

134

291



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DEL ACIDO PURGICO B, COMPONENTE OLIGOSACARIDO MINORITARIO DE LA CONVULVULINA DE IPOMOEA PURGA".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

OSCAR SALVADOR YAÑEZ MUÑOZ



MEXICO, D. F.,



EXAMENES PROFESIONALES FAC. DE QUIMICA

1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

253903



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 está 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. YOLANDA CABALLERO ARROYO.
Vocal: Dra. RACHEL MATA ESSAYAG.
Secretario: Dr. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA.
1er. Suplente: Dra. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LÓPEZ.
2do Suplente: M. en C. JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ.

Sitio donde se desarrolló el tema:

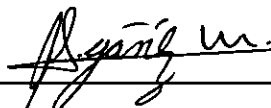
Laboratorio 123. Departamento de Farmacia. Conjunto E. Facultad de Química.

Asesor



Dr. Rogelio Pereda Miranda.

Sustentante



Oscar Salvador Yáñez Muñoz.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dirección General de asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico proporcionado a los siguientes proyectos IN205197, convenio 400313-5-25118N respectivamente.

Al Subprograma 127, "Formación Básica a la Investigación", de la Facultad de Química-UNAM por la beca con la que fui beneficiado.

Al personal de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI), a la M. en C. Nuria Esturau, M. en C. José Luis Gallegos y la Q. Marisela Gutiérrez por el registro de los espectros de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas y rotación óptica.

A la M. en C. Isabel Chávez del laboratorio de resonancia magnética nuclear del Instituto de Química de la UNAM por el registro de los espectros de RMN.

A mis amigos: Carmen, Lluvia, Jesús, Adela por todos los momentos que hemos pasados juntos.

Haydeé muchas gracias por haberme soportado durante todo este tiempo, tal vez sin ti esto hubiera sido menos divertido. Gracias Jaydeé.

A la M. en C. Beatriz Hernández por su valiosa asesoría y por la aportación de ideas en la realización de este trabajo, además por ser una excelente consejera y gran compañera. Muchas gracias Bety.

A Emma, Miriam y Mabel por su compañerismo durante toda la realización de este trabajo.

Con especial admiración y respeto agradezco al Dr. Rogelio Pereda la oportunidad de haberme permitido trabajar con él y por la dirección y tiempo dedicado en la revisión de este trabajo.

DEDICATORIAS.

A mis padres:

Por todo el amor, cuidado, consejos y ayuda que me han brindado en todos los momentos de mi vida y por que gracias a ustedes soy feliz por lo que soy. Espero darles mucho mas que esto. Los quiero mucho.

A mis hermanos:

Por cada una de las admirables virtudes que poseen. Ójala sigamos unidos como hasta ahora.

A mi tío Toño:

Por estar conmigo en cualquier momento, por las charlas compartidas las cuales son parte de mi formación como individuo. Por sus enseñanzas, ayuda y por todo lo que vendrá, muchas gracias tío, lo quiero mucho.

A Bety:

Por estar siempre a mi lado en todo momento, por ser mi gran amiga y compañera, por todo lo que me has dado y lo que seguiré recibiendo de ti.

INDICE

I. Lista de tablas y cuadros.	III
II. Lista de figuras.	IV
III. Lista de espectros.	V
IV. Lista de Abreviaturas.	VI
1. Introducción.	1
2. Antecedentes.	3
2.1 Características de la familia Convolvulaceae.	3
2.2 Compuestos bioactivos del género <i>Ipomoea</i> .	4
2.3 Resinas glicosídicas del género <i>Ipomoea</i> .	5
2.4 Estudios fitoquímicos y farmacológicos de las glicorresinas.	6
2.5 Estudios químicos y etnobotánicos de <i>Ipomoea purga</i> .	14
3. Justificación.	18
4. Objetivos.	19
5. Parte experimental.	20
5.1 Procedimientos generales.	20
5.1.1 Métodos Cromatográficos.	20
5.1.2 Determinación de constantes físicas.	20
5.2 Material Vegetal.	21
5.3 Preparación de los extractos orgánicos.	21
5.4 Fraccionamiento del extracto metanólico por cromatografía en columna.	21
5.5 Preparación de derivados.	22
5.5.1 Hidrólisis alcalina.	22
5.5.2 Reacciones de alquilación con Diazometano.	23
5.5.2.1 Generación del reactivo.	23
5.5.2.2 Reacciones de alquilación.	23
5.5.3 Reacciones de Acetilación.	24
5.5.4 Hidrólisis ácida: Análisis de carbohidratos.	24
5.5.4.1 Análisis de carbohidratos mediante HPLC.	24

5.5.4.2 Identificación de la aglicona.	24
5.5.5 Reacción de sililación.	25
5.6 Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Instrumentación.	25
5.6.1 Procedimientos de preparación de la muestra problema.	26
5.6.1.1 Preparación de la muestra y pruebas de solubilidad.	26
5.6.2 Cromatografía de líquidos a nivel analítico.	26
5.6.2.1 Separación de los ácidos glicosídicos alquilados mediante HPLC a nivel analítico.	27
5.6.3 Cromatografía de líquidos a nivel preparativo.	28
5.6.4 Purificación de Ag-6.	28
5.6.5 Purificación de Ag-6Ac.	30
5.6.6 Identificación de los carbohidratos presentes en Ag-6 mediante HPLC.	31
6. Resultados y Discusión.	32
6.1 Extracción y fraccionamiento.	32
6.2 Separación de los ácidos glicosídicos mayoritarios mediante HPLC.	33
6.3 Purificación del derivado peracetilado (Ag-6Ac) mediante HPLC.	36
6.4 Análisis estructural de los productos de hidrólisis ácida de Ag-6.	39
6.4.1 Caracterización de la aglicona.	39
6.4.2 Identificación de los carbohidratos.	40
6.5 Caracterización de Ag-6 a través de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.	43
7. Conclusiones.	51
8. Bibliografía.	52
9. Espectros.	57

I. LISTA DE TABLAS Y DE CUADROS

Tabla 1. Evaluación del potencial citotóxico del extracto clorofórmico de la raíz de jalapa (<i>Ipomoea purga</i>).	15
Cuadro 1. Fraccionamiento del extracto metanólico de <i>Ipomoea purga</i> .	22
Cuadro 2. Solubilidad de los productos II-H (mezcla de ácidos glicosídicos) y II-MH (ésteres metílicos de la mezcla II-H).	26
Cuadro 3. Condiciones instrumentales utilizadas en HPLC a nivel analítico para el análisis de la muestra II-H.	27
Cuadro 4. Condiciones instrumentales utilizadas en HPLC a nivel analítico para el análisis de la muestra II-HM.	27
Cuadro 5. Rendimiento de cada uno de los constituyentes presentes en la muestra problema obtenido mediante cromatografía de líquidos a nivel preparativo.	36
Cuadro 6. Comparación de los tiempos de retención entre los estándares de carbohidratos y los carbohidratos encontrados en Ag-6.	42
Cuadro 7. Desplazamientos químicos (RMN- ^1H y ^{13}C) para las señales anoméricas y los grupos metilo (Me-6) de las pentosas.	44
Cuadro 8. Conectividades heteronucleares $^3J_{\text{1H-13C}}$ observadas a través de los experimentos bidimensionales a larga distancia (HMBC).	48

II. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alcaloides presentes en <i>Ipomoea tricolor</i> .	4
Figura 2. Procedimiento degradativo utilizado en el estudio químico de las glicorresinas de <i>Exogonium purga</i> .	7
Figura 3. Tricolorina A, componente mayoritario de <i>Ipomoea tricolor</i> .	8
Figura 4. Glicolípidos presentes en <i>Ipomoea muricata</i> .	10
Figura 5. Estructura de la Simonina I encontrada en <i>Ipomoea batatas</i> .	11
Figura 6. Glicolípidos de <i>Ipomoea stans</i> .	12
Figura 7. Glicolípidos presentes en <i>Merremia mammosa</i> .	13
Figura 8. Esquema de identificación del quinovósido constitutivo de la convolvulina de <i>Ipomoea purga</i> propuesto por Singh y Stacey.	16
Figura 9. Ácido escamónico, producto de hidrólisis de la jalapina de <i>Ipomea purga</i> .	16
Figura 10. Acido glicosídico mayoritario de la convolvulina de <i>Ipomoea purga</i> .	17
Figura 11. Fracciones obtenidas a partir de la convolvulina de <i>Ipomoea purga</i> mediante cromatografía en columna (I) y sus respectivos productos de hidrólisis básica (II).	33
Figura 12. Aislamiento y purificación de los constituyentes presentes en la mezcla metilada de ácidos glicosídicos derivada de la convolvulina (II-HM) de <i>Ipomoea purga</i> mediante HPLC a nivel preparativo.	35
Figura 13. Purificación del compuesto Ag-6 mediante recirculación de la muestra a través de HPLC a nivel preparativo.	37
Figura 14. Resolución del producto Ag-6Ac mediante HPLC a nivel analítico.	38
Figura 15. Aislamiento y purificación del producto Ag-6Ac mediante HPLC a nivel preparativo.	38

Figura 16. Aislamiento y purificación de la aglicona constitutiva de los núcleos oligosacáridos Ag-6 ($t_r= 16.4$ min) y Ag-7 ($t_r= 18.66$ min) mediante HPLC a nivel preparativo.	39
Figura 17. Espectro de masas generado por impacto electrónico del derivado siliado del jalapinolato de metilo (Agl-I).	40
Figura 18. Coelución de los estándares de carbohidratos mediante HPLC a nivel analítico.	41
Figura 19. Análisis del contenido de carbohidratos Az a nivel analítico.	42
Figura 20. Coelución del contenido de carbohidratos Az y los estándares de L-ramnosa, D-quinovosa, D-fucosa y D-glucosa mediante HPLC a nivel analítico.	43
Figura 21. Espectro de masas FAB negativo del éster metílico del ácido glicosídico Ag-6.	48
Figura 22. Espectro de correlación heteronuclear en dos dimensiones (HMBC).	49
Figura 23. Estructura del éster del ácido glicosídico (ácido púrgico B) presente en la convolvulina de <i>Ipomoea purga</i> .	50

III. LISTA DE ESPECTROS.

Espectro No. 1. RMN ^1H del compuesto Ag-6.	58
Espectro No. 2. RMN ^{13}C del compuesto Ag-6.	59
Espectro No. 3. RMN ^1H del compuesto Ag-6Ac.	60
Espectro No. 4. RMN ^{13}C del compuesto Ag-6Ac.	61
Espectro No. 5. RMN ^1H de la aglicona del compuesto Ag-6.	62
Espectro No. 6. RMN ^{13}C de la aglicona del compuesto Ag-6.	63

IV. LISTA DE ABREVIATURAS.

3J : constante de acoplamiento a tres enlaces.

cm: centímetros.

d: señal doble.

dd: señal doble de dobles.

dq: señal doble de cuádruples.

EM: espectrometría de masas.

Fuc: fucosa.

g: gramo.

Gluc: glucosa.

Gluc': segunda unidad de glucosa.

Hz: hertzios.

I.R.: índice de refracción.

J : constante de acoplamiento.

Jal: jalapinólico.

Kg: kilogramo.

m/z : relación masa-carga.

m: multiplete.

mg: miligramo.

Mhz: megahertzios.

ml: mililitro.

mm: milímetros.

N: concentración normal.

N_2 : nitrógeno.

Qui: quinovosa.

Qui': segunda unidad de quinovosa.

Ram: ramnosa.

RMN ^{13}C : resonancia magnética nuclear de carbono 13.

RMN 1H : resonancia magnética nuclear protónica.

s: señal simple.

t: triplete.

t_R = tiempo de retención.

δ : desplazamientos químicos expresados en partes por millón.

μ l: microlitro.

μ m: micrómetro.

Quauhilla huizquilill.

Vehic pahli.



Ventris frigiditas.

Ventris alget expellitur potione sumpta ex radicibus
herbarum cepali-rac xuh-tonlli, flancex-hi-xuh-tonlli, chienne
xihuil & quauhilla huizquilill' centesis addite vino
Indico.

Purgatio ventris.

Com venter fuerit purulens, efficies pus. si infirmus
ante prandium in aqua calfacta biberit potionem
ex radice trita herbe nomine vehic pahli. lectus
vero vel locus ubi iacet eger. thuris odore adolebitur
quo nexius aet expellatur.

PURGATIO VENTRIS.

Cum venter fuerit purulentus, eiicies pus, si infirmus ante prandium in aqua calfacta biberit potionem ex radice trita herbae nomine *velicpahlī*.

Lectus uero uel locus ubi iacet aeger thuris odore adolebitur quo noxius aer expellatur.

PURGA DEL VIENTRE.

Cuando hay pus en el vientre, harás que el pus sea desechado si el enfermo bebe en agua caliente, antes de la comida, una poción hecha con la raíz molida de *huelicpahlī*. El lecho o el lugar en que se acuesta se perfumará con olor del incienso para echar fuera el aire maligno.

La hoja anterior es una copia facsimilar del Códice Badiano donde se ilustra la apariencia macroscópica de las raíces de *Ipomoea purga*.

1. Introducción.

Las plantas medicinales mexicanas se han utilizado por nuestro pueblo de manera tradicional, y constituyen una de las manifestaciones del acervo cultural que nos legaron nuestros antepasados. La herbolaria nacional utilizada desde tiempos inmemorables para aliviar el dolor de muchas enfermedades, en la actualidad, continúa en uso y, al parecer con el resurgimiento de los fitofármacos, numerosas plantas constituyen fuente de materias primas que cuando se les ingiere en forma de infusiones o son aplicados tópicamente ejercen su acción terapéutica. En la mayoría de los casos la población emplea estos recursos de manera empírica, ya que el conocimiento de las plantas y su uso específico se ha transmitido verbalmente de una generación a otra sin fundamento científico, aunque al parecer con bastante certeza.

Cabe destacar que aunque no se niegan los beneficios aportados por los medicamentos sintéticos, cada vez es más frecuente el uso de medicamentos de origen natural. Este resurgimiento de la herbolaria tradicional no significa que la medicina popular se contraponga a los fármacos oficiales, por el contrario, representa una fuente potencial alternativa de materias primas para la elaboración de medicamentos. Prueba de ello es la creciente demanda de los productos vegetales que se utilizan en la industria farmacéutica para la elaboración y la búsqueda de nuevos principios activos (Cox, 1994).

La flora mexicana se caracteriza por una amplia diversidad. Lo anterior, aunado a una etnobotánica milenaria explican en parte el gran uso que continúan teniendo en nuestro país las plantas medicinales (Bye, *et al.*, 1995). Una de las familias que se encuentra mejor representada en la etnobotánica mexicana es la de las convolvuláceas. La investigación del potencial terapéutico de los constituyentes bioactivos de las plantas de esta familia, en especial del género *Ipomoea* (Pereda-Miranda, 1995), ha despertado el interés de las comunidades científicas del área médica debido a las diversas actividades que se les atribuyen, por ejemplo, antimicrobiana (*Ipomoea tricolor*) (Pereda-Miranda *et al.*, 1993), antiepilépticas, anticancerígenas (*Ipomoea stans*) (Díaz, 1977; Enriquez *et al.*, 1992), y en especial purgativas (*Ipomoea purga*) (Martínez 1959).

Según algunos autores los principios activos responsables de las actividades farmacológicas demostradas por las especies de este género son las resinas glicosídicas en estas plantas (Lothar, *et al.*, 1986). Otros miembros de las convolvuláceas de amplio uso en la medicina tradicional de diversas regiones del mundo, por ejemplo *Convolvulus*, *Merremia* y *Operculina*, también presentan resinas glicosídicas como los constituyentes mayoritarios de sus tubérculos con propiedades purgantes (Bah, 1997). Sin embargo, el estudio acerca de la naturaleza y la composición de los constituyentes de estas resinas es muy escaso debido a su gran complejidad estructural (Bah y Pereda-Miranda, 1996).

2. Antecedentes.

2.1 Características de la familia Convolvulaceae.

En particular, la familia de las convolvuláceas se encuentra ampliamente distribuida en las regiones tropicales, subtropicales y templadas de ambos hemisferios. Este grupo de plantas se encuentra constituido por plantas herbáceas y leñosas, con tallos rastreros y en su mayoría volubles. La familia está representada por 50 géneros y 1200 especies, siendo *Ipomoea* el género más grande con cerca de 400 especies. En México, esta familia comprende 22 géneros con una gran diversidad y una amplia distribución de especies (López-Laiseca, 1982). Una de las características predominantes de las plantas de la familia convolvulaceae es la presencia de resinas glicosídicas secretadas generalmente a través de cavidades o ductos especiales en el tejido de las plantas. Estas cavidades están alineadas con una capa especial de células secretoras las cuales liberan la resina a través de una delgada película cuticular (Howes, 1949).

La mayoría de los estudios, principalmente de tipo farmacológico y fitoquímico, sobre la familia convolvulaceae se centran en el género *Ipomoea*. En México, *Ipomoea* está representada por aproximadamente 150 especies (Austin y Pedraza, 1993). Este género tiene importancia económica por sus usos alimenticios (*Ipomoea batatas*), ornamentales (*Ipomoea canea* e *Ipomoea alba*) y medicinales (*Ipomoea purga* e *Ipomoea stans*), entre otros. Las semillas de *Ipomoea violacea* son estimadas en el estado de Oaxaca como uno de los principales alucinógenos usados en la adivinación, tanto en rituales mágico-religiosos como en curativas. Los indígenas chinantecos y mazatecos nombran a las semillas de esta enredadera como “piule” y los zapotecos como “Badoh negro”. Antes de la conquista los aztecas las conocieron como “tlililtzin” y las emplearon de la misma forma que el aloliuqui, conocidas como semillas de la virgen, e identificadas botánicamente como *Turbina corymbosa*, otro miembro de las convolvuláceas (Shultes y Hoffmann, 1982).

2.2 Compuestos bioactivos del género *Ipomoea*.

Entre la gran diversidad de metabolitos secundarios existentes en el género *Ipomoea*, hay dos grupos muy importantes para la actividad biológica de estas especies y, evidentemente, en estos principios se basa su utilización práctica, los alcaloides neurotóxicos y las resinas glicosídicas purgantes.

Los alcaloides presentes en este género son del tipo ergolina y están relacionados con el ácido lisérgico (Figura 1), los cuales son los responsables de las propiedades alucinógenas tan utilizadas en las ceremonias mágico-religiosas de los pueblos mesoamericanos (Mac Dougall, 1960). Por ejemplo, *Ipomoea violacea* debe sus propiedades alucinógenas a la presencia del ácido lisérgico. En *Ipomoea* los alcaloides se encuentran presentes en las semillas, las hojas y los tallos pero no en la raíz de la planta madura. Sin embargo, no todas las semillas pertenecientes a las especies de *Ipomoea* contienen estos alcaloides. (Amor-Prats y Harborne, 1993).

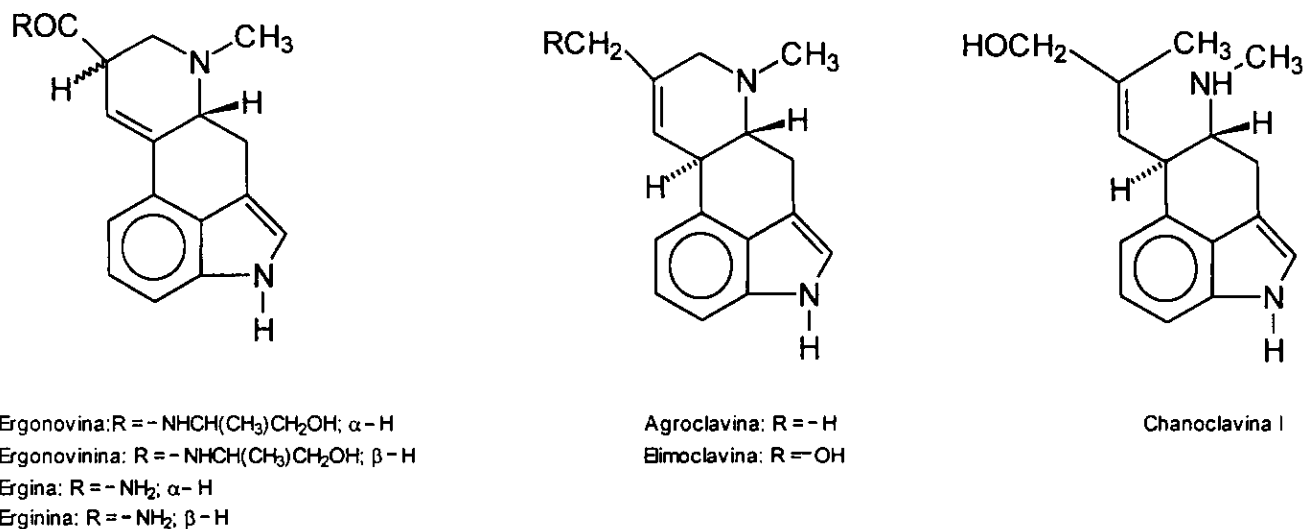


Figura 1. Alcaloides presentes en *Ipomoea tricolor*.

Las resinas glicosídicas son el segundo tipo de metabolitos secundarios biodinámicos presentes en el género *Ipomoea*, las cuales representan mezclas de glicolípidos de alto peso molecular. A estas resinas se les atribuyen propiedades purgativas, antimicrobianas y citotóxicas, entre otras (Pereda-Miranda, 1995).

2.3 Resinas glicosídicas del género *Ipomoea*.

La biosíntesis de los oligosacáridos de las convolvuláceas ha sido muy poco estudiada pero se cree que algunos de ellos se forman a través de la polimerización y la reducción de carbohidratos, particularmente del almidón, y que la planta los utiliza en la prevención de la deshidratación y los daños a los tejidos producto del envejecimiento (Howes, 1949).

Desde el punto de vista químico, las resinas de las convolvuláceas están compuestas por una mezcla de glicolípidos de alto peso molecular constituidos por un ácido graso mono o dihidroxilado de 14 a 16 átomos de carbono unido glicosídicamente a una cadena oligosacárida cuyas unidades de azúcar generalmente son: Glucosa, quinovosa, fucosa y ramnosa; el número de unidades monosacáridas oscila de cuatro a seis. El ácido graso, que puede ser el convolvulínico (11-OH-C₁₄), jalapinólico (11-OH-C₁₆), operculínico (3,12-di-OH-C₁₆), iprólico (3,11-di-OH-C₁₄) o brasiliólico (tri-OH-C₁₄), se encuentra esterificando la cadena oligosacárida para formar una lactona macrocíclica. Al mismo tiempo, el núcleo sacárido se encuentra esterificado con pequeños ácidos de cadena variable de los cuales los más comunes son el 2-metilbutanoico, 3-hidroxi-2-metilbutanoico, acético, propiónico, dimetilacético, metiletilacético, isobutírico, *n*-isovalérico, tíglico, 4-oxo-caprílico y exogónico (MacLeod y Ward, 1997).

La complejidad de estas resinas es una consecuencia de la semejanza estructural de los constituyentes individuales ya que representan principalmente mezcla de isómeros que involucran diferentes sitios de esterificación al núcleo oligosacárido. Por lo tanto, esta complejidad constituye la mayor dificultad para la purificación de los constituyentes individuales y su completa caracterización. Sin embargo, estos glicolípidos muestran rasgos

estructurales que los unifican. Mediante el empleo de un tratamiento alcalino, estos compuestos liberan los ácidos volátiles de cadena corta y al respectivo ácido glicosídico. Este último, mediante un tratamiento ácido, proporciona una mezcla de monosacáridos así como la aglicona. Estos métodos de degradación constituyen el único camino para fines de identificación de estas resinas en conjunto con el análisis espectroscópico (RMN) y espectrométrico (EM) de alta resolución de los productos naturales (Bah, 1997). La figura 2 ilustra la metodología química degradativa utilizada en el estudio de las resinas de *Exogonium purga* (Mannich y Schumann, 1938).

2.4 Estudios fitoquímicos y farmacológicos de las glicorresinas.

Los primeros estudios químicos enfocados a la caracterización estructural de las resinas glicosídicas permitieron distinguir dos grandes grupos con base en la solubilidad que presentaban. A la porción del crudo resinoso soluble en éter o cloroformo se le denominó como la jalapina y a la porción del crudo resinoso insoluble en estos disolventes se le denominó convolvulina. Los estudios fitoquímicos se enfocaron a la caracterización de los productos de hidrólisis básica y ácida (en especial de la jalapina) con ayuda de las técnicas espectroscópicas como la resonancia magnética nuclear (RMN), y la espectrometría de masas (EM) en sus modalidades de impacto electrónico. La cromatografía de gases aplicada a la espectrometría de masas ha representado la herramienta de análisis de mayor uso para el estudio de sus derivados volátiles (Bah, 1997). En la actualidad, la caracterización estructural de los constituyentes individuales se logra gracias al empleo conjunto de técnicas de alta resolución en la RMN y EM, por ejemplo, RMN-500 MHz y EM-bombardero rápido de átomos (FAB) (Bah, 1997).

Para lograr la elucidación estructural de los glicolípidos de alto peso molecular se debe lograr una máxima pureza del compuesto de interés, por lo que es muy importante la selección adecuada de la técnica a emplear para conseguir dicho fin (Marston, *et al.*, 1988). La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica que ha permitido el aislamiento de los constituyentes individuales de las resinas de las convolvuláceas y en la mayoría de los casos constituye el paso final de purificación, pues así se logra obtener una

óptima separación de cada constituyente y un alto grado de pureza (Décosterd *et al.*, 1987). La aplicación de esta técnica instrumental a nivel preparativo se ejemplifica mediante el aislamiento de glicolípidos a partir de especies asiáticas de las convolvuláceas por el grupo de Kawasaki y Miyahara (Noda *et al.*, 1987). Recientemente, el empleo de la técnica de reciclaje de la muestra, ha permitido la separación de cada componente de las mezclas de manera eficiente y, en consecuencia se obtiene una alta pureza la cual no se alcanzaría con los métodos habituales de la cromatografía líquida de alta resolución (Kubo y Nakatsu, 1990).

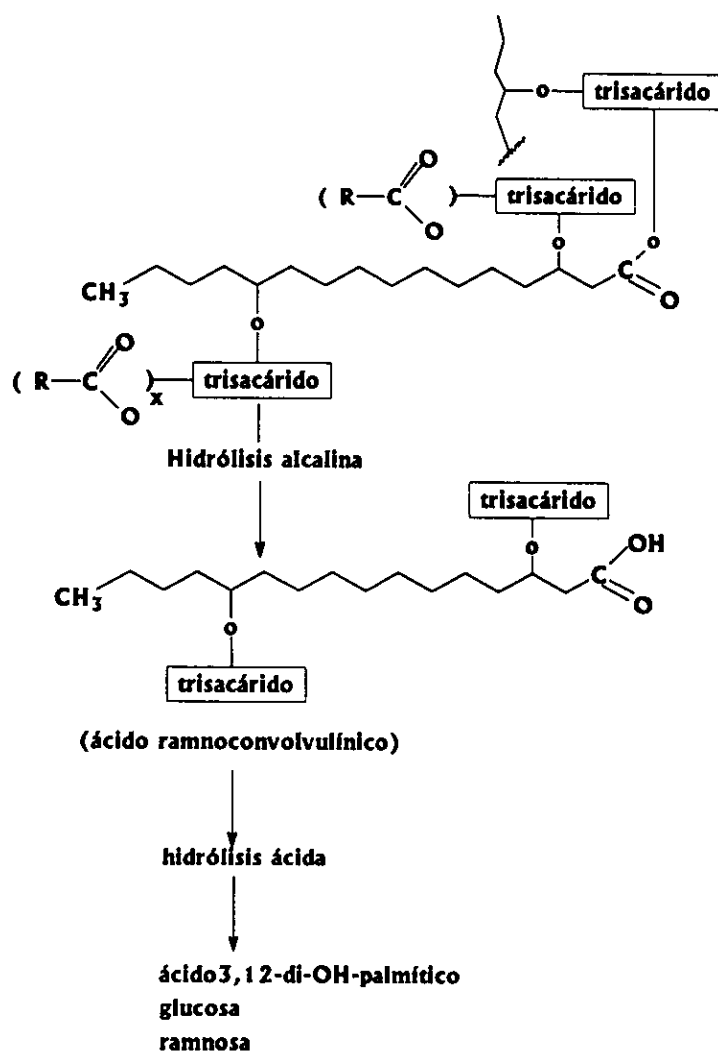


Figura 2. Procedimiento degradativo utilizado en el estudio químico de las glicoresinas de *Exogonium purga*.

La aplicación de esta técnica de purificación se ejemplifica con estudios recientes sobre las resinas glicosídicas del género *Ipomoea*, por ejemplo, el aislamiento de los constituyentes mayoritarios de las resinas de *I. tricolor* denominados con los nombres de tricolorinas A-E (Bah y Pereda-Miranda, 1996; Pereda-Miranda *et al.*, 1993).

El núcleo liposacárido de la tricolorina A (figura 3) se caracterizó como el 11-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido del ácido jalapínico. En cuanto a las propiedades biológicas presentes en *I. tricolor*, se han reportado actividades antimicrobianas, citotóxicas, fitoinhedoras (Pereda-Miranda, *et al.*, 1993), uterotónicas (Rangel-Cordero, 1995) y también resultó ser un agente modulador de la actividad enzimática de la proteína cinasa C (Pereda-Miranda, 1995).

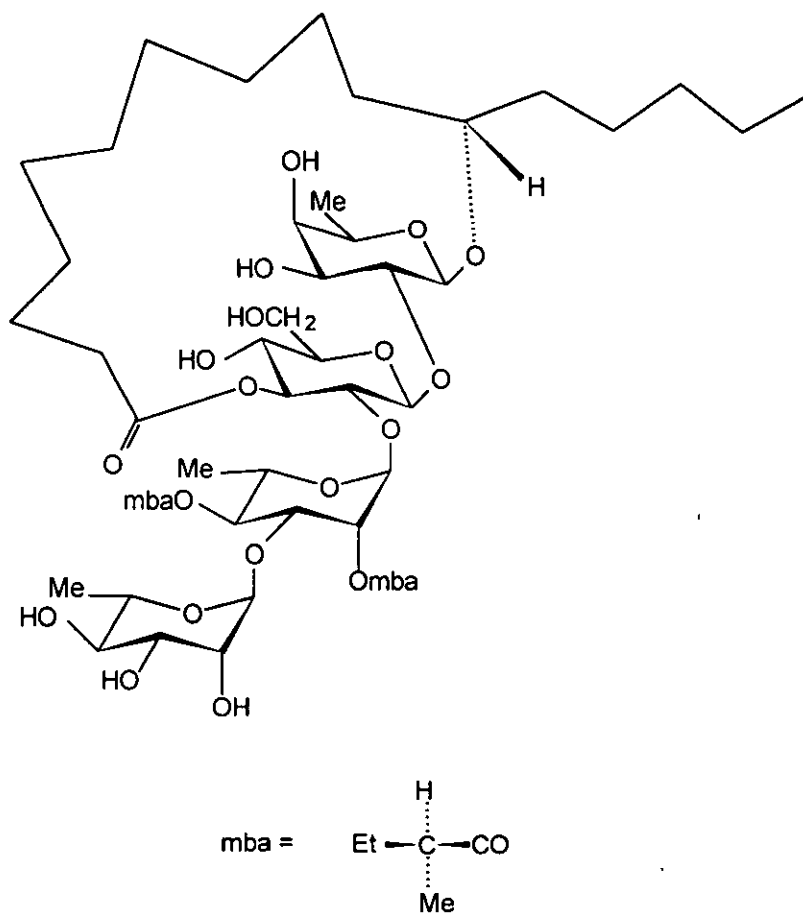
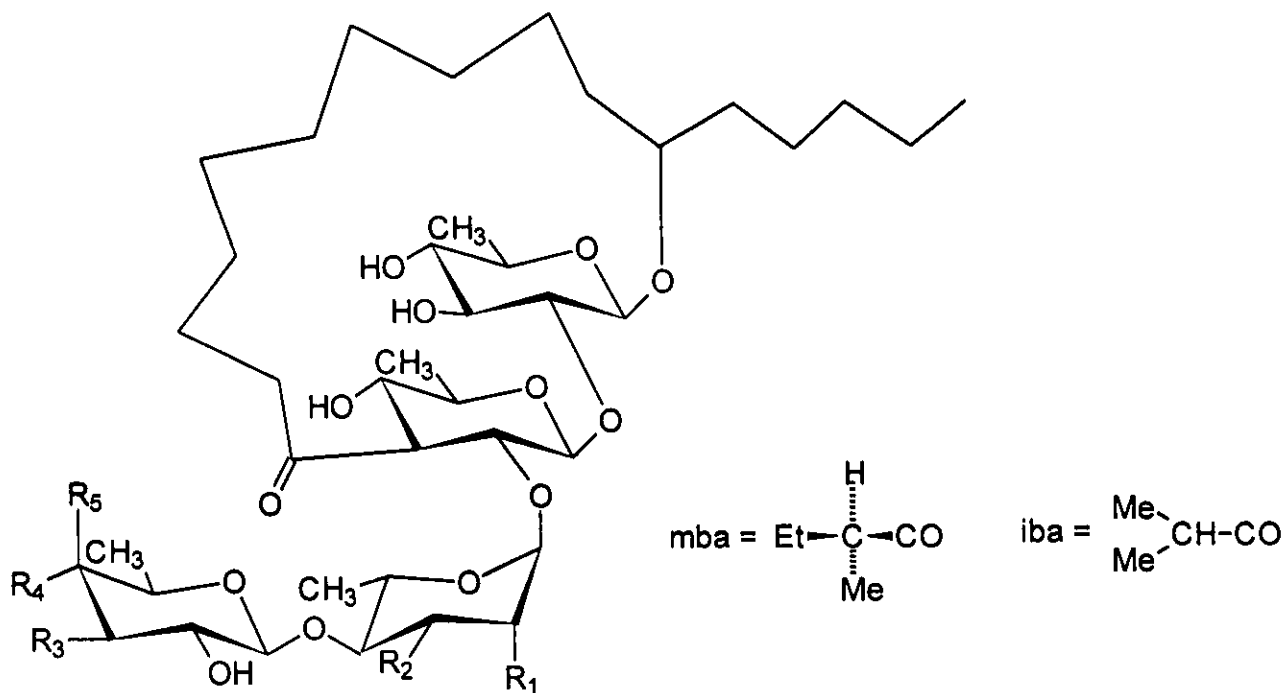


Figura 3. Tricolorina A, componente mayoritario de *Ipomoea tricolor*.

La característica estructural común que poseen los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas encontradas en la familia de las convolvuláceas es el núcleo oligosacárido (acilado en la mayoría de los casos) combinado con el grupo carboxilo de la aglicona para formar un éster macrocíclico. La diversidad estructural de éstos depende de las diferencias observadas en el tipo y número de unidades monosacáridas que constituyen el núcleo oligosacárido, en la secuencia de glicosidación de los mismos y en la posición de acilación y lactonización. Ejemplos selectos de esta diversidad química de las resinas glicosídicas se presentan a continuación.

Las raíces de *Ipomoea operculata* (Massateru *et al.*, 1992) y las semillas de *Ipomoea muricata* presentan como constituyentes mayoritarios de los núcleos oligosacáridos de sus resinas a los ácidos glicosídicos, muricatina A y muricatina B, identificados como el 11-*O*-β-D-fucopiranosil-(1→4)-*O*-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-*O*-β-D-quinovopiranosil-(1→2)-β-D-quinovopiranosido del ácido 11*R*-jalapínico y el 11-*O*-β-D-quinovopiranosil-(1→4)-*O*-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-*O*-β-D-quinovopiranosil-(1→2)-β-D-quinovopiranosido del ácido 11*R*-jalapínico, respectivamente (Noda *et al.*, 1988a). Recientemente, se describieron seis glicósidos (Muricatinas I-VI) presentes en las semillas de *Ipomoea muricata* (Figura 4), siendo todos tetrasacáridos del ácido jalapínico difiriendo en las posiciones de acilación del núcleo oligosacárido constitutivo (Noda *et al.*, 1988b). Estas semillas son usadas como laxantes y carminativos en la medicina tradicional de la India (Noda *et al.*, 1988a).

Los tubérculos de *Ipomoea batatas* además de ser utilizados como alimento, se ha reportado que sus hojas y raíces son efectivas para el tratamiento de la leucemia, la anemia, la hipertensión, la diabetes y las hemorragias (Noda, *et al.*, 1992). En *Ipomoea batatas* se han aislado 5 glicorresinas (Simoninas I-V) de la jalapina de esta raíz, siendo la simonina I el primer ejemplo de una jalapina esterificada en uno de los monosacáridos de la porción glicona con el ácido *trans*cinámico (Noda, *et al.*, 1992) (Figura 5).



- I. $R_1 = R_5 = \text{mba}$, $R_2 = R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$
- II. $R_1 = \text{mba}$, $R_2 = R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{iba}$
- III. $R_1 = R_3 = \text{OH}$, $R_2 = R_5 = \text{mba}$, $R_4 = \text{H}$
- IV. $R_1 = R_3 = \text{OH}$, $R_2 = \text{mba}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{iba}$
- V. $R_1 = \text{mba}$, $R_2 = R_3 = R_5 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$
- VI. $R_1 = \text{mba}$, $R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}$, $R_5 = \text{H}$

Figura 4. Glicolípidos presentes en *Ipomoea muricata*.

La simonina I se caracterizó como el 11-*O*-(2-*O*-*trans*cinámico)-[(4-*O*-*n*-decanoil)]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-*O*-*n*-decanoil)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido del ácido jalapínico (1,2''-lactona).

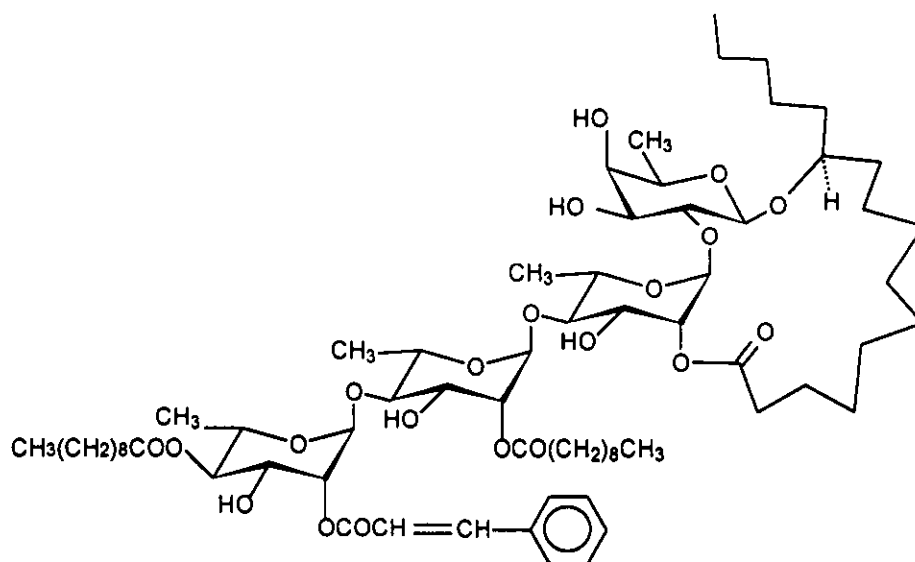
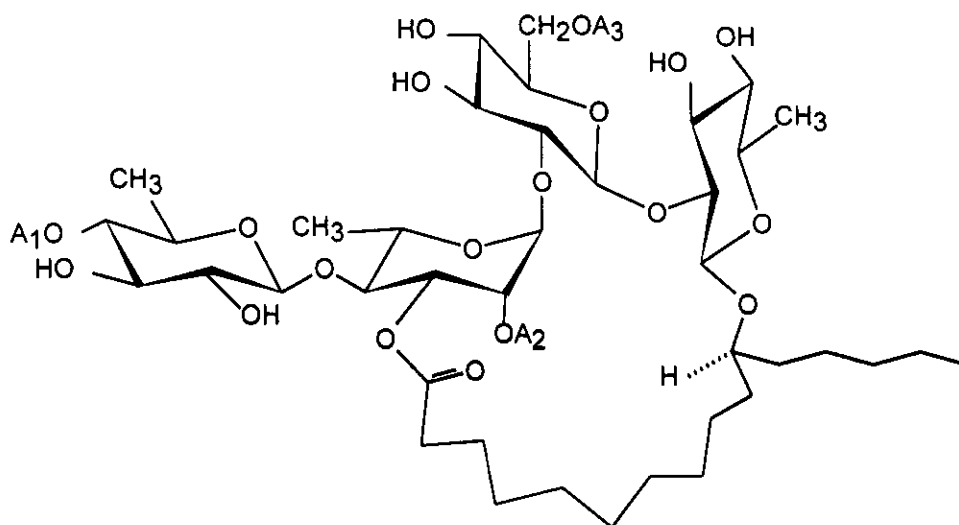


Figura 5. Estructura de la Simonina I encontrada en *Ipomoea batatas*.

A los constituyentes individuales de las resinas de *Ipomoea bahiensis* se les ha caracterizado como derivados de los ácidos 11-hidroxihexadecanoico y 11-hidroxitetradecanoico unidos glicosídicamente en la posición 11 a tres unidades sacáridas compuestas por glucosa, ramnosa y fucosa. Cabe señalar que los extractos totales de esta planta presentan actividad antimicrobiana (especialmente en el extracto metanólico de las hojas) y anticancerígena. Las pruebas realizadas indican que la actividad antitumoral está condicionada a la macrolactona presente en la molécula; la ausencia de ella provoca la pérdida de la actividad biológica (Lothar *et al.*, 1986). Estos resultados son congruentes con la observación del mismo fenómeno durante la saponificación de las resinas de *Ipomoea tricolor* e *Ipomoea purga* ya que los ácidos glicosídicos resultantes se encuentran desprovistos tanto de sus propiedades purgativas como de su potencial citotóxico (Pereda-Miranda, 1995).

Ipomoea stans, conocida también como “tumbavaqueros”, se utiliza en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la epilepsia (Díaz, 1977). Estudios fitoquímicos de la jalapina de esta planta lograron la identificación de cuatro glicolípidos (1-4) (Figura 6). Ensayos biológicos realizados a la fracción glicosídica mayoritaria de esta planta

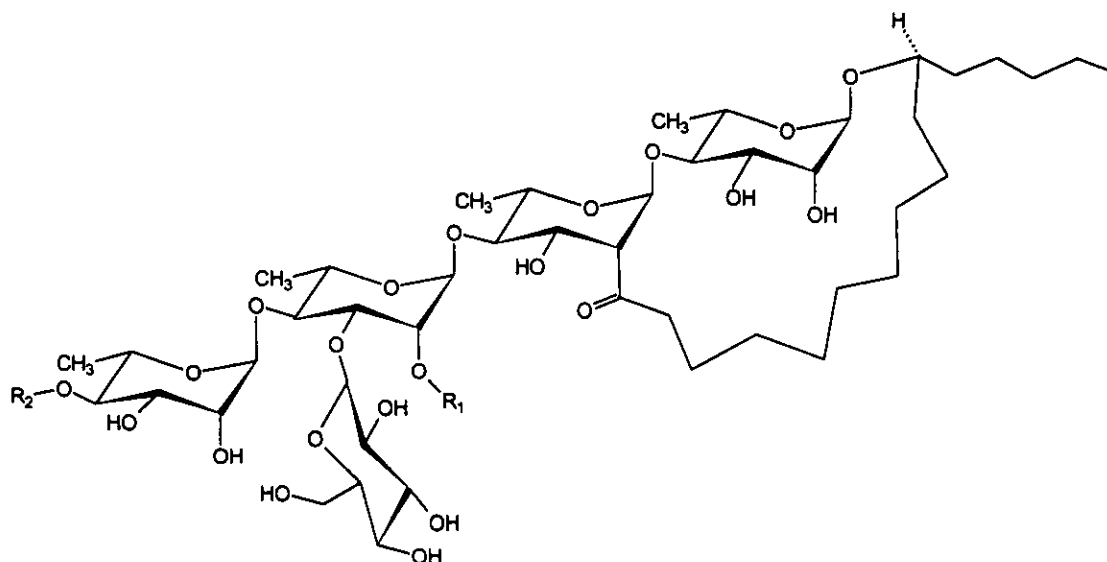
describieron actividades citotóxicas sobre líneas celulares derivadas de carcinoma nasofaríngeo (KB), colon y cérvix, además de una poderosa actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Reynolds *et al.*, 1995). El extracto acuoso de esta planta a su vez mostró un efecto vasodilatador (Perusquía *et al.*, 1995).



- | | |
|--|--|
| 1: A ₁ = A ₂ = 2-metilbutanoilo.
A ₃ = 3-hidroxi-2-metilbutanoilo | 2: A ₁ = A ₂ = 2-metilpropanoilo.
A ₃ = 3-hidroxi-2-metilbutanoilo |
| 3: A ₁ = 2-metilpropanoilo.
A ₂ = 2-metilbutanoilo
A ₃ = 3-hidroxi-2-metilbutanoilo | 4: A ₁ = 2-metilbutanoilo
A ₂ = 3-metilbutanoilo
A ₃ = 3-hidroxi-2-metilbutanoilo |

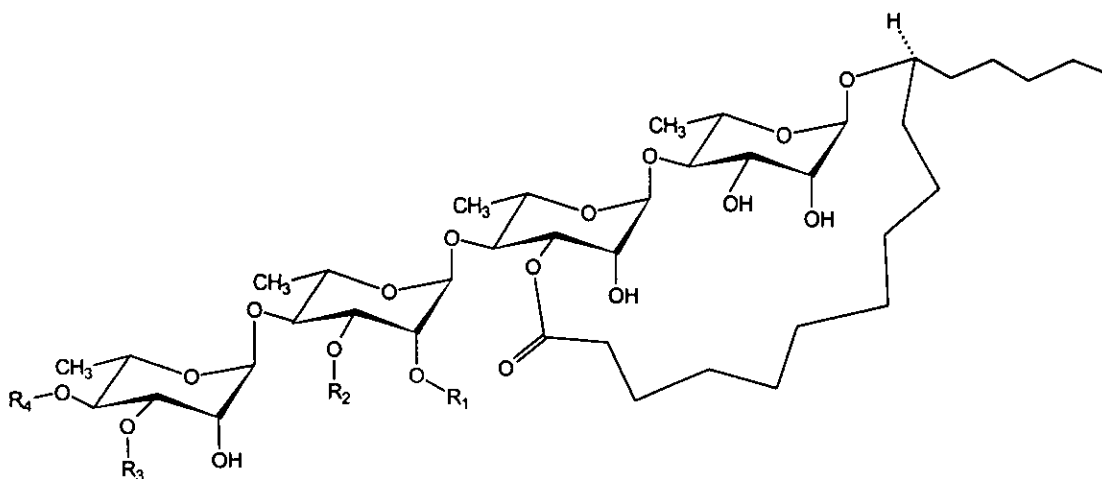
Figura 6. Glicolípidos de *Ipomoea stans*.

Otros géneros de convolvuláceas medicinales también deben sus principales bondades medicinales a la presencia de oligosacáridos, por ejemplo, se ha demostrado una capacidad ionofórica a los constituyentes de *Merremia mammosa* (figura 7), debido a sus características anfipáticas (Kitagawa *et al.*, 1989). Esta actividad deberá correlacionarse con las propiedades biológicas que han demostrado todos los glicolípidos de esta familia.



$h_1: R_1 = (2S)\text{-}2\text{-metilbutanoilo}; R_2 = \text{isobutiroilo}$

$h_2: R_1 = R_2 = \text{isobutiroilo}$



a: $R_1 = R_4 = (2S)\text{-}2\text{-metilbutanoilo}; R_2 = R_3 = H$

b: $R_1 = R_4 = \text{isobutiroilo}; R_2 = R_3 = H$

c: $R_2 = R_3 = H; R_2 = (2S)\text{-}2\text{-metilbutanoilo}; R_4 = \text{isobutiroilo}$

d) $R_1 = R_3 = H; R_2 = R_4 = \text{isobutiroilo}$

e: $R_1 = R_4 = H; R_2 = R_3 = \text{isobutiroilo}$

f: $R_1 = (2S)\text{-}2\text{-metilbutanoilo}; R_4 = \text{isobutiroilo}; R_2 = \beta\text{-D-glucopiranosil -}; R_3 = H$

g: $R_1 = R_4 = \text{isobutiroilo}; R_2 = \beta\text{-D-glucopiranosil -}; R_3 = H$

Figura 7. Glicolípidos presentes en *Merremia mammosa*.

2.5 Estudios químicos y etnobotánicos de *Ipomoea purga*.

Ipomoea purga, conocida popularmente como “raíz de jalapa”, es una planta trepadora que constituye uno de los recursos medicinales tradicionales de México más famosos, tanto en nuestro país como en el extranjero, debido a su propiedad purgativa. Hay registros acerca del uso de la raíz de esta planta por los aztecas y tlaxcaltecas, conocida por ellos como toloompatl (medicina redonda), cacacmotic tlanquinoli (camote purgante) y caxcatlalpan (quiebra cajete) (Pedraza,1982). En la medicina vernácula, la planta también es conocida como “jalapa” y a otras especies purgantes del mismo género con propiedades muy parecidas a *Ipomoea purga* se les considera como falsas jalapas.

Desde el punto de vista farmacológico se considera a esta especie medicinal como un agente catártico drástico hidragogo (Bausor,1937; Wallis,1966), siendo un purgante enérgico a fuertes dosis y un ligero laxante a menores dosis (Martinez 1959, 1969), actuando en la primera sección del intestino delgado, incrementando los movimientos peristálticos. Esta planta también se emplea para tratar las hidrocefalias, las fiebres gastroneuróticas, enteromeningitis, disentería e incluso se le han atribuido propiedades curativas para padecimientos cardíacos, hemorragias cerebrales y de los estados congestivos e inflamatorios (Young-Ken,1956).

Evaluaciones citotóxicas realizadas sobre el extracto clorofórmico de la raíz de jalapa utilizando como líneas celulares carcinoma epidermoide, cáncer mamario, cáncer de colon, fibrosarcoma, carcinoma nasofaríngeo, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, melanoma, y leucemia de mûridos han demostrado un efecto citotóxico significativo para los sistemas tumorales de cáncer mamario, cáncer de próstata, carcinoma epidermoide y leucemia de mûridos (Sosa-Vazquez, 1993). La tabla 1 muestra los valores de dosis efectiva media DE_{50} para cada línea estudiada (Pereda-Miranda, 1995).

Tabla 1. Evaluación del potencial citotóxico del extracto clorofórmico de la raíz de jalapa (*Ipomoea purga*).

Línea celular ^a

A-431	BC-1	Col-2	HT-1080	KB	LNCAP	Lu-1	Mel-2	ZR-75-1	P-388
2.8	2.4	9.5	8.9	7.7	4.2	7.7	6.0	6.5	2.2

^a Los resultados se expresan en dosis efectiva media (DE₅₀ µg/ml).

Abreviaciones: A-431, carcinoma epidermoide; BC-1, cáncer mamario; Col-2 cáncer de colon; HT-1080, fibrosarcoma; KB, carcinoma nasofaríngeo; LNCaP, cáncer de próstata; Lu-1, cáncer de pulmón; Mel-2, melanoma; ZR-75-1, cáncer mamario; P-388, leucemia de móridos.

En cuanto a las investigaciones fitoquímicas realizadas en la raíz de *Ipomoea purga*, existen pocos estudios sobre los constituyentes químicos. Se sabe de la existencia de la D-quinovosa en forma de un glicósido del ácido 11-hidroxitetradecanoico (Shingh y Stacey, 1973) presente en la convolvulina de este tubérculo (figura 8). Un estudio enfocado a la jalapina de *I. purga* reportó la presencia de ramnosa, glucosa y dos unidades de quinovosa, junto con el ácido 11-hidroxihexadecanoico como productos de hidrólisis de esta planta (Sosa-Vázquez, 1993) (figura 9) y recientemente se reportó la existencia del ácido 11-S-hidroxitetradecanoico unido a una cadena oligosacárida de seis unidades de monosacáridos (2 moles de D-quinovosa, 2 moles de D-glucosa, 1 mol de D-fucosa y 1 mol de L-ramnosa) como componente mayoritario de los productos de hidrólisis de la convolvulina de esta planta (Cruz-Bailón, 1998) (Figura 10). Este mismo trabajo menciona la presencia de otros compuestos minoritarios en la convolvulina de *Ipomoea purga*, los cuales no fueron aislados y, por lo tanto, tampoco caracterizados desde el punto de vista estructural.

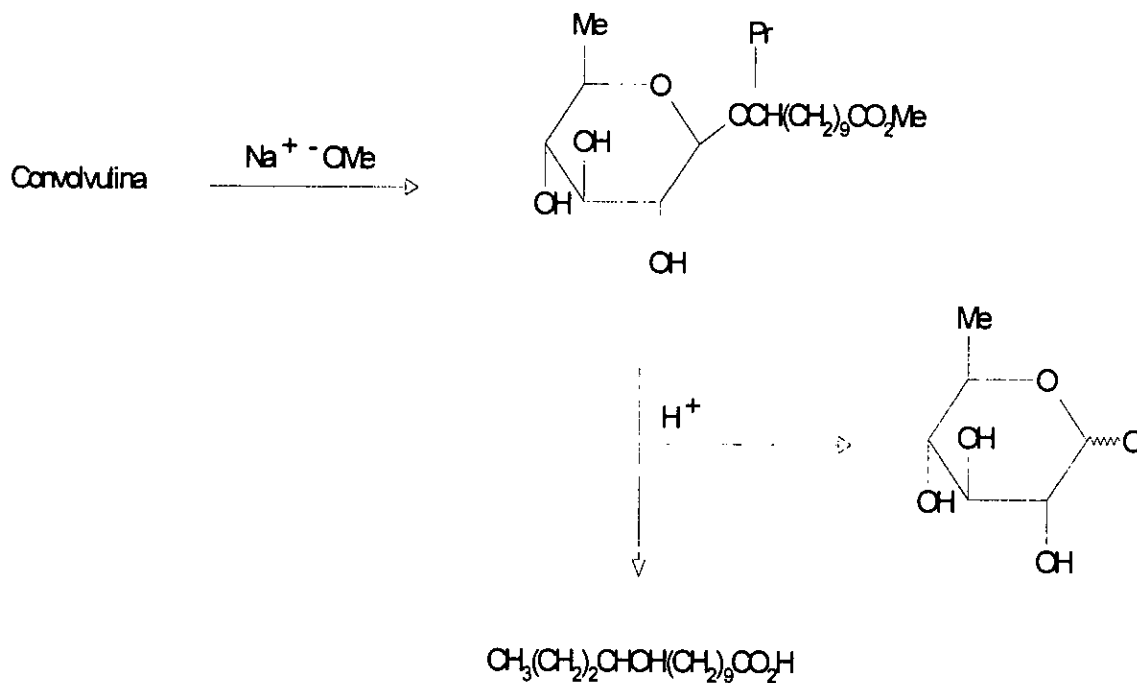


Figura 8. Esquema de identificación del quinovósido constitutivo de la convolvulina de *Ipomoea purga* propuesto por Shingh y Stacey.

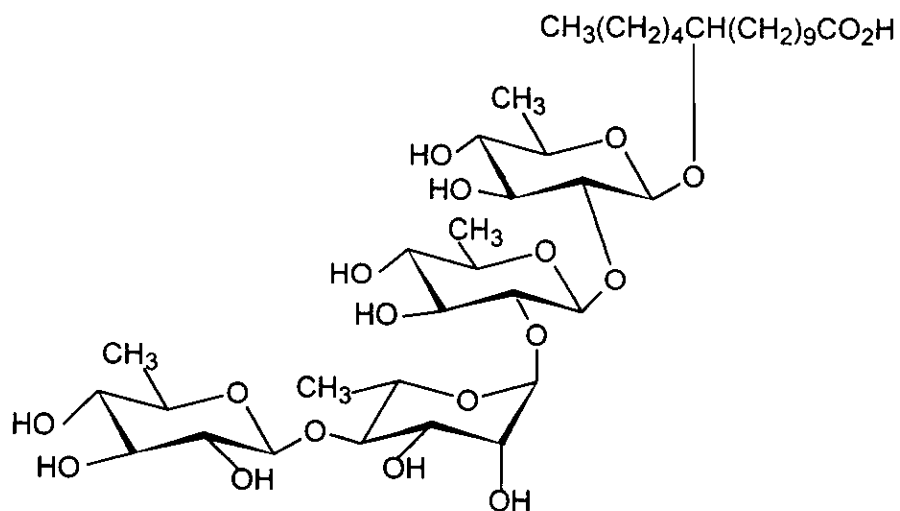


Figura 9. Ácido escamónico, producto de hidrólisis de la jalapina de *Ipomoea purga*.

3. Justificación.

Debido a que las resinas glicosídicas de las convolvuláceas presentan una gran complejidad estructural, su aislamiento en forma pura ha dificultado la caracterización de los constituyentes individuales de estas complejas mezclas de principios biodinámicos. Así, el desarrollo de métodos de alta resolución en la cromatografía de líquidos ha permitido lograr la purificación a nivel preparativo de algunos oligosacáridos representativos de esta familia (Bah, 1997).

Las resinas glicosídicas del género *Ipomoea* representan una fuente potencial para la búsqueda de nuevos compuestos de origen vegetal con aplicación terapéutica y agroquímica debido al amplio espectro de actividades biológicas descritas para estas plantas, por ejemplo propiedades fitoinhedoras, antimicrobianas y citotóxicas. En especial, *Ipomoea purga* representa un sujeto digno de estudio ya que es una especie medicinal de amplio uso en la medicina tradicional mexicana y las investigaciones fitoquímicas de esta raíz son sumamente escasas y poco profundas. Sólo se ha reportado el constituyente mayoritario generado durante la hidrólisis básica de la convolvulina de la raíz de jalapa. De tal suerte que el presente trabajo plantea la continuación de la investigación química de esta especie enfocada al aislamiento de uno de los ácidos glicosídicos minoritarios presentes en la mezcla de saponificación de las resinas que constituyen la porción oligosacárida soluble en metanol.

4. Objetivos.

El objetivo general de la presente investigación fue el aislamiento y la caracterización estructural del producto minoritario con un $t_r = 22.7$ min generado durante la hidrólisis básica de la convolvulina de la raíz de jalapa (*Ipomoea purga*), el cual recibió la denominación trivial de ácido púrgico B. Para lograr esta meta se propusieron los siguientes objetivos específicos:

a) Obtención del extracto metanólico (convolvulina) a partir de las raíces de *Ipomoea purga*.

b) Fraccionamiento del extracto metanólico.

c) Hidrólisis básica de las fracciones obtenidas.

d) Establecimiento de las condiciones instrumentales a nivel analítico y preparativo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para aislar el componente minoritario de interés presente en el producto de saponificación de las resinas glicosídicas de *I. purga*.

e) Establecimiento de la estructura molecular del ácido glicosídico en cuestión mediante métodos químicos degradativos y análisis espectroscópico y espectrométrico.

5. Parte experimental.

5.1 Procedimientos generales.

5.1.1 Métodos Cromatográficos.

Los procedimientos cromatográficos involucrados en la realización del presente trabajo consistieron en la aplicación de la cromatografía en columna abierta para lograr el fraccionamiento del extracto metanólico (convolvulina) de *Ipomoea purga*. Se utilizó gel de sílice 60 Merck (0.2-0.5 mm) desactivada con un 25 % de agua.

El análisis de la homogeneidad y la semejanza de las fracciones obtenidas, así como el seguimiento de las reacciones efectuadas, se llevó a cabo mediante la cromatografía en capa fina (CCF). Se utilizaron cromatoplasmas (10 x 5 cm; 10 x 10 cm) cubiertas de gel de sílice 60 F₅₄ Merck y desactivadas con una solución de H₃BO₃ 0.036 N (Ghebregzabher *et al.*, 1976). La solución acuosa de ácido bórico se aplicó a cada una de las placas mediante un rociado homogéneo y, posteriormente, se evaporó el exceso de humedad mediante un calentamiento (70-90 °C) en una estufa por 10 minutos. Después de la aplicación de la solución problema en la cromatoplasma, ésta se colocó en una cámara que contenía el sistema de elución adecuado y que facilitó la separación de los componentes. Finalizada la elución, se evaporó el disolvente y bajo exposición a la luz ultravioleta de onda corta y onda larga se pretendió localizar las zonas que presentaran fluorescencia. Sin embargo, no se visualizaron debido a que los carbohidratos en estudio no absorben en la región del ultravioleta. Las placas se humedecieron con un agente cromógeno (mezcla H₂SO₄-sulfato cérico) y se revelaron por calentamiento sobre una parrilla a una temperatura de 80 °C.

5.1.2 Determinación de constantes físicas.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) protónica (¹H) y de carbono-13 (¹³C) se generaron en equipos Varian VXL-500 y Bruker AMX-500, los cuales se operaron a una frecuencia de 500 MHz y 125 MHz, respectivamente. Se utilizó piridina deuterada (C₅D₅N) como disolvente y los desplazamientos químicos δ se expresaron en ppm utilizando como referencia interna tetrametilsilano (TMS). La rotación óptica se determinó en un

polarímetro Perkin-Elmer 241. Los espectros de masas se registraron en un aparato modelo JEOL SXIOA, utilizando como método de ionización el bombardeo rápido de átomos (FAB-MS modo negativo).

5.2 Material Vegetal.

La muestra analizada consistió en 10 kg de tubérculos frescos de *Ipomoea purga* colectados en el municipio de Xico, en el estado de Veracruz. El ejemplar se depositó en el Herbario del Instituto de Ecología, A. C.

5.3 Preparación de los extractos orgánicos.

El material vegetal seco y pulverizado se sometió a una extracción preliminar con *n*-hexano para eliminar los constituyentes de baja polaridad. Posteriormente, se continuó con la preparación de los extractos clorofórmico y metanólico de los tubérculos mediante un proceso de maceración, con una duración de cuatro semanas para cada disolvente. Una vez concluido el tiempo de maceración, se filtró el disolvente y se concentró a sequedad a presión reducida. Así, se obtuvo el extracto clorofórmico (jalapina) con un peso de 4.41 g y el extracto metanólico (convolvulina) con un peso de 169.55 g.

5.4 Fraccionamiento del extracto metanólico por cromatografía en columna.

La convolvulina (169.5 g) de *Ipomoea purga* se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta, la cual se empacó con 1.0173 kg de gel de sílice. Se inició la elución del extracto con un sistema ternario constituido por MeOH-CHCl₃-CH₃COCH₃ (25:60:15) cuya polaridad se incrementó gradualmente de acuerdo a las necesidades requeridas. El volumen de los eluatos fue de 200 ml y cada uno se concentró al vacío. Posteriormente, se reunieron las fracciones tomando en cuenta su homogeneidad y semejanza cromatográfica. El cuadro 1 resume el seguimiento cromatográfico del extracto metanólico total.

Cuadro 1. Fraccionamiento del extracto metanólico de *Ipomoea purga*.

Sistema de Elución	Eluatos combinados	No. de Fracción	Cantidad obtenida
MeOH:CHCl ₃ :CH ₃ COCH ₃ 25 : 60 : 15	1-2	I	1.2597 g
25 : 60 : 15	3-7	II	52.7933 g
23 : 28 : 49	8-11	III	84.1965 g
23 : 28 : 49	12-15	IV	4.4684 g
50 : 0 : 50	16-18	V	1.0213 g
50 : 0 : 50	19-21	VI	0.1361 g
100 : 0 : 0	22-31	VII	0.2706 g

5.5 Preparación de derivados.

5.5.1 Hidrólisis alcalina.

Todas las fracciones obtenidas (I-VII) a partir del extracto metanólico se sometieron a una hidrólisis básica. A cada fracción (10 mg) se le adicionaron 3 ml de KOH 5% y la mezcla de reacción se dejó a reflujo (95 °C) durante una hora. Se ajustó el pH a 4 con HCl 4N y, posteriormente, se extrajo con éter etílico (2 x 5 ml). La fase etérea se desechó. La fase acuosa se sometió a extracciones con *n*-Butanol (2 x 5 ml) y esta última fase se concentró a sequedad con ayuda de una bomba de alto vacío. Cada fracción proporcionó una mezcla compleja de ácidos glicosídicos, los cuales fueron analizados por CCF utilizando un sistema de elución constituido por CHCl₃-MeOH-H₂O (6:4:1).

Posteriormente, el estudio se continuó con la fracción II, por lo que fue necesario obtener una mayor cantidad de su producto de hidrólisis. De esta forma, 500 mg de la fracción II se sometieron al mismo tratamiento alcalino conservando las relaciones de volúmenes de reactivo a utilizar de acuerdo con la técnica anteriormente descrita y se obtuvieron 421.9 mg (II-H) del producto hidrolizado. De igual forma, el monitoreo de la

reacción se llevó a cabo mediante CCF usando como sistema de elución la mezcla ternaria constituida por CHCl_3 -MeOH- H_2O (6:4:1).

La separación de los componentes presentes en la mezcla de saponificación se logró a través de sus derivados metilados por medio del empleo de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los procedimientos experimentales utilizados se describen en el inciso 5.6.2.1.

5.5.2 Reacciones de alquilación con Diazometano.

5.5.2.1 Generación del reactivo.

A una solución de KOH (5 g en 7.5 ml de agua), 25 ml de EtOH y 15 ml de éter se adicionaron 30 ml de una solución etérea de N-metil-N-nitroso-O-toluensulfonamida (21.5 g). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua en baño maría (58-60 °C). Después de 5 minutos, el CH_2N_2 generado se colectó mediante destilación en 20 ml de éter en baño de hielo.

5.5.2.2 Reacciones de Alquilación.

Se adicionó un exceso de la solución etérea de diazometano a la mezcla II-H (400 mg) disuelta en 10 ml de metanol para llevar a cabo la reacción de alquilación. La adición del agente alquilante se realizó hasta que cesó el desprendimiento de N_2 en el medio de reacción.

Se obtuvieron 423.5 mg (II-HM) como producto de alquilación de II-H. La mezcla de componentes de II-HM se analizó por HPLC utilizando una columna de gel de sílice enlazada con grupos aminopropilmetilsilano, lográndose de esta forma la resolución de la mezcla en siete compuestos: Ag 1-7. Esta mezcla se analizó mediante cromatografía de líquidos a nivel preparativo para el aislamiento del compuesto minoritario Ag-6 con un tiempo de retención de 22.7 min, al cual se le asignó la denominación trivial de ácido púrgico B (ver sección 5.6.4).

5.5.3 Reacciones de Acetilación.

19 mg del compuesto Ag-6 se disolvieron en 0.5 ml de piridina y 0.5 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 hrs. Posteriormente, se adicionaron 2 ml de H₂O destilada y se dejó en agitación por 5 min. Se adicionaron tres mililitros de agua y se efectuaron tres extracciones sucesivas, utilizando en cada una de ellas volúmenes de 5 ml de acetato de etilo. La fase orgánica fue tratada con HCl 1N (2 x 5 ml), seguida de un tratamiento alcalino con una solución saturada de NaHCO₃ (2 x 5 ml). Por último, la fase orgánica se lavó con H₂O (2 x 5 ml), se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Esta reacción produjo 28.3 mg (Ag-6Ac) del producto de peracetilación del compuesto Ag-6. Este compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución (ver sección 5.6.5).

5.5.4 Hidrólisis ácida: Análisis de Carbohidratos.

5.5.4.1 Análisis de carbohidratos mediante HPLC.

Se agregaron 10 ml de HCl 4 N a 15 mg de Ag-6. La mezcla de reacción se calentó a 90 °C durante dos horas y, posteriormente, se diluyó con 5 ml de H₂O y se extrajo con éter (3 x 10 ml). La fase acuosa se neutralizó con KOH y se extrajo con *n*-BuOH (3 x 10 ml). La fase butanólica se lavó con H₂O (2 x 5 ml) y se concentró en el rotaevaporador hasta sequedad total para obtener una mezcla de monosacáridos (Az), la cual se analizó por HPLC en una columna de carbohidratos utilizando como fase móvil CH₃CN-H₂O (85:15) a un flujo de 1 ml/min, para lograr la identificación de la L-ramnosa (*t_r*= 6.9 min), la D-quinovosa (*t_r*= 7.3 min), la D-fucosa (*t_r*= 8.3 min) y la D-glucosa (*t_r*= 13.6 min) mediante comparación con patrones de referencia.

5.5.4.2 Identificación de la aglicona.

La fase orgánica se disolvió en 10 ml de cloroformo y se alquiló con un exceso de una solución etérea de CH₂N₂. La mezcla de reacción se evaporó al vacío y se purificó mediante HPLC. La cantidad de muestra analizada fue de 5 mg y se utilizó un sistema de elución ternario constituido por hexano-cloroformo-acetona (6:3:1) y una columna preparativa de gel de sílice (Isco, 10 µm, 21.2 x 250 mm); con un flujo de 6 ml/min; el volumen de inyección fue de 500 µl y el detector fue de índice de refracción. De esta forma

se obtuvieron 2 mg del éster metílico de la aglicona ($t_r = 16.4$ min). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, Me-16), 1.64-1.23 (m, H-3-10 y H12-15), 2.30 (t, $J = 7.2$ Hz, H-2), 3.59 (m, H-11), 3.67 (s, $-\text{CO}_2\text{Me}$).

5.5.5 Reacción de sililación.

El éster metílico de la aglicona (1 mg) se disolvió en 0.2 ml del reactivo SIGMA SIL-A (trimetilclorosilano-hexametildisilano-piridina, 1:3:9). Esta mezcla de reacción se mantuvo en agitación a una temperatura de 70 °C en baño maría durante 15 minutos.

5.6 Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Instrumentación.

La instrumentación está conformada por un equipo Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA) equipado con un sistema de distribución de disolvente y un refractómetro diferencial Waters 410 integrado a un equipo de cómputo (OptiPlex 466/Le,Dell). El control del equipo, los datos de adquisición, el proceso y el manejo de la información cromatográfica se realizaron a través del programa de software Millennium 2000 (Waters). Los tipos de columnas utilizadas durante el presente estudio fueron los siguientes:

Columna analítica de gel de sílice ($\mu\text{porasil}^{\text{TM}}$, 10 μm , 3.9 \times 300 mm).

Columna analítica de fase reversa enlazada con dimetiloctadecilsilano (C-18) (Novapak, 6 μm , 7.8 \times 300 mm, 60 Å).

Columna analítica de aminopropilmetilsilano (Amino) ($\mu\text{Bondapak}^{\text{TM}}$, 10 μm , 3.9 \times 300 mm, 125 Å).

Columna analítica para análisis de carbohidratos (Waters, 10 μm , 3.9 \times 300 mm).

Columna preparativa amino ($\mu\text{Bondapak}^{\text{TM}}$, 10 μm , 19 \times 150 mm, 125 Å).

Columna preparativa de gel de sílice (Isco, 10 μm , 21.2 \times 250 mm).

5.6.1 Procedimientos de preparación de la muestra problema.

5.6.1.1 Preparación de la muestra y pruebas de solubilidad.

Se efectuaron pruebas de solubilidad de las fracciones II-H y II-HM en diversos disolventes, utilizando 2 mg de muestra en cada caso. Los resultados se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Solubilidad de los productos II-H (mezcla de ácidos glicosídicos) y II-MH (ésteres metílicos de la mezcla II-H).

Diluyente	Solubilidad de II-H y II-HM
Diclorometano 20 μ l	Nula
Acetona 20 μ l	Parcial
Tetrahidrofurano 20 μ l	Nula
Alcohol Isopropílico 20 μ l	Parcial
Acetonitrilo 20 μ l	Parcial
Metanol 20 μ l	Total
Agua 20 μ l	Total
Acetonitrilo : Agua 60 μ l : 40 μ l	Total
Acetonitrilo : Agua 70 μ l : 30 μ l	Total
Acetonitrilo : Agua 78 μ l : 22 μ l	Total
Acetonitrilo : Agua 80 μ l : 20 μ l	Total

5.6.2 Cromatografía de líquidos a nivel analítico.

Una vez establecida la solubilidad de la muestra problema y, por lo tanto, determinado el sistema de elución adecuado, se realizan pruebas a nivel analítico con el fin de obtener un perfil cromatográfico de la muestra bajo las condiciones de trabajo

planteadas. De esta forma se realizaron varias pruebas para establecer las condiciones óptimas de separación de las muestras problemáticas.

5.6.2.1 Separación de los ácidos glicosídicos alquilados mediante HPLC a nivel analítico.

En primer lugar, se intentó separar la mezcla II-H bajo las condiciones establecidas en el cuadro 3 sin éxito alguno en la separación. Posteriormente, se ensayaron diversas condiciones cromatográficas para la mezcla II-HM (cuadro 4), lográndose de esta forma una completa separación de los productos de saponificación metilados mediante el empleo de la columna aminopropilmetilsilano con el sistema CH₃CN-H₂O (78:22).

Cuadro 3. Condiciones instrumentales utilizadas en HPLC a nivel analítico para el análisis de la muestra II-H.

Tipo de Columna	Fase Móvil	Flujo y Sensibilidad	Concentración de la muestra	Volumen de inyección	Detector
C ₁₈	MeOH : H ₂ O 50 : 50	0.7 ml/min. 64	10 µg/ml	20 µl	IR
Sílica	CHCl ₃ : MeOH 20 : 80	0.8 ml/min. 64	10 µg/ml	20 µl	IR

Cuadro 4. Condiciones instrumentales utilizadas en HPLC a nivel analítico para el análisis de la muestra II-HM.

Tipo de Columna	Fase Móvil	Flujo y Sensibilidad	Concentración de la muestra	Volumen de inyección	Detector
Amino	CH ₃ CN:H ₂ O 70 : 30	0.5 ml/min. 64	10 µg/ml	20 µl	IR
Amino	CH ₃ CN:H ₂ O 78 : 22	0.5 ml/min. 64	10 µg/ml	20 µl	IR
Amino	CH ₃ CN:H ₂ O 80 : 20	0.5 ml/min. 64	10 µg/ml	20 µl	IR

5.6.3 Cromatografía de líquidos a nivel preparativo.

Una vez encontradas las condiciones a nivel analítico para la resolución de la muestra problema, se procedió a extrapolar las condiciones analíticas a un nivel preparativo para lograr el aislamiento y la purificación de los constituyentes individuales presentes en la muestra. Esta extrapolación se efectuó mediante las siguientes ecuaciones matemáticas.

Cantidad de muestra inyectada

$$M_p = M_a (L_p / L_a) (d_p^2 / d_a^2)$$

Donde:

M_p = masa de escalamiento (mg)

L_p = longitud de la columna preparativa (mm)

d_p = diámetro interno de la columna

semipreparativa (mm)

F_p = flujo a nivel preparativo (ml/min)

Flujo nivel preparativo

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

M_a = masa inyectada a nivel analítico (mg)

L_a = longitud de la columna analítica (mm)

d_a = diámetro interno de la columna

analítica (mm)

F_a = flujo a nivel analítico (ml/min)

Las condiciones para el aislamiento y la purificación de cada uno de los constituyentes presentes en la mezcla II-HM a nivel preparativo fueron las siguientes: columna amino, μ BondapakTM, 10 μ m, 19 \times 150 mm; fase móvil, CH₃CN-H₂O (78:22); flujo, 4.0 ml/min; detector, índice de refracción (sensibilidad 64 RIU); concentración de la muestra: 25 mg/500 μ l; volumen de inyección, 500 μ l.

La muestra prueba se resolvió en 7 diferentes constituyentes cuyos tiempos de retención son los siguientes: Ag-1 (t_r = 11.6 min), Ag-2 (t_r = 12.8 min), Ag-3 (t_r = 13.9 min), Ag-4 (t_r = 17.9 min), Ag-5 (t_r = 19.8 min), Ag-6 (t_r = 22.7 min), Ag-7 (t_r = 25.0 min)

5.6.4 Purificación de Ag-6.

Para lograr la purificación del compuesto Ag-6 (t_r = 22.7 min.), se realizó una inyección adicional a nivel preparativo, sólo que en esta ocasión se utilizó la técnica de corte de núcleo y reciclaje de la muestra para lograr una máxima separación y pureza (Kubo y Nakatsu, 1990). Se inyectaron 35 mg en un volumen de 500 μ l del compuesto Ag-

6 en una columna amino (μ BondapakTM, 10 μ m, 19 \times 150 mm). La fase móvil utilizada fue una mezcla binaria de CH₃CN-H₂O (78:22), a un flujo de 4.0 ml/min. Se utilizó un volumen de inyección de 500 μ l. Estas condiciones permitieron la purificación de 30 mg en forma de un sólido blanco con p.f. 145-148 °C; $\{\alpha\}_D^{20} = -29^\circ$ (c=1, MeOH); RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N, TMS): δ 4.78 (d, $J = 7.5$ Hz, Qui-1), 4.18-4.12* (Qui-2), 4.63 (dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, Qui-3), 3.52 (dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, Qui-4), 3.70 (dq, $J = 9.5, 6.5$ Hz, Qui-5), 1.45 (d, $J = 6.5$ Hz, Qui-6), 5.75 (d, $J = 8.0$ Hz, Gluc-1), 4.35-4.23* (Gluc-2), 4.35-4.23* (Gluc-3), 4.05-3.97* (Gluc-4), 3.80-3.74* (Gluc-5), 4.44 (dd, $J = 11.0, 3.0$ Hz, Gluc-6a), 4.25 (dd, $J = 11.0, 6.0$ Hz, Gluc-6b), 6.45 (d, $J = 1.5$ Hz, Ram-1), 4.85 (dd, $J = 2.0, 3.0$ Hz, Ram-2), 5.30 (dd, $J = 3.0, 9.5$ Hz, Ram-3), 4.81 (dd, $J = 9.5, 9.5$ Hz, Ram-4), 5.20 (dq, $J = 10.0, 6.5$ Hz, Ram-5), 1.95 (d, $J = 6.0$ Hz, Ram-6), 6.23 (d, $J = 7.5$ Hz, Gluc'-1), 4.09-3.97* (Gluc'-2), 4.52 (dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, Gluc'-3), 4.05-3.97* (Gluc'-4), 4.18-4.12* (Gluc'-5), 4.56-4.50* (Gluc'-6a), 4.18-4.12* (Gluc'-6b), 5.09 (d, $J = 8.0$ Hz, Qui'-1), 4.06 (dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, Qui'-2), 4.04-3.97* (Qui'-3), 3.61 (dd, $J = 9.5, 9.5$ Hz, Qui'-4), 3.14 (dq, $J = 9.5, 6.5$ Hz, Qui'-5), 1.66 (d, $J = 6.5$ Hz, Qui'-6), 5.78 (d, $J = 7.5$ Hz, Fuc-1), 4.35-4.23* (Fuc-2), 4.35-4.23* (Fuc-3), 4.04-3.97* (Fuc-4), 4.18-4.12* (Fuc-5), 1.54 * (d, $J = 6.0$ Hz, Fuc-6), 2.32 (t, $J = 7.0$ Hz, Jal-2), 3.81 (m, Jal-11), 0.86 (t, $J = 7.0$ Hz, Jal-16), 3.40 (s, Jal-MeO). RMN ¹³C (125 MHz, C₅D₅N, TMS): δ 102.36 (Qui-1), 80.80 (Qui-2), 78.43 (Qui-3), 77.08 (Qui-4), 72.18 (Qui-5), 18.25 (Qui-6), 100.57 (Gluc-1), 77.81 (Gluc-2), 76.39 (Gluc-3), 72.53 (Gluc-4), 77.50 (Gluc-5), 63.81 (Gluc-6), 100.14 (Ram-1), 71.77 (Ram-2), 78.18 (Ram-3), 78.93 (Ram-4), 67.69 (Ram-5), 18.98 (Ram-6), 102.29 (Gluc'-1), 84.76 (Gluc'-2), 76.70 (Gluc'-3), 72.28 (Gluc'-4), 79.49 (Gluc'-5), 63.32 (Gluc'-6), 104.80 (Qui'-1), 76.12 (Qui'-2), 77.44 (Qui'-3), 76.77 (Qui'-4), 73.66 (Qui'-5), 18.56 (Qui'-6), 102.91 (Fuc-1), 73.47 (Fuc-2), 75.00 (Fuc-3), 72.88 (Fuc-4), 71.08 (Fuc-5), 16.95 (Fuc-6), 173.99 (Jal-1), 34.12 (Jal-2), 80.49 (Jal-11), 14.20 (Jal-16), 51.56 (Jal-OCH₃).

* sobreposición de señales.

5.6.5 Purificación de Ag-6Ac.

Se ensayaron pruebas en HPLC a nivel analítico para el derivado peracetilado Ag-6Ac y, posteriormente, se purificó mediante cromatografía de líquidos a nivel preparativo. Las condiciones a nivel analítico incluyeron una columna de gel de sílice (μ porasilTM, 10 μ m, 3.9 \times 300 mm) y una fase móvil binaria de CHCl₃-Acetona (90:10; flujo, 0.5 ml/min.). La concentración de la muestra fue de 10 μ g/ml y un volumen de inyección de 20 μ l. El escalamiento a nivel preparativo para el aislamiento de este derivado se logró a través de las siguientes condiciones instrumentales: columna de gel de sílice (Isco, 10 μ m, 21.2 \times 250 mm); fase móvil: CHCl₃-Acetona (90:10); flujo: 6.0 ml/min, concentración de la muestra: 28.3 mg/ml; volumen de inyección: 500 μ l. De esta forma se consiguió purificar 28.3 mg del derivado Ag-6Ac (t_R = 29.86 min). RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N, TMS): δ 4.71 (d, J = 7.5 Hz, Qui-1), 4.24-4.18* (Qui-2), 5.78 (dd, J = 9.5, 9.5 Hz, Qui-3), 5.07 (dd, J = 9.7, 9.7 Hz, Qui-4), 4.13 (dq, J = 9.5, 6.2 Hz, Qui-5), 1.34 (d, J = 6.5 Hz, Qui-6), 5.12 (d, J = 7.8 Hz, Gluc-1), 4.24-4.12* (Gluc-2), 5.67 (dd, J = 10.0, 10.0 Hz, Gluc-3), 5.33 (dd, J = 9.8, 9.8 Hz, Gluc-4), 4.09 (ddd, J = 10.7, 5.0, 3.1 Hz, Gluc-5), 4.64-4.58* (Gluc-6a), 4.35-4.26* (Gluc-6b), 5.45 (d, J = 1.45 Hz, Ram-1), 5.66* (Ram-2), 4.60 (dd, J = 3.4, 9.0 Hz, Ram-3), 4.35-4.26* (Ram-4), 4.55-4.50* (Ram-5), 1.84 (d, J = 6.25 Hz, Ram-6), 5.45* (Gluc'-1), 4.24-4.12* (Gluc'-2), 5.57 (dd, J = 9.2, 9.2 Hz, Gluc'-3), 5.29 (dd, J = 9.3, 9.3 Hz, Gluc'-4), 4.35-4.26* (Gluc'-5), 4.55-4.50* (Gluc'-6a), 4.39 (dd, J = 11.7, 2.0 Hz, Gluc'-6b), 5.24 (d, J = 8.25 Hz, Qui'-1), 5.50 (dd, J = 9.2, 9.2 Hz, Qui'-2), 5.66 (dd, J = 9.5, 9.5 Hz, Qui'-3), 5.46 (dd, J = 10.0, 10.0 Hz, Qui'-4), 3.96 (dq, J = 9.5, 6.0 Hz, Qui'-5), 1.44 (d, J = 6.0 Hz, Qui'-6), 5.59 (d, J = 8.0 Hz, Fuc-1), 5.79 (dd, J = 10.5, 7.9 Hz, Fuc-2), 5.59 (dd, J = 3.3, 7.8 Hz, Fuc-3), 5.83 (d, J = 3.2 Hz, Fuc-4), 4.35-4.26* (Fuc-5), 1.29 (d, J = 7.0 Hz, Fuc-6), 2.34 (t, J = 7.4 Hz, Jal-2), 3.65 (m, Jal-11), 0.89 (t, J = 7.2 Hz, Jal-16), 3.56 (s, Jal-MeO). RMN ¹³C (125 MHz, C₅D₅N, TMS): δ 100.89 (Qui-1), 76.91 (Qui-2), 76.02 (Qui-3), 74.2 (Qui-4), 70.99 (Qui-5), 17.73 (Qui-6), 101.14 (Gluc-1), 72.57 (Gluc-2), 76.02 (Gluc-3), 69.83 (Gluc-4), 72.22 (Gluc-5), 62.55 (Gluc-6), 97.28 (Ram-1), 73.79 (Ram-2), 78.40 (Ram-3), 76.91 (Ram-4), 67.63 (Ram-5), 18.96 (Ram-6), 102.31 (Gluc'-1), 78.22 (Gluc'-2), 75.57 (Gluc'-3), 69.83 (Gluc'-4), 71.49 (Gluc'-5), 63.17 (Gluc'-6), 101.52 (Qui'-1), 72.08 (Qui'-2), 73.65 (Qui'-3), 74.01 (Qui'-4), 69.67 (Qui'-5), 17.94 (Qui'-6), 100.94

(Fuc-1), 69.44 (Fuc-2), 72.49 (Fuc-3), 70.99 (Fuc-4), 69.38 (Fuc-5), 16.09 (Fuc-6), 173.38 (Jal-1), 34.13 (Jal-2), 81.00 (Jal-11), 14.24 (Jal-16), 51.19 (Jal- OCH₃).

* sobreposición de señales.

5.6.6 Identificación de los carbohidratos presentes en Ag-6 mediante HPLC.

El compuesto Ag-6 fue sometido a una hidrólisis ácida generándose una mezcla de monosacáridos y su correspondiente aglicona. La mezcla de carbohidratos (Az) así como los estándares de azúcares utilizados se analizaron en una columna estándar para carbohidratos (Waters, 10 μ m, 3.9 \times 300 mm), utilizando como fase móvil CH₃CN-H₂O (85:15), con un flujo de 1.0 ml/min en un detector de índice de refracción. La concentración de la muestra fue de 13 μ g/ μ l y el volumen de inyección: 20 μ l. Los azúcares presentes en la mezcla se compararon con muestras auténticas de L-Ramnosa (St-1, t_r = 6.9 min), D-Quinovosa (St-2, t_r = 7.3 min), D-Fucosa (St-3, t_r = 8.3 min), D-Xilosa (St-4, t_r = 8.3 min), D-Arabinosa (St-5, t_r = 9.6 min), D-Fructosa (St-6, t_r = 11.11 min), D-Glucosa (St-7, t_r =13.6 min), D-Galactosa (St-8, t_r = 15.1 min). Posteriormente, se hizo una coelución de todos los estándares para obtener un perfil general del comportamiento de cada uno de los carbohidratos en la mezcla bajo las condiciones analíticas anteriormente descritas.

La mezcla de Az se resolvió en 5 constituyentes (Az-1-Az-5), con los siguientes tiempos de retención Az-1 t_r = 6.9 min, Az-2 t_r = 7.3 min, Az-3 t_r = 8.3 min, Az-4 t_r = 9.9 min y Az-5 t_r = 13.6 min.

6. Resultados y Discusión.

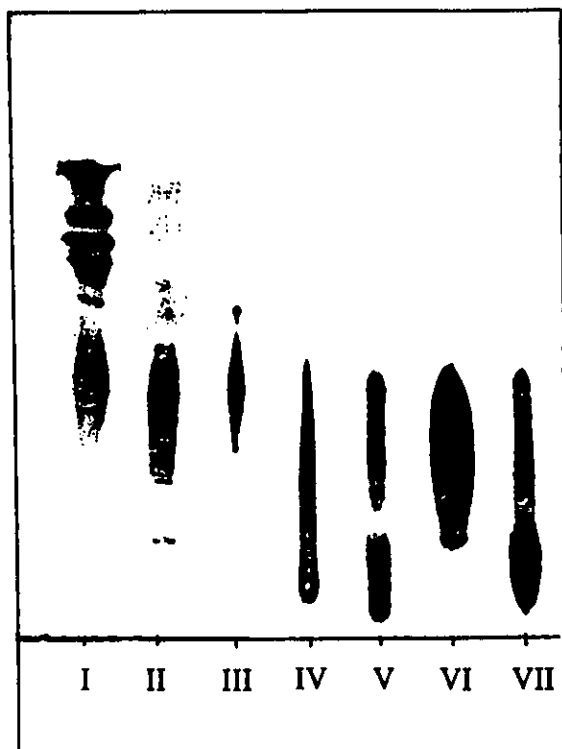
6.1 Extracción y fraccionamiento.

La preparación de los extractos clorofórmico (jalapina) y metanólico (convolvulina) de *Ipomoea purga* permitieron la obtención de 4.41 g de jalapina y 169.55 g de la convolvulina. El total de la convolvulina se sometió a un fraccionamiento en columna abierta para lograr una separación a *grosso modo* de los constituyentes presentes en el extracto de acuerdo a su polaridad. Las eluciones se realizaron con un sistema ternario MeOH-CHCl₃-CH₃COCH₃ mediante el incremento gradual de la polaridad tal y como se describió en la sección 5.4. Cabe señalar que las cromatoplacas de gel de sílice utilizadas durante todo el estudio fueron desactivadas con H₃BO₄, pues se sabe que se mejora la resolución de los azúcares en estos soportes debido a que el H₃BO₄ forma complejos con los azúcares provocando una disminución de la polaridad de estos últimos (Ghebregzabher *et al.*, 1976).

Se obtuvieron siete fracciones en orden creciente de polaridad (I-VII). Estas se sometieron a un tratamiento alcalino con el fin de generar los ácidos glicosídicos que representarían cada uno de los núcleos oligosacáridos que constituyen a estas mezclas complejas. Al término de la saponificación, cada fracción se analizó mediante CCF para observar similitudes, así como la complejidad de sus constituyentes. La figura 11 muestra el comportamiento en CCF de cada fracción antes y después del tratamiento alcalino.

Los resultados mostrados a partir de CCF revelaron una total homogeneidad para cada uno de los productos de saponificación analizados. La purificación de los ácidos glicosídicos de la convolvulina de *Ipomoea purga* se realizó mediante un análisis por HPLC de la fracción II ya que ésta representaba una de las mayoritarias. El empleo de esta técnica analítica fue determinante para lograr la separación de los constituyentes de la muestra problema y alcanzar una máxima purificación.

I



II

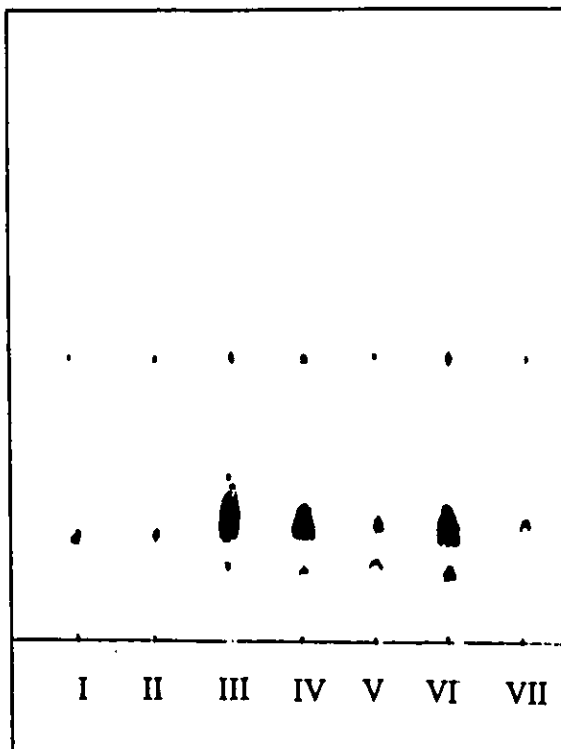


Figura 11. Fracciones obtenidas a partir de la convulvulina de *Ipomoea purga* mediante cromatografía en columna (I) y sus respectivos productos de hidrólisis básica (II).

6.2 Separación de los ácidos glicosídicos mayoritarios mediante HPLC.

La similitud de los constituyentes de las glicorresinas representa el principal obstáculo que ha impedido su purificación mediante el empleo de las técnicas convencionales cromatográficas (cromatografía en columna a baja presión sobre gel de sílice o sephadex, intercambio iónico, filtración en gel, etc.). La aplicación de éstas sólo ha permitido la purificación parcial de estas mezclas complejas de oligosacáridos. El éxito en la purificación total de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas ha dependido únicamente del empleo de la cromatografía de líquidos (Bah, 1997).

Se realizaron pruebas a nivel analítico de la mezcla de saponificación II-H utilizando columnas de fase normal (gel de sílice) y de fase reversa enlazada con dimetiloctadecilsilano (C_{18}), ya que el uso de estas columnas se ha descrito para la

purificación de ácidos glicosídicos resultantes del proceso de hidrólisis alcalina de las resinas (MacLeod y Ward, 1997) y de los productos naturales presentes en las glicorresinas (Noda *et al.*, 1990). Sin embargo, las pruebas realizadas no fueron satisfactorias debido a que en la columna de gel de sílice la muestra presentó una alta afinidad y, en consecuencia, se observaron tiempos de retención muy largos y un alto gasto de disolvente. Las pruebas realizadas en C₁₈ produjeron una elución muy rápida por lo que era necesario aumentar la proporción de agua en el sistema de elución utilizado. Se manejó hasta un 50 % H₂O en la composición de la fase móvil y los resultados de nueva cuenta no fueron satisfactorios. Las condiciones cromatográficas a nivel analítico ensayadas se describieron anteriormente en el cuadro 3 (sección 5.6.2.1).

Debido a que la columna de aminopropilmetilsilano se recomienda para el aislamiento de carbohidratos, y dado el alto contenido de glicósidos en la muestra problema, se procedió al empleo de esta columna. Por otra parte, este tipo de columna ya había sido utilizado con anterioridad en nuestro laboratorio para la purificación de glicolípidos de *Ipomoea tricolor* y sus ácidos glicosídicos asociados (Bah, 1997). Con la finalidad de disminuir la polaridad de la muestra, se realizó la metilación de ésta antes de ser analizada mediante HPLC. Los resultados fueron satisfactorios pues se encontró una resolución total de los constituyentes glicosídicos presentes en la mezcla II-HM al utilizarse el sistema de elución binario constituido por CH₃CN-H₂O (78:22) a flujo de 0.5 ml/min (Cuadro 4, sección 5.6.2.1).

Estas condiciones instrumentales se extrapolaron a nivel preparativo de acuerdo con los procedimientos descritos en la sección 5.6.3, encontrándose que la cantidad de muestra a inyectar debía ser de 23.7 mg empleando un flujo de la fase móvil de 6 ml/min. Sin embargo, uno de los riesgos que se corren al manejar flujos altos utilizando una celda de índice de refracción como detector es que se pueden generar altas presiones dentro de la celda provocando su fractura. Por esta razón, se decidió ajustar el flujo de trabajo para lograr el aislamiento y la purificación del compuesto de interés a 4 ml/min ya que estas condiciones instrumentales permitieron mantener la resolución de cada uno de los constituyentes oligosacáridos presentes en la mezcla problema. La figura 12 muestra el cromatograma obtenido a nivel preparativo. El rendimiento obtenido para cada uno de estos constituyentes oligosacáridos se presenta en el cuadro 5.

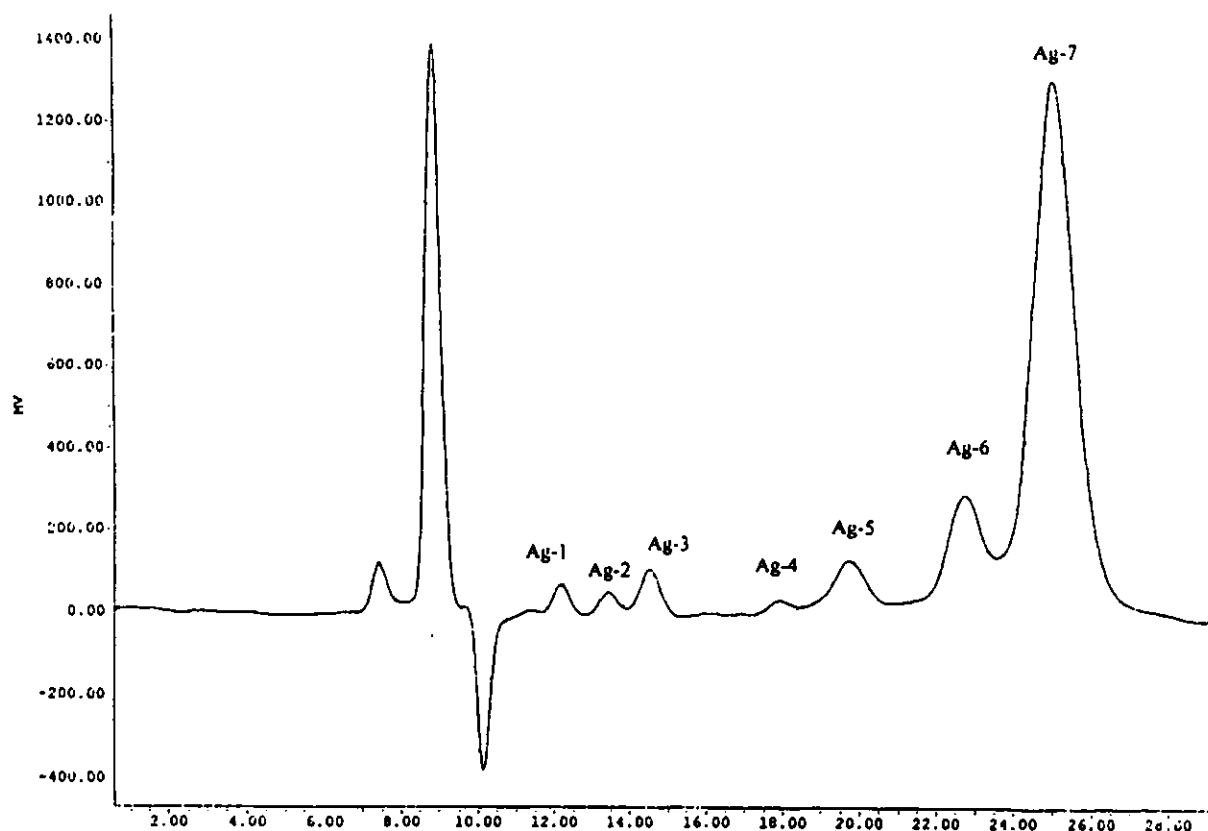


Figura 12. Aislamiento y purificación de los constituyentes presentes en la mezcla metilada de ácidos glicosídicos derivados de la convolvulina (II-HM) de *Ipomoea purga* mediante HPLC a nivel preparativo. Condiciones instrumentales: columna amino (μ Bondapak, 10 μ m, 19 \times 150 mm); fase móvil: CH₃CN-H₂O (78:22); flujo: 4.0 ml/min; detector: índice de refracción (sensibilidad 64 RIU), concentración de la muestra 25 mg/500 μ l; volumen de inyección: 500 μ l. Asignación de las señales observadas: Ag-1 (t_r =11.6 min); Ag-2 (t_r =12.8 min); Ag-3 (t_r =13.9 min); Ag-4 (t_r =17.9 min); Ag-5 (t_r =19.8 min); Ag-6 (t_r =22.7 min); Ag-7 (t_r =25.0 min).a

El compuesto mayoritario Ag-7 (t_r = 25 min) correspondió al éster metílico del ácido glicosídico mayoritario (trivialmente denominado con el nombre de ácido púrgico A) previamente descrito para la convolvulina de *Ipomoea purga* (Cruz-Bailón, 1998). Esta propuesta estructural se comprobó al realizar una coelución del compuesto puro Ag-7 con una muestra auténtica. El escalamiento de las condiciones instrumentales a nivel preparativo permitió la separación de un segundo constituyente, el ácido púrgico B, con un tiempo de retención de 22.7 min (Ag-6). Este compuesto representa el ácido glicosídico constitutivo más abundante de la convolvulina de la raíz de jalapa después del oligosacárido Ag-7.

Cuadro 5. Rendimiento de cada uno de los constituyentes presentes en la mezcla problema obtenido mediante cromatografía de líquidos a nivel preparativo.

Constituyente	Tiempo de retención (min)	Peso (mg)
Ag-1	$t_r = 11.6$	4.05
Ag-2	$t_r = 12.8$	3.2
Ag-3	$t_r = 13.9$	6.8
Ag-4	$t_r = 17.9$	6.1
Ag-5	$t_r = 19.8$	18.6
Ag-6	$t_r = 22.7$	35.9
Ag-7	$t_r = 25.0$	65.1

Para garantizar una máxima pureza, Ag-6 ($t_r = 22.7$ min) se sometió a un proceso de purificación mediante una segunda inyección utilizando la técnica de corte de núcleo y reciclaje. La figura 13 muestra el cromatograma obtenido al cabo de una secuencia de cinco ciclos a través de la columna cromatográfica. Las dos primeras eluciones permitieron eliminar los constituyentes minoritarios que presentaron tiempos de retención diferentes al de la muestra problema. De tal suerte que los picos que aparecen antes ($t_r = 12.4$ min) y después ($t_r = 38.8$ min) del núcleo de interés se eliminaron del sistema para permitir el reciclamiento del compuesto Ag-6 durante 95 min. A partir del segundo ciclo, se inició el desdoblamiento del pico en reciclaje. Dos ciclos adicionales fueron suficientes para obtener la máxima purificación de la muestra problema.

6.3 Purificación del derivado peracetilado (Ag-6Ac) mediante HPLC.

La generación del compuesto acetilado a partir de Ag-6 provocó una disminución de su polaridad, teniendo como consecuencia la solubilidad de la muestra en disolventes de baja polaridad. De acuerdo con esto, se decidió que la purificación de Ag-6Ac mediante HPLC sería utilizando una columna de fase normal como la de gel de sílice. La figura 14 muestra el cromatograma a nivel analítico del análisis del compuesto peracetilado. De igual forma estas condiciones se extrapolaron a nivel preparativo de acuerdo con lo establecido

en la sección 5.6.3, resultando que se debería realizar una inyección con una cantidad de muestra de 49.24 mg con un flujo de trabajo de 12.31 ml/min.

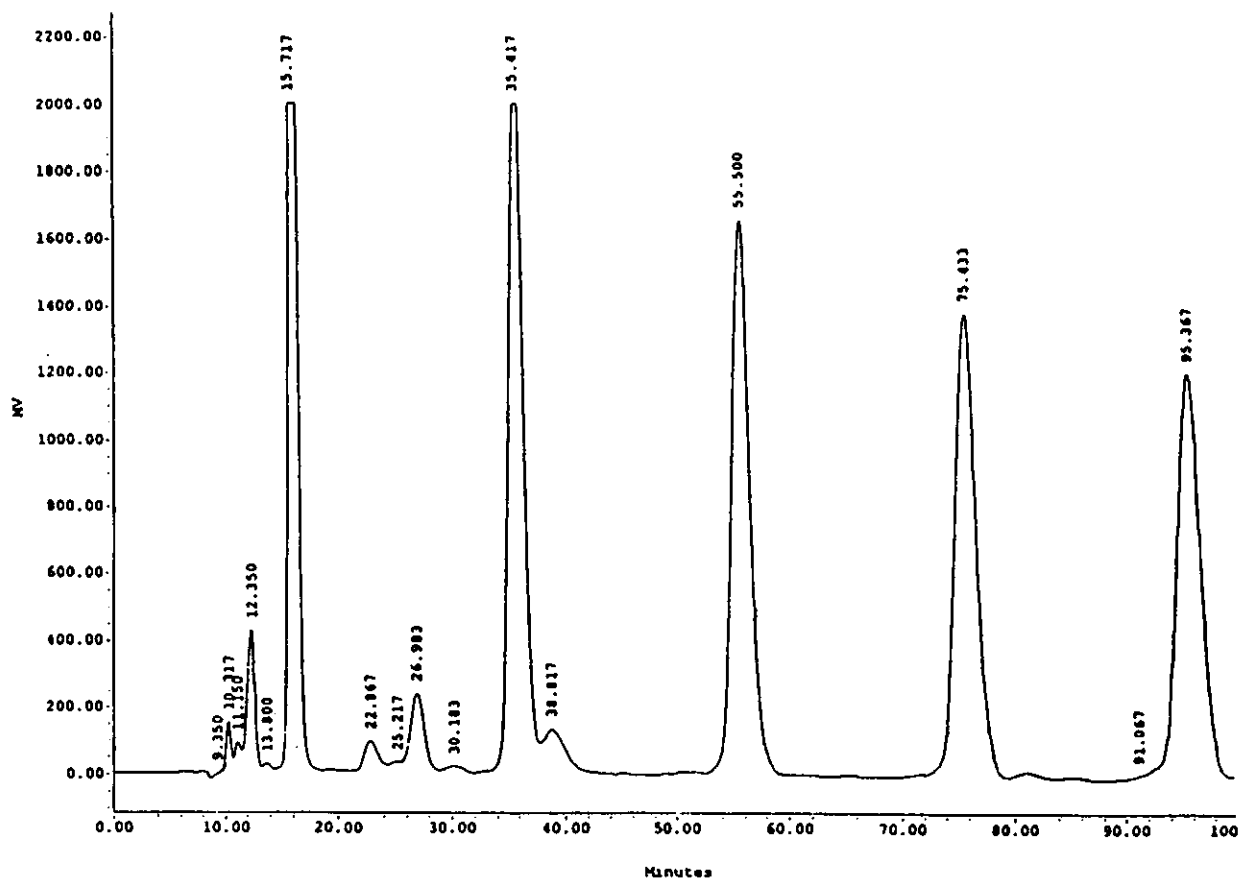


Figura 13. Purificación del compuesto Ag-6 mediante recirculación de la muestra a través de HPLC a nivel preparativo. Condiciones instrumentales: columna amino (μ Bondapak, 10 μ m, 19 \times 150 mm); fase móvil: CH₃CN-H₂O (78:22); flujo: 4.0 ml/min; detector: índice de refracción (sensibilidad 64 RIU); concentración de la muestra 25 mg/500 μ l; volumen de inyección: 500 μ l.

Por las mismas razones establecidas para II-HM, el flujo se disminuyó a 6 ml/min y sólo se inyectaron 28.3 mg para mejorar la eficiencia en la resolución que proporcionaría la columna. La figura 15 muestra el cromatograma obtenido durante la purificación del producto peracetilado a nivel preparativo.

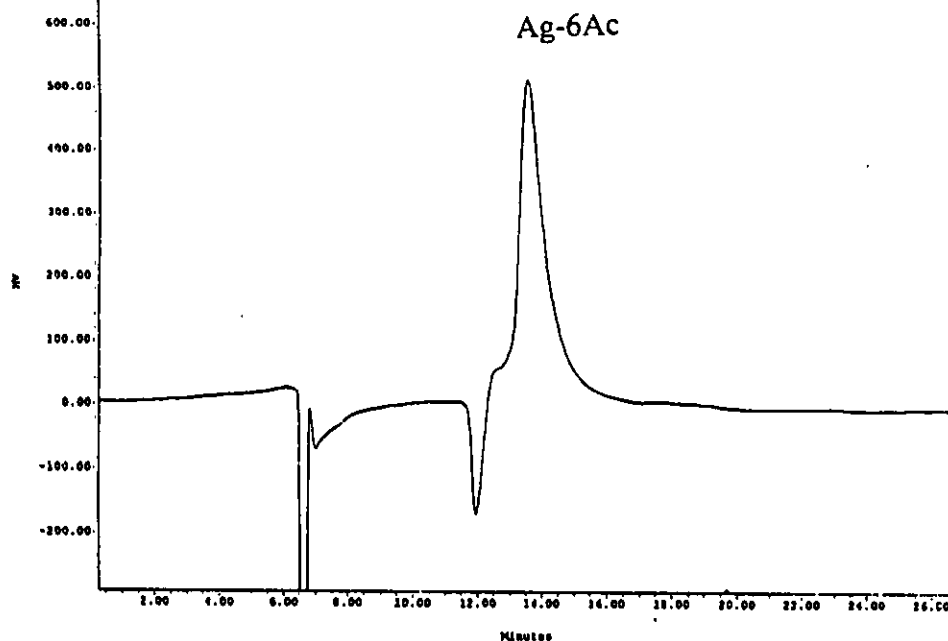


Figura 14. Resolución del producto Ag-6Ac mediante HPLC a nivel analítico. Condiciones instrumentales: columna de gel de sílice (μ porasilTM, 10 μ m, 3.9 \times 300 mm); fase móvil CHCl₃-Acetona (90:10); flujo: 0.5 ml/min; detector: índice de refracción (sensibilidad 64 RIU), concentración de la muestra 10 μ g/ml; volumen de inyección: 20 μ l; t_r =13.5 min.

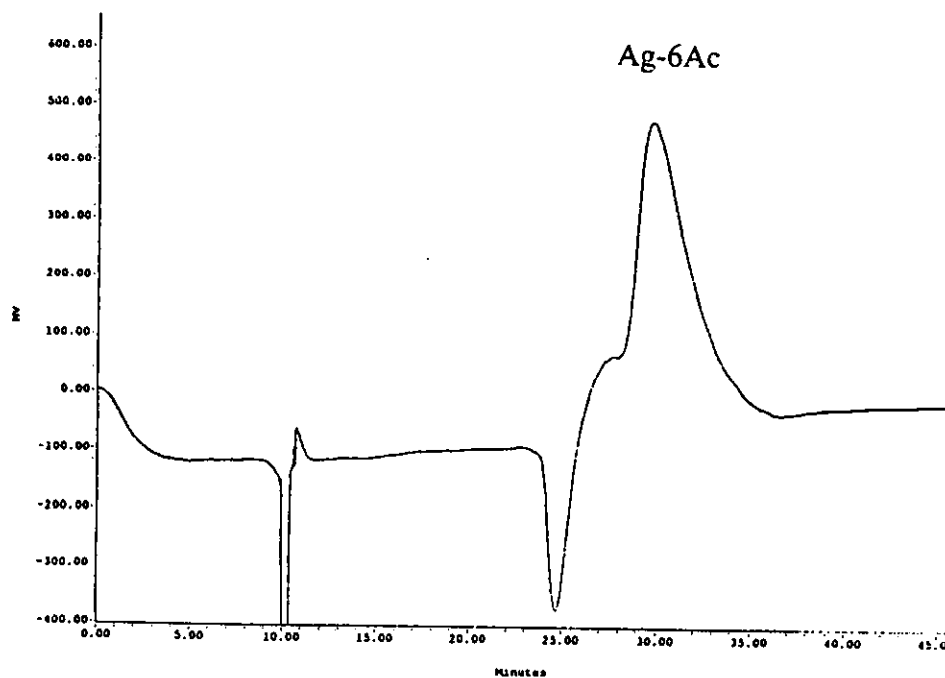


Figura 15. Aislamiento y purificación del producto Ag-6Ac mediante HPLC a nivel preparativo. Condiciones instrumentales: columna de gel de sílice (Isco, 10 μ m, 21.2 \times 250 mm); fase móvil CHCl₃-Acetona (90:10); flujo: 0.5 ml/min; detector: índice de refracción (sensibilidad 64 RIU); concentración de la muestra 28.3 mg/ml; volumen de inyección: 500 μ l; t_r =29.86 min.

6.4 Análisis estructural de los productos de hidrólisis ácida de Ag-6.

6.4.1 Caracterización de la aglicona.

La liberación del ácido graso hidroxilado que corresponde a la aglicona del núcleo oligosacárido se logró a través del tratamiento con una solución ácida del compuesto Ag-6. La purificación de la aglicona se llevó a cabo también mediante HPLC para garantizar una alta pureza. El cromatograma obtenido a nivel preparativo se muestra en la figura 16. Los parámetros instrumentales establecidos para la purificación de la aglicona se describieron en la sección 5.5.4.2.

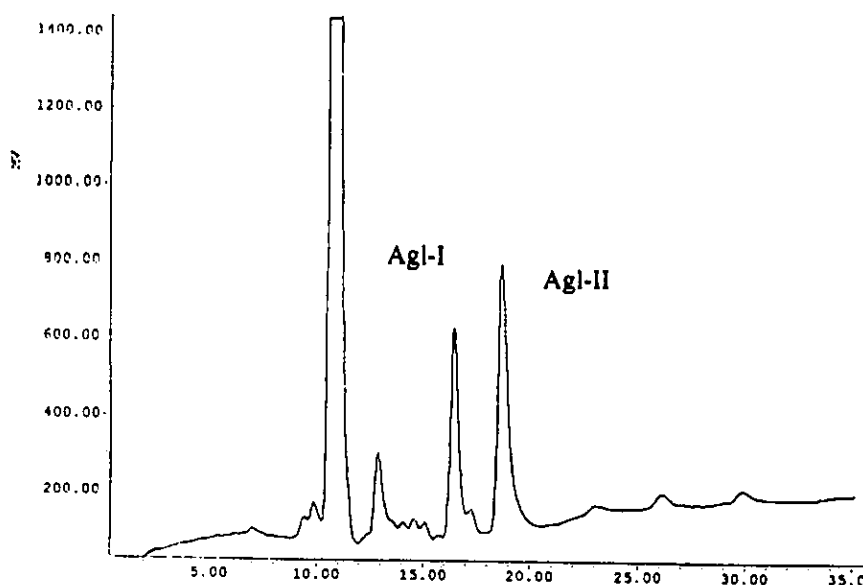


Figura 16. Aislamiento y purificación de la aglicona constitutiva de los núcleos oligosacáridos Ag-6 ($t_r=16.4$ min) y de Ag-7 ($t_r=18.66$ min) mediante HPLC a nivel preparativo. Condiciones instrumentales: columna de gel de sílice (Isco, $10 \mu\text{m}$, 21.2×250 mm); fase móvil Hexano- CHCl_3 -Acetona (6:3:1); flujo: 6 ml/min; detector: índice de refracción (sensibilidad 64 RIU); concentración de la muestra 5 mg/500 μl ; volumen de inyección: 500 μl .

El análisis de la aglicona se llevó a cabo a través del análisis de su derivado sililado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas por impacto electrónico (CG-EI), ya que esta técnica ha sido de gran utilidad en la determinación del tamaño de los ácidos grasos saturados de alto peso molecular presentes en los glicolípidos además de proporcionar evidencias para la localización de los grupos hidroxilos en la cadena

hidrocarbonada (Bah, 1997). Mediante este procedimiento se genera un derivado de mayor estabilidad para las condiciones utilizadas en la ionización de la muestra. Así en el espectro de masas del derivado sililado de AgI-I se observó el ion molecular $[M-1]^+$ que corresponde a una fórmula molecular de $C_{20}O_3SiH_{42}$ (358 Da). Los fragmentos producidos a partir de la ruptura alfa al heteroátomo permitieron establecer la posición del hidroxilo en la aglicona, como se muestra por la formación de los iones 287 (58 %) y 173 (100 %). La figura 17 muestra el espectro de masas del ácido jalapínolico obtenido y el patrón de fragmentación generado.

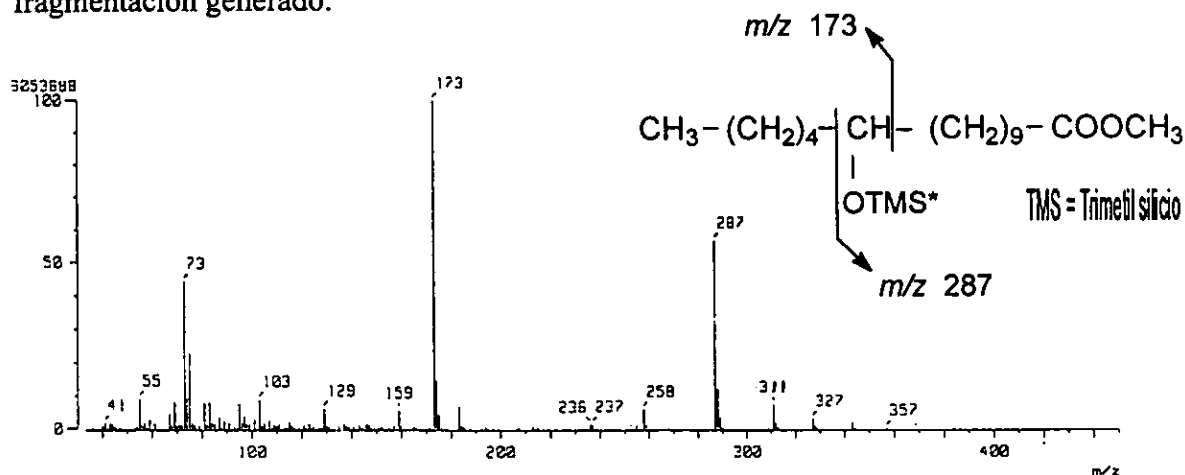


Figura 17. Espectro de masas generado por impacto electrónico del derivado sililado del jalapinolato de metilo (AgI-I).

6.4.2 Identificación de los carbohidratos.

La cromatografía de líquidos permitió la identificación de cada una de las unidades sacáridas presentes en Ag-6. El análisis se inició mediante la inyección individual de la mezcla problema y la posterior coelución con varias muestras auténticas de los azúcares bajo las mismas condiciones instrumentales tal y como se describe en la sección 5.6.6. Este proceso proporcionó los tiempos de retención de cada uno de los estándares utilizados y, por lo tanto, la identificación de cada uno de los carbohidratos. La figura 18 muestra el cromatograma obtenido de la coelución de los estándares de carbohidratos.

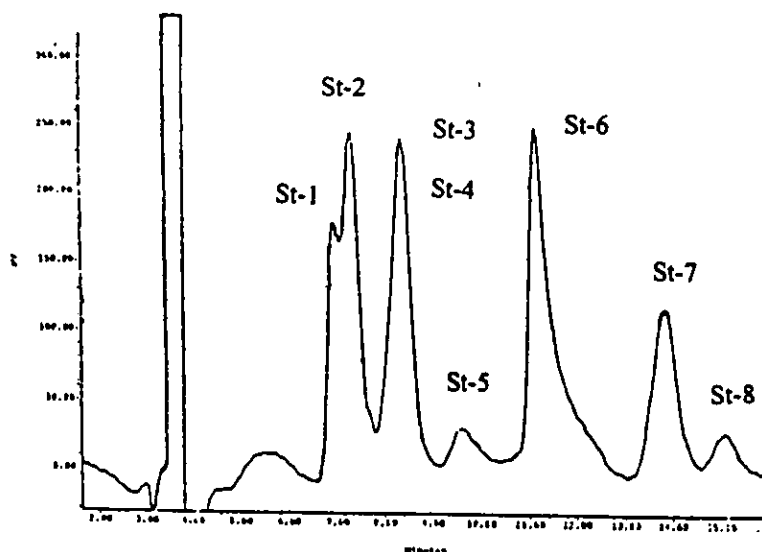


Figura 18. Coelución de los estándares de carbohidratos mediante HPLC a nivel analítico. Condiciones instrumentales: columna para análisis de carbohidratos (Waters, 10 μ m, 3.9 \times 300 mm); fase móvil: CH₃CN-H₂O (85:15); flujo: 1.0 ml/min; detector: índice de refracción; concentración de la muestra: ramnosa (St-1, t_r =6.9 min) 10 μ g/ μ l; quinovosa (St-2, t_r =7.3 min) 10 μ g/ μ l; fucosa (St-3, t_r =8.3 min) 14 μ g/ μ l; xilosa (St-4, t_r =8.3 min) 11 μ g/ μ l; arabinosa (St-5, t_r =9.6 min) 8 μ g/ μ l; fructosa (St-6, t_r =11.11 min) 12 μ g/ μ l; glucosa (St-7, t_r =13.6 min) 10 μ g/ μ l; galactosa (St-8, t_r =15.1 min) 13 μ g/ μ l; volumen de inyección: 20 μ l.

El análisis de la mezcla de monosacáridos Az se realizó utilizando las mismas condiciones instrumentales desarrolladas para los estándares de carbohidratos. La muestra se resolvió en 5 componentes. La figura 19 muestra el cromatograma obtenido.

Para lograr la identificación de los carbohidratos presentes en Az, se efectuó una coelución de la mezcla problema (Az) con las siguientes muestras auténticas: L-ramnosa, D-quinovosa, D-fucosa y D-glucosa. La elección de estos estándares se basó en la similitud que se observó entre los tiempos de retención de los componentes presentes en la mezcla Az y los desarrollados por las muestras estándares de los azúcares (Ver cuadro 6). La figura 20 muestra el cromatograma de la coelución de la mezcla de los azúcares con los estándares referencia.

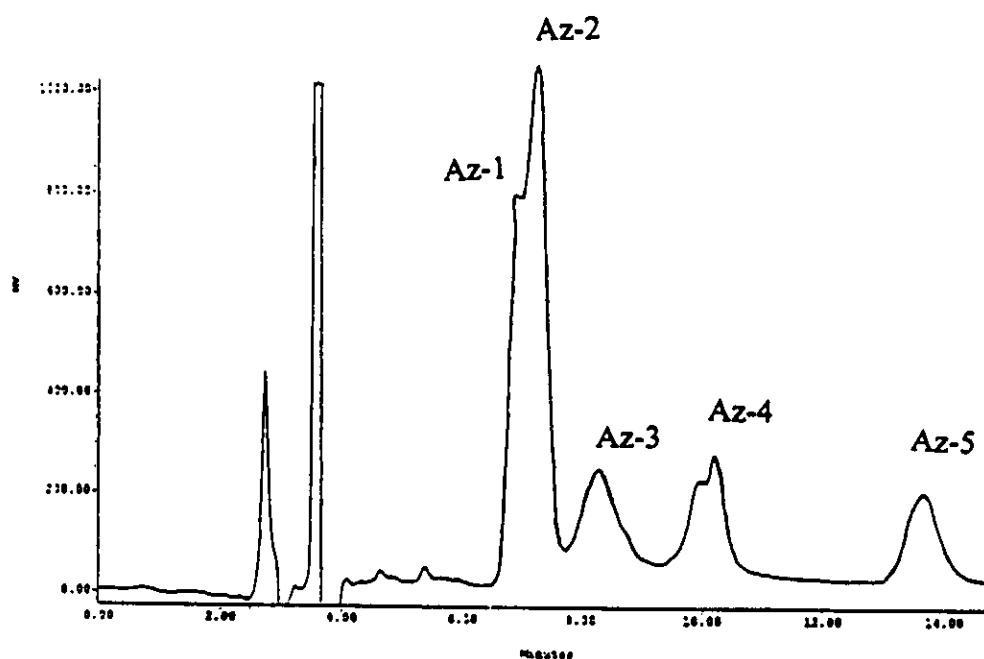


Figura 19. Análisis del contenido de carbohidratos Az a nivel analítico. Condiciones instrumentales: columna para análisis de carbohidratos (Waters, 10 μm , 3.9 \times 300 mm); fase móvil: $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (85:15); flujo: 1.0 ml/min; detector: índice de refracción; concentración de la muestra: 45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; volumen de inyección: 20 μl . Asignación de señales: Az-1 ($t_r=6.8$ min); Az-2 ($t_r=7.2$ min); Az-3 ($t_r=8.3$ min); Az-4 ($t_r=9.9$ min); Az-5 ($t_r=13.6$ min).

Cuadro 6. Comparación de los tiempos de retención entre los estándares de carbohidratos y los carbohidratos encontrados en Ag-6.

Monosacáridos en Az	Tiempo de retención (min)	Estándares de Carbohidratos	Tiempo de retención (min)
Az-1	6.9	St-1	6.9
Az-2	7.3	St-2	7.3
Az-3	8.3	St-3	8.3
Az-4	9.9	-	-
Az-5	13.6	St-7	13.6

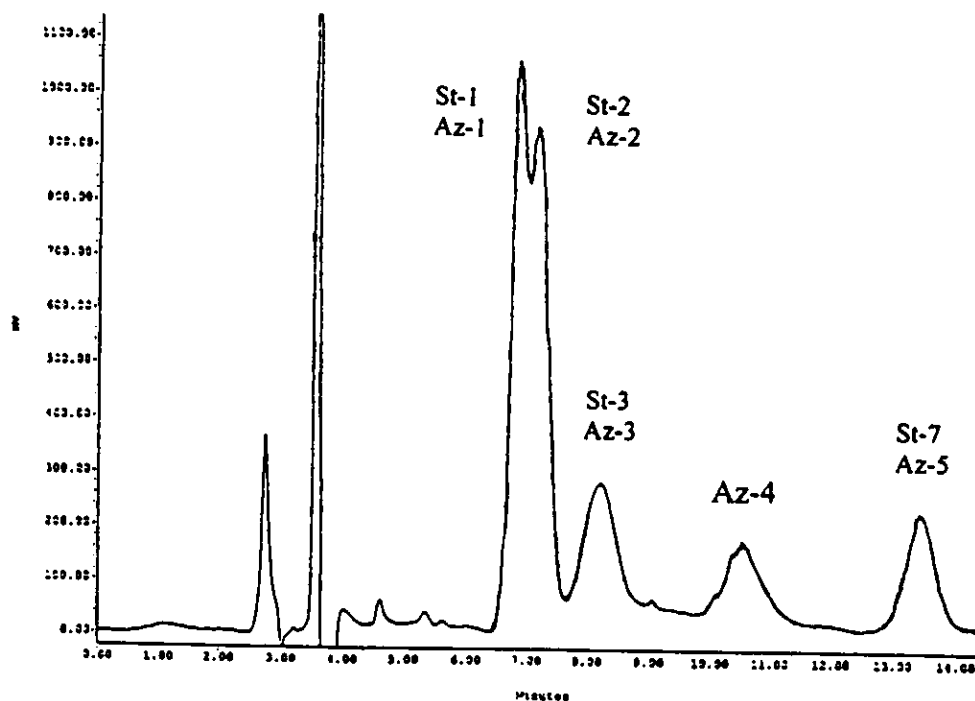


Figura 20. Coelución del contenido de carbohidratos de Az y los estándares de L-ramnosa, D-quinovosa, D-fucosa y D-glucosa mediante HPLC a nivel analítico. Condiciones instrumentales: columna para análisis de carbohidratos (Waters, 10 μ m, 3.9 \times 300 mm); fase móvil: CH₃CN-H₂O (85:15); flujo: 1.0 ml/min; detector: índice de refracción; concentración de la muestra: 10 μ g/ μ l; volumen de inyección: 20 μ l. Asignación de señales: St-1Az-1 (L-ramnosa, t_r =6.8 min); St-2Az-2 (D-quinovosa, t_r =7.2 min); St-3Az-3 (D-fucosa, t_r =8.3 min); Az-4 (Producto de hidrólisis parcial, t_r =9.9 min); St-7Az-5 (D-glucosa, t_r =13.6 min).

El cromatograma refleja los mismo tiempos de retención tanto en los estándares como en los carbohidratos de la muestra problema, salvo el compuesto con un tiempo de retención de 9.9 min, el cual corresponde a un producto de degradación parcial (Az-4) de la materia prima. Por lo tanto, el núcleo oligosacárido del compuesto Ag-6 esta constituido por D-quinovosa, L-ramnosa, D-fucosa y D-glucosa.

6.5 Caracterización de Ag-6 a través de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Los espectros unidimensionales de ¹H y ¹³C fueron el primer paso para obtener una información general acerca de la estructura del ácido glicosídico estudiado. Los desplazamientos químicos alrededor 95-112 ppm en el espectro de ¹³C correspondientes a

los carbonos anoméricos permitieron establecer el número de unidades monosacáridas presentes en el núcleo del compuesto Ag-6. Esta zona mostró seis señales anoméricas y, por lo tanto, la presencia de seis monosacáridos en la muestra. Otras señales características en el espectro de ^{13}C son las que aparecen alrededor de 57.7 a 64.7 ppm las cuales corresponden a hidroximetilenos no sustituidos. En el espectro de la muestra aparecieron dos señales en esta zona y de acuerdo con los resultados observados en el análisis de los azúcares mediante HPLC el único azúcar que posee hidroximetilenos es la glucosa, por lo que la muestra Ag-6 posee dos unidades de esta hexosa. La señal presente en la región de 173.99 ppm justifica la presencia del grupo carbonilo correspondiente al ácido glicosídico que conforma la aglicona.

El análisis del espectro de RMN- ^1H reveló la presencia de 6 señales dobles en la zona de 4.7 a 6.5 ppm correspondientes a los protones anoméricos lo cual confirmó la presencia de seis unidades monosacáridas en la molécula como se había propuesto con base en el número de señales observadas para los carbonos anoméricos. Las señales dobles presentes en la zona de 1.4 a 1.9 ppm son características de grupos metilos de 6-desoxihexosas y en el espectro de RMN- ^1H de la muestra Ag-6 se observaron cuatro señales dobles en esta zona, lo que indica que de los seis monosacáridos de la misma, cuatro son metilpentosas.

Cuadro 7. Desplazamientos químicos (RMN ^1H y ^{13}C) para las señales anoméricas y los grupos metilo (Me-6) de las pentosas.

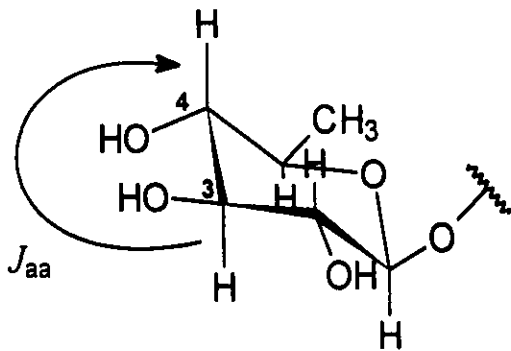
^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	H-6 (ppm)
4.78 d (7.5)	100.14	1.45 d (6.5)
5.09 d (8.0)	100.57	1.54 d (6.0)
5.75 d (8.0)	102.15	1.66 d (6.5)
5.78 d (7.5)	102.40	1.95 d (6.0)
6.23 d (7.5)	102.92	
6.45 d (1.5)	104.76	

Uno de los principales problemas para la completa asignación de las resonancias en el espectro de RMN ^1H es la sobreposición de señales en la zona central entre 3.0 y 4.5 ppm. Lo anterior motivó la preparación del derivado peracetilado de Ag-6 para así lograr una dispersión de las señales y con ello la identificación de cada una de las unidades monosacáridas del núcleo oligosacárido.

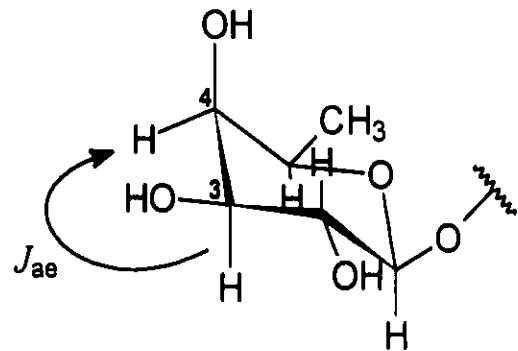
De acuerdo con los resultados del análisis de los monosacáridos obtenidos mediante HPLC, las metilpentosas presentes en Ag-6 son L-ramnosa, D-quinovosa y D-fucosa y, de acuerdo con los resultados mostrados en el espectro de RMN- ^1H de Ag-6 alguna de estas unidades se encontraría duplicada en la molécula. El análisis y la identificación de las metilpentosas se puede lograr a través de los valores de las constantes de acoplamiento de cada una de las unidades monosacáridas. Se sabe que el protón anomérico de la ramnosa tiene una constante de acoplamiento $^3J_{1,2}$ de 1-2 Hz. Observando el espectro de RMN- ^1H la única señal doble en la zona de los protones anoméricos con una constante de acoplamiento en este rango es la señal localizada en 6.45 ppm ($J_{1,2}=1.5$ Hz), lo cual indica la presencia de ramnosa en la molécula.

El auxilio de las técnicas espectroscópicas bidimensionales en la RMN (COSY) permitió la asignación de cada uno de los protones vecinales de las unidades monosacáridas y, con ello resolver la zona tan compleja producida por la sobreposición de los protones de los metinos (3.5-6.0 ppm). Mediante el análisis del espectro de RMN- ^1H del derivado peracetilado, se pudo establecer la existencia de la fucosa debido a la señal doble ubicada en 5.83 ppm correspondiente al H-4 de este monosacárido con una constante de acoplamiento $J_{3,4} = 3.2$ Hz, pues este valor de J no puede pertenecer a las señales de la quinovosa ya que sólo se observan interacciones trans-diaxiales en esta última. Lo anterior está basado en la curva de Karplus, la cual establece una relación entre la constante de acoplamiento y el ángulo diedro formado entre los protones vecinales relacionados. A mayor apertura del ángulo, mayor es la constante de acoplamiento (Günther, 1997).

Si lo anterior lo representamos esquemáticamente tendremos:

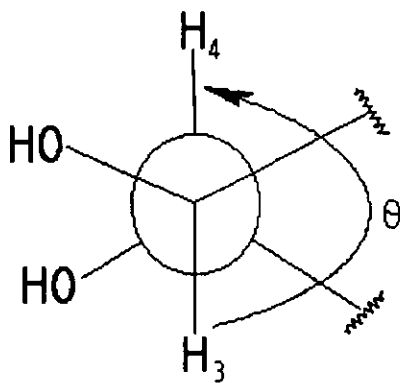


Quinovosa

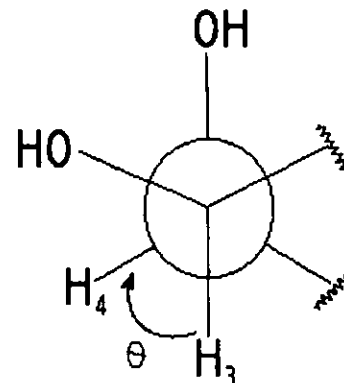


Fucosa

Representando la molécula en una proyección de Newman y observando a través del centro quiral C_3 para cada monosacárido, se pueden representar las siguientes conformaciones alternadas para el enlace C_3-C_4 de estos monosacáridos epiméricos en el centro asimétrico C_4 :



Quinovosa



Fucosa

$\theta = \text{ángulo diedro}$

Al comparar las dos proyecciones se observa que el ángulo diedro formado entre los protones 3 y 4 es menor en la fucosa con respecto al de la quinovosa. Por lo tanto, la constante de acoplamiento ($J_{3,4}$) es mayor en la quinovosa ($J = 9.5$ Hz) y menor para la fucosa ($J = 3.2$ Hz).

Este análisis en conjunto con las conectividades establecidas mediante las interacciones vecinales ^1H - ^1H y a larga distancia totales (HMBC) permitió establecer la presencia de sólo un monosacárido con el núcleo de fucosa y, por lo tanto, la metilpentosa que se duplicaba debería corresponder a la quinovosa.

El análisis por espectrometría de masas del compuesto Ag-6 se realizó mediante el empleo de una técnica de ionización suave, el bombardeo rápido de átomos en modo negativo (FAB-), porque permite el análisis de los glicósidos sin la necesidad de generar derivados (Bah, 1997). Los resultados de esta técnica espectrométrica revelaron que el peso molecular del éster metílico del ácido glicosídico Ag-6 corresponde a 1194 Da. El patrón de fragmentación evidenció la pérdida consecutiva de las unidades de metilpentosa 1048 ($\text{M}-146$), de hexosa 886 ($\text{M}-146-162$), de metilpentosa 739 ($886-146$), de metilpentosa 593 ($739-146$), de hexosa 431 ($593-162$), de metilpentosa 285 ($431-146$). Este análisis confirmaba las observaciones previas de la presencia de 4 unidades de metilpentosa y 2 unidades de hexosa. La formación del ión correspondiente a la aglicona m/z 285 permitió su identificación como el éster metílico del ácido jalapínico (Bah y Pereda-Miranda, 1996). Estos resultados se ajustaron a la siguiente fórmula molecular $\text{C}_{53}\text{O}_{29}\text{H}_{94}$, la cual corresponde al éster metílico del ácido jalapínico unido a seis unidades monosacáridas, 4 de ellas son metilpentosas y las dos restantes son hexosas. Así, las evidencias espectrométricas se encuentran en total concordancia con los resultados espectroscópicos (RMN), mismos que permitieron establecer la secuencia de glicosilación que se ilustra en la figura 21.

Una vez identificadas las unidades monosacáridas presentes en la molécula y conociendo la secuencia de glicosidación a través de la espectrometría de masas lo que resta por establecer son los sitios de unión de cada uno de los monosacáridos y el orden de las metilpentosas en el núcleo oligosacárido. Esto se logró por medio de técnicas

espectroscópicas heteronucleares a largo alcance (HMBC). El análisis de este espectro permitió establecer cada una de las conectividades del núcleo oligosacárido de la muestra (Cuadro 8, Figura 22).

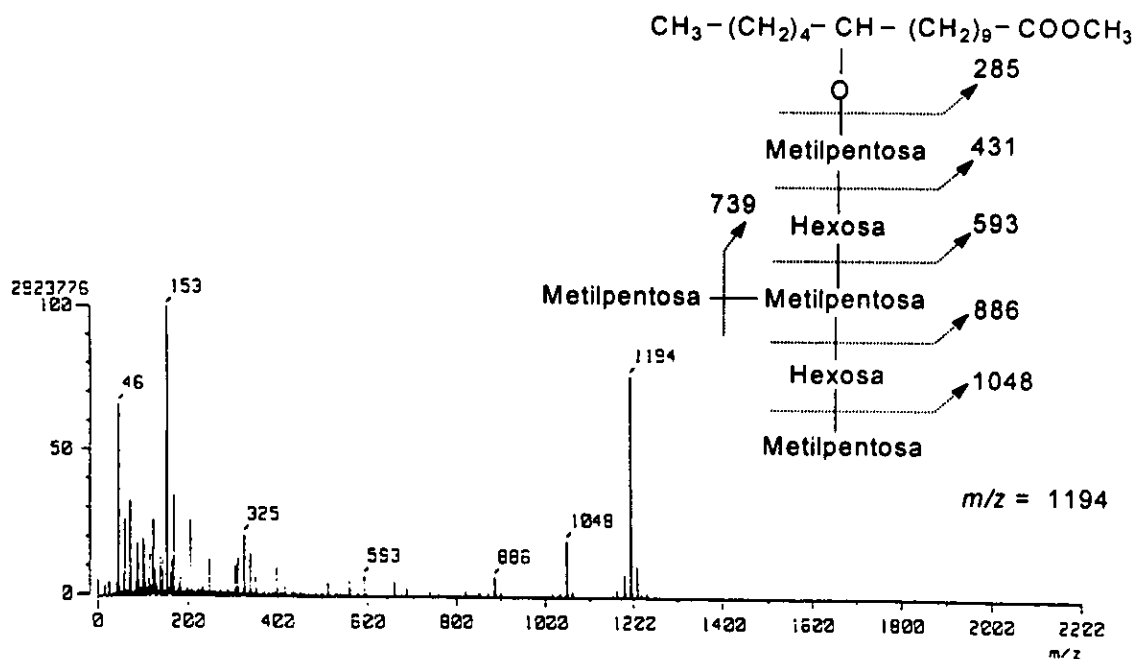


Figura 21. Espectro de masas FAB negativo del éster metílico del ácido glicosídico Ag-6. Se ilustra el patrón de fragmentación del núcleo oligosacárido.

Cuadro 8. Conectividades heteronucleares $^3J_{1H-13C}$ observadas a través de los experimentos bidimensionales a larga distancia (HMBC).

Conectividad $^3J_{1H-13C}$	Conectividad $^3J_{13C-1H}$
H-1 _{Qui} (4.78 ppm) – C-11(80.49ppm)	-
H-1 _{Gluc} (5.75 ppm) – C-2 _{Qui} (80.80 ppm)	C-1 _{Gluc} (100.57 ppm) – H-3 _{Ram} (5.3 ppm)
H-1 _{Ram} (6.45 ppm) – C-2 _{Gluc} (77.81 ppm)	-
H-1 _{Gluc} '(6.23 ppm) – C-3 _{Ram} (78.18 ppm)	-
H-1 _{Qui} '(5.09 ppm) – C-2 _{Gluc} '(84.76 ppm)	-
H-1 _{Fuc} (5.78 ppm) – C-4 _{Ram} (78.93 ppm)	C-1 _{Fuc} (102.91 ppm) – H-4 _{Ram} (4.81 ppm)

Los resultados anteriores permitieron establecer la estructura del ácido púrgico B (Ag-6) como el 11-*O*-β-D-quinovopiranosil-(1→2)-*O*-β-glucopiranosil-(1→3)-*O*-[β-D-fucopiranosil-(1→4)]-*O*-α-L-ranopiranosil-(1→2)-*O*-β-D-glucopiranosil-(1→2)-*O*-β-D-quinovopiranosido del ácido (11*S*)-11-hidroxihexadecanoico.

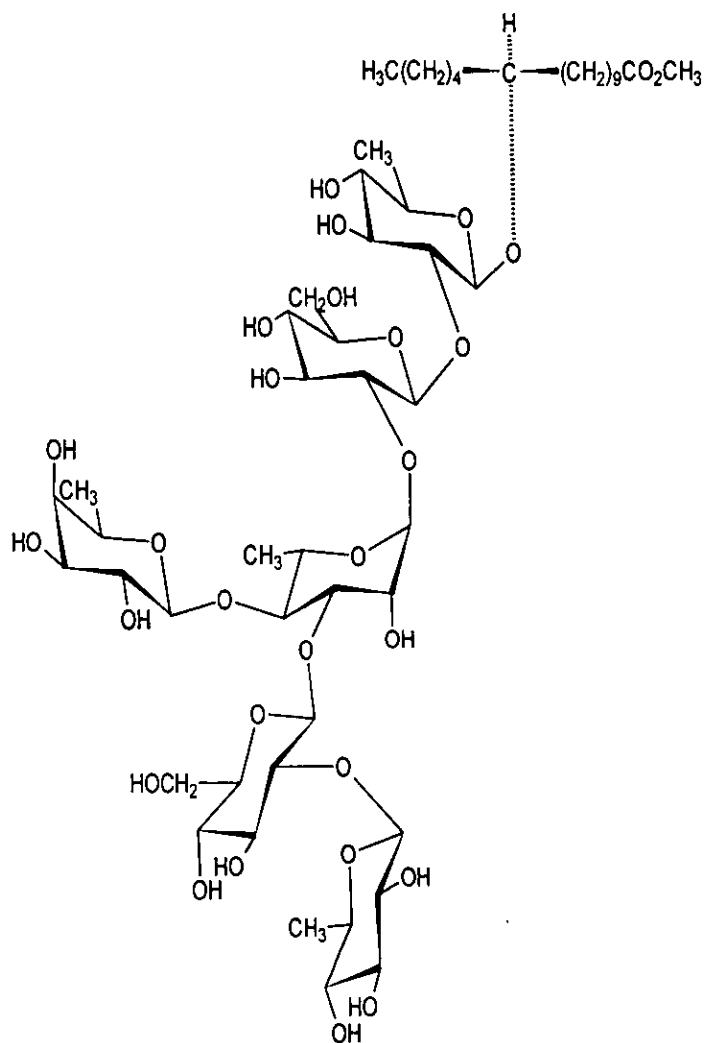


Figura 23. Estructura del éster metílico del ácido glicosídico (ácido púrgico B) presente en la convolvulina de *Ipomoea purga*.

Conclusiones.

El extracto convolvulínico de *Ipomoea purga* reveló la presencia de una mezcla compleja de glicolípidos, constituyentes de las resinas glicosídicas responsables de la actividad purgante de la raíz de jalapa.

La saponificación de la convolvulina proporcionó siete ácidos glicosídicos, de los cuales se logró el aislamiento y la caracterización de los dos componentes mayoritarios Ag-7 y Ag-6 denominados trivialmente como ácido púrgico A y ácido púrgico B respectivamente. El núcleo oligosacárido mayoritario correspondió a un hexasacárido conocido del ácido convolvulínico y caracterizado como el 11-*O*- β -D-quinovopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[β -D-fucopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-quinovopiranosido del ácido (11*S*)-11-hidroxitradecanoico.

Se logró el aislamiento del ácido púrgico B ($t_r = 22.7$ min) que corresponde a uno de los constituyentes minoritarios no identificados de esta mezcla mediante la aplicación de técnicas cromatográficas de alta resolución (HPLC). Este análisis por cromatografía de líquidos fue el único camino posible para obtener una máxima pureza del compuesto de interés. El mejor soporte cromatográfico para el procedimiento de purificación de los ácidos glicosídicos fue el empleo de una columna de gel de sílice desactivada con grupos aminopropilmetilsilano.

Las técnicas espectroscópicas (RMN) y espectrométricas (EM-FAB) de alta resolución permitieron establecer la naturaleza hexasacárida del ácido púrgico B y al mismo tiempo, lo identificaron como un oligosacárido del ácido jalapínico.

La estructura del ácido glicosídico minoritario con un $t_r = 22.7$ min constitutivo de la convolvulina de *Ipomoea purga*, el cual resultó ser novedoso, corresponde al 11-*O*- β -D-quinovopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[β -D-fucopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-quinovopiranosido del ácido (11*S*)-11-hidroxihexadecanoico.

8. Bibliografía.

- Amor-Prats, D. y Harborne, J. B. (1993). Allelochemical effects of ergoline alkaloids from *Ipomoea parasitica* on *Heliothis virescens*. *Chemoecology* **41**, 55-61.
- Austin, D. F. y Pedraza, R.A. (1983). Los géneros de convolvulaceae en México. Boletín. Sociedad Botánica de México **44**, 3-6.
- Bah, M. y Pereda-Miranda, R., (1996) Detailed FAB-Mass Spectrometry and High Resolution NMR Investigations of Tricolorins A-E, Individual Oligosaccharides from the Resins of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron* **52**, 13063-13080.
- Bah, M. (1997). Aplicación de la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas (FAB) de alta resolución en la elucidación estructural de las tricolorinas A-J, oligosacáridos aislados de las resinas de *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). Tesis Doctoral. Facultad de Química, UNAM, México, 292 pp.
- Bausor, S.C. (1937). A review of some medicinal plants. *Torreya* **37**, 25-32.
- Bye, R., Linares, E. y Estrada, E. (1995). Biological diversity of Medicinal plants in Mexico. En: *Phytochemistry of Medicinal Plants*. J.T. Arnason, R. Mata, J. T. Romeo (Eds.). Plenum Press, Nueva York, pp. 65-82.
- Cox, P.A. (1994). The ethnobotanical approach to drug discovery: Strengths and limitations. En: *Ethnobotany and the Search for New Drugs*. Ciba Foundation Symposium 185. John Wiley and Sons, Gran Bretaña, pp. 25-41.
- Cruz-Bailón, H. (1998). Estudio Fitoquímico preliminar de la resina glicosídica de *Ipomoea purga*. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, 59 pp.
- Décosterd, L.A., Dorzas, A. C. y Hostettman K. (1987) Application of semi-preparative high-performance liquid chromatography to difficult natural product separations. *Journal of Chromatography* **406**, 367-373.

- Díaz, J. L. (1977). *Uso de las plantas medicinales de México*. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, A. C., México, p. 66.

- Enriquez, R. G., Leon, I., Perez, F., Walls, F., Carpenter, K. A., Puzzuoli, F. V. y Reynolds, W. F. (1992). Characterization by two-dimensional NMR spectroscopy, of a complex tetrasaccharide glycoside isolated from *Ipomoea stans*. *Canadian Journal of Chemistry* **70**, 1000-1008.

- Ghebregzabher, M., Rufini, S. Monaldi, B. y Lato, M (1976). Thin-layer chromatography of carbohydrates. *Journal of chromatography* **127**,133-162.

- Günther, H. (1997). *Basic principles, concepts and applications in chemistry. NMR Spectroscopy*, 2^a.ed., Wiley and sons, Nueva York, pp. 115-119.

- Howes, F. N. (1949). *A new series of Plants. Science Books Vol. XX. Vegetable Gums and Resins*. EE.UU. pp. 85-87.

- Kubo, I. y Nakatsu T. (1990). Recent examples of preparative-scale recycling high performance liquid chromatography in natural products chemistry. *LC-GC* **8**, 933-939.

- Linajes, A., Rico-Gray, V. y Carrión, G. (1993). Traditional production System of the Root of Jalapa, *Ipomoea purga* (Convolvulaceae), in Central Veracruz, México. *Economic Botany* **48**, 84-89.

- López-Laiseca, M. (1982). *Estudio de Ipomoea stans, una planta con posible actividad anticonvulsiva*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, 35 pp.

- Lothar, W., Alves Da silva, A., Correa, R., Andrade, A., Carneiro, S., De Souza, I., De Mello, J. y Jürgen H. (1986). Anticancer and Antimicrobial Glycosides From *Ipomoea bahiensis*. *Phytochemistry* **25**, (5), 1077-1081.

- Mac. Dougall, A. (1960). *Ipomoea tricolor* a hallucinogenic plant of the zapotecs. CIIM. Bulletin No. 6. Instituto de Biología. UNAM.

- MacLeod, J. y Ward, A. (1997). Structural Investigation of Resin Glycosides from *Ipomoea lonchophylla*. *Journal of Natural Products* **60**, 467-471.

- Mannich, C. y Schumann, P. (1938). Jalap resin and its principal constituent, convolvulin. *Archiv der pharmazie* **276**, 211-226.

- Marston, A., Potterat, O. y Hostettman, K. (1988). Isolation of biologically active plants constituents by liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **450**, 3-11.

- Martín de la Cruz. *Libellus de medicinalibus indorum herbis (Códice Badiano)*. Edición Facsimilar. Instituto Mexicano del Seguro Social. México (1964). p. 184-1885.

- Martínez, M. (1959). *Plantas útiles de la Flora Mexicana*. Editorial Botas, México, pp. 276-279.

- Massateru, O., Fujimoto, K., Kawata, M., Fukunaga, T., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1992). Resin Glycosides. XIII. Operculins VI, XI, XII, XIII, XIV and XV, the ether-soluble resin glycosides (jalapin) from rhizoma jalapae braziliensis (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **40**, 1400-1403.

- 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). *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **40**, 3163-3168.

- Noda, N., Kogetsu, H., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1990). Scammonins I and II, the resin glycosides of Radix scammoniae from *Convolvulus scammonia*. *Phytochemistry* **29**, 3565-3569.

- Noda, N., Kobayashi, H., Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1988a). Resin glycosides. II. Identification and characterization of the component organic and glycosidic acids of crude resin glycoside from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **36**, 627-633.

- Noda, N., Kobayashi, H., Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1988b). Resin glycosides. III. Isolation and structural study of the genuine resin glycosides, muricatins I-VI, from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **36**, 920-929.

- Noda, N., Ono, M., Miyahara, K., Kawasaki, T. y Okabe, M. (1987). Resin glycosides. I. Isolation and structure elucidation of orizabin I, II, III and IV, genuine resin glycosides from the root of *Ipomoea orizabensis*. *Tetrahedron* **43**, 3889-3902.

- Pedraza, R.A. (1982). La raíz de Jalapa. INIREB informa. Comunicado No. 54 sobre recursos bióticos potenciales del país. México.

- Pereda-Miranda R., R., Mata, R., Anaya, A.L., Winckramaratne, D.B.M., Pezuto, J.M. y Kinghorn, A.D. (1993) Tricolorin A, major phytochrome inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *Journal of Natural Products* **56**, 571-582.

- Pereda-Miranda, R. (1995). Bioactive Natural Products from traditionally used Mexican Plants. En: *Phytochemistry of medicinal plants*. J.T. Arnason, R. Mata y J. T. Romeo (Eds.). Plenum press, Nueva York, pp. 83-112.

- Perusquía, M., Mendoza, S., Bye, R., Linares, E. y Mata R. (1995). Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology* **46**, 63-69.

- Rangel-Cordero, A. (1995). Efecto de la tricolorina A sobre la contractilidad del útero grávido de la rata. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, 56 pp.

- Reynolds, W., Yu, M., Enriquez, R., González, H., Leon, I., Magos, G. y Villareal M. (1995). Isolation and characterization of cytotoxic and antibacterial tetrasaccharide glycosides from *Ipomoea stans*. *Journal of Natural Products* **58** (11), 1730-1734.

- Schultes, R. E. y Hofmann, A. (1982). Plantas de los Dioses. Orígenes del uso de los alucinógenos. Fondo de Cultura Económica. México, p. 46.

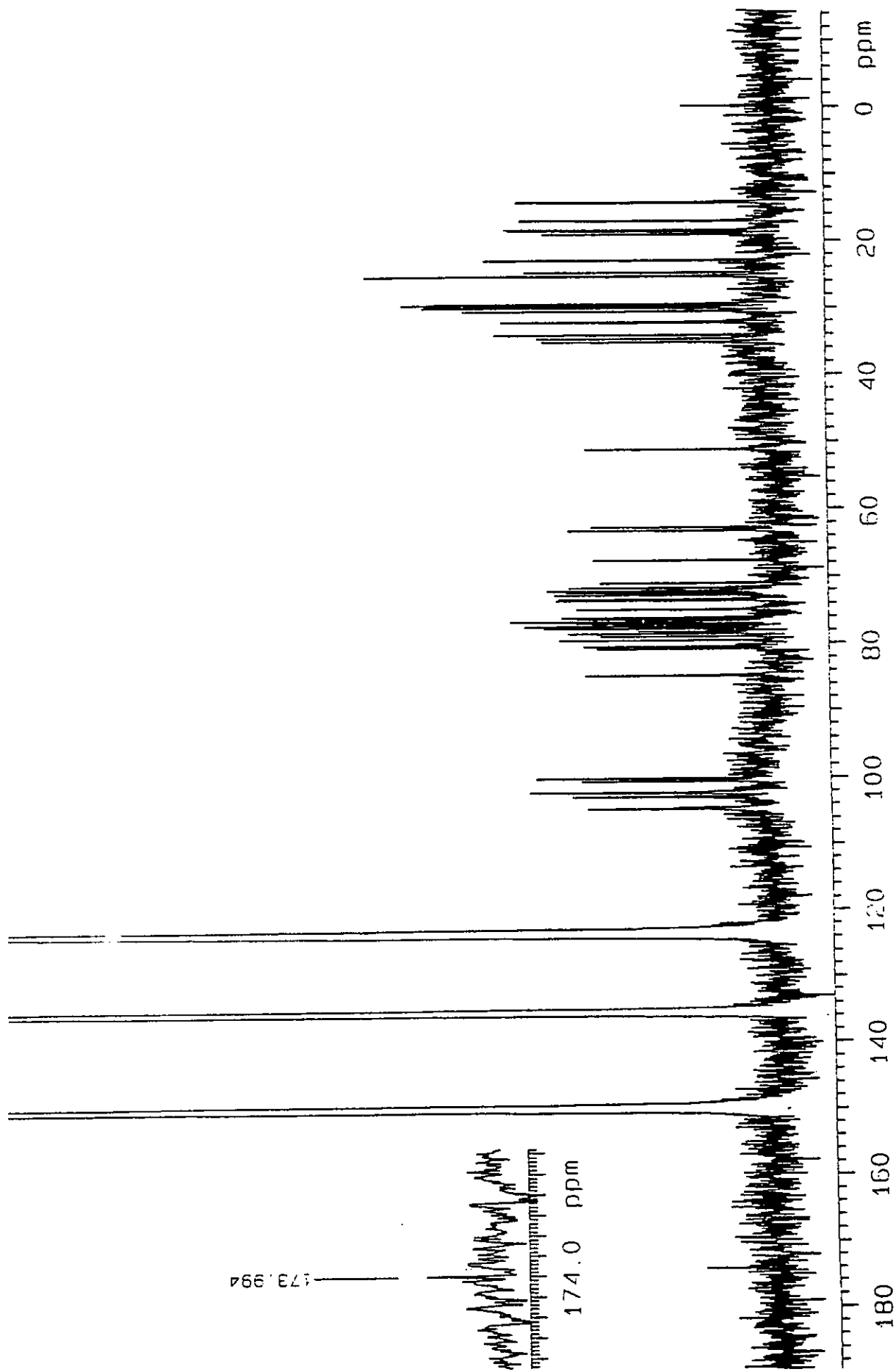
- Shingh, S. y Stacey, B. (1973). A new β -D-Quinovoside from commercial *Ipomoea purga*. *Phytochemistry* **12**, 1701-1705.

- Sosa-Vazquez, F. (1993). Estudio Fitoquímico preliminar de la raíz de Jalapa (*Ipomoea purga*). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, pp 56.

- Wallis, T.E. (1966). Manual de Farmacología. C.E.C.S.A. México, pp. 477-481.

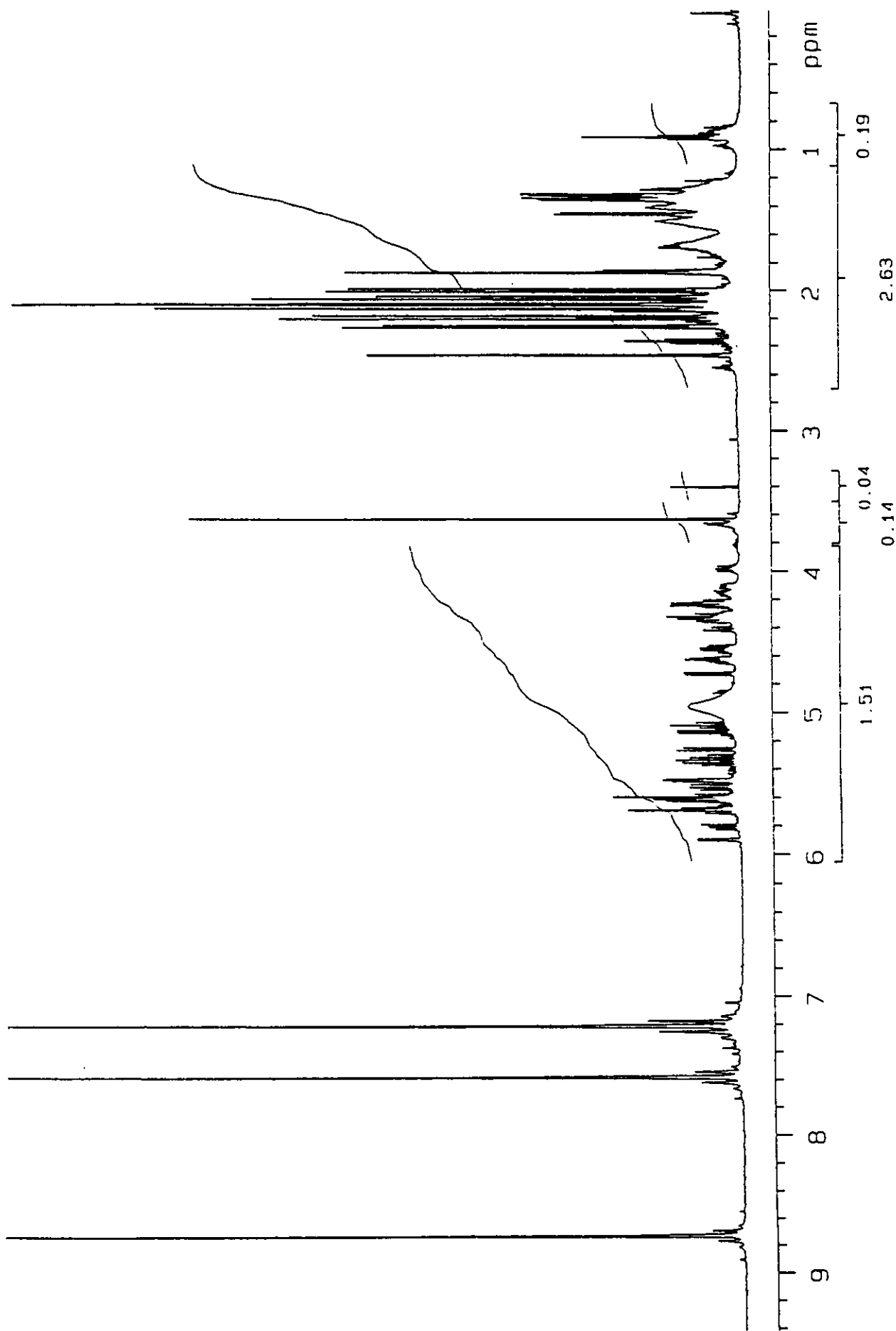
- Young-Ken (1956). Tratado de Farmacognosia. Atlanta, México, pp. 901-911.

9. E S P E C T R O S

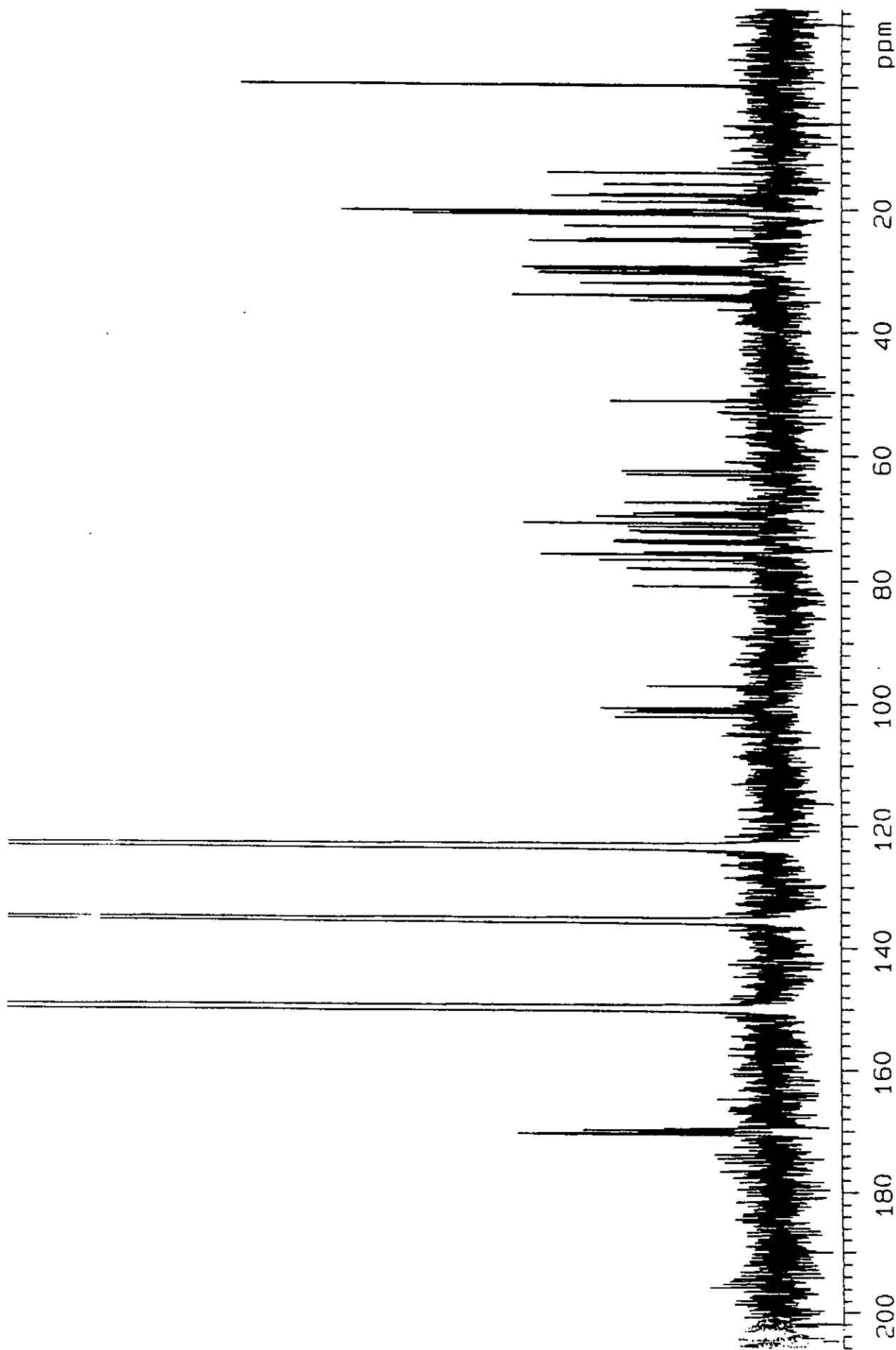


Espectro No. 2. RMN ^{13}C del compuesto Ag-6.

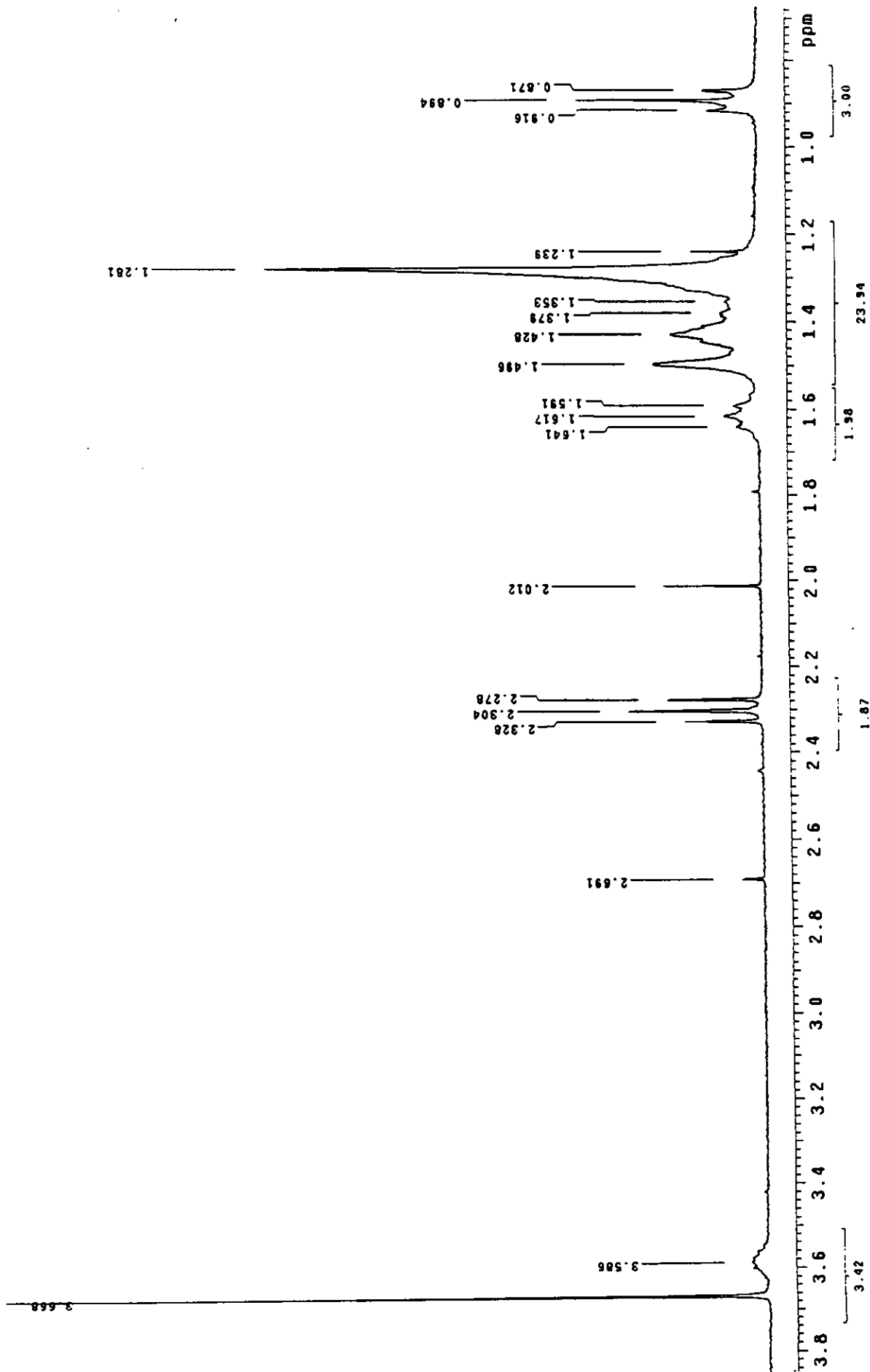
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



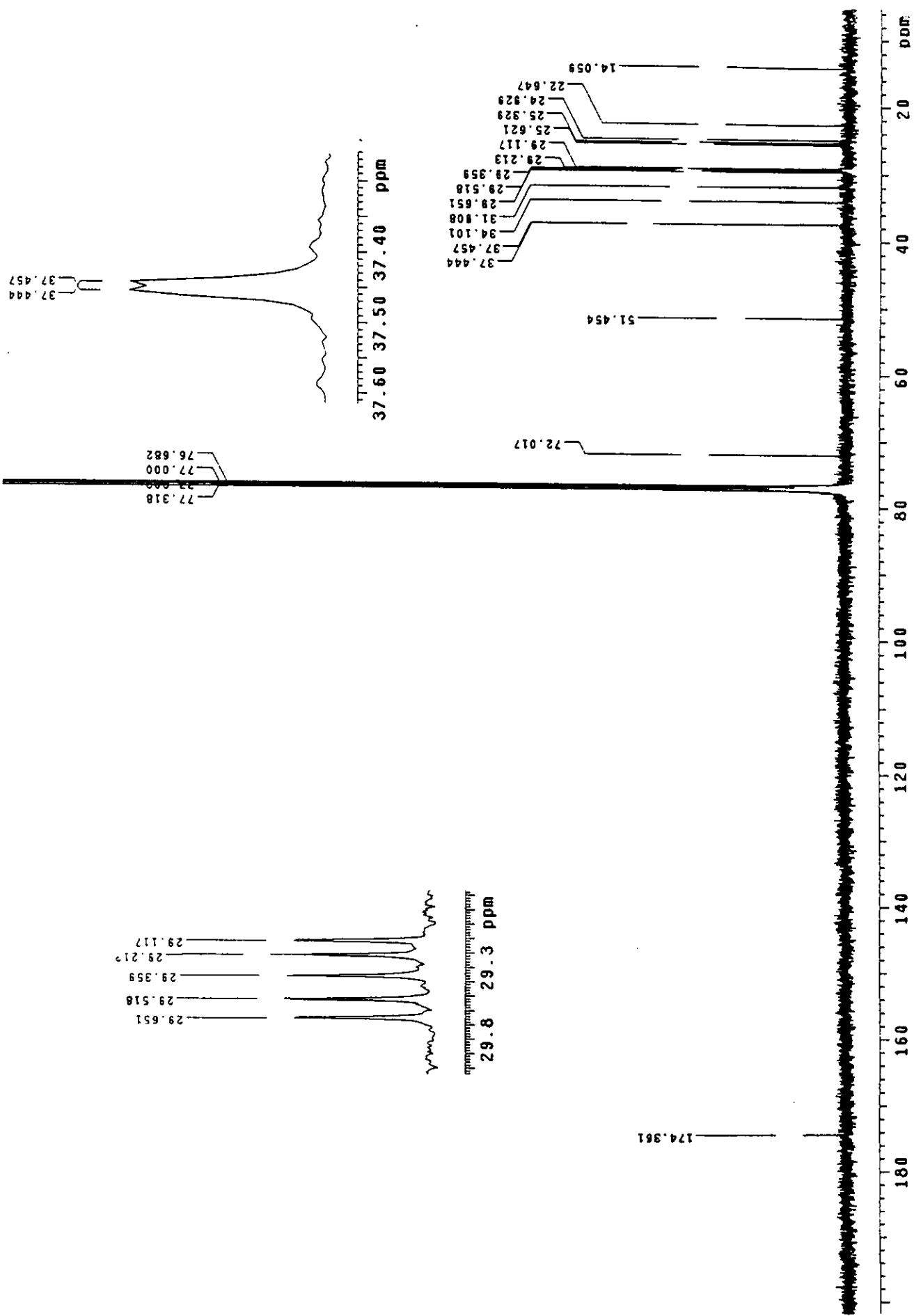
Espectro No. 3. RMN ^1H del compuesto Ag-6Ac.



Espectro No. 4. RMN ^{13}C del compuesto Ag-6Ac.



Espectro No. 5. RMN ¹H de la aglicona del compuesto Ag-6.



Espectro No. 6. RMN ¹³C de la aglicona del compuesto Ag-6.