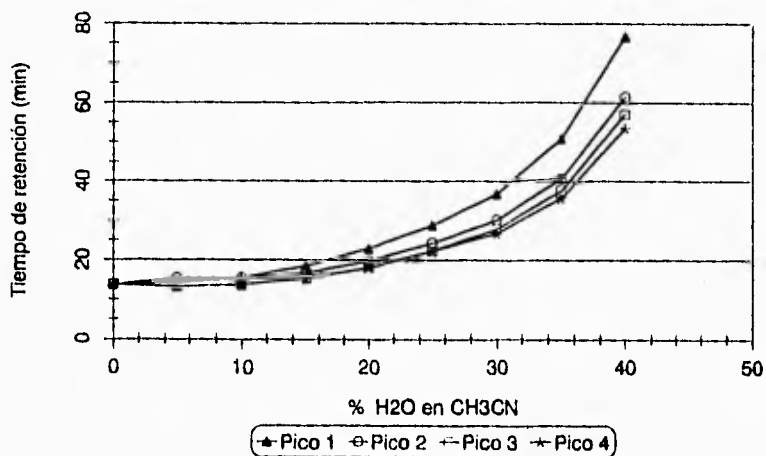


Figura 42.0 Relación entre el tiempo de retención de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃CN). Columna de fase reversa C18. Pico 1, tricolorina A; Pico 2, tricolorina B; Picos 3 y 4 constituyentes aún no caracterizados. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.1).

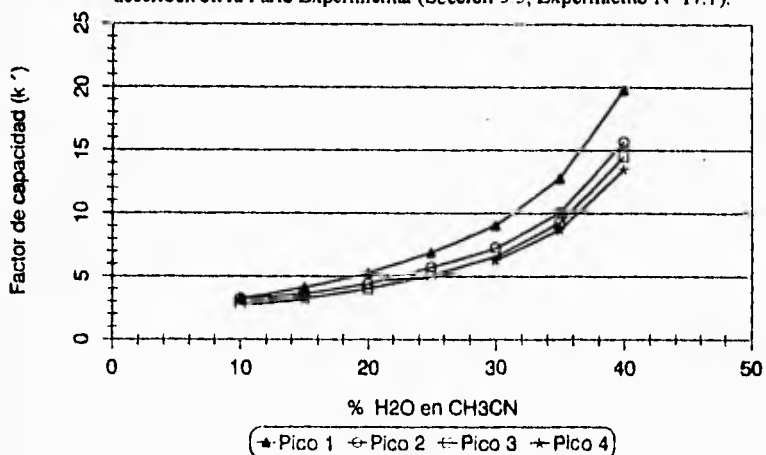


Figura 43.0 Relación entre los factores de capacidad (k') de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃CN). Columna de fase reversa C18. Pico 1, tricolorina A; Pico 2, tricolorina B; Picos 3 y 4 constituyentes aún no caracterizados. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.1).

Discusión de Resultados

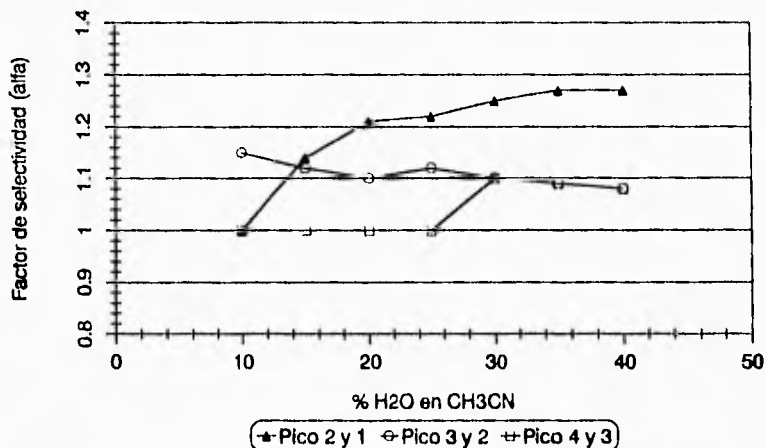


Figura 44.0 Relación entre los factores de selectividad (α) de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃CN). Columna de fase reversa C18. Picos 2 y 1, tricolorina B-tricolorina A; Picos 3 y 2, Constit. s/caract.-tricolorina B y; Picos 4 y 3, constituyentes aún no caracterizados. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.1).

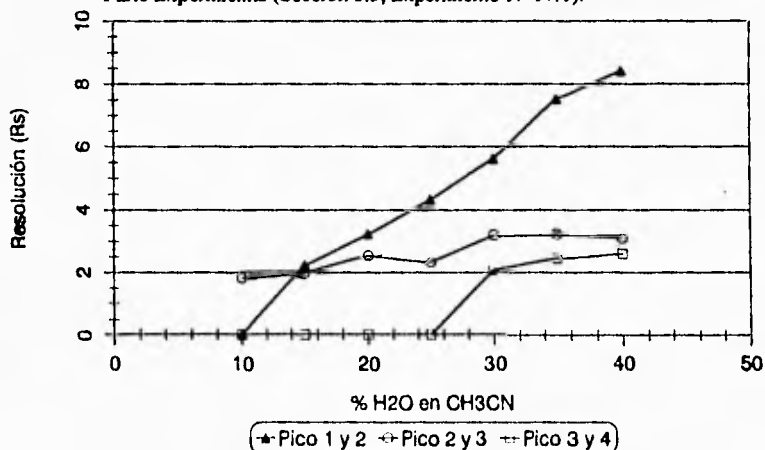


Figura 45.0 Relación entre la resolución (Rs) de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃CN). Columna de fase reversa C18. Picos 1 y 2, tricolorina A-tricolorina B; Picos 2 y 3, tricolorina B-Constit. s/caract. y; Picos 3 y 4, constituyentes aún no caracterizados. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento 17.1).

Discusión de Resultados

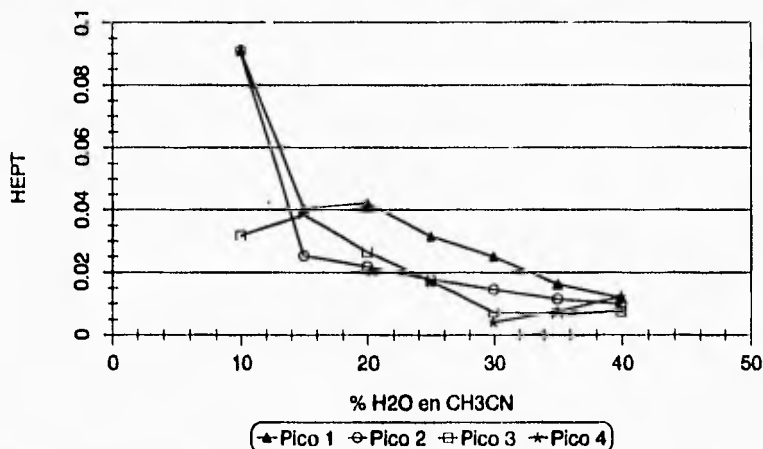


Figura 46.0 Relación entre la altura equivalente de platos teóricos (HEPT) de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃CN). Columna de fase reversa C₁₈. Pico 1, tricolorina A; Pico 2, tricolorina B; Picos 3 y 4 constituyentes aún no caracterizados. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.1).

Por otra parte, la comparación entre las figuras N° 48-52 y el cromatograma múltiple N° 3 ilustra los efectos inducidos por el cambio en el sistema de elución al utilizar mezclas binarias constituidas por CH₃OH-H₂O en lugar de CH₃CN en solución acuosa en los análisis en fase reversa C₁₈. Este cambio, representa un ahorro en el consumo de disolventes puesto que el metanol acuoso resultante puede ser recuperado, secado y, reciclado casi en su totalidad, lo cual no sucede con el acetonitrilo acuoso debido a la formación de una mezcla azeotrópica (CH₃CN-H₂O; 83.7:16.3) con un punto de ebullición de 76.5 °C (Weast, 1969-70). La anterior serie de análisis permitió visualizar que a partir del 6 % de H₂O en CH₃OH se inició la separación de los constituyentes, obteniéndose con esto diferentes tiempos de retención (T_r) para cada uno de ellos y, por lo tanto, también factores de capacidad (k') definidos. La representación gráfica de los parámetros cromatográficos permitió seleccionar las mejores condiciones de análisis que resultaron ser las ilustradas en el Cromatograma múltiple N° 3, ensayo N° 6 (90% MeOH, con un valor de rango (R_k) de 1.19). Este ensayo permitió obtener valores globales mayores para la eficiencia de separación de la mezcla problema mediante el empleo de la columna de fase reversa enlazada C₁₈ en comparación con las restantes mezclas binarias (MeOH- H₂O) utilizadas como fase móvil para este mismo soporte, por último mucho menores en comparación con el experimento en donde se utilizó

Discusión de Resultados

CH₃CN acuoso como fase móvil; es decir, se obtuvieron globalmente mayores valores de HEPT y valores menores de R_S consecuencia del cambio a MeOH acuoso. El (HEPT) para los tres constituyentes detectados con un T_r de 26.6 min (Pico 1), 24.1 min (Pico 2), 23.1 min (Pico 3) fue de (250/8560), (250/14890) y (250/78400), respectivamente. La selectividad (α) correspondió a 1.13 (Pico 2/Pico 1) y 1.05 (Pico 3/Pico 2) entre cada uno de estos componentes. Estos valores son muy semejantes a los obtenidos en la columna CN. Sin embargo, este análisis permitió la obtención de valores menores para (k') es decir 4.78 (Pico 1), 4.23 (Pico 2) y 4.02 (Pico 3). Por lo tanto, estos valores repercuten en una pobre resolución (R_s) 2.57 para los componentes mayoritarios (Pico 1/Pico 2) con T_r de 26.6 y 24.1 min y (R_s) 1.78 para los componentes (Pico 2/Pico 3) con T_r de 24.1 y 23.1 min, respectivamente. El tiempo necesario para efectuar cada análisis es menor a 80 min, con un valor de rango correspondiente a (R_r) 1.38. Debido a la resolución parcial de la mezcla problema resultado del cambio en selectividad (α) no se procedió con el escalamiento de estas condiciones cromatográficas a nivel preparativo. El análisis mediante "ratio plotting" (ver Parte Experimental, Sección 3.6, experimento 21, Figura N° 26) demostró la heterogeneidad cromatográfica para los picos resultantes con T_r 26.6 (Pico 1), T_r 24.1 (Pico 2) y 23.1 min (Pico 3). Por lo tanto, estos resultados reflejaron una disminución global en la eficiencia de separación (HEPT) como una consecuencia del aumento de la viscosidad de la fase móvil MeOH/H₂O vs. CH₃CN/H₂O. La figura N° 47 muestra la eficiencia (N) respecto al cambio de la velocidad de flujo en los sistemas binarios que con mayor frecuencia se utilizan como fase móvil en HPLC de fase reversa. Como una primera aproximación, el aumento en la (viscosidad, η) de la fase móvil tendrá como consecuencia una disminución en la eficiencia cromatográfica (Waters Developing HPLC separations; s/año).

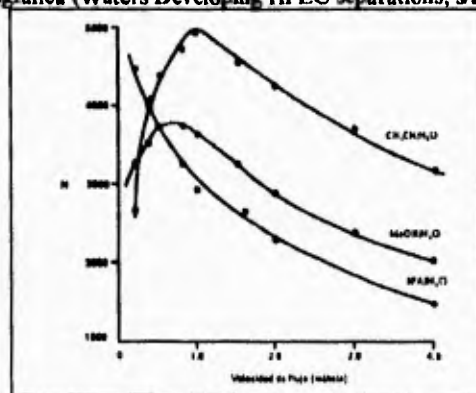
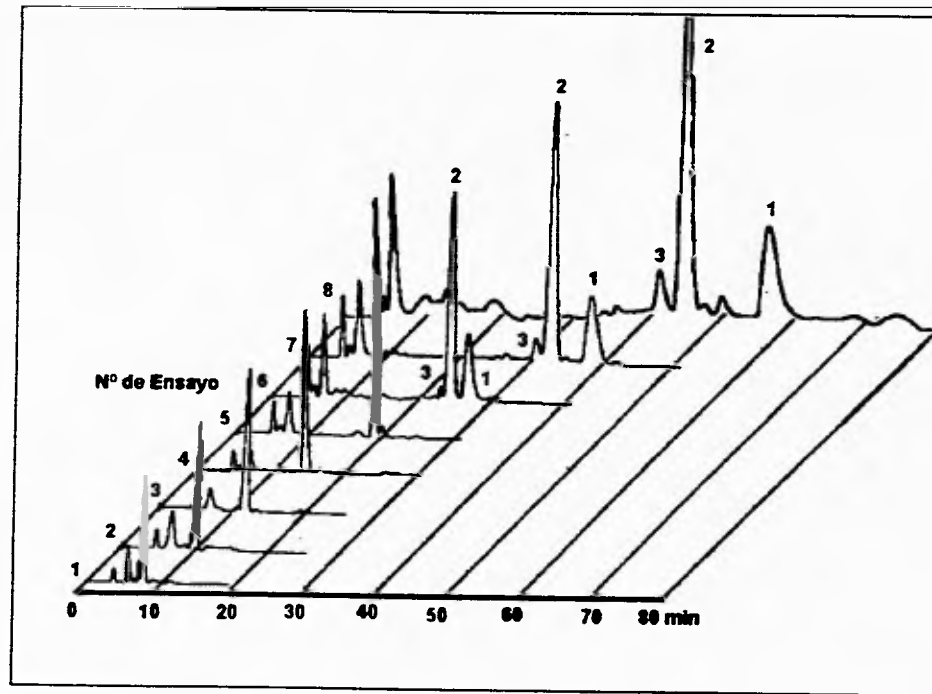


Figura 47.0 Relación entre la eficiencia cromatográfica (N) y la velocidad de flujo de distintas fases móviles en la HPLC de fase reversa.



Cromatograma múltiple N° 3.0. Resumen de los análisis más importantes para el crudo resinoso total de *Ipomoea tricolor* recopilados en el transcurso de la optimización de las condiciones cromatográficas analíticas. Condiciones de análisis: Columna: 4.6 · 250 mm. fase reversa enlazada-C₁₈ (5 μm); velocidad de flujo total: 0.5 ml/min; fase móvil: CH₃OH acuoso, 8) 86 % 7) 88 % 6) 90 % 5) 92 % 4) 94 % 3) 96 % 2) 98 % 1) 100 %; detectores: UV-visible; longitud de onda: 216 nm; volumen de la línea de inyección: 10 μl; temp.: 25 °C; concentración: 20 μg/μl. Pico 1, Tricolorina A; Pico 2, Tricolorina B.

Discusión de Resultados

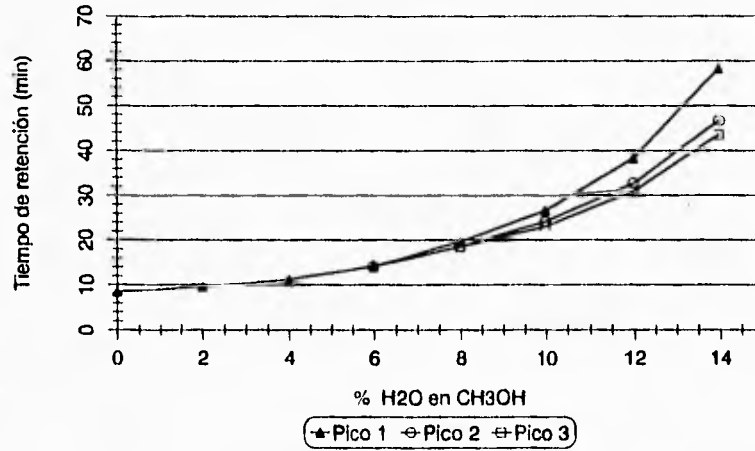


Figura 48.0 Relación entre el tiempo de retención de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃OH). Columna de fase reversa C18. Pico 1, tricolorina A; Pico 2, tricolorina B y; Pico 3, constituyente aún no caracterizado. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.4).

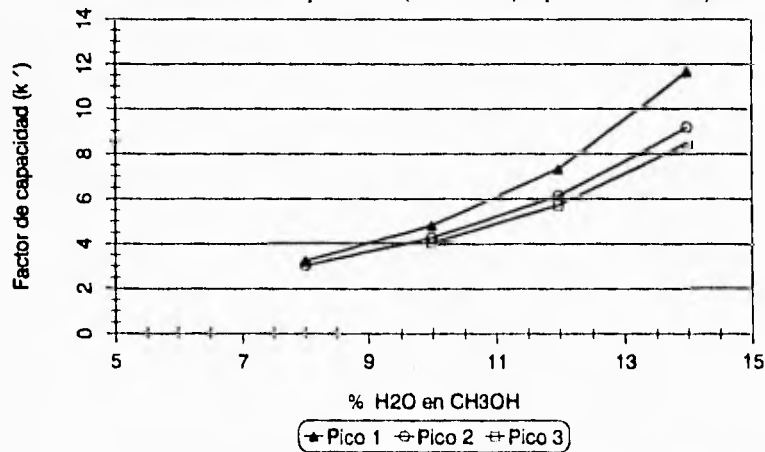


Figura 49.0 Relación entre el factor de capacidad (k') de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃OH). Columna de fase reversa C18. Pico 1, tricolorina A; Pico 2, tricolorina B y; Pico 3, constituyente aún no caracterizado. Las condiciones instrumentales se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.4).

Discusión de Resultados

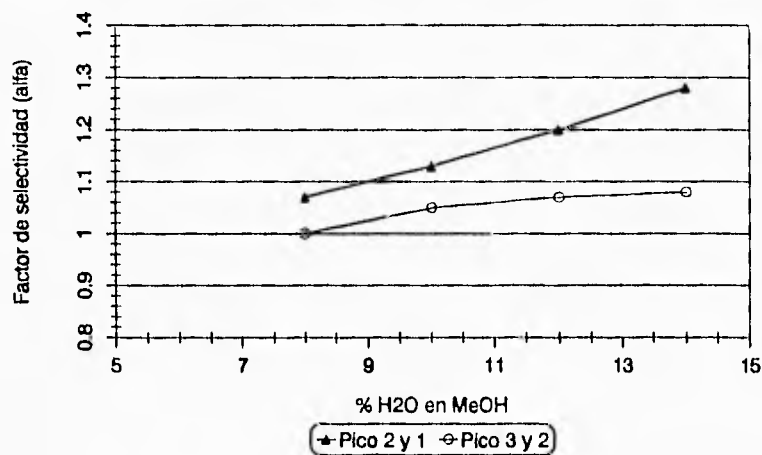


Figura 50.0 Relación entre el factor de selectividad (α) de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃OH). Columna de fase reversa C18. Picos 2 y 1, tricolorina B-tricolorina A; Picos 3 y 2, Constit. s/caract.-tricolorina B. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.4).

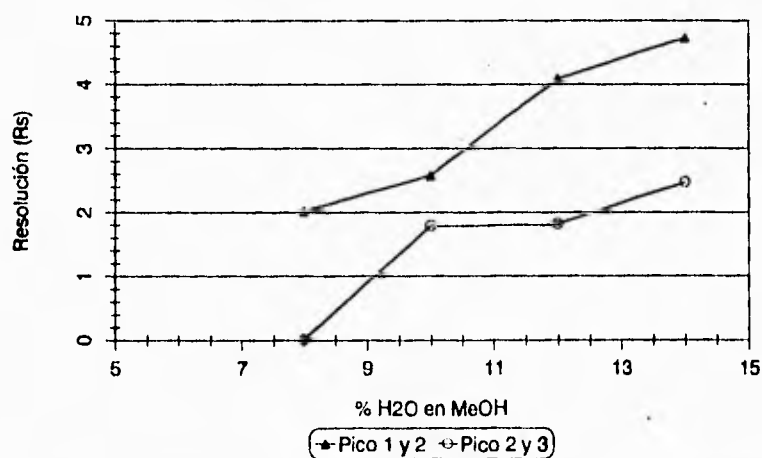


Figura 51.0 Relación entre la resolución (R_s) de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃OH). Columna de fase reversa C18. Picos 1 y 2, tricolorina A-tricolorina B; Picos 2 y 3, tricolorina B-Constit. s/caract. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.4).

Discusión de Resultados

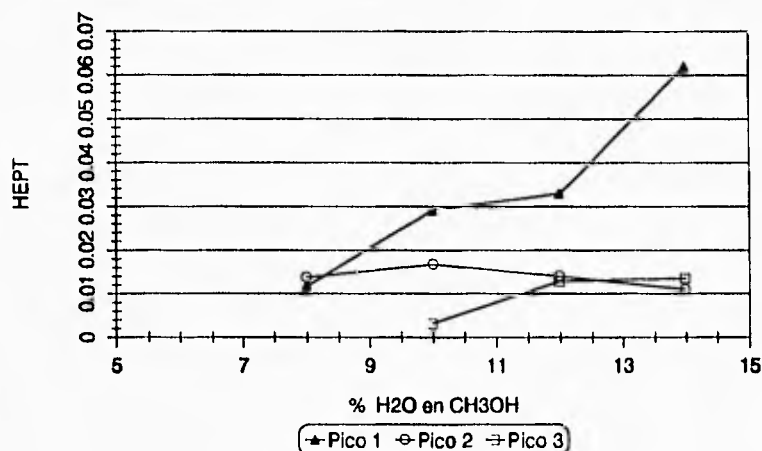
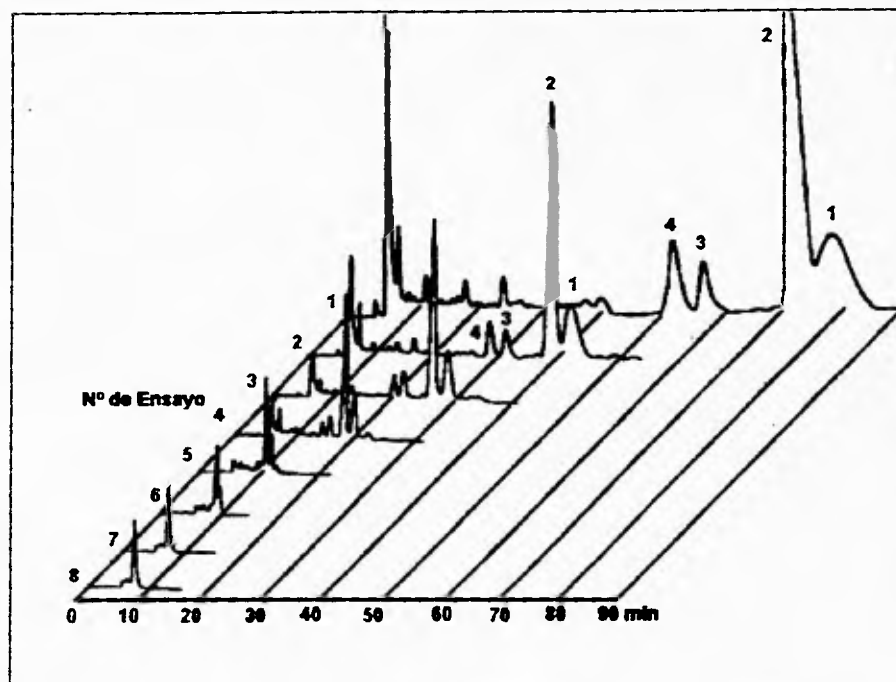


Figura 52.0 Relación entre la altura equivalente de platos teóricos (HEPT) de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (H₂O-CH₃OH). Columna de fase reversa C18. Pico 1, tricolorina A; Pico 2, tricolorina B y; Pico 3, constituyente aún no caracterizado. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.4).

Por otra parte, la comparación entre las Figuras N° 53-57 y el cromatograma múltiple N° 4 generado al utilizar la columna de fase moderadamente polar enlazada NH₂ permitió concluir en primera instancia que a partir de un 88 % CH₃CN en H₂O se logra la resolución de la muestra problema obteniéndose para cada uno de los constituyentes tiempos de retención y factores de capacidad (k') definidos. La representación gráfica de los parámetros cromatográficos permitió seleccionar las mejores condiciones de elución que resultaron ser las ilustradas en el Cromatograma múltiple N° 4, ensayo N° 4 (93 % CH₃CN, (R_k) 1.52). Este ensayo permitió establecer los valores de máxima eficiencia en la separación de la muestra problema mediante el empleo de la columna de fase moderadamente polar enlazada NH₂ operando como fase reversa; en comparación con las restantes mezclas binarias CH₃CN-H₂O empleadas como la fase móvil en este mismo soporte cromatográfico. El (HEPT) para los cuatro constituyentes detectados con un T_r de 27.9 min (Pico 1), 25.3 min (Pico 2), 21.1 min (Pico 3) y 19.6 min (Pico 4) fue de (300/7707), (300/16697), (300/14800) y (300/14820), respectivamente. La selectividad (α) correspondió a 1.12 (Pico 2/Pico 1), 1.17 (Pico 3/Pico 2) y 1.11 (Pico 4/Pico 3), entre cada uno de estos componentes. El factor de capacidad (k') correspondió a 6.54 (Pico 1), 5.83 (Pico 2), 4.73 (Pico 3) y 4.29 (Pico 4). Estos valores representan excelentes parámetros

Discusión de Resultados

para este factor ya que se encuentran entre el intervalo de 2-6 y teóricamente constituyen un buen balance entre el tiempo necesario para cada análisis y la resolución obtenida (Waters Chromatography Handbook, 1993-1994). Los valores pequeños de (k') repercutieron en una mejor resolución (R_s) 2.5 para los componentes mayoritarios (Pico 1/Pico 2) con T_r de 27.9 min (Pico 1) y 25.3 min (Pico 2); así como (R_s) 5.13 para los componentes (Pico 3/Pico 4) con T_r 21.1 min (Pico 3) y T_r 19.6 (Pico 4). Sin embargo, este incremento en la resolución contribuyó al aumento en el tiempo necesario para cada realización de cada análisis (90 min, (R_k) 1.53). Los factores que influyeron de manera decisiva para continuar con el escalamiento a nivel preparativo de esta separación fueron en primer lugar la resolución total obtenida de la mezcla problema ya que el análisis mediante "ratio plotting" (ver Parte Experimental, Sección 3.6, Figura N° 27) demostró la homogeneidad cromatográfica de cada uno de los picos resultantes.



Cromatograma múltiple N° 4.0. Resumen de los análisis más importantes para el crudo resinoso total de *Ipomoea tricolor* recopilados en el transcurso de la optimización de las condiciones cromatográficas analíticas. Condiciones de análisis: Columna: 3.9 × 150 mm, fase moderadamente polar enlazada-NH₂ (10 μm); velocidad de flujo total: 0.5 ml/min; fase móvil: CH₃CN acuoso, 1) 100 % 2) 95 % 3) 94 % 4) 93 % 5) 92 % 6) 90 % 7) 88 % 8) 86 %; detectores: UV-visible; longitud de onda: 216 nm; lámpara: deuterio; sensibilidad: 0.10 A.U.F.S.; volumen de la línea de inyección: 10 μl; temp.: 25 °C; concentración: 20 μg/μl. Pico 1, Tricolorina A; Pico 2, Tricolorina B.

Discusión de Resultados

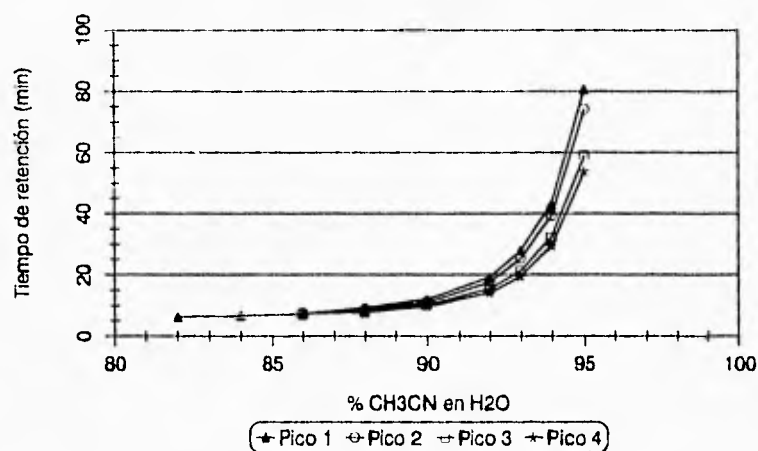


Figura 53.0 Relación entre el tiempo de retención de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (CH3CN-H2O). Columna de fase moderadamente polar enlazada NH2. Pico 1, tricolorina A; Pico 2, tricolorina B; Picos 3 y 4, constituyentes aún no caracterizados. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.2).

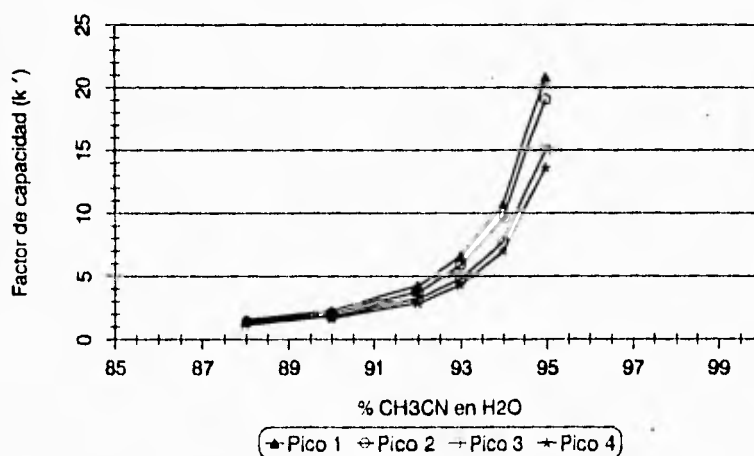
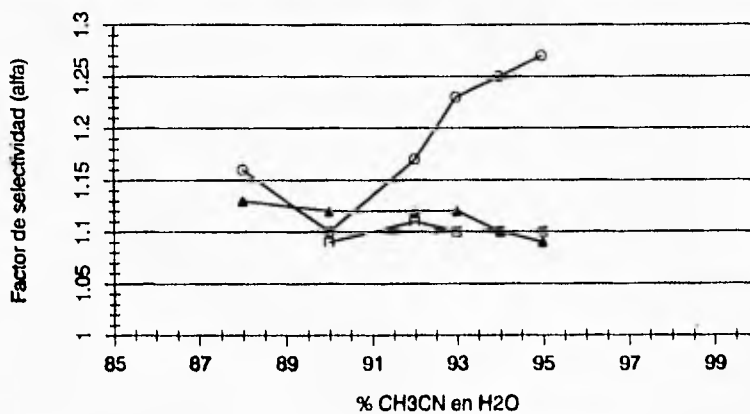


Figura 54.0 Relación entre el factor de capacidad (k') de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (CH3CN-H2O). Columna de fase moderadamente polar enlazada NH2. Pico 1, tricolorina A; Pico 2, tricolorina B; Picos 3 y 4, constituyentes aún no caracterizados. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.2).

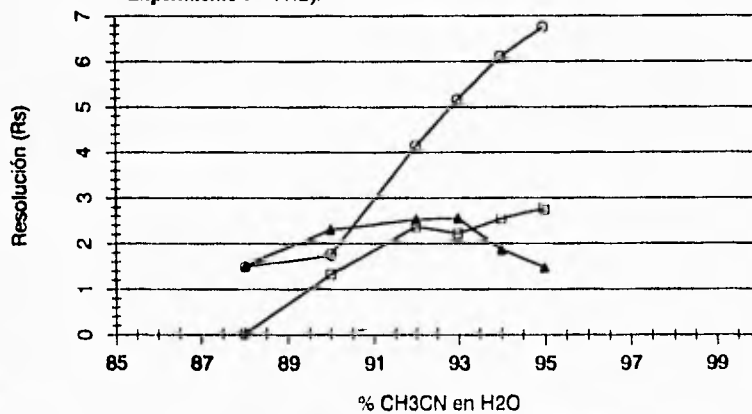
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Discusión de Resultados



▲ Pico 2 y 1 ○ Pico 3 y 2 □ Pico 4 y 3

Figura 55.0 Relación entre el factor de selectividad (α) de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (CH₃CN-H₂O). Columna de fase moderadamente polar enlazada NH₂. Picos 2 y 1, tricolorina B-tricolorina A; Picos 3 y 2, constit. s/caract.-tricolorina B y; Picos 4 y 3, constituyentes aún no caracterizados. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.2).



▲ Pico 1 y 2 ○ Pico 2 y 3 □ Pico 3 y 4

Figura 56.0 Relación entre la resolución (R_s) de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (CH₃CN-H₂O). Columna de fase moderadamente polar enlazada NH₂. Picos 1 y 2, tricolorina A-tricolorina B; Picos 2 y 3, tricolorina B-Constit. s/caract. y; Picos 3 y 4, constituyentes aún no caracterizados. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.2).

Discusión de Resultados

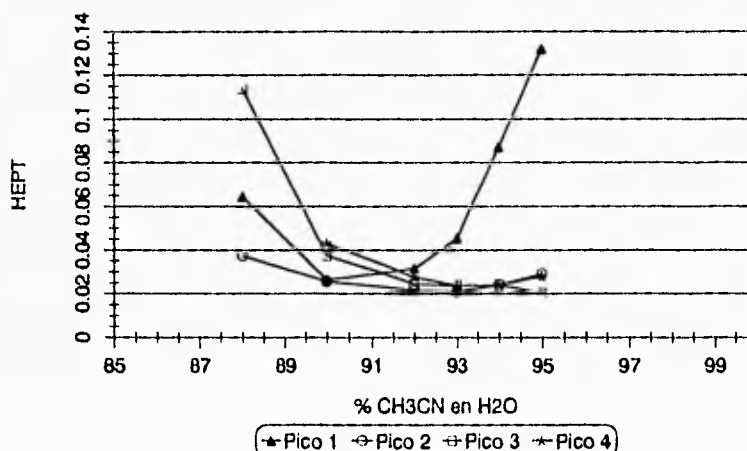


Figura 57.0 Relación entre la altura equivalente de platos teóricos (HEPT) de los constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea tricolor* y la polaridad del sistema de elución (CH₃CN-H₂O). Columna de fase moderadamente polar enlazada NH₂. Pico 1, tricolorina A; Pico 2 tricolorina B; Picos 3 y 4, constituyentes aún no caracterizados. Las condiciones instrumentales para el desarrollo de los cromatogramas se describen en la Parte experimental (Sección 3.5, Experimento N° 17.2).

4.2.2.3 Análisis para la columna de fase normal-adsorción

Por otra parte, el análisis numérico de los ensayos realizados en columnas de gel de sílice sin recubrimiento (ver Parte Experimental, Sección 3.5, experimento 17.5) no produjo ningún resultado satisfactorio. La mayoría de estos ensayos produjeron una pobre interacción de la muestra problema con la fase estacionaria; puesto que la mezcla total aparentemente eluye en el volumen muerto del sistema cromatográfica (V_0). A pesar, de haber disminuido la fuerza de elución de la fase móvil hasta casi una proporción de 100-0 % CHCl₃- MeOH.

4.2.2.4 Justificación de los parámetros químicos y mecánicos empleados en la optimización de la separación

Los parámetros que dan origen a la configuración y tipo de la columna cromatográfica de HPLC, se eligieron con base en la experiencia, factibilidad de aplicación, disponibilidad y costo. En este sentido, el objetivo fue unificar lo mejor posible al grupo de columnas preseleccionadas y, de esta manera, eliminar contribuciones generadas por el tipo de empaque y configuración de la columna (ver Tabla N° 4).

Discusión de Resultados

Grupo funcional	Tamaño de partícula	Tamaño de Poro	Forma de la partícula	Carga de Carbón	Recubrimiento final "Endcapped"	Dimensiones (d.i. × L)
C ₁₈	5 μm	80 Å	Esférica	N/R	No	4.6 × 250 mm
C ₁₈	10 μm	60 Å	Irregular	N/R	No	21.2 × 250 mm
CN	10 μm	125 Å	Irregular	6 %	Sí	3.9 × 150 mm
CN	10 μm	125 Å	Irregular	6 %	Sí	7.8 × 300 mm
NH ₂	10 μm	125 Å	Irregular	3.5 %	No	3.9 × 300 mm
NH ₂	10 μm	125 Å	Irregular	3.5 %	No	19 × 150 mm
Sílica	10 μm	125 Å	Irregular	N/R	No	3.9 × 300 mm
Sílica	10 μm	60 Å	Irregular	N/R	No	21.2 × 250 mm

N/R= no reportado en la literatura.

Tabla 4.0 Estandarización de los parámetros que describen a las columnas analíticas y preparativas utilizadas en cada uno de los análisis de optimización del método.

Discusión y comentarios particulares sobre los parámetros de configuración de las columnas cromatográficas:

Excepto el empaque tipo C₁₈, Spherisorb (Phase Separations™) todos los demás son de tipo μBondapak (Millipore™). Este empaque es el de mayor uso en el mundo aparentemente por tener capacidades exclusivas de separación debido entre otras cosas a su forma de partícula irregular, pero quizás hubiera sido mejor el empleo de soportes de forma esférica para evitar la disgregación del soporte de la columna en partículas finas (The Waters Chromatography Handbook., 1993-1994; Snyder, 1988). Las medidas de las columnas analíticas (4.6 × 250 mm y 3.9 d.i × 150 mm) son exclusivas para los casos de C₁₈ y CN respectivamente. Todas las demás columnas poseen medidas estándar de (3.9 d.i × 300 mm). Las columnas con longitud de 300 mm poseen algunas ventajas como; una excelente resolución y alta capacidad de carga; mientras que las columnas con longitud de 150 mm permiten alcanzar altas velocidades de análisis y una excelente resolución.

Por otra parte, las columnas con diámetro interno estándar de 3.9 mm son comúnmente usadas en cromatografía de líquidos a nivel analítico; las columnas con diámetro interno de 4.6 mm pertenecen a la generación anterior de columnas analíticas debido al incremento del efecto de dilución del pico. Todos los empaques poseen idéntico

tamaño de partícula 10 μm , igual tamaño de poro 125 Å , así como forma irregular "exceptuando a la columna tipo C_{18} "; finalmente el endcapping fue exclusivo en el empaque con funcionalidad CN.

NOTA 2: La finalidad de los comentarios anteriores, pretende hacer referencia a los problemas que se tuvieron para dar uniformidad a los parámetros que describen la configuración de las columnas cromatográficas. De esta manera se eliminaron las contribuciones de éstos parámetros y, las diferencias antes citadas, son resultado de las especificaciones propias que guarda cada fabricante con respecto a un determinado tipo de columnas.

4.2.3 Escalamiento a nivel preparativo

4.2.3.1 Método de sobrecarga de la columna y corte del núcleo

La capacidad de una separación a nivel preparativo se incrementa mediante la sobrecarga de la columna y corte del núcleo. Estas técnicas eliminan la contaminación causada por componentes minoritarios eluidos antes y después del pico de interés (Figura N° 58). Sin embargo, el método de sobrecarga de la columna y corte del núcleo tiene como desventajas; la pérdida (merma) de una cierta cantidad del componente mayoritario, la cual se obtiene en forma de una fracción mezclada. Pese a ello, la pureza final del componente mayoritario resulta ser excelente.

Para proceder con el escalamiento a nivel preparativo de las dos mejores condiciones analíticas obtenidas en las columnas C_{18} y NH_2 se realizaron experimentos adicionales con las dos mejores condiciones a nivel analítico. La única variable manipulada en estos experimentos fue la cantidad de muestra problema introducida en el sistema cromatográfico. La finalidad de estos ensayos fue la obtención de un adecuado grado de sobrecarga. Por lo tanto, se procedió a determinar la cantidad máxima de muestra problema que podía ser inyectada a la columna sin comprometer el valor de la resolución de la separación cromatográfica en cuestión; es decir, ocasionar una disminución apreciable en la resolución (R_s) de los constituyentes individuales de la resina en estudio. Estos ensayos permitieron obtener los valores máximos de carga y, con ellos se efectuaron los cálculos teóricos que establecieron las condiciones del sistema cromatográfico a nivel preparativo (ver Parte Experimental, Sección 3.7.2). El procedimiento para sobrecargar la columna involucró la selección de técnicas que permiten aumentar la carga de la muestra problema mediante el aumento de la cantidad en masa del soluto en un volumen de inyección predeterminados o bien el incremento gradual del volumen de inyección para una misma solución. Este último método posee la ventaja de su fácil manipulación y, por lo tanto, fue seleccionado como el

idóneo. La carga máxima para la muestra problema correspondió a 5 mg para el análisis en la columna C₁₈ y de 4.2 mg para la columna NH₂.

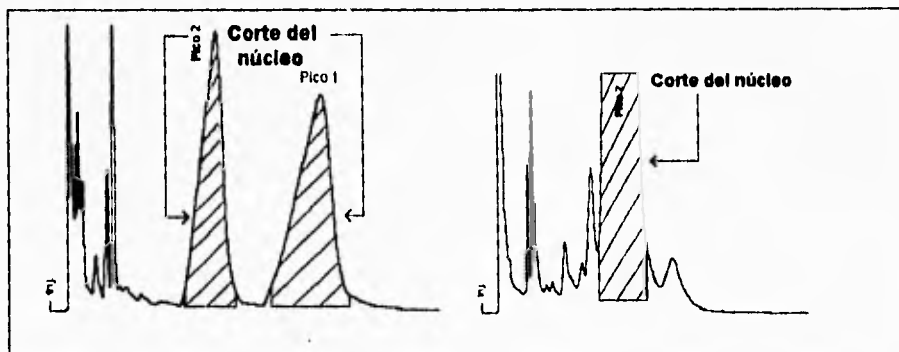


Figura 58.0 Separación de las tricolorinas A y B mediante las técnicas de sobrecarga de la columna y corte del núcleo en HPLC a nivel preparativo. Columna de fase reversa enlazada C₁₈. Pico 1, tricolorina A, T_r 36.9 min; Pico 2, tricolorina B, T_r 30.2 min.

4.2.3.2 Método del rasurado y reciclado de picos

De manera adicional, se utilizó la técnica cromatográfica de rasurado y reciclado de picos para efectuar la separación total de la resina en estudio en sus componentes individuales. Después de la optimización de las condiciones de separación analíticas y el escalamiento a nivel preparativo, se procedió a someter algunas de las fracciones semipurificadas a esta metodología. De esta manera, la repurificación mediante rasurado y reciclado de picos para los componentes mayoritarios, así como los minoritarios obtenidos en la fracción de desecho del método de sobrecarga de la columna y corte del núcleo principalmente permitió la obtención de los compuestos mayoritarios (tricolorina A y B) con un grado de pureza del 100 % (Figura N° 59).

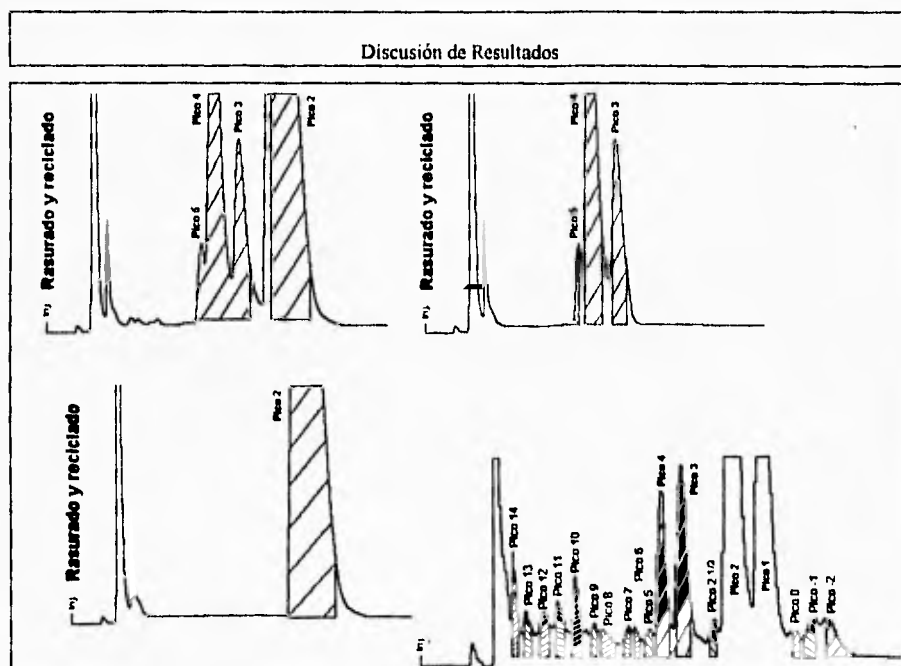


Figura 59.0 Separación de las tricolorinas A y B mediante las técnicas de rasurado y reciclado de picos en HPLC a nivel preparativo y extrapolación teórica hacia el aislamiento de los componentes minoritarios. Columna de fase moderadamente polar enlazada NH_2 . Pico 1, tricolorina A, T_r 27.9 min; Pico 2, tricolorina B, T_r 25.3 min; Picos adicionales, Compuestos aún no caracterizados. Zona del rasurado; Zona del reciclado.

4.2.4 Recuperación del material purificado

El procedimiento seleccionado para la recuperación cuantitativa se basó en la evaporación a sequedad de la mezcla de disolventes orgánicos empleada como fase móvil ($\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$). De esta manera, se logró disminuir al máximo las pérdidas de material ocasionadas durante su manipulación. Debido a que este método involucra la evaporación total del agua, resulta ser sumamente laborioso si se compara con otras técnicas de recuperación de la muestra en donde las pérdidas del material son más significativas. Por ejemplo, una alternativa consistió en evaporar únicamente la fase orgánica de la mezcla de disolventes y realizar (N) extracciones sucesivas de la fase acuosa durante un tiempo (X) con un disolvente orgánico como el AcOEt.

4.2.5 Análisis de las sustancias obtenidas

El Pico N° 1, tricolorina A, y el Pico N° 2, tricolorina B, representan los constituyentes mayoritarios presentes en el crudo resinoso total. La integración del área bajo la curva de los cromatogramas generados empleando las condiciones que proporcionaron la máxima resolución de la mezcla problema, permitió calcular la abundancia relativa para cada uno de estos constituyentes (C₁₈; Pico 1, tricolorina A, T_r 36.9 min, 26.56 %, Pico 2, tricolorina B, T_r 30.2 min, 49.49 %; NH₂; Pico 1, tricolorina A, T_r 27.9 min, 17.23 %, Pico 2, tricolorina B, T_r 25.3 min, 40.79 %). El aislamiento en cantidad suficiente de cada uno de estos compuestos (cientos de mg), permitió efectuar experimentos adicionales para demostrar su alto grado de pureza así como la integridad cromatográfica para las tricolorinas A y B. Por otra parte, la purificación de los constituyentes minoritarios de la resina de *I. tricolor* puede lograrse en cantidad suficiente (decenas de mg) para efectuar su elucidación estructural mediante la aplicación de la metodología cromatográfica desarrollada y que evidentemente involucrará un esfuerzo mayor de acuerdo al valor del porcentaje de la abundancia relativa de c/u de los constituyentes (ver Sección 4.0.2.3, Figura N° 59 parte inferior), o bien, partiendo de otra fracción de la columna original rica en los componentes minoritarios más polares (ver Parte Experimental, Sección 3.1, Figura N° 3). En este sentido, el método propuesto probó su eficacia en la purificación de los constituyentes mayoritarios presentes en el crudo total. La secuencia final de purificación en HPLC preparativo fue monitoreada en varias etapas de repurificación de la tricolorina A y la tricolorina B. Los cromatogramas (ver Parte Experimental, Sección 3.7.2, Figura N° 34), muestran a la tricolorina A con un T_r = 27.9 min, y a la tricolorina B con un T_r = 25.3 min; ambas con una pureza del 100 %, misma que fue confirmada mediante el registro de sus correspondientes espectros de Resonancia Magnética Nuclear (ver Espectros del Anexo I).

4.2.6 Estructura de la tricolorina A

El primer componente mayoritario aislado de las partes aéreas de *Ipomoea tricolor* se denominó con el nombre de tricolorina A {1} y, las propiedades químicas y, espectroscópicas correspondieron a las descritas previamente para este mismo compuesto (Pereda-Miranda, 1994).

4.2.7 Estructura del ácido tricolórico

El ácido glicosídico generado a partir de la saponificación de la tricolorina B; se denominó con el nombre de ácido tricolórico {3} y, las propiedades químicas y, espectroscópicas correspondieron a las descritas previamente para este mismo compuesto (Pereda-Miranda, 1994).

5.0 CONCLUSIONES

A) El presente trabajo se inició con la finalidad de estandarizar un método analítico mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia que permitiera la obtención de la máxima resolución de los constituyentes individuales de la glicorresina de *Ipomoea tricolor*. En este sentido, la estrategia para efectuar el escalamiento a nivel preparativo de las condiciones analíticas de separación contempló los siguientes aspectos: 1.- la utilización de un método adecuado para el pretratamiento de la muestra problema 2.- el desarrollo de una metodología a nivel analítico para la máxima separación de la muestra problema 3.- el empleo de un método preciso "full loop loading" para efectuar la inyección de la muestra problema 4.- la estimación experimental de la carga máxima soportada en una columna analítica y la extrapolación a nivel preparativo 5.- la sobrecarga de la columna, el corte de fracciones y el reciclamiento de picos dobles y triples 6.- la adaptación de un método para la recuperación cuantitativa de la muestra.

El pretratamiento inicial de la muestra problema se realizó mediante el empleo de la cromatografía en columna flash; de esta manera, se obtuvo una fracción polar de glicósidos libre de contaminantes cuya resolución se efectuó mediante HPLC. Este primer tratamiento permitió obtener fracciones semipurificadas de los componentes mayoritarios de interés, la tricolorina A y la tricolorina B y, al mismo tiempo se consiguió la eliminación de los componentes de interferencia de mayor polaridad presentes en las fracciones de partida. A continuación, se probó el efecto provocado sobre la resolución de la muestra problema mediante el empleo en HPLC de las columnas de fase normal-adsorción (gel de sílice), en fase poco polar enlazada C₁₈, CN y finalmente en fase moderadamente polar enlazada NH₂ operando en condiciones de fase reversa. De esta manera, se estandarizaron las condiciones a nivel analítico que produjeron una resolución máxima de la muestra problema empleando condiciones de fase reversa que incluyeron:

1) Columna: 4.6 × 250 mm, fase reversa enlazada-C₁₈ (5 μm); velocidad de flujo total: 0.5 ml/min; fase móvil: CH₃CN-H₂O (7:3); detector: UV-visible ; longitud de onda: 216 nm; sensibilidad: 0.1 A.U.F.S.; volumen de la línea de inyección: 10 μl; temp.: 25 °C; concentración: 20 μg/μl.

2) Columna: 3.9 × 150 mm, fase moderadamente polar enlazada-NH₂ (10 μm); velocidad de flujo total: 0.5 ml/min; fase móvil: CH₃CN-H₂O (93:7); detector: UV-visible; longitud de onda: 216 nm; lámpara: deuterio; sensibilidad: 0.1 A.U.F.S.; volumen de la línea de inyección: 10 μl; temp.: 25 °C; concentración: 20 μg/μl.

Conclusiones

La purificación a nivel preparativo de los constituyentes individuales mayoritarios de la glicorresina de *I. tricolor*, la tricolorina A (C_{18} T_r 36.9 min; NH_2 T_r 27.9 min) y tricolorina B (C_{18} T_r 30.2 min; NH_2 T_r 25.3 min), se efectuó mediante una secuencia de purificación en fase reversa que involucró una primera purificación en una columna C_{18} seguida de un segundo proceso en una columna NH_2 . En un inicio se empleó el método de sobrecarga de la columna y corte del núcleo para el escalamiento a nivel preparativo en las siguientes condiciones: Columna: 21.2 × 250 mm, fase reversa enlazada- C_{18} (10 μ m); velocidad de flujo total: 10.6 ml/min; fase móvil: CH_3CN-H_2O (7:3); detector: UV-visible; longitud de onda: 216 nm; sensibilidad: 0.1 A.U.F.S.; volumen de la línea de inyección: 500 μ l; temp.: 25 °C; concentración: 212 μ g/ μ l. Por otra parte, el método de rasurado y reciclado empleó principalmente las siguientes condiciones: Columna: 19 × 150 mm, fase moderadamente polar enlazada- NH_2 (10 μ m); velocidad de flujo total: 5.9 ml/min; fase móvil: CH_3CN-H_2O (93:7); detector: UV-visible; longitud de onda: 216 nm; sensibilidad: 0.1 A.U.F.S.; volumen de la línea de inyección: 500 μ l; temp.: 25 °C; concentración: 100 μ g/ μ l. De esta manera, se eliminó la contaminación debida a los componentes eluidos antes y después de cada pico de interés y al mismo tiempo permitió obtener muestras (cientos de mg) de la tricolorina A y B con una pureza del 100 %.

B) La presente investigación demostró la nula resolución cromatográfica que se obtiene en la fase normal-adsorción (gel de sílice) y, al mismo tiempo, la descomposición que sufren las glicorresinas promovida por la gel de sílice cuando se utilizó como soporte para la cromatografía preparativa en columna o en capa fina. Así mismo, se demostró la ineficacia de los métodos tradicionales como la cromatografía en columna abierta o flash y la CCF a nivel preparativo para la resolución de las resinas glicosídicas de las Convolvuláceas, debido a la poca resolución (R_s) que presentan estos métodos.

C) El empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia constituye la alternativa de análisis para la resolución total de las complejas mezclas de glicolipidos presentes en las resinas de las Convolvuláceas. Este trabajo constituye la primera descripción del empleo de una columna de fase moderadamente polar enlazada amino y que permite efectuar la máxima resolución de la glicorresina de *Ipomoea tricolor* en sus constituyentes individuales mediante el empleo de un modo cromatográfico de fase reversa. A pesar de que la funcionalidad NH_2 es un grupo de uso común que se emplea para el análisis de una amplia variedad de compuestos polares relacionados con los oligosacáridos (Waters Chromatography Handbook, 1993-1994; Chaplin y Kennedy, 1986 y Macherey-Nagel Applications, 1993), su uso no se ha descrito para efectuar la separación de glicorresinas de las Convolvuláceas. La

Conclusiones

posible desventaja del empleo de este tipo de columna radica en el deterioro de ésta con el uso prolongado y que se refleja en la disminución de su eficiencia, debido a la pérdida por hidrólisis de la fase enlazada; sin embargo este punto no representa ningún problema ya que se tienen que aplicar todos los cuidados pertinentes para dar un mayor tiempo de vida a la columna.

D) Los resultados derivados del desarrollo experimental descritos en la presente disertación permitieron generar las siguientes recomendaciones para el desarrollo de una propuesta futura enfocada a la optimización de las condiciones instrumentales descritas en el presente trabajo. Estas recomendaciones incluirán la optimización del sistema de análisis cromatográfico (Colin y Salwa, 1993) mediante la aplicación de variables alternativas a la fuerza de elución y que son parámetros intrínsecos a la configuración de la columna, es decir los factores mecánicos y químicos (ver figura N° 60).

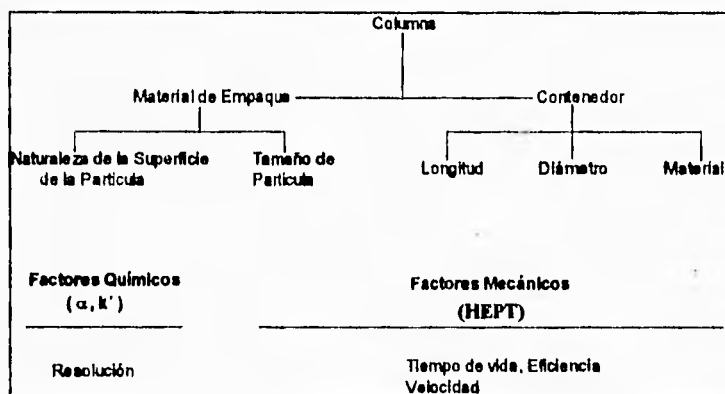


Figura 60.0 Factores químicos y mecánicos que conforman una columna de HPLC y su contribución a la optimización cromatográfica.

Los factores mecánicos que pueden ser modificados incluyen el tamaño de partícula del material de empaque y la longitud y el diámetro de la columna; estos factores afectan la eficiencia (HEPT), el grado de sensibilidad, la velocidad de separación y, de manera directa, la durabilidad de la columna. Por otra parte, los factores químicos, como la naturaleza de la superficie de la partícula seleccionada, afectan directamente a la resolución de la muestra mediante la modificación de la selectividad (α) y el factor de capacidad (k'). De esta manera, se puede proponer el cambio en el tamaño de poro de la columna NH_2 de 125 Å a 60 Å, y, por lo tanto, se aumentará la superficie de contacto de la fase adsorbente con la que

Conclusiones

la glicoresina interactuará y, teóricamente se obtendrá una mayor retención y, una mejor resolución. Para disminuir el consumo de disolventes, se recomienda la reducción en el tamaño de partícula y en la longitud de la columna. Esto provocará análisis rápidos con eficiencias idénticas a la generada con la columna de mayor longitud y de mayor tamaño de partícula, generando picos finos bien definidos. También, se podría trabajar de preferencia con columnas con carga de carbón mayor al 3.5 %, de forma de partícula esférica y recubiertas con endcapping. Con la finalidad de asegurar análisis cromatográficos reproducibles de columna a columna.

Una vez optimizado el sistema mediante la reconfiguración de la columna. También se podría desarrollar la separación mediante el empleo de técnicas alternativas, i.e., la cromatografía multidimensional por medio del acoplamiento de las columnas en serie ($C_{18} \rightarrow NH_2$ y $NH_2 \rightarrow C_{18}$), (Snyder, 1988; Mandal et al., 1991 y Yang et al., 1981). O bien, el desarrollo de un método de separación en columnas de α - y β -Ciclodextrina operando en condiciones de fase reversa (Armstrong y Jin, 1989; Armstrong y Demond, 1984), para todos los casos se propone desarrollar el método mediante análisis asistidos por computadora (Snyder, 1988) y siempre que sea posible deberá emplearse el perfil de elución en gradiente empleando preferentemente fases móviles binarias constituidas por CH_3CN-H_2O o por Acetona- H_2O y, en caso requerido por mezclas ternarias de estos disolventes. Sin que ello indique que imperativamente en el método final deba de emplearse un análisis en gradiente (Snyder, 1988). Esta selección de las mezclas de disolventes obedece a su bajo punto de ebullición (mezclas azeotrópicas), a la baja viscosidad η de sus soluciones y que en combinación con un incremento de la temperatura y quizás un aumento de la velocidad de flujo a 1.0 ml/min tendrá como consecuencia la generación de análisis de eficiencia mucho mayores (Snyder, 1988; Quattrochi et al., 1990). Para finalizar, la escasa bibliografía que describa con claridad el desarrollo de un método de análisis para la separación de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas de las Convolvuláceas es un reflejo de las enormes dificultades que se presentan durante la separación de estos productos naturales. Este inconveniente se ha puesto de manifiesto en publicaciones que describen la separación y la purificación parcial de los constituyentes de diversas resinas y en algunos ejemplos no se ha logrado la purificación total de los glicolípidos individuales como formas libres (Noda et al., 1992; Enriquez et al., 1991).

E) Las condiciones instrumentales de HPLC descritas en la literatura para la resolución de las resinas de las Convolvuláceas representan ejemplos individuales debido a la diversidad estructural, y diferencia en la polaridad de los glicolípidos individuales y, de esta manera, imposibilitan su aplicación general.

BIBLIOGRAFIA

Agrawal, P.K. (1992) NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, 10, 3307-3330.

Alltech (1991) *Manual of Chromatography*.

Anaya, A.L.; Calera, M.R.; Mata, R. y Pereda-Miranda, R. (1990) Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *J. Chem. Ecol.*, 16, 7, 2145-2152.

Armstrong, W.D., Jin, H.L. (1989) Evaluation of the liquid chromatographic separation of monosaccharides, disaccharides, trisaccharides, tetrasaccharides, deoxysaccharides and sugar alcohols with stable cyclodextrin bonded phase columns. *J. Chromatogr.*, 462, 219-232.

Armstrong, W.D., Jin, H.L. (1989) Liquid chromatographic separation of anomeric forms of saccharides with cyclodextrin bonded phases. *Chirality*, 1, 27-37.

Armstrong, W.D., Demond, W. (1984) Cyclodextrin Bonded Phases for the Liquid Chromatographic Separation of Optical, Geometrical and Structural Isomers. *J. Chromatogr.*, 22, 411-415.

Batley, M.; Redmond, J.W. y Tseng, A. (1982) Sensitive analysis of aldose sugars by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 253, 124-128.

Beckman Latinoamericana (s/año) *La cromatografía líquida de alta resolución*.

Beckman Latinoamericana, Expofarma (1995) *La cromatografía líquida de alta resolución, la adecuación y la verificación del sistema*.

Bergh, M.L.E.; Koppen, P.L. y Van den Eijden, D.H. (1983) High pressure liquid chromatography of isomeric oligosaccharides that form part of the complex-type carbohydrate chains of glycoproteins. *Carbohydr. Res.*, 117, 275-278.

Bieber, L.W., Alves da Silva filho, A., Corrêa Lima, R.M.O., De Andrade Chiappeta, A., Carneiro do Nascimento, S., de Souza, I.A., De Mélo, J.F. y Jürgen Veith, H. (1986) Anticancer and antimicrobial glycosides from *Ipomoea bahiensis*. *Phytochemistry* 25, 1077-1081.

Biermann, J.C.; Mc Ginnis, G.D. (1989) *Analysis of carbohydrate by GLC and MS*, capítulo 2, Press CRC, Inc., Boca ratón, Florida, U.S.A., 19-26.

Bibliografía

- Blanken, W.M.; Berg, M.L.; Koppen, P.L. y Van den Eijden, D.H. (1985) High-pressure liquid chromatography of neutral oligosaccharides: effects of structural parameters. *Anal. Bioch.*, 145, 322-330.
- Blumberg, K.; Liniere, F.; Pustilnik, L. y Bush, C.A. (1982) Fractionation of oligosaccharides containing N-acetyl amino sugars by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 119, 407-412.
- Boersma, A.; Lamblin, G.; Degand, P. y Poussel, P. (1981) Separation of complex mixture of oligosaccharides by HPLC on a bonded-primary amine packing using a linear-gradient solvent system. *Carbohydr. Res.*, 94, C7-C9.
- Chaplin, M.F.; Kennedy, J.F. (1986) Carbohydrate analysis a practical approach. Capítulos 1 y 2, CRL Press, Oxford, England, 3-54.
- Clark, W.S.; Kahn, M. y Mitra, A. (1978) Rapid Chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.*, 43, 14, 2923-2925.
- Colin, F.P.; Salwa, K. P. (1993) *Chromatography Today*, 2ª Imp. Elsevier Science Publisher, Netherlands, 453-458.
- Däppen, R.; Arm, H. y Meyer, R.V. (1986) Applications and limitations of commercially available chiral stationary phases for High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* 373, 1-20.
- Dawidar, A.M.; Winternitz, F. y Johns, S.R. (1977) Structure of Ipomine alkaloid from *Ipomoea muricata* Jacq. *Tetrahedron*, 33, 1733-1734.
- Deyl (1984) *Separation Methods*, capítulo 4.3 y 4.4, Elsevier Science Publishers B.V.
- Dua, K.V. y Bush, C.A. (1983) Identification and fractionation of human milk oligosaccharides by proton-nuclear magnetic resonance spectroscopy and reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 133, 1-8.
- Dubey, P.; Khare, N. y Gupta, C. (1982) A new flavonoid glycoside from the leaves of *Ipomoea fistulosa*. *Current Science*, 51, 7, 351-352.
- Eggert, F.M. y Jones, M. (1985) Measurement of neutral sugars in glycoproteins as dansyl derivatives by automated high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 333, 123.
- Enriquez, R.G.; Leon, I., Perez, F.; Walls, F.; Carpenter, K.A.; Puzzuoli, F.V. y Reynolds, W.F. (1991) Characterization, by two-dimensional NMR spectroscopy, of a complex tetrasaccharide glycoside isolated from *Ipomoea stans*. *Can. J. Chem.*, 70, 1000-1008.

Bibliografía

- Erma (1989) Refraction index detector Erc-7522 instruction manual, Tokyo, Japan.
- Gazdag, M.; Szepesi, G. (1989) Selection of High-Performance Liquid Chromatographic Methods in Pharmaceutical analysis IV^a Selection of most applicable separation system. J. of Chromatogr., 464, 279-288.
- Gazdag, M.; Szepesi, G. y Varga-Fábián, K. (1988) Selection of High-Performance Liquid Chromatographic Methods in Pharmaceutical analysis II^a Optimization for selectivity in normal-phase systems., 454, 95-107.
- Gazdag, M.; Szepesi, G. y Szelecki, E. (1988) Selection of High-Performance Liquid Chromatographic Methods in Pharmaceutical analysis I Optimization for selectivity in Reversed Phase Chromatography., 454, 83-94.
- Ghebregzabher, M.; Rufini, S.; Monaldi, B. y Lato, M. (1976) Thin-layer chromatography of carbohydrates. J. of Chromatogr., 127, 133-162.
- Goerz (1992) Manual Users flatbet recorder. 1-1, 8-1.
- Harrison, D.A.; Madhusudan, K.P. y Kulshreshtha, D.K. (1985) Structure of dichroside D, a fatty acid glycoside from *Ipomoea dichroa*. Carbohydr. Res., 143, 207-220.
- Hostettmann, K., Hostettmann, M. y Marston, A. (1986) Preparative Chromatography Techniques Applications in Natural Product Isolation. 1^a edic. Springer-Verlag, Berlin, 1-139.
- Isco (1986) Manual of applications liquid chromatography with the V⁴ detector.
- Isco, Bulletin. (1987) Troubleshooting HPLC. N° 49, 2^a edic.
- Isco (1988) Pump instruction manual model 2350.
- Isco (1989) Manual columns guide to installation, use, and maintenance.
- Isco (1991) Catalog of instruments for separation and analysis.
- Isco (1987) Tables and handbook of data for biological and physical scientists, 9^a edic.
- Isco (1989) V⁴, variable wavelength absorbance detector instruction manual.
- Isco (1989) Cygnet fraction collector instruction manual.
- Isco (1988) Chemresearch chromatographic data management/ system controller instruction manual, version 2.4.

Bibliografía

- Jenett-Siems, K.; Kaloga, M. y Eich, Eckart. (1993) Ipangulines, the first pyrrolizidine alkaloids from the convolvulaceae. *Phytochemistry*, 34, 2, 437-440.
- Kakehi, K. y Honda, S. (1985) Analysis of carbohydrates by GLC and MS; Capítulo 4, Silyl ethers of carbohydrates
- Khana, S.N. y Gupta, P.C. (1967) Structure of muricatin. *Phytochemistry*, 6, 735-739.
- Kogetsu, H.; Noda, N.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1991) Scamoin III-VI, resin glycosides of *Convolvulus scammonia*. *Phytochemistry*, 30, 3, 957-963.
- Lewis, B.A. y Smith, F. (1966) Sugars and Derivates. Capítulo X, 807-837.
- Lindsay, S. (1992) Instrumental methods of analysis, 2ª edic, John Willey & Sons, U.S.A., 207-252, 266-299 y 587-629.
- Liptak, A.; Chari, V.M.; Kreil, B. y Wagner, H. (1978) Structure proof of muricatin B: 11-hydroxy hexadecanoic acid dirhamnoside. *Phytochemistry*, 17, 997-999.
- Macherey-Nagel (1993) HPLC Applications, 69-78.
- Macrae, R.; Trugo, L.C. y Dick, J. (1982) The mass detector. A new detection system for carbohydrate and lipid analysis, *Chromatographia*, 15, 476-.
- Mandal, S.; Naqvi, A.A. y Thakur, R.S. (1991) Simultaneous determination of atropine and scopolamine in plants by mixed-column high performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.*, 2, 208-210.
- Maldener, G. (1989) Requeriments and Tests for HPLC Apparatus and Methods in Pharmaceutical Quality control. *Chromatographia*, 28, 85-88.
- March, J. (1985) Advanced Organic Chemistry, 3ª ed., John Wiley & Sons, 351-352.
- Matin, M.A.; Tewari, J.P. y Kalani, D.K. (1969) Pharmacological effects of paniculatin a glycoside isolated from *Ipomoea digitata* Linn. *J. Pharm. Sci.*, 58, 757-759.
- Merck (1994) Enlaces, Vol 6.
- Merck (1995) Enlaces, Vol 7.
- McDonald, A. (1993 y 1994) Flora de veracruz, Fascículos # 73 y 77. Proyecto de la Universidad de california, Riverside, CA. y el Instituto de ecología, A.C., Xalapa, Ver.
- Mc Nair (1974) Cromatografía, O.E.A., 1-63.

Bibliografía

- Nikolov, Z.L.; Meagher, M.M. y Reilly, J.P. (1985) High-performance liquid chromatography of disaccharides on amine-bonded silica columns. *J. Chromatogr.*, 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, 12, 3163-3168.
- Noda, N.; Nishi, M.; Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1988) Resin Glycosides. IV. Two new resin glycosides, muricatins VII and VIII, from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 5, 1707-1713.
- Noda, N.; Kobayashi, H.; Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1988) Isolation and structural study of the genuine resin glycosides, Muricatins I-VI, from the seeds of *Ipomoea muricata*, *Chem Pharm. Bull.*, 36, 3, 920-929.
- Noda, N.; Kobayashi, H.; Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1988) Identification and characterization of the component organic and glycosidic acids of the crude resin glycosides from the seeds of *Ipomoea muricata*, *Chem Pharm. Bull.*, 36, 2 627-633.
- Noda, N.; Ono, Tsuji, K.; M.; Miyahara, K. y Yang, Chon-Ren. (1994) Resin glycosides. XXI. Tuguajalapins I-X, the resin glycosides having long-chain fatty acid groups from the root of *Merremia hungaiensis*, *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 10, 2011-2016.
- Noda, N.; Ono, M.; Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1987) Isolation and structure elucidation of orizabin I, II, III and IV, genuine resin glycosides from the root of *Ipomoea orizabensis*, *Tetrahedron.*, 43, 17, 3889-3902.
- Noda, N.; Takahashi, N.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. y Yang, Chong-Ren. (1994) stoloniferins I-VII, resin glycosides from *Ipomoea stolonifera*, *Phytochemistry.*, 36, 2, 365-371.
- Noda, N., Nishi, M. y Miyahara, K. (1988) Resin glycosides. IV. Two new resin glycosides, muricatins VII and VIII, from the seeds of *Ipomoea muricata*, *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 5, 1707-1713.
- Noda, N.; Kogetsu, H.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. (1992) Scammonins VII and VIII, two resin glycosides from *Convolvulus scammonia*, *Phytochemistry.*, 31, 8, 2761-2766.
- Ono, M.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1991) Resin glycosides. XI. Operculins III, IV, IX, X, XVI, XVII and XVIII, new ether-soluble crude resin glycosides of rhizoma jalapae *braziliensis* (root of *Ipomoea Operculata*), *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 10, 2534-2539.

Bibliografía

- Ono, M.; Kenchiro, F.; Kawata, M.; Fukunaga, T.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1992) Resin glycosides. XIII. Operculins VI, XI, XII, XIII, XIV and XV, the ether-soluble glycosides (Jalapin) from rhizoma jalapae braziliensis (roots of *Ipomoea Operculata*), Chem. Pharm. Bull., 40, 6, 1400-1403.
- Ono, M.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1989) Identification and characterization of the component organic and glycosidic acids of the ether-soluble crude resin glycosides (Jalapin) from rhizoma jalapae braziliensis (roots of *Ipomoea Operculata*), Chem. Pharm. Bull., 37, 12, 3209-3213.
- Ono, M.; Fukunaga, T.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1990) Four new glycosidic acids, operculinic acids D, E, F, and G, of the ether-soluble crude resin glycosides (Jalapin) from rhizoma jalapae braziliensis (roots of *Ipomoea Operculata*), Chem. Pharm. Bull., 38, 10, 2650-2655.
- Ono, M.; Nishi, M.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1990) Resin glycosides. IX. Operculins I, II, V, VII, new ether-soluble crude resin glycosides of rhizoma jalapae braziliensis (the roots of *Ipomoea Operculata*), Chem. Pharm. Bull., 38, 11, 2986-2991.
- 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., 37, 1, 241-244.
- Ono, M.; Kuwabata, K.; H.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1992) Resin Glycosides. XIV. Quamoclins I-IV, New ether-soluble resin glycosides (Jalapin) from the seeds of *Quamoclit pennata*. Chem. Pharm. Bull., 40, 10, 2674-2680.
- Ono, M.; Noda, N.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1990) resin Glycosides. VIII. Reinvestigation of the component organic and glycosidic acids of pharbitin, the crude ether-insoluble resin glycoside (Convolvulin) of Pharbitidis Semen (Seeds of *Pharbitidis nil*), Chem. Pharm. Bull., 38, 7, 1892-1897.
- Ono, M.; Ueguchi, T.; Murata, H.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1992) Resin Glycosides. XVI. Marubajalapins I-VII, New ether-soluble resin glycosides from *Pharbitidis purpurea*. Chem. Pharm. Bull., 40, 12, 3169-3173.
- 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, 11, 1925-1932.
- Pereda-Miranda, R.; Mata, R.; Anaya, A.L.; Winckramaratne, D.B.M.; Pezzuto, J.M. y Kinghorn, A.D. (1993) Tricolorin A, major phytogrowth inhibitor from *Ipomoea tricolor*, J. Nat. Prod., 56, 4, 571-582.

Bibliografía

Pereda Miranda, R. Tesis Doctoral (1994) Estructura de la tricolorina A, un glicolípido modulador de la actividad enzimática de la proteína cinasa C y principal agente alelopático de *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). Facultad de Química, UNAM, México, 1-164.

Pereda-Miranda, R. (1995) Bioactive natural products from traditionally used Mexican plants, *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Plenum Press. Rec. Adv. Phytochemistry 29, in press.

Perkin-Elmer (1979) Instrumental sources of error in high precision quantitative LC analysis. Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy. Pittsburgh, U.S.A.

Pomilio, A.B. y Sproviero, J.F. (1972) Acylated anthocyanins from *Ipomoea cairica*. *Phytochemistry*, 11, 1125-1128.

Pongprayoon, U.; Wasuwat, S., Bohlin, L.; Baeckström, P.; Lindström, M. y Jacobsson, U. (1989) Chemical and pharmacological studies of the thai medicinal plant *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae) 6th annual meeting International of Chemical Ecology, Göteborg, Sweden.

Poster presentation 12th American Peptide Symposium-June. (1991) A comparison of analytical and preparative reverse phase packing materials for the purification of peptides. Essentials in bioresearch.

Poster presentation 12th American Peptide Symposium-May. (1991) Simplified Methods development and scale-up for organic synthesis using segmented column technology™. Essentials in bioresearch.

Promeco (1995) PNO's para validar métodos analíticos y para determinar la adecuabilidad del sistema en HPLC.

Quattrochi, O.A.; Andrizzi, S.T.A. y Laba, R.F. (1990) Introducción a la HPLC Aplicación y práctica. Buenos Aires, Argentina, 1-407.

Rainin (1991) Edp 2™ Instructions

Remington's (1980) Pharmaceutical Sciences, 16ª edic., Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, USA, 571-576.

Shimadzu (s/año) Application data book for Shimadzu Co. HPLC; Tokyo, Japan, 2-11.

Snyder, L.R. (1988) Practical HPLC method development, John Wiley & Sons, U.S.A., 1-260.

Supelco (1992) Chromatography supplies catalog.

Bibliografía

Szepesi, G.; Gazdag, M. y Mihalyfi, K. (1989) Selection of High-Performance Liquid Chromatographic Methods in Pharmaceutical analysis III^a Method Validation. *J. of Chromatogr.*, 464, 265-278.

Szepesy, L.; Fehér, I.; Szepesi, G. y Gazdag, M. (1978) High-performance liquid chromatography of ergot alkaloids. *J. Chromatogr.*, 149, 271-280.

Takemoto, H.; Hase, S. y Ikenaka, T. (1985) Microquantitative analysis of neutral and amino sugars as fluorescent pyridylamino derivatives by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 145, 245-250.

Tipson, R.S.; Horton, D. (1987) F.A.B.-Mass spectrometry of carbohydrates. *Adv. in Carbohydr. Chem. and Biochem.*, Academic Press, Capítulo I, Vol 45, 19-72.

Tyler, V.E., Brady, L.R. y Robbers, J.E. (1988) *Pharmacognosy*, 9^a edic, Lea & Febiger, Filadelfia, 139-145.

USP 23 (1995) United States Pharmacopeial Convention, Inc., U.S.A., 1774-1779.

Valco (1989) HPLC injector instruction manual

Van Den, T., Biermann, C.J. (1989) Simple sugars, oligosaccharides, and starch concentrations in raw and cooked sweet potato. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 421-.

Varian (1993) Analytical supplies catalog.

Wagner, H. (1973) The chemistry of resin glycosides of the Convolvulaceae family. *Nobel Symposium.*, 25, 235-240.

Waters (1992) Sourcebook of chromatography.

Waters (1989) Chromatography Systems and Chemistries for Food and Agricultural Product Analysis.

Waters (1993-1994) The waters chromatography handbook.

Waters (1988) Notes preparative chromatography; 1-12.

Waters (1991) Care and use manual of columns.

Waters (1991) Developing HPLC separations, Book 1 y 2.

Waters (1995) Notas del curso de cromatografía de líquidos.

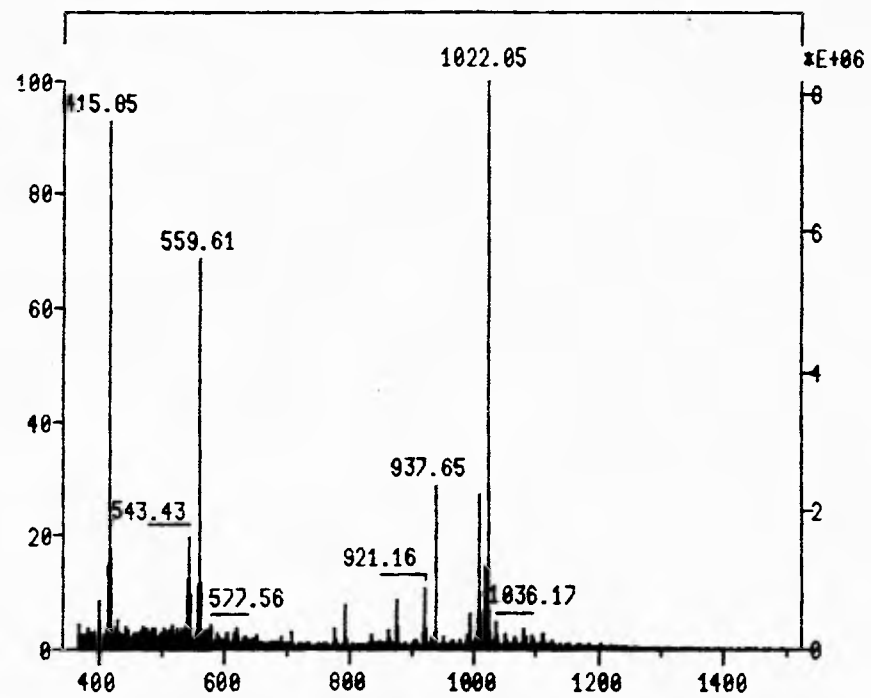
Bibliografía

Weast, R.C. (1969-1970) Handbook of Chemistry and Physics, 50ª edic., CRC, Cleveland, D3-D44.

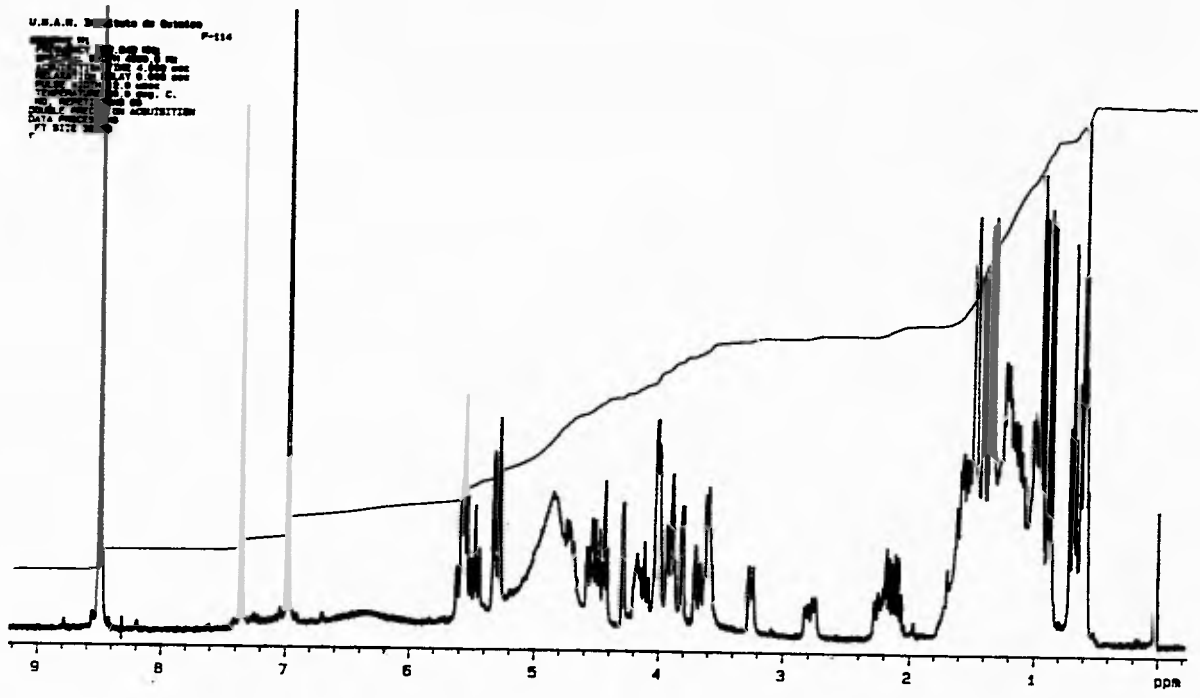
Yang, M.T.; Milligan, L.P. y Mathison, G.W. (1981) Improved sugar separations by high-performance liquid chromatography using porous microparticle carbohydrate columns. J. Chromatogr., 209, 316-322.

Zsandon, B.; Otta, K.H. y Tüdös, F. (1979) Separation of ciclodextrins by high-performance liquid chromatography. J. Chromatography., 172, 490-492.

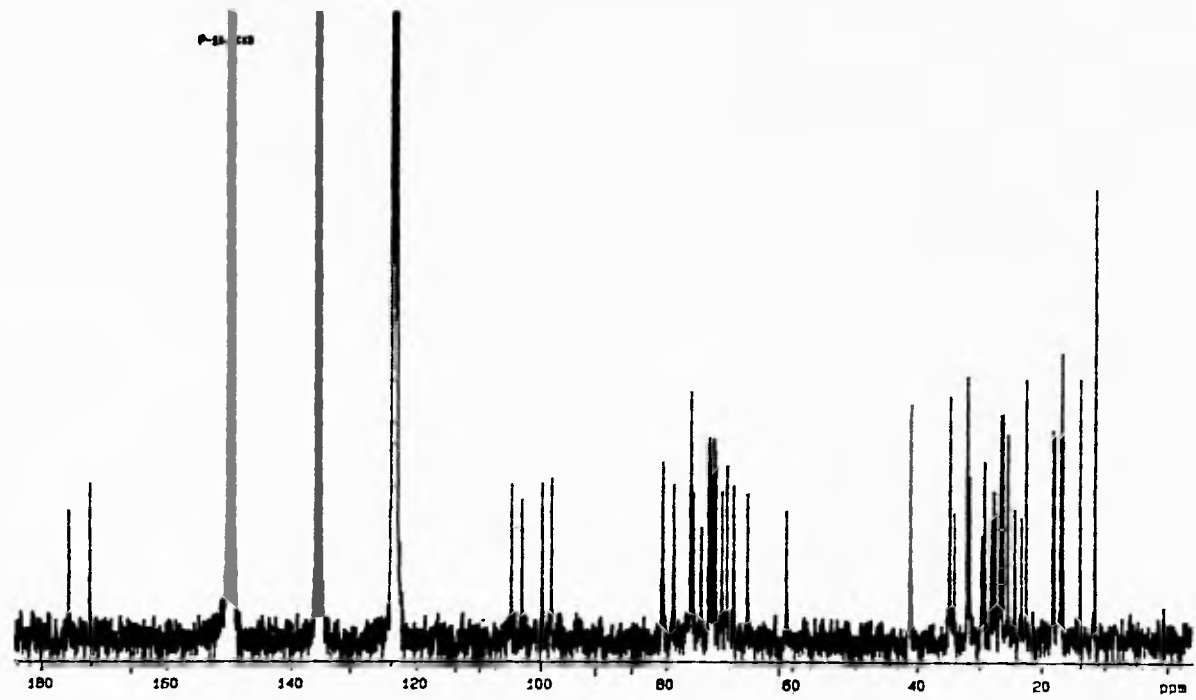
ANEXO I



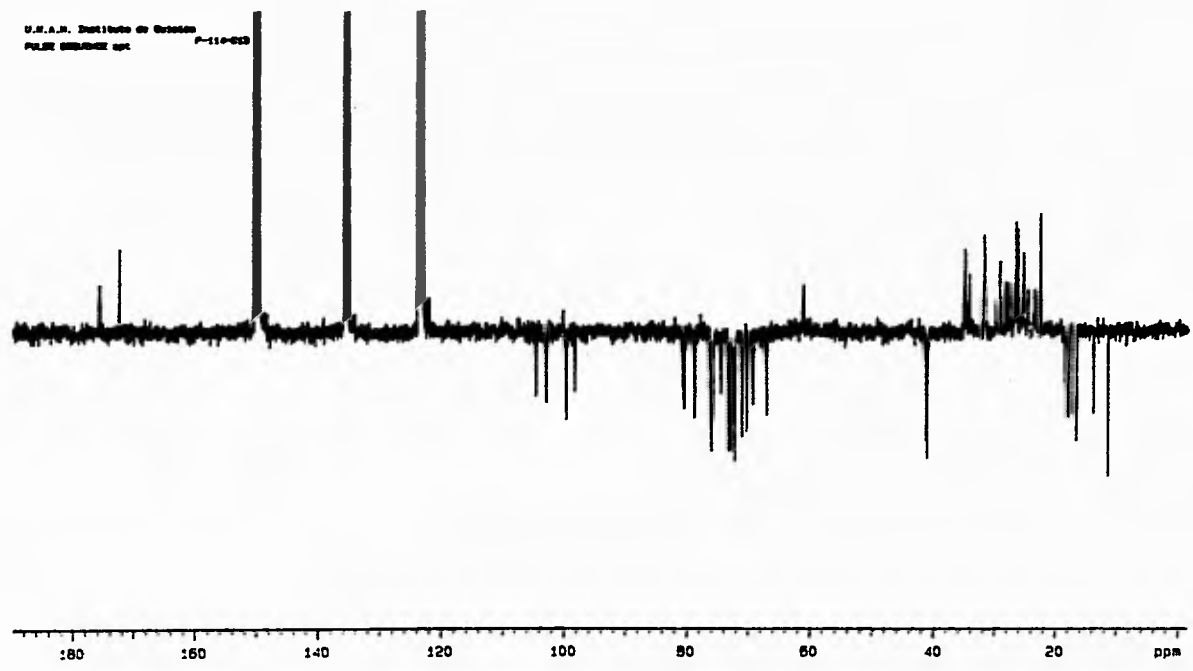
Espectro N° 1 Espectro de masas FAB-negativo de la tricolorina A.



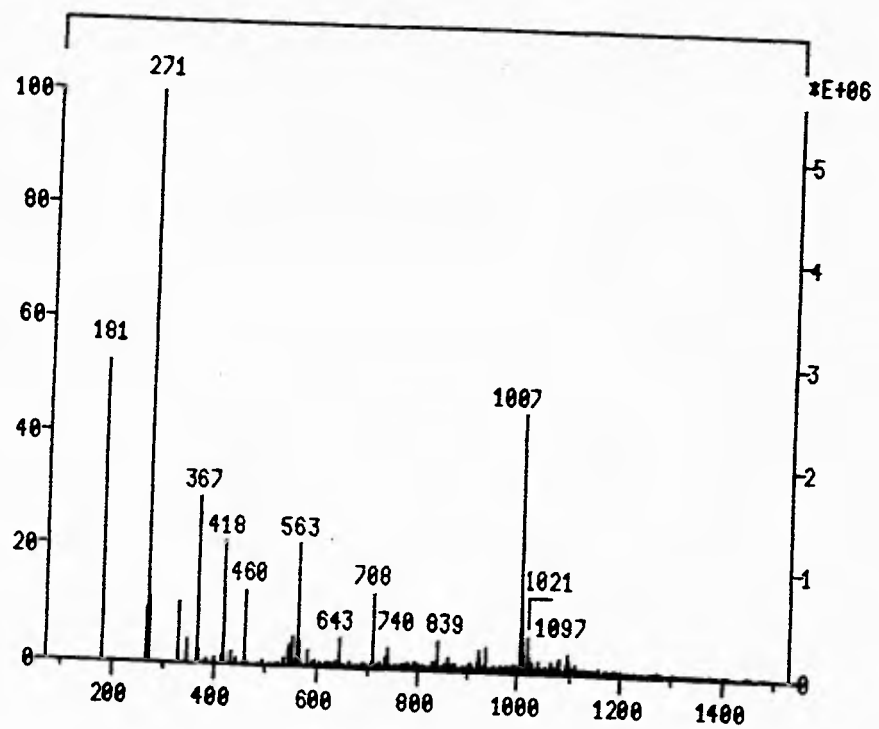
Espectro N° 2 Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) de la tricolorina A.



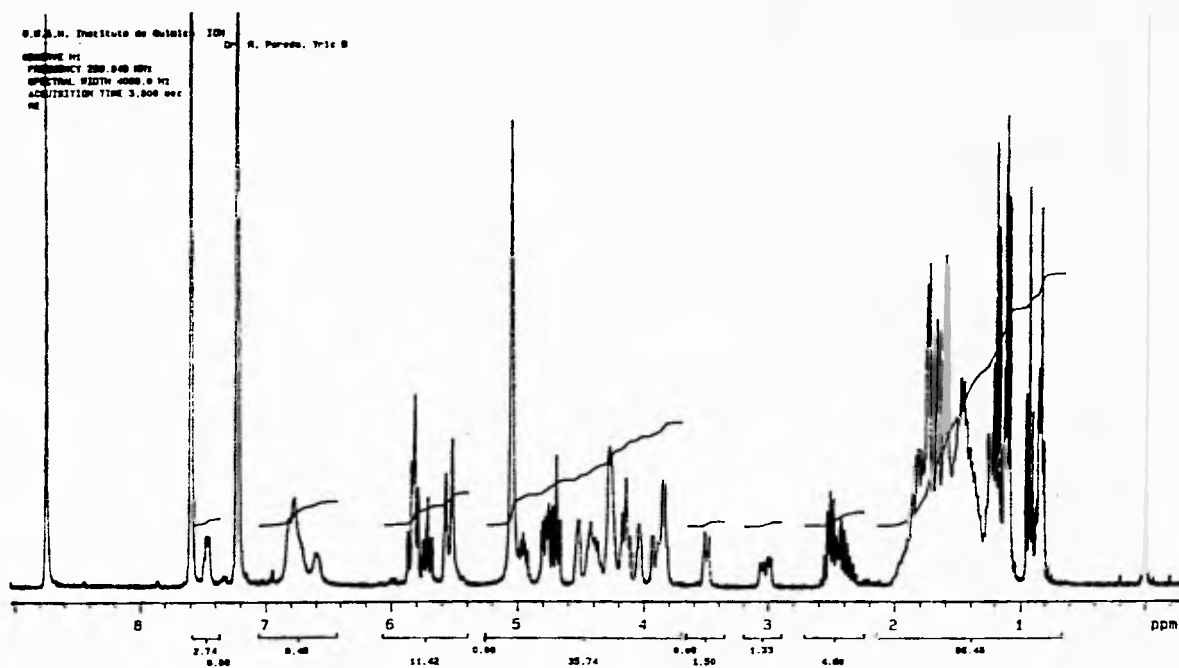
Espectro N° 3 Espectro de RMN- ^{13}C (75.43 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) de la tricolorina A.



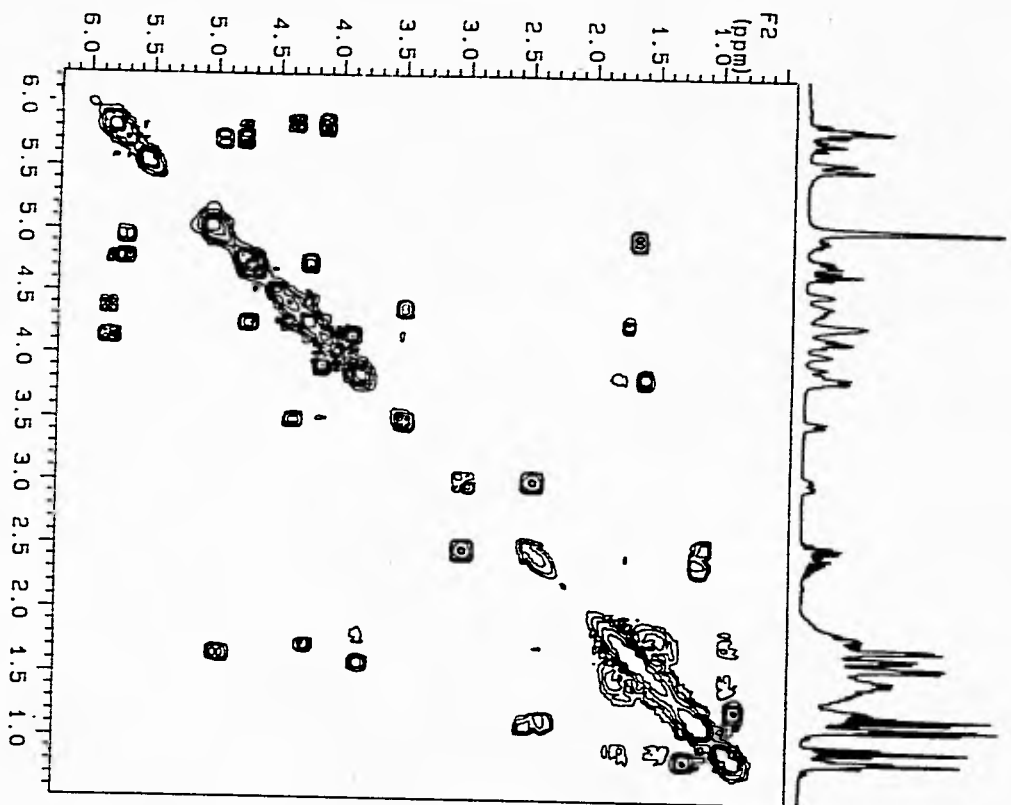
Espectro N° 4 Espectro de RMN- ^{13}C (APT) de la tricolorina A.



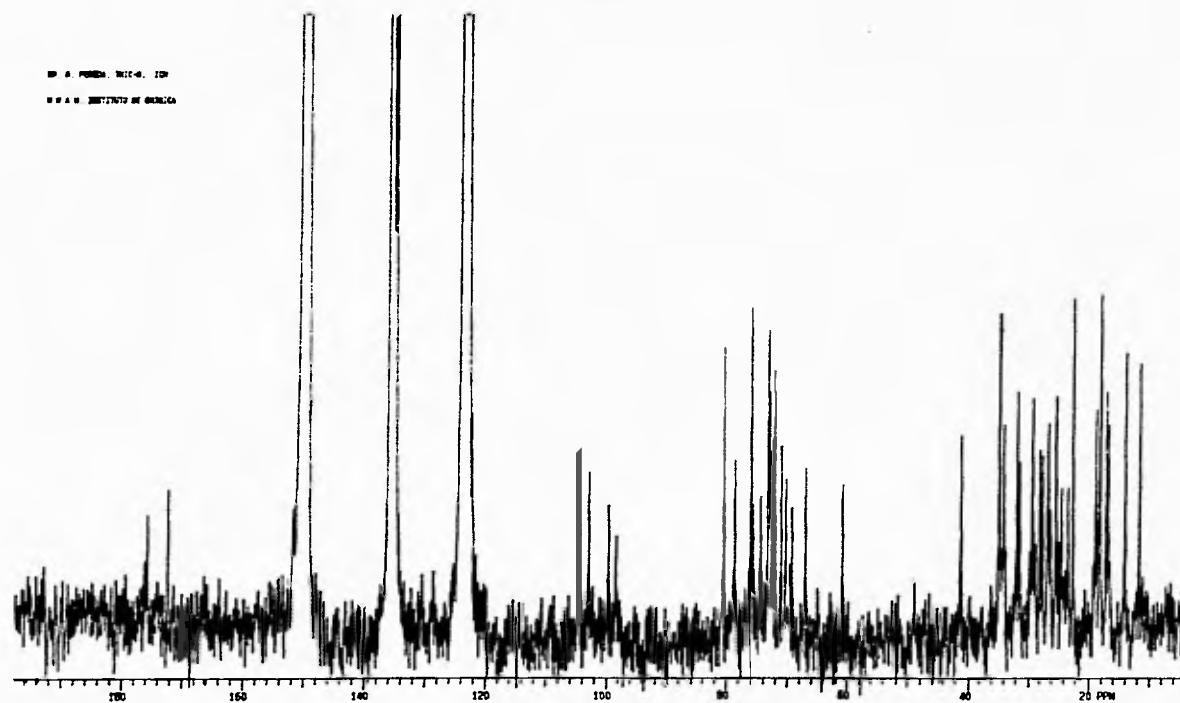
Espectro N° 5 Espectro de Masas FAB-negativo de la tricolorina B.



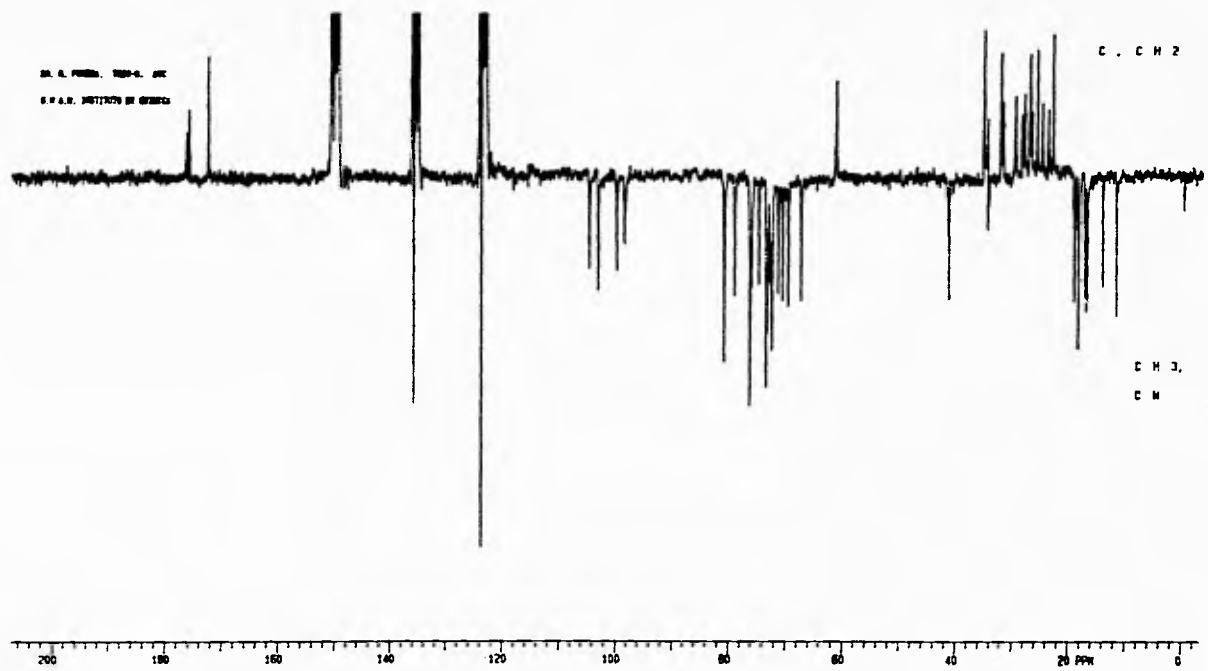
Espectro N° 6 Espectro de RMN-¹H (300 MHz, C₅D₅N, TMS) de la tricolorina B.



Espectro N° 7 Espectro de RMN- ^1H bidimensional homonuclear COSY de la tricolorina B. El espectro se registró a 25 °C (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS).



Espectro N° 8 Espectro de RMN- ^{13}C (75.43 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) de la tricolorina B.



Espectro N° 9 Espectro de RMN- ¹³C (APT) de la tricolorina B.

GLOSARIO

α	Factor de separación (Selectividad)
AcN	Acetonitrilo
AUFS	Unidades de Absorbancia a Escala completa " <i>Absorbance Units Full Scale</i> "
Angstrom (Å)	Angstrom (10^{-10} m)
BPC	Cromatografía de fase ligada " <i>Bonded Phase Chromatography</i> "
CC	Cromatografía en columna abierta
C ₅ D ₅ N	Piridina Deuterada
° C	Grado centígrado
CHCl ₃	Cloroformo
CH ₃ OH, MeOH	Metanol
CH ₃ CN, MeCN	Acetonitrilo
δ	Desplazamiento químico (ppm)
DEAE	Grupo dietilaminoetilo
dp	Diámetro de partícula
EtOAc	Acetato de etilo
ϵ°	Fuerza del solvente
FC-113	1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano
G.P.	Grado de polimerización
GPC	Cromatografía de permeación por gel " <i>Gel Permeation Chromatography</i> "
HEPT	Altura equivalente de un plato teórico " <i>Heigh Equivalent a Theoretical Plate</i> "
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia " <i>High Performance Liquid Chromatography</i> "
I, μ	Fuerza iónica
I.R.	Índice de refracción
k'	Factor de capacidad
L	Longitud de la columna (en general en mm)
LC	Cromatografía líquida
λ	Longitud de onda en nm
MHz	MegaHertzios
N	Número de platos teóricos
NPC	Cromatografía líquida de fase normal " <i>Normal Phase Chromatography</i> "
ODS	Octadecilsilano
pKa	Logaritmo negativo de la constante de acidez
ppm	Partes por millón
PSI	Libras por pulgada cuadrada " <i>Pounds per Square Inch</i> "
R.A.	Reactivo analítico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
R _s	Resolución

GLOSARIO

R_k	Rango de separación que existe entre el valor de K_n' del último pico y el K_1' inicial (K_n'/K_1'); para corridas isocráticas su valor es menor a 20 y para elución en gradiente mayor a 20.
R_t	Tiempo de retención " <i>Retention time</i> "
R_r'	Tiempo de retención relativo ($R_{t1}-R_{t0}$)
RPC	Cromatografía líquida en fase reversa " <i>Reversed Phase Chromatography</i> "
R.I.U.F.S	Unidades de Índice de Refracción a Escala completa " <i>Refraction Units Full Scale</i> "
SAX	Intercambiador aniónico fuerte " <i>Strong Anion Exchanger</i> "
SCX	Intercambiador catiónico fuerte " <i>Strong Cation Exchanger</i> "
SPE	Extracción en fase sólida " <i>Solid Phase Extraction</i> "
Switching	Técnica de desvío del caudal por medio de válvulas
THF	Tetrahidrofurano
TLC, CCF	Cromatografía en capa delgada " <i>Thin Layer Chromatography</i> "
TMS	Tetrametilsilano (Referencia interna para RMN)
T_0	Tiempo de elución del volumen muerto
T_r	Tiempo de elución
UV	Ultravioleta
V_0	Volumen muerto
V_r	Volumen de elución
WAX	Intercambiador aniónico débil " <i>Weak Anion Exchanger</i> "
WCX	Intercambiador catiónico débil " <i>Weak Cation Exchanger</i> "
W	Anchura de pico
$W_{1/2}$	Anchura media del pico
W_b	Anchura del pico tomando por extrapolación a la línea basal
η	Viscosidad