



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

**Identificación por CG-EM de β -
fenetilaminas y tetrahidroisoquinolinas
aisladas de las especies de *Lophophora
williamsii* (Lem. Ex SD.) Coult. y
Carnegiea gigantea (Engelm.).**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA
LUIS BARBO HERNÁNDEZ PORTILLA

TUTOR: Dr. CÉSAR MATEO FLORES ORTIZ
FES IZTACALA, UNAM

MÉXICO D.F.

MAYO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**Identificación por CG-EM de β -fenetilaminas y tetrahidroisoquinolinas aisladas
de las especies de *Lophophora williamsii* (Lem. Ex SD.) Coult. y *Carnegiea
gigantea* (Engelm.).**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

BIÓLOGO LUIS BARBO HERNÁNDEZ PORTILLA



TUTOR: Dr. CÉSAR MATEO FLORES ORTIZ
FES IZTACALA, UNAM
MÉXICO D.F. MAYO 2014

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biogeoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, de la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, bajo la dirección del Dr. César Mateo Flores Ortiz.

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, por haberme dado la oportunidad de seguir adelante con mis estudios.

Al Dr. César Mateo Flores Ortiz, por su gran ayuda y apoyo para la realización de esta tesis, por su gran insistencia para graduarme y por ser un amigo.

Al Dr. René Miranda Ruvalcaba, gracias por permitir ser parte de su familia en la FES Cuautitlan y por todo el apoyo brindado durante la realización de la misma.

A los sinodales: Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dr. Roberto Martínez, Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda, Dr. José Guillermo Ávila Acevedo y Dr. René Miranda Ruvalcaba, por sus acertadas opiniones al escrito de esta tesis y sus observaciones oportunas a la misma.

A Josefina Vázquez, Rafael Quintanar, Elías Piedra, Amanda Moreno, Martha Urzúa y Margarita Moreno, por ser parte de este trabajo y amigos de los laboratorios de Fisiología Vegetal y Biogeoquímica, mi aprecio para ustedes.

A el apoyo financiero recibido por MGU, como parte del proyecto “MGU de plantas útiles” bajo la coordinación del Royal Botanic Kew Gardens, UK.

Así mismo quiero agradecer a mi esposa Nancy, por insistir en la graduación y por su gran Amor y comprensión; a mis hijos Itzel, Ana Ayelén y Luis Emiliano, por todas las bendiciones que me han dado durante nuestras vidas.

A mis padres (José y Silvia), por darme la vida y la oportunidad de seguir mis estudios, a mis hermanos César, Jesús, Irma, Joel, Rosa, Marco Antonio y Martha, por su gran apoyo y ayuda.

A todos mis amigos, quienes saben que están presentes y que es imposible nombrarlos a todos.

Dedicatoria

A mi Esposa por su gran apoyo incondicional y a mis hijos porque me dan motivos para seguir superándome.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
1.- RESUMEN	i
2.- ABSTRACT	ii
3.- INTRODUCCIÓN	1
4.- ANTECEDENTES	2
4.1 GENERALIDADES DE ALCALOIDES	2
4.2 ALCALOIDES EN LA FAMILIA CACTACEAE	6
4.3 <i>Carnegieia gigantea</i>	9
4.4 <i>Lophophora williamsii</i>	11
4.5 ESPECTROMETRIA DE MASAS EN LA FAMILIA CACTACEAE	15
5.- HIPÓTESIS	22
6.- OBJETIVOS	22
6.1 GENERAL	22
6.2 PARTICULARES	22

7.- METODOLOGÍA	24
7.1 COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO	24
7.2 EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES	24
7.3 IDENTIFICACIÓN POR CG-EM DE ALCALOIDES	25
8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
8.1 ALCALOIDES DE <i>Lophophora williamsii</i>	26
8.2 ALCALOIDES DE <i>Carnegiea gigantea</i>	50
8.3 IMPLICACIONES ANALÍTICAS DEL TRABAJO	68
9.- CONCLUSIONES	69
10.- REFERENCIAS	70

1.- RESUMEN

Dada la importancia que tienen los alcaloides, en cuanto a su uso medicinal, fitoquímico y biológico, es de suma importancia conocer los compuestos presentes en las plantas de la familia cactaceae, por tal motivo el objetivo del presente estudio es Identificar por CG-EM la presencia de β -fenetilaminas y tetrahydroisoquinolinas aisladas de las especies de *Lophophora williamsii* (Lem. Ex SD.) Coult. y *Carnegiea gigantea* (Engelm.). Para la extracción de los alcaloides se empleó la técnica de separación ácido-base, y la identificación se llevo a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los resultados muestran que en los extractos de las cactáceas estudiadas se presentan 5 β -fenetilaminas y 7 tetrahydroisoquinolinas para la especie de *Lophophora williamsii* con un total del 0.127 % de alcaloides en peso fresco, de los cuales los más abundantes fueron la N-metil-3,4-dimetoxi-fenetilamina con 4.8413 $\mu\text{g/g}$, y gigantina con 685.8527 $\mu\text{g/g}$. Por otro lado para la especie de *C. gigantea* se presentó un rendimiento del 0.1573 % de alcaloides en peso fresco de las cuales 9 corresponden a tetrahydroisoquinolinas y el de mayor abundancia fue la carnegina con 1441.8936 $\mu\text{g/g}$. Finalmente se logró identificar un alcaloide que no ha sido reportado para *L. williamsii* el cual es 1-metil-5-hidroxi-6,7-dimetoxi-tetrahydroisoquinolina. En conclusión se logró identificar la presencia de β -fenetilaminas y tetrahydroisoquinolinas.

2.- ABSTRACT

Given the importance of alkaloids in medicinal, phytochemical and biological use, it is extremely important to know the compounds present in plants of the family Cactaceae, for this reason the aim of this study is to identify the presence of β -phenethylamines and tetrahydroisoquinolines isolated from *Lophophora williamsii* (SD Lem. Ex.) Coult. and *Carnegiea gigantea* (Engelm.) by GC-MS. For the extraction of alkaloids the technique acid-base separation was employed, and the identification was carried out by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The results show that in extracts of *L. williamsii* there are 5 β -phenethylamines and 7 tetrahydroisoquinolines these represent a total of 0.127 % of fresh weight of total alkaloids, of which the most abundant were the N-methyl-3,4-dimethoxy-phenethylamine with 4.8413 $\mu\text{g/g}$, and gigantine with 685.8527 $\mu\text{g/g}$. In addition *C. gigantea* yield 0.1573 % alkaloids of fresh weight of which 9 correspond to tetrahydroisoquinolines and the most abundant was carnegine with 1441.8936 $\mu\text{g/g}$. Finally it was possible to identifying an alkaloid which has not been reported for *L. williamsii* that is 1-methyl-5-hydroxy-6,7-dimethoxy-tetrahydroisoquinoline. In conclusion it was identify the presence of β -phenethylamines and tetrahydroisoquinolines.

3.- INTRODUCCIÓN

El empleo de los alcaloides en la medicina ha despertado el interés por el estudio de esta clase de compuestos en diversas especies vegetales, de aquí la importancia de su estudio en la familia Cactaceae, donde se presentan gran variedad de moléculas alcaloideas. Por otro lado, la familia Cactaceae ha atraído el interés de estudios fitoquímicos por los niveles que tienen en cuanto a alcaloides, triterpenos y flavonoides que se han aislado y que potencialmente pueden ser precursores de principios terapéuticos. En particular, la presencia de alcaloides en especies de la familia han recibido atención por los usos tradicionales asociados a ritos religiosos, donde se ha correlacionado la presencia de derivados de β -fenetilaminas y tetrahidroisoquinolinas con los efectos psicodélicos característicos.¹⁻³

Los alcaloides son un grupo diverso de productos naturales con pesos moleculares bajos y que contienen nitrógeno, éstos se han encontrado en cerca del 20% de las especies vegetales, así como en algunos microorganismos y animales.¹ Adicionalmente se ha descrito la importancia de ellos en defensa contra la herbívora y patógenos.¹

A pesar de la gran cantidad de estudios fitoquímicos realizados en especies de cactus⁴⁻¹⁹, los reportados en las especies concernientes a este estudio, *Carnegiea gigantea* y *Lophophora williamsii*, las cuales se distribuyen en México, han sido estudiadas con enfoques biológicos, taxonómicos y pocos estudios fitoquímicos.^{2,10,20-26}

Por ello, con el propósito de contribuir al conocimiento fitoquímico de alcaloides de las cactáceas de México, se plantea como objetivo de este trabajo, aislar e identificar de las especies *Carnegiea gigantea* y *Lophophora williamsii* de la fracción alcaloidea las β -fenetilaminas y tetrahidroisoquinolinas.

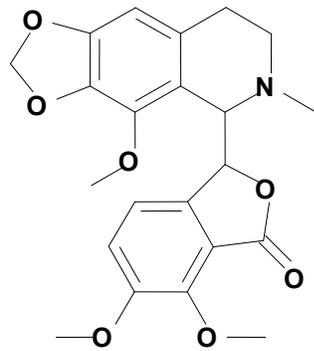
4.- ANTECEDENTES

4.1 GENERALIDADES DE ALCALOIDES.

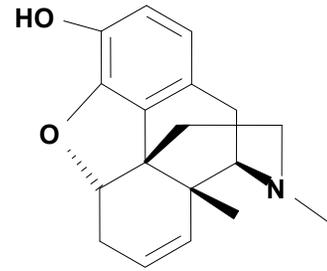
Los alcaloides son bases orgánicas de nitrógeno. Con uno o más átomos de nitrógeno presentes, por lo general como amina primaria, secundaria o terciaria, esto generalmente confiere basicidad al alcaloide, facilitando su aislamiento y purificación. Su nombre deriva de álcali. Sin embargo, el grado de basicidad varía mucho, dependiendo de la estructura del alcaloide, y la presencia y localización de otros grupos funcionales. De hecho, algunos alcaloides son neutros.¹

Los alcaloides a menudo se clasifican de acuerdo a la naturaleza de la estructura que contenga el nitrógeno, por ejemplo, pirrolidina, piperidina, quinolina, isoquinolina, indol, etc., aunque la complejidad estructural de algunos de ellos genera un número de subdivisiones. Los átomos de nitrógeno y el esqueleto de carbono en alcaloides proceden de un aminoácido en general. Relativamente son pocos los precursores de aminoácidos que están realmente involucrados en la biosíntesis de alcaloides, siendo los principales ornitina, lisina, fenilalanina, tirosina, histidina y triptófano, además de otros intermediarios como el ácido nicotínico y el ácido antranílico.¹

La primer droga cruda, investigada químicamente, fue el opio; látex seco de la amapola (*Papaver somniferum*); este ha sido utilizado por siglos en la medicina popular, siendo bien conocidas sus propiedades analgésico-narcóticas. Al respecto, Derosne 1803 aisló un alcaloide semiduro del opio, el cual llamó narcotina, dos años después, Serturmer aisló la morfina¹ (Figura 1).



Narcotina



Morfina

Figura 1. Ejemplo de estructuras moleculares de dos alcaloides.

Otras características de los alcaloides es que suelen ser tóxicos y de amplia distribución en los vegetales, en algunos casos cumplen alguna función en la fisiología de las plantas u organismos, como elementos de protección contra depredadores. Generalmente, estos compuestos se encuentran en las plantas en forma de sales de ácidos orgánicos, también suelen ser aislados de animales, insectos, microorganismos y organismos marinos. Es importante mencionar que cerca del 25 % de toda la prescripción de alcaloides medicinales son derivados de plantas y que cada año más de 1500 estructuras químicas nuevas son publicadas y de éstas un número substancial son estudiadas farmacológicamente.

Se han propuesto diversas rutas biosintéticas para los alcaloides, algunas de ellos implican la administración y el marcaje isotópico de precursores, seguidos por el aislamiento de los alcaloides, los cuales son degradados en una manera sistemática para determinar la posición del átomo marcado.²

Algunas de las propiedades físicas de los alcaloides es que son sólidos cristalinos con punto de fusión o intervalo de descomposición definidos, algunos son gomas amorfas, otros como la nicotina son líquidos. Así mismo algunos de estos no

presentan color, pero otros más complejos provenientes de aminoácidos aromáticos, son coloridos como la betaína que es de color rojo (Figura 2).

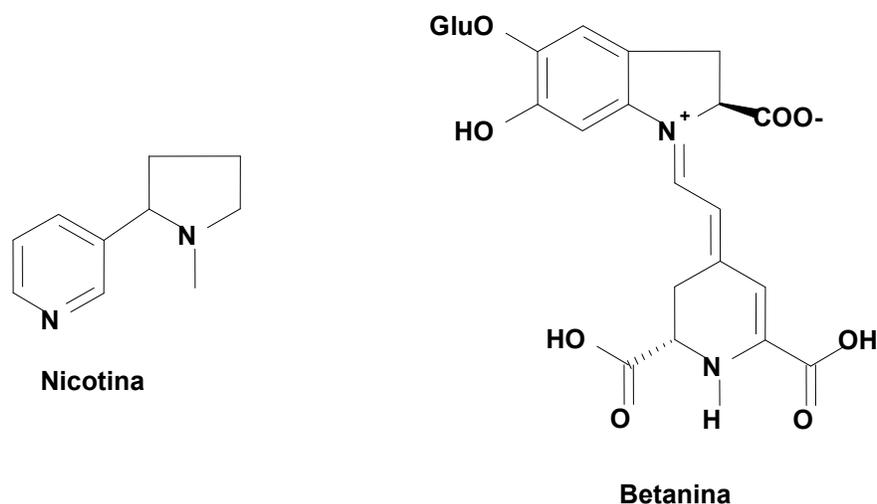
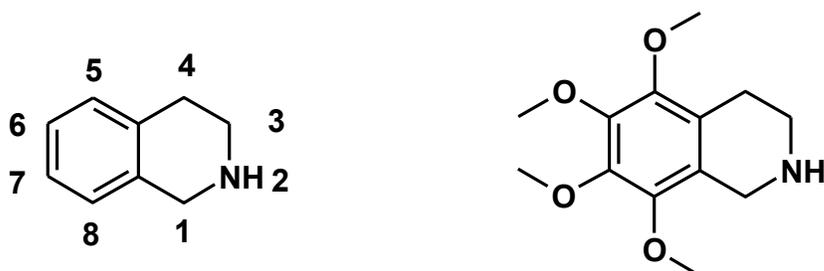


Figura 2. Esquemas de la nicotina y betanina.

La solubilidad de los alcaloides y sus sales es de considerable importancia en la industria farmacéutica, en la extracción, de plantas u hongos, y en la formulación en la forma farmacéutica. En general, las bases libres de los alcaloides suelen ser solubles en disolventes orgánicos. Químicamente, son moléculas básicas, propiedad inherente a la disponibilidad del par de electrones no compartidos en el átomo de nitrógeno. Al respecto si un sustituyente cercano al nitrógeno es electrodonador, la disponibilidad de los electrones sobre el nitrógeno se incrementa y por ende la molécula será más básica, por ejemplo la trietilamina es más básica que la etilamina. En cambio, si la respectiva funcionalidad es electroattractora la disponibilidad de los electrones es limitada y, en consecuencia, el alcaloide disminuye su basicidad.

Dado que existe una diversidad estructural amplia, no es posible una nomenclatura unificada. Aún dentro de un grupo dado de ellos, no existe un sistema consistente de nomenclatura o numeración. La estructura básica para las

tetrahidroisoquinolinas se muestra en la figura 3, así como un ejemplo de ésta nomenclatura.



5,6,7,8-tetrametoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina

Figura 3. Esquema que ejemplifica la nomenclatura para tetrahidroisoquinolinas.

Por otro lado pueden adoptarse diversas clasificaciones para el estudio de los alcaloides, una de ellas es la de organizarlas de acuerdo a las familias botánicas a la que pertenecen, a su acción fisiológica, o a su estructura; por ejemplo los alcaloides de la familia Papaveraceae, Cactaceae; alcaloides con actividad sobre el sistema periférico o alcaloides del sistema de la quinolina, según el criterio seleccionado.³

Así mismo se han realizado numerosos intentos para suministrar un sistema de clasificación donde la mayoría de los alcaloides puedan ser ubicados apropiadamente. Por ejemplo, se ha aceptado el sistema de clasificación de los grupos de alcaloides como: a) alcaloides verdaderos, los cuales contienen el nitrógeno en un anillo heterocíclico, son derivados de aminoácidos, presentan distribución limitada; b) protoalcaloides, son aminas simples donde el átomo de nitrógeno no es parte de un heterociclo; c) pseudoalcaloides, se consideran como obtenidos de un aminoácido.

4.2 ALCALOIDES EN LA FAMILIA CACTACEAE

Mata y McLaughlin en 1982²⁹ publican una recopilación de los alcaloides aislados de cactáceas hasta ese momento, de donde se observa que los más comúnmente encontrados en cactáceas son aquellos derivados de la tirosina, los cuales tienen la presencia de una hidroxilación en la posición 4 del anillo aromático, adicionalmente se pueden presentar hidroxilaciones en las posiciones 3 y 5 del anillo aromático con las correspondientes metoxilaciones.⁴ Para el modelo descrito se presentan dos grandes grupos de alcaloides, las β -fenetilaminas y las tetrahydroisoquinolinas, en los primeros, se presentan grupos funcionales en la posición 2 de la cadena lateral y el amino terminal puede encontrarse en forma de amina primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria. En la figura 4 se muestra una relación biosintética para el grupo de β -fenetilaminas y algunas de ellas más comúnmente encontradas en esta familia.³

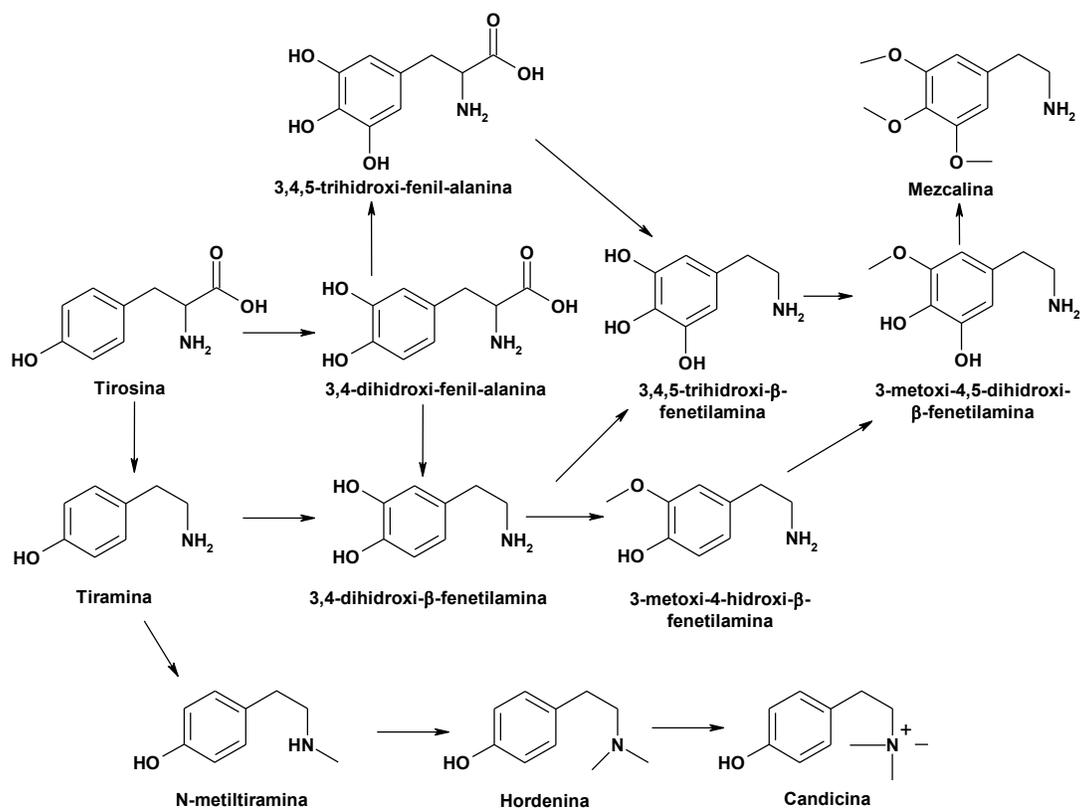


Figura 4. Relación biosintética de algunas β -fenetilaminas presentes en cactáceas

Por su parte las tetrahydroisoquinolinas se producen cuando las dimetoxi y las trimetoxifenetilaminas aceptan un carbono adicional, incorporando el nitrógeno en un nuevo anillo. La mayoría de tetrahydroisoquinolinas reportadas se han aislado del genero *Lophophora*, no obstante, hasta 1985 se habían extraído 26 tetrahydroisoquinolinas de especies de la subtribu *Pachycereinae*. En general muestran una hidroxilación en la posición 4 del anillo aromático e hidroxilaciones o metoxilaciones en las posiciones 3 y 5, asimismo se ha encontrado que pueden formar dímeros y trímeros. En la figura 5 se muestra una compilación de las tetrahydroisoquinolinas caracterizadas en la subtribu *Pachycereinae*.^{3,11,12,27}

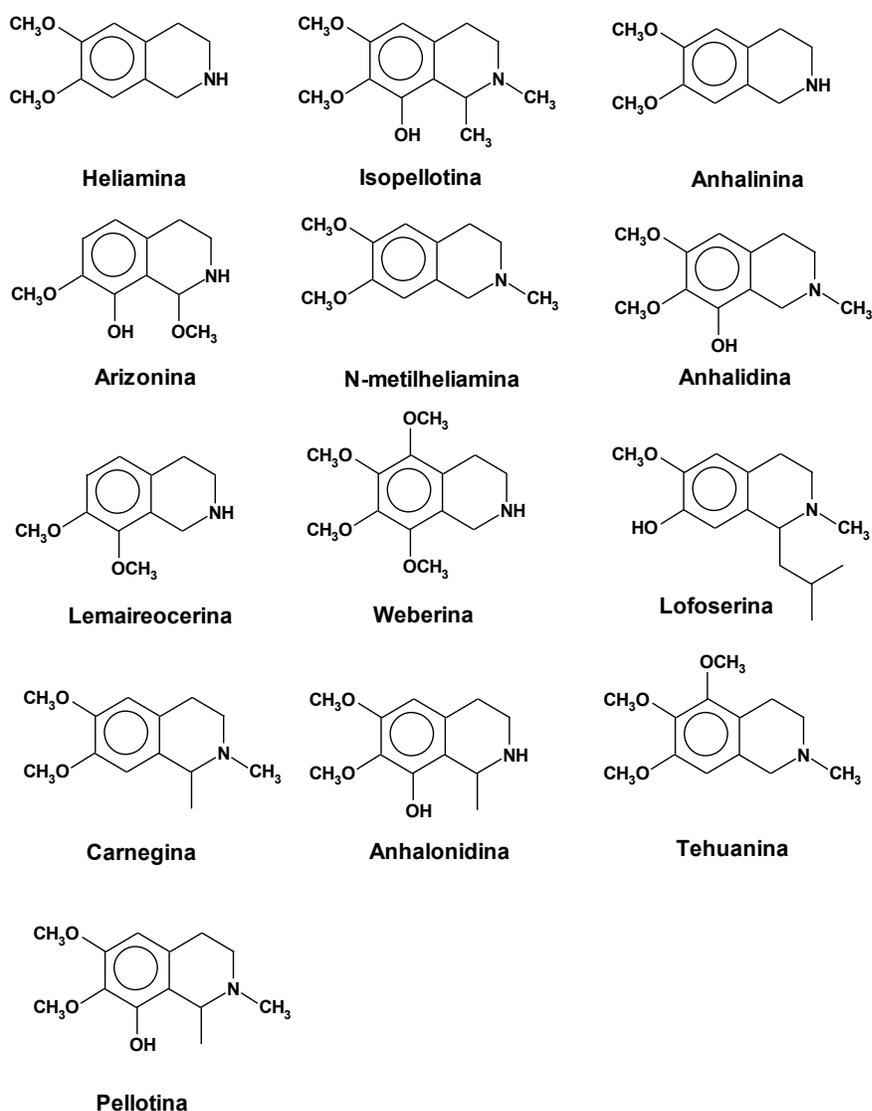


Figura 5. Tetrahydroisoquinolinas representativas de la tribu *Pachycereae*

Otras especies donde se han hecho estudios fitoquímicos son *Pachycereus pringlei*, donde se reporta la cristalización de la tehuana y la heliamina, así como trazas de la lemaireocereina y la weberina¹¹. Por otro lado, en *Pachycereus weberi* se aislaron ocho tetrahydroisoquinolinas.¹² Además se ha reportado que el Saguaro (*Carnegiea gigantea*) es uno de los cactus que al ser expuesto, su tallo tiende a oscurecerse en un periodo de 24 horas, y este oscurecimiento es causado por la oxidación del alcaloide dopamina o DOPA³. En *Backebergia militaris* también fue aislada la heliamina y la 3,4-dimetoxi- β -fenetilamina.²⁸

No obstante, de la enorme cantidad de información generada sobre la presencia de alcaloides en especies de la familia Cactaceae, hasta el momento, el género más estudiado al respecto del contenido de alcaloides es *Carnegiea*, del cual se han aislado los siguientes alcaloides.²⁹ carnegina, gigantina salsolidina, 3-metoxitiramina, 3,4-dimetoxifenetilamina, arizonina y dopamina (figura 6).

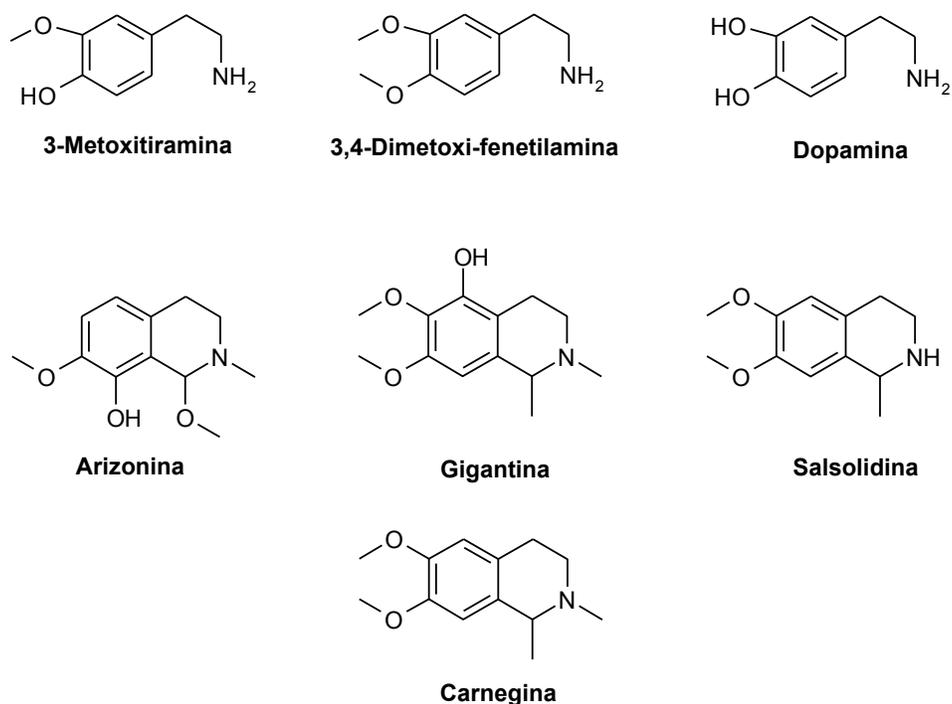


Figura 6.- Alcaloides de especies emparentadas con el genero *Carnegiea*

4.3 *Carnegiea gigantea*

una planta arborescente, con tallos suculentos crece de de alto y de 5 a 75 cm de diámetro. Es la más grande de las cactáceas que crecen en el Estados Unidos y México. Tiene raíz pivotante de anclaje hasta 1 m de profundidad y raíces extensas y laterales de 4 a 30 m de largo. Los tallos son simples, con uno a cinco (raramente hasta 49) ramas laterales erectas, costillas, armadas con espinas densas y gruesas, que son hasta de 7 cm de largo, Las flores son de 8 a 13 cm de largo y se presentan en los extremos de las ramas. Los frutos son alargados y contienen hasta 2500 semillas.³⁰

Carnegiea gigantea se encuentra en la mayor parte del desierto de Sonora y Arizona y California. Los límites norte de su distribución están en el borde de las montañas Hualapait en Arizona y en el Río Colorado en el sureste de California. Las poblaciones extienden hacia el sur; las mayores poblaciones de esta especie se producen en Sonora, México.³¹

Otros estudios realizados con esta especie han determinado la composición de aceites y la constitución de proteínas en semillas.³² Por otro lado se han realizado estudios sobre la composición de ácidos grasos en las membranas del cloroplasto con respecto a elevadas temperaturas.³³ En plantas jóvenes de *Carnegiea gigantea*, se estudió la biosíntesis de carnegina y salsolidina, a partir de precursores marcados radioactivamente con ¹⁴C.²² Se determinó la presencia de 2,4-metilen-colesterol en saguaro por medio de cromatografía de gases y espectrometría de masas.³⁴

Los estudios concernientes a la identificación de alcaloides se enuncian a continuación: se reportan en *Carnegiea gigantea* la presencia de la carnegina, la salsolidina y la dehidroheliamina, y de esta última se presenta como ion molecular $M \pm 191(100)$ y los fragmentos a m/z , 190(15), 176(70), 164 (5), 146 (10), 136(30), 117(12), 104(15), 91(10) y 77(20).²⁰ En un estudio se lograron aislar e identificar

los alcaloides carnegina, salsolidina, 3,4-dimetoxi fenetilamina, gigantina, arizonina y dopamina, en *Carnegiea gigantea*, y para la arizonina (8-hidroxi-7-metoxi-1-metil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina) reportan los iones formados, los cuales corresponden a el $M^{\ddagger} 193(2)$ y los iones a m/z 192(6), 178(100 $M^+ -15$), 163(30).²¹

Empleando la técnica de MIKE, en *Carnegiea gigantea* lograron identificar la presencia de la dehidrosalsolidina seleccionando el ion a m/z 206; para salsolidina a m/z 208; para la heliamina a m/z 194 y finalmente para la carnegina a m/z 222.¹⁰

Unger, Cooks, Mata y McLaughlin, 1980⁴⁰, realizan un estudio con *Carnegiea gigantea* empleando la técnica de MIKES con los iones a m/z 194, 208, 208, 222, 238, 238 252, 268 y 282, donde relacionan la presencia de los alcaloides con la taxonomía de la familia cactaceae.

Hodgkins, Brown y Massing, 1967⁴⁶, estudian en el extracto alcaloideo de *Carnegiae gigantea* por espectrometría de masas, la carnegina con un ion molecular M^{\ddagger} a m/z 221, el cual origina el pico base a m/z 206, de la ruptura del metilo en la posición C-1 (figura 7a); y un nuevo compuesto que presenta un el ion molecular M^{\ddagger} a m/z 237, que cuando se fragmenta forma como pico base el ion a m/z 222 que corresponde a la perdida de un metilo en la posición C-1 ($M^{\ddagger} -15$), estos fragmentos identifican a la gigantina (figura 7b).

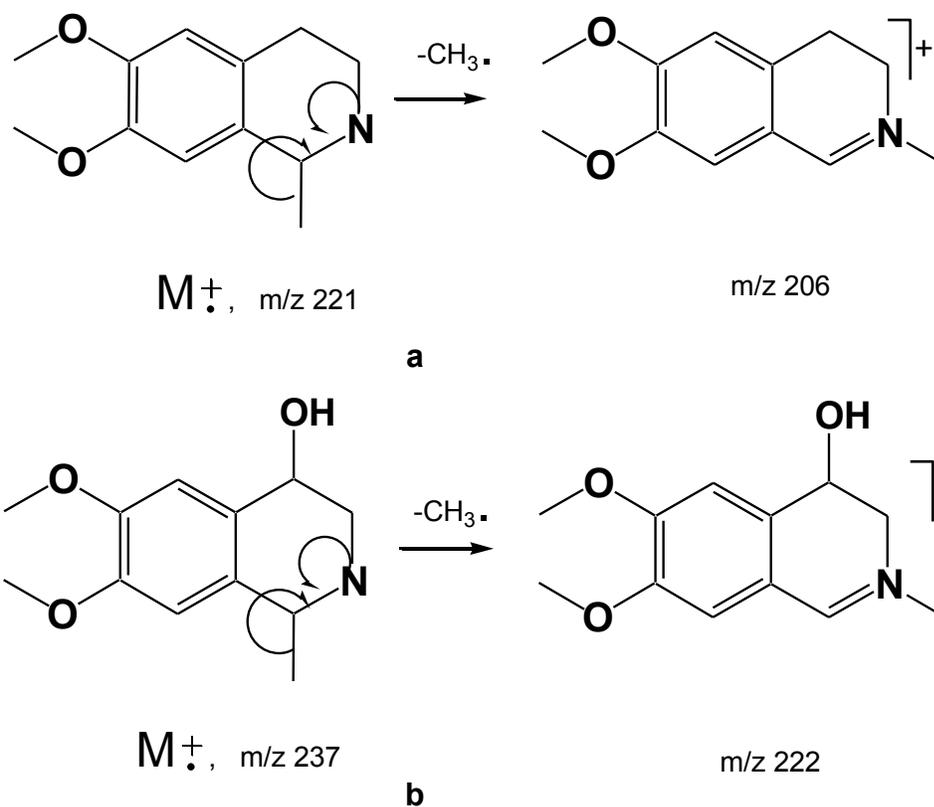


Figura 7.- Mecanismo de la ruptura del metilo en la posición C-1 de tetrahidroisoquinolinas presentes en *Carnegiea gigantea*.

4.4 *Lophophora williamsii*

Lophophora williamsii se distribuye al norte de México, entre San Luis Potosí y Texas, posee una porción subterránea, es una planta pequeña, puede medir entre 1 y 8 cm de diámetro, y tener una altura aproximada de 5 cm, se presenta de forma simple o en ramilletes, sin espinas (plántulas con débiles o pocas cerdas púbecentes-como las espinas), muy suculenta, costillas amplias y redondeadas, presenta pocos tubérculos, areolas redondas, presentando flores solo cuando es joven, siempre con un mechón de pelos erectos enmarañados, flores que nacen en el centro de la planta, pequeña y acampanada, de color blanco a rosa, fruto en forma redondeada, desnudo, de color rojo a rosado, madura rápidamente, y sus semillas son de color negro, rugosa.³⁵

En los trabajos realizados con la especie *Lophophora williamsii* se han determinado la presencia de fenilalquilaminas, por medio de la cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos encontrando a la mescalina, con límites de detección de 500 pg.⁶ Por su parte las investigaciones realizadas por Kringstad y sus colaboradores (1980) demostraron la presencia del ácido 2-C-metilaldotetronico en esta especie.³⁶ Así mismo, se han realizado estudios donde se proponen rutas biosintéticas entre las β -fetilaminas y las tetrahydroisoquinolinas en peyote.³⁷ Por su parte, Rosenberg y Stohs en 1974 presentan un estudio donde se observa la incorporación de la tirosina en ruta de biosíntesis de mescalina, encontrando que ésta se incorpora para la producción de este alcaloide.³⁸ Adicionalmente, se ha reportado como alcaloide mayoritario en *Pelecypora aselliformis* (peyote) la N,N-dimetil-3-hidroxi-4,5-dimetoxi-fenetilamina, así como la descripción etnobotánica de esta especie.²

McFarlane y Slaytor en 1972, realizaron estudios con N-acetilaminas marcadas isotópicamente, y observaron su incorporación para la formación de tetrahydro- β -carbolina, y tetrahydroisoquinolinas, encontrando que este compuesto se incorpora para la formación de la anhalidina en *Lophophora williamsii*.¹⁷ Finalmente se ha descrito que la fenilalanina, DOPA y DOPamina son precursores de la mescalina en *Lophophora williamsii*.^{23,39}

Kapadia y Fayez 1973⁵², describen las principales fragmentaciones de los constituyentes de *Lophophora williamsii*, resultando la ruptura de los enlaces β - en los anillos aromáticos de las β -fenetilaminas y de los derivados N-alkil sustituidas formando iones bencílicos (figura 8a), y también pueden formar estructuras del ion tropilio así como la trasposición de un átomo de hidrogeno o rearreglo McLaferty, formando la estructura (figura 8b).

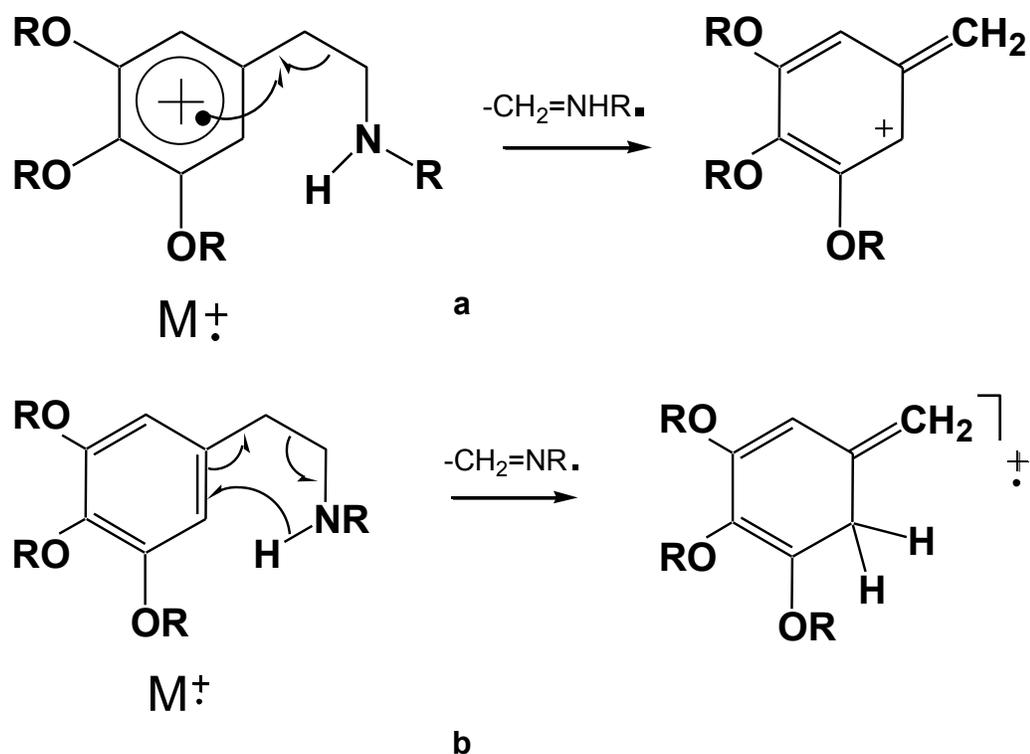


Figura 8.- Mecanismo propuesto para β -fenetilaminas

Adicionalmente la reacción primaria en las tetrahydroisoquinolinas involucra la expulsión del sustituyente en el C-1, dando una alta estabilidad de los iones dihydroisoquinolinas (figura 9a), a demás de la formación de altos picos en los espectros debidos a las especies (figura 9b), formadas a través de la reacción retro Diels-Alder,

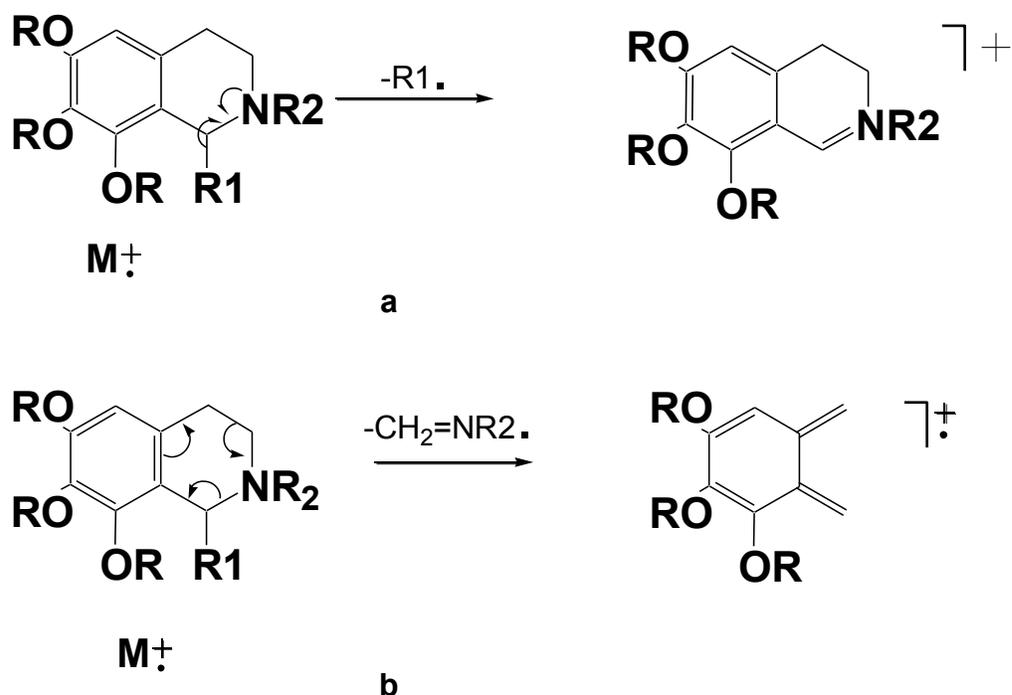


Figura 9.- Mecanismo propuesto para tetrahidroisoquinolinas

Este tipo de ruptura (retro Diels-Alder) parece no tener lugar en los compuestos con un metilo sustituyendo el C-1, debido a que la eliminación de este sustituyente es favorecida y con mucho es la reacción mas importante.

Lundström y Agurell, 1968²⁶, describen la presencia de la 3,4-dimetoxifenetilamina por medio de espectrometría de masas, con un ion molecular M^+ a m/z 181 y los fragmentos a m/z 152, 151, 137, 108, 107 y 30 como pico base, además de la mescalina, N-metil-mescalina, anhalidina, anhalamina, anhanlonina, anhalonidina, pelletina, lophophorina y tricocereina en *Lophophora williamsii*

Mas adelante en al año de 1971 Lundström²¹, reporta la presencia de tiramina, N-metiltiramina, hordenina, 4-hidroxi-3-metoxi fenetilamina, N-metil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetilamina, N,N-dimetil-4-hidroxi-3-metoxi-fenetilamina y dos compuestos desconocidos en la misma especie de *Lophophora williamsii*. Y en 1972²⁴ reporta le presencia de 4 isómeros de tetrahidroisoquinolinas, isoanhalamina, con un ion molecular M^+ a m/z 209 (55) y iones a m/z 208 (100) y 180(68); isoanhalidina, con

ion molecular M^+ a m/z 223(50), 222(100) y 180 (70); isoanhalonidina con un ion molecular M^+ a m/z 223 y un pico base m/z 208, por último la isopellotina reporta un ion molecular M^+ a m/z 237 y el pico base con m/z 222. Finalmente en un estudio mas reciente se reporta mescalina en muestras arqueológicas de *Lophophora* de Texas, con su espectro de masas, donde se observan el ion molecular M^+ a m/z 211, y los fragmentos m/z 182, 167, 105 y 77 como los mas abundantes El-Seedi, *et al.*, 2005⁶⁴.

4.5 ESPECTROMETRIA DE MASAS EN LA FAMILIA CACTACEAE

No obstante de la gran cantidad de estudios fitoquímicos realizados en especies de cactus, los estudios realizados las especies de *Carnegieae gigantea* y *Lophophora williamsii*, los cuales son endémicos de México, han tenido escasa atención. En algunos de ellos se ha empleado la cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM) para la identificación de los alcaloides^{5-9,13,18,19}. A continuación se describen estudios referentes a la presencia de alcaloides en la familia cactaceae.

Mata, y McLaughlin, 1980⁴⁸, reportan la presencia de la heliamina y la 3,4-dimetoxi- β -fenetilamina en *Backebergia militaris*.

Pummangura, Nichols y McLaughlin, 1977⁵⁴, reportan la presencia de β -fentilaminas, en *Pilosocereus maxonii*. Encontrando el ion molecular a m/z 181 con el pico base a m/z 152 el cual corresponde a la 3,4-demetoxi- β -fenetilamina; para la *N*-metil-3-metoxitiramina el ion molecular M^+ a m/z 181 y el pico base a m/z 44; para la *N,N*-dimetil-3-metoxitiramina el ion molecular M^+ a m/z 195, y el pico base a m/z 58.

Pardanani, McLaughlin, Kondrat y Cooks, 1977⁴⁴, identificaron en *Trichocereus peruvianus* la presencia de la tiramina, la 3-metoxi-tiramina y la 3,5-dimetoxi-4-

hidroxifenetilamina, de esta última reportan el ion molecular M^+ a m/z 197, un pico base m/z 30.

Ranieri, McLaughlin, 1976⁴⁹, aislaron de *Coryphantha greenwoodii*, la *N*-metil-3,4-dimetoxi-fenetilamina y la normacromerina.

Crosby y McLaughlin, 1973⁴³, identificaron la mescalina y la 3-metoxitiramina de *Trichocereus pachanoi*.

West y McLaughlin, 1973¹⁵, aislaron e identificaron de *Mammillaria elongata*, la β -*O*-metilsynefrina, la tiramina y la *N*-metiltiramina

Bruhn y Lindgren, 1976²⁷, aíslan e identifican en *Pachycereus pecten-aboriginum* por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, la presencia de la salsolidina así como trazas de la 3,4-dimetoxi-fenetilamina.

Kruger, Cooks, McLaughlin y Ranieri 1977¹⁴, empleando la técnica de MIKE describen la presencia de la ubina, la hordenina y la *N*-metiltiramina, y describen el siguiente patrón para la ubina en la figura 10.

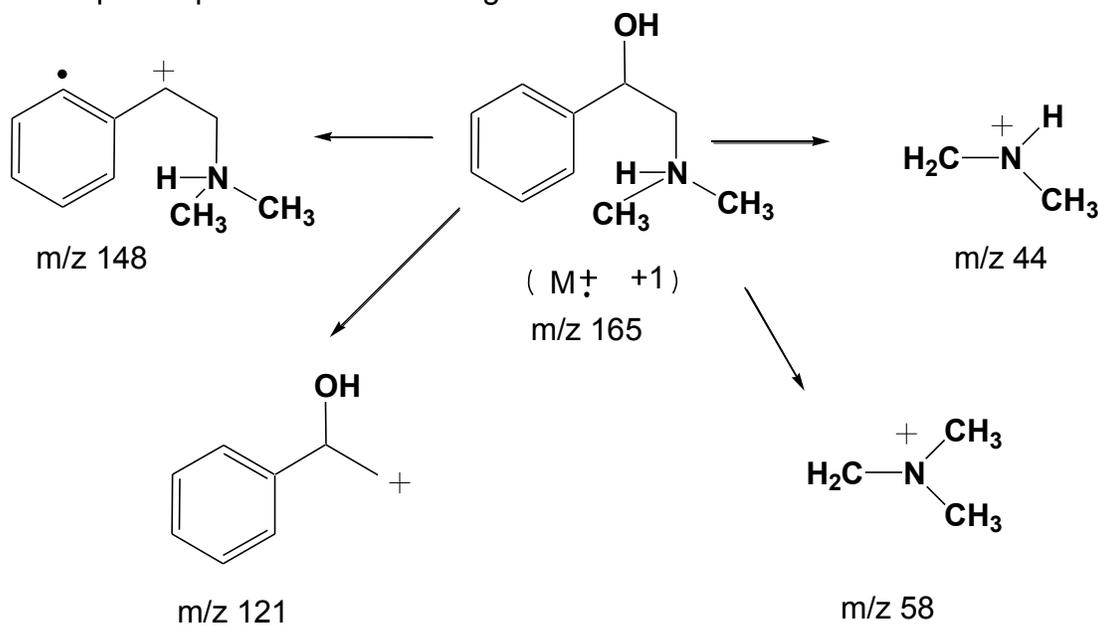


Figura 10.- Patrón de fragmentación para la ubina

Pummangura, McLaughlin y Schifferdecker, 1981⁶², reportan la presencia de β -fenetilaminas a partir de *Coryphantha missouriensis*, encontrando la hordenina, la *N*-metil-tiramina y la tiramina la cual identifican por medio de CIMS con el ion molecular mas uno a m/z 138; y con la misma técnica reportan la presencia de la *N*-metil-3,4-dimetoxi-fenetilamina con el ion molecular mas uno a m/z 196.

Bruhn, y Agurell, 1974⁴⁷, realizan la caracterización de la *N*-metil-3,4-dimetoxi-fenetilamina, en *Coryphantha calipensis* por espectrometría de masas, reportando la siguiente fragmentación, el ion molecular M^+ a m/z 225(0.4), 182(28), 181(100), 166(17), 151(8) y 44(67).

Lindgren, Agurell, Lundström, y Svensson, 1971⁵⁰, identifican en *Trichocereus cuzcoensis* la presencia de la 3-metoxitiramina, donde se forman los fragmentos a m/z 137 del rompimiento del anillo bencílico (figura 11a), y a m/z 138 de un transposición de McLafferty, (figura 11b).

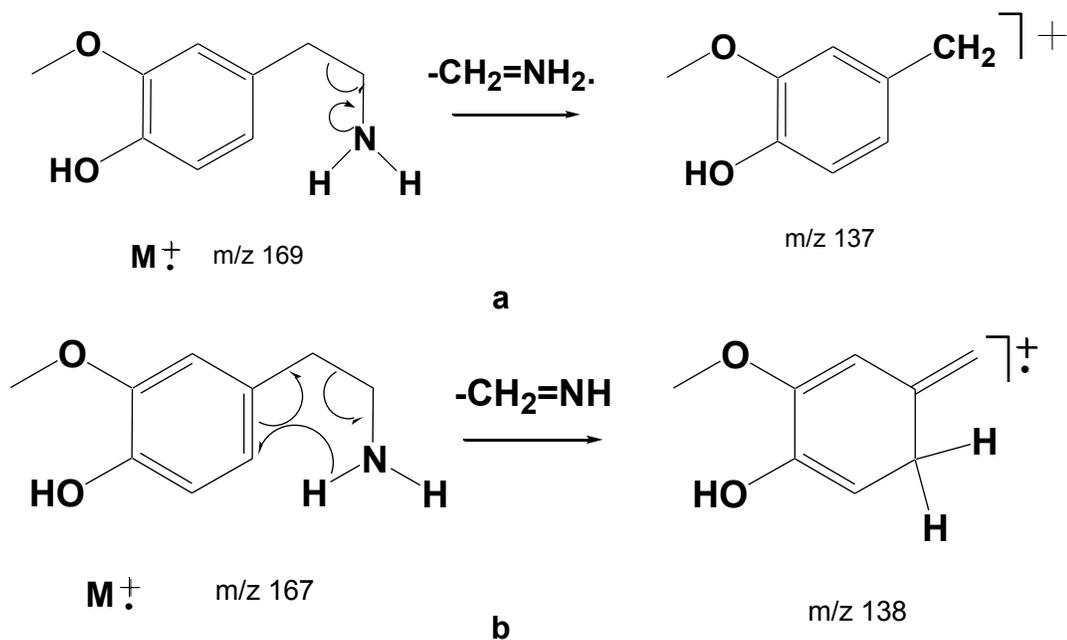


Figura 11.- Patrón de fragmentación para la 3-metoxi tiramina.

Adicionalmente reportan la fragmentación para la 3,4-dimetoxi-5-hidroxi-fenetilamina, con los siguientes el ion molecular a m/z 197(12), y los iones a m/z 168(61), 167(25), 30(100). La mescalina con el ion molecular M^+ a m/z 211(20), y los iones a m/z 182(100), 181(50), 167(52), 137(14) y 30(90). Por otro lado reportan la *N*-metil-3-metoxi-4-hidroxi-fenetilamina con el ion molecular M^+ a m/z 181(1), y los iones a m/z 138(22), 137(7) y 44(100), la 3,4-dimetoxi-5-hidroxi-fenetilamina y la anhalidina.

Agurell, 1969⁴¹, estudia por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas las especies de *Trichocereus pachanoi* y *Trichocereus werdermannianus*, reportando la presencia de la 3,4-dimetoxifenetilamina, la 4-hidroxi-3-metoxifenetilamina y la 3,5-dimetoxi-4-hidroxifenetilamina, en *T. pachanoi*; y en *T. werdermannianus* la presencia de la tiramina, la 3-metoxitiramina, la 3-hidroxi-4-metoxifenetilamina, la 3,4-dimetoxifenetilamina, la 3,4-dimetoxi-5-hidroxifenetilamina, la mescalina y la 3,5-dimetoxi-4-hidroxifenetilamina.

Speir, Mihranian y McLaughlin, 1970⁶¹, estudian la presencia de alcaloides en *Ariocarpus trigonus*, reportando un estudio por espectrofotometría con luz UV, en los alcaloides encontrados, para la mescalina; la *N*-metilmescalina; la *p*-metoxy-fenetilamina; la 5,6,7-trimetoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina; la 6,7-dimetoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina; la 1,2-dimetil,-6,7-dimetoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina; la 3,4-dimetoxifenetilamina; la macromerina y un alcaloide desconocido.

Neal y McLaughlin, 1970⁶⁰, aislaron dos alcaloides de la especie *Ariocarpus retusus*, identificándolos en pequeñas cantidades, la *N*-metil-3,4-dimetoxi-fenetilamina y el *N*-metil-4-metoxi-fenetilamina.

Ranieri y McLaughlin, 1977⁶³, reportan en la especie *Dolichothele uberiformis*, la presencia de la ubina (*N,N*-dimetil- β -hidroxi- β -fenetilamina) con una fragmentación con el ion molecular M^+ a m/z 165(0.4), y los fragmento a m/z 147(0.6), 107(0.6)

58(100). Por otro lado la presencia de la urbina con el ion molecular M^+ a m/z 193(42), 192(64), y los iones a m/z 150(100), 135(39), y 107(53), (M^+-43), el pico base es atribuible a una reacción retro Diels-Alder a partir del ion molecular.

Otro tipo de alcaloides glucosilados han sido reportados en la literatura como es el caso de la pterocereina, el cual tiene el ion molecular CIMS a m/z 415 y con IE el ion molecular a m/z 384.164 el cual se origina por la pérdida del fragmento CH_2OH , el cual se identificó en la especie *Pterocereus gaumeri* por Mohamed, Chang y Mclaughlin, 1979⁵⁸.

También se ha identificado de las partes aéreas de *Hammada articulata* ss. *scoparia*, la presencia de la *N*-metilisalsolina, la carnegina, la isosalsolina, la salsolidina, la dehidrosalsolidina y la isosalsolidina así como el flavonoide isorhamnetina-3-*O*- β -D-robinobiosido por Benkrief, Brum-Bousquet, Tillequin y Koch, 1990⁴⁵.

Existen estudios realizados referentes a la identificación por espectrometría de masas para las β -fenetilaminas y las tetrahidroisoquinolinas, con varias especies del género *Trichocereus* *courantii*, *T. fulvilanus*, *T. cuzcoensis*, *T. santiaguensis*, *T. skottsbergii*, *T. strigosus*, *T. thelegonoides*, *T. thelegonus*, *T. courantii*, *T. knuthianus*, *T. manguinii*, *T. pupureopilosus*, *T. taquimbalensis*, *T. tunariensis* y *T. validus*, y en especies de *Echinopsis* *rhodotricha*, *Pachycereus pecten-aboriginum*, *pelecyphora aselliformis* y *Stetsonia coryne*, le presencia de β -fenetilaminas y de tetrahidroisoquinolinas, entre las cuales podemos mencionar a la tiramina, la *N*-metiltiramina, la hordenina, la 3-hidroxi-4-metoxifenetilamina, la 3-metoxitiramina, la *N*-metil-3-metoxitiramina, la 3,4-dimetoxifenetilamina, la 3-hidroxi-4,5-dimetoxifenetilamina, la mescalina, la anhalidina y la anhlionidina (Agurell, Bruhn, Lundström y Svensson, 1971)⁴².

Starha, Urbánková, Kuchyna, 1997⁵¹, realizan un estudio con las especies del género *Gymnocalycium* en las especies *G. albispinum*, *G. chubutense*, *G.*

gibbosum, *G. marsoneri*, *G. monvielli*, *G. oenanthemum*, *G. quehlianum*, *G. stellatum*, *G. uebelmannianum* reportando la presencia de alcaloides identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas entre los cuales están la tiramina, la N-metiltiramina, la hordenina, la mescalina, la N-metil-mescalina, la N,N-dimetil-mescalina, la O-metil-anhalidina, la anhalinina, la O-metil-anhalonidina, la anhalidina, la anhalonidina, la pelletina, la anhalonina y la lophophorina..

Starhá, Chybidziurová, y Lacný, 1999⁴ reportan la presencia de los alcaloides β -fenetilamina, la tiramina, la N-metiltiramina, la hordenina, la mescalina, la N-metil-mescalina, la N,N-dimetil-mescalina, la O-metil-anhalidina, la anhalinina, la anhalonidina y la pelletina en las especies de *Turbinicarpus schmiedeckianus*, *T. schmiedeckianus* var. *schwarzii*, *T. lophophoroides*, *T. schmiedeckianus* var. *flaviflorus*, *T. pseudomacrochele* var. *krainzianus*, *T. pseudopectinatus*, *T. schmiedeckianus* var. *dickisoniae*. Algunos de ellos solo en cantidades traza.

Meyer, Mohamed, McLaughlin, 1980⁵⁹, reportan la presencia de los alcaloides tiramina, la 3-metoxitiramina, la mescalina, la 3,4-dimetoxifenetilamina, la hordenina y la N-metiltiramina, en las especies de *Opuntia acanthocarpa*, *O. fulgida*, *O. imbricata*, *O. invicta*, *O. kleiniae*, *O. schottii*, *O. stanlyi*, *O. subulata*, *O. versicolor* y *O. whipplei*.

En otras familias también se ha reportado la presencia de alcaloides pertenecientes a los grupos de las β -fenetilaminas y las tetrahidroisoquinolinas, como lo es el estudio de la especie *Haloxylon articulatum*, de la familia *Chenopodiaceae*, en donde reportan la presencia de la carnegina y su fragmentación por espectrometría de masas con el ion molecular M^+ a m/z 221(30), y los iones a m/z 220(34), 207(80), 206(100), 191(60), 190(76), 178(40), 162(50), 148(30), 103(35), 91(20) y 42(14); la presencia de la N-metil-isosalsolina, con su ion molecular M^+ a m/z 207(15), y los iones a m/z 193(30), 192(100), 177(45), 164(10), 149(15), 121(5), 96(6), 91(5), 77(5), 57(5) y 42(4); la salsolidina

con el ion molecular M^+ a m/z 207(78), y sus iones secundarios a m/z 206(79), 193(80), 192(100), 190(60), 178(55), 177(60), 176(75), 163(30), 160(25), 134(23), 131(25), 118(20), 96(24), 91(25), 77(20), 65(10) y 36(17), y el compuesto 2-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina con su ion molecular M^+ a m/z 186(26), y su fragmentación a m/z 171(6), 144(100), 143(63), 115(10), 94(5), 77(4) y 42(4) estos fueron descritos por El-Seedi *et al.*, 2005⁶⁴.

Otro ejemplo donde se reporta la presencia de este tipo de alcaloides es en la familia Leguminosae donde Ghosal, y Srivastava en 1973¹⁶ estudia a la especie *Desmodium tiliaefolium*, y reportan el aislamiento e identificación de diferentes alcaloides entre ellos se encuentra la 3,4-dimetoxi- β -fenetilamina, la cual presenta la fragmentación siguiente: el ion molecular M^+ a m/z 181(8), y los picos mas significantes a m/z 166 (6), 152 (19), 151 (100), 137 (12), 136 (22), 30(43), la salsolidina con un ion molecular M^+ a m/z 207(2%) y los picos mas representativos a m/z 206(14), 192(100), 163(7), 162(3), 154(6), 153(17), 151(5), 149(8), 133(4) y 43(21); la salsolina con un ion molecular M^+ a m/z 193(3), y los fragmentos mas significativos a m/z 192(12), 178(100), 164(5), 163(17), 149(11), 134(7), 122(6) y 43(25); la NN-dimetil-3,4-dimetoxi- β -fenetilamina con el ion molecular M^+ a m/z 209 (3), y los iones a m/z 194(4), 179(8), 152(10), 151(19), 149(5), 136(5), 121(3), y 58(100); la N-metil-3,4-dimetoxi- β -hidroxi-fenetilamina con el ion molecular M^+ a m/z 211(8), y los fragmentos a m/z 196(5), 194(5), 193(3), 178(14), 167(12), 166(17), 165(42), 151(100), 150(62), 72(7), 43(58) y 29(21); por último reportan la hordenina con el ion molecular M^+ a m/z 165 (14) y los fragmentos a m/z 149(5), 121(18), 107(16) y 58(100).

Finalmente existen dos revisiones sobre alcaloides isoquinolinicos, donde se describen las formulas moleculares de los compuestos, su punto de fusión, sus longitudes de absorción máxima en luz ultra violeta cuando los hay, sus señales por espectroscopia de infra-rojo, su espectrometría de masas, y sus estudios de resonancia magnética nuclear de 1H o ^{13}C (Menachery *et al.*, 1986⁵⁶; Atta-ur-Rahman, 1994⁵⁷).

HIPOTESIS

La literatura resalta la importancia biológica, fitoquímica y medicinal que tienen los alcaloides presentes en diversos especímenes de cactáceas; adicionalmente, dado que se cuenta con el conocimiento de este tipo y de los compuestos que se han estudiado, a través de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, entonces se podrá identificar mediante esta dualidad técnica la presencia de β -fenetilaminas y tetrahidroisoquinolinas en las especies de *Lophophora williamsii* (Lem. Ex SD.) Coult. y *Carnegiea gigantea* (Engelm.).

6.- OBJETIVOS

6.1 GENERAL

Determinar la presencia β -fenetilaminas y tetrahidroisoquinolinas en las especies de *Lophophora williamsii* (Lem. Ex SD.) Coult. y *Carnegiea gigantea* (Engelm.) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas a efecto de contribuir al conocimiento de estos compuestos en la familia cactácea.

6.2 PARTICULARES

- Analizar los extractos obtenidos por partición ácido-básica de *Lophophora williamsii* (Lem. Ex SD.) Coult. y *Carnegiea gigantea* (Engelm.) por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).
- Identificar 3,4-dimetoxi-5-hidroxi- β -fenetilamina, 3,4-dimetoxi- β -fenetilamina, mescalina, *N*-metil-3,4-dimetoxi- β -fenetilamina, *N*-metil-mescalina,

gigantina, lophophorina, iso-lophophorina, anhalonidina, carnegina, weberina, gigantina, iso-salsolidina y salsolidina, los cuales son representativos de la familia cactaceae de acuerdo en la literatura, mediante sus correspondientes espectros de masas.

- Validar el empleo de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación de este tipo de compuestos, en las especies de *Lophophora williamsii* (Lem. Ex SD.) Coult. y *Carnegiea gigantea* (Engelm.).

7.- METODOLOGÍA

7.1 COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Para el estudio fitoquímico se colectó, la muestra de *Carnegiea gigantea* en la localidad de Autopista Nogales, a 2 km sobre la vereda hacia los Jacales, Guaymas, Sonora. Una muestra de al menos 10 kg de peso fresco de los tallos tomados a partir del ápice, la parte más apical de la muestra se herborizó en el herbario de la FES-Iztacala. Para el estudio de los alcaloides de *Lophophora williamsii* se partió de un extracto realizado de muestras pertenecientes a la colección de cactáceas del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO FES-Iztacala.

7.2 EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES

Para la extracción de los alcaloides se siguió la técnica de rutina de separación ácido-básica⁴³, pesando 150 g de material fresco de *Carnegiea gigantea*, y 11.42 g de *Lophophora williamsii*, se adicionaron 200 ml y 20 ml de metanol respectivamente, ambas muestras se homogenizan por separado en una licuadora, y se dejaron en reposo durante toda la noche protegidos del aire. Posteriormente se filtraron las muestras con embudo buchner y papel filtro. El extracto metanólico se evaporó a baja presión y el residuo se resuspendió en 50 ml de disolución 0.1 N de HCl y se realizaron dos extracciones con 50 ml de CHCl₃, el extracto clorofórmico fue desechado y la fase acuosa se neutralizó con bicarbonato de sodio a una concentración de 0.2 N. Posteriormente se realizaron dos extracciones con 50 ml de CHCl₃, se recuperó la fase orgánica y se secó con sulfato de sodio anhidro, finalmente se evaporó a sequedad con baja temperatura y presión reducida. De la forma anterior se obtiene la fracción alcaloidea cruda.

7.3 IDENTIFICACIÓN POR CG-EM DE ALCALOIDES.

Para el análisis e identificación química de los compuestos mayoritarios de cada especie se utilizó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), la fracción alcaloidea se resuspendió en 2 ml de metanol grado HPLC, el cual se inyectó en el cromatógrafo de gases con las siguientes condiciones de corrida: temperatura inicial del horno a 70 °C y se mantiene durante 2 minutos; se realiza una primer rampa de calentamiento de 8°C/min hasta 270 °C; y una segunda rampa a 10 °C/min hasta 290 °C y se mantiene durante 3 minutos; la temperatura del inyector fue de 220 °C; el gas acarreador fue Helio a una velocidad constante de 35 cm/seg; el modo de inyección Splitless, con split cerrado a 0.0 min. y split abierto a 0.01 min, el volumen de inyección fue de 1 µl. Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes: Temperatura de la fuente de ionización a 180 °C; Temperatura de la línea de transferencia a 290 °C, Tipo de ionización barrido completo con impacto Electrónico (IE) con una energía de ionización de 70 eV y un rango de 50 a 650 de relación de masa carga (m/z); polaridad de los iones positivos. Los espectros de fragmentación de masas obtenidos de los alcaloides separados se compararon los espectros de la biblioteca NIST, y de los iones más abundantes encontrados en las muestras se llevó a cabo una fragmentación secundaria (masas/masas), los cuales se presentan en cada una de las estructuras de los compuestos obtenidos. La cuantificación se llevó a cabo empleando como estándar externo 8-hidroxiquinolina. Finalmente se comparan los espectros de masas obtenidos con la biblioteca NIST, así como la fragmentación reportada en la literatura.

8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo muestran que a través de la inspección de los patrones de fragmentación y la comparación con la biblioteca NIST, se pueden identificar las estructuras químicas de los alcaloides con esqueleto de β -fenetilamina y de tetrahidroisoquinolina. Así mismo los estudios de fragmentación secundaria permitieron apoyar la asignación estructural de los iones más importantes para la identificación química.

Para una discusión más objetiva de los resultados obtenidos se considero conveniente, llevar ésta a cabo por especie estudiada: *Lophophora williamsii* y *Carnegiea gigantea*. En forma complementaria a lo mencionado con anterioridad, se hace apropiado resaltar que en total se identificaron 21 compuestos de los cuales dos de ellos (gigantina y anhalonidina) en *Lophophora williamsii* y seis de estos (iso-salsolidina, weberina, O-metil-pellotina, isoanhalonidina, iso-pellotina y pellotina) en *Carnegiea gigantea* no han sido reportados en estas especies.

8.1 ALCALOIDES DE *Lophophora williamsii*

Para el estudio de los alcaloides de *Lophophora williamsii* se partió de un extracto obtenido de muestras pertenecientes a la colección de cactáceas del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO FES-Iztacala. Las muestras fueron procesadas y analizadas tal como se describe en la parte de materiales y métodos. La fracción de alcaloides obtenida para esta especie fue de 0.0146 g lo que corresponde a un 0.127 % de alcaloides en peso fresco, mientras que Kapadia y Favez informan de un 3.7 % en peso seco y un 0.41 % en peso fresco⁵⁴. Así en la figura 12A se muestra el cromatograma correspondiente al extracto alcaloideo de *Lophophora williamsii* y en la Figura 12B se presenta una amplificación de la región donde se observan los tiempos de retención de los alcaloides encontrados. En el cromatograma hay 5 picos correspondientes a alcaloides del tipo β -fenetilaminas y 7 al tipo de tetrahidroisoquinolinas. Como se

aprecia las tetrahydroisoquinolinas fueron mucho más abundantes que las β -fenetilaminas, probablemente debido a que las β -fenetilaminas son precursores de las tetrahydroisoquinolinas, las cuales se acumulan como productos terminales de las rutas de biosíntesis, dicho proceso de biosíntesis de tetrahydroisoquinolinas a partir de β -fenetilaminas ha sido descrito previamente.^{37,41,53}

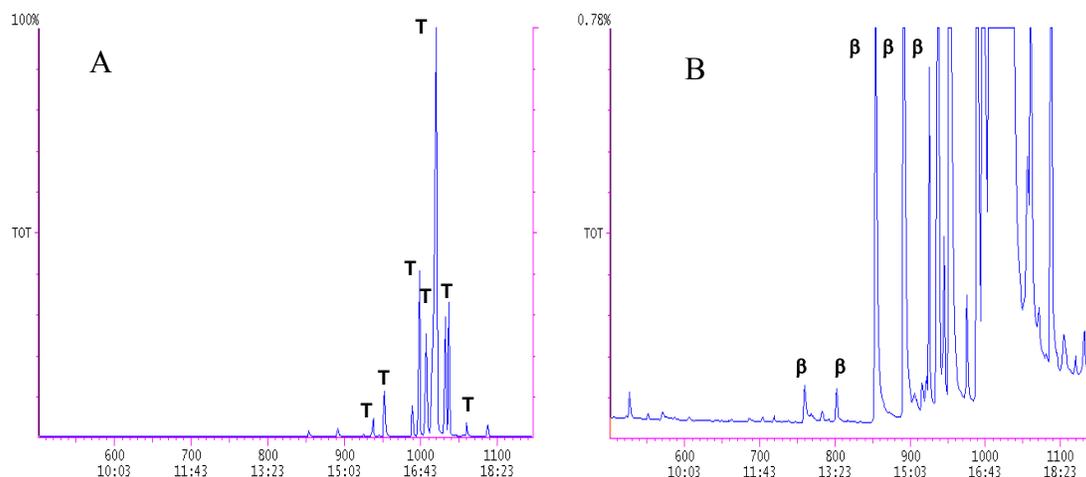


Figura 12. Cromatograma del extracto de alcaloides de *Lophophora williamsii*. **A**, Cromatograma completo; **B**, ampliación de la región de alcaloides; **T**, Tetrahydroisoquinolinas; **β**, β -fenetilaminas

En el Cuadro 1 se indica la asignación de los alcaloides correspondientes a cada pico del cromatograma. Como se puede observar las β -fenetilaminas tienen tiempos de retención menores que las tetrahydroisoquinolinas, lo cual puede ser explicado en función de su mayor volatilidad asociada a su menor peso molecular. También se indican las concentraciones de cada uno de los alcaloides expresada en microgramos por gramo de tejido fresco. De las β -fenetilaminas se observa que la más abundante fue la *N*-metil-3,4-dimetoxifenetilamina con 4.8413 $\mu\text{g/g}$, y la menos abundante 3,4-dimetoxifenetilamina con 0.3389 $\mu\text{g/g}$. mientras que para el caso de las tetrahydroisoquinolinas la más abundante fue gigantina con 685.8527 $\mu\text{g/g}$, y la que presenta la menor concentración fue iso-lophophorina con 9.3102 $\mu\text{g/g}$.

Cuadro 1. Tiempos de retención y tipos de alcaloides presentes en el extracto de *Lophophora williamsii*

T.R. (min)	Tipo de alcaloide	Nombre	µg/g
14:17	β-fenetilamina	3,4-dimetoxi-5-hidroxifenetilamina	0.3389
12:43	β-fenetilamina	3,4-dimetoxifenetilamina	0.3355
14:55	β-fenetilamina	mescalina	3.5342
13:25	β-fenetilamina	N-metil-3,4-dimetoxifenetilamina	4.8413
15:28	β-fenetilamina	N-metil-mescalina	3.2195
15:41	Tetrahidroisoquinolina	1-metil-5-hidroxi-6,7-dimetoxi-tetrahidroisoquinolina	173.7907
15:56	Tetrahidroisoquinolina	anhalonidina	117.9294
16:41	Tetrahidroisoquinolina	gigantina	685.8527
16:50	Tetrahidroisoquinolina	anhalamina	127.2396
17:03	Tetrahidroisoquinolina	isoanhalonidina	139.6533
17:20	Tetrahidroisoquinolina	lofoforina	12.4136
17:43	Tetrahidroisoquinolina	iso-lofoforina	9.3102

T.R.= Tiempo de retención (minutos)

µg/g=microgramos por gramo de tejido fresco.

A continuación se describen los espectros de masas de todos los alcaloides presentes y la fragmentación secundaria de los iones más importantes. Con base en la inspección química de estos espectros y empleando las reglas de asignación de fragmentación de masas, se hace una propuesta de fragmentación para algunos de ellos

El espectro de masas en barrido completo de la β-fenetilamina, se presenta en la figura 13. Como se puede observar, en éste se reconoce el ion molecular M^+ a m/z 197, el cual manifiesta congruencia con el peso molecular esperado para la 3,4-dimetoxi-5-hidroxifenetilamina, que presenta un formula molecular $C_{10}H_{15}NO_3$.

Así mismo se observa el pico base a m/z 168, y el ion a m/z 153, el cual también presenta una abundancia relativa mayor que los demás iones. Para el estudio de masas/masas fueron seleccionados los iones a m/z 168, 153, 137 y 123, los espectros de fragmentación secundaria de estos iones se presentan en la Figura 14. Este compuesto ha sido reportado para la especie *Trichocereus cuzcoensis* por Lindgren y colaboradores en 1971.⁵⁰

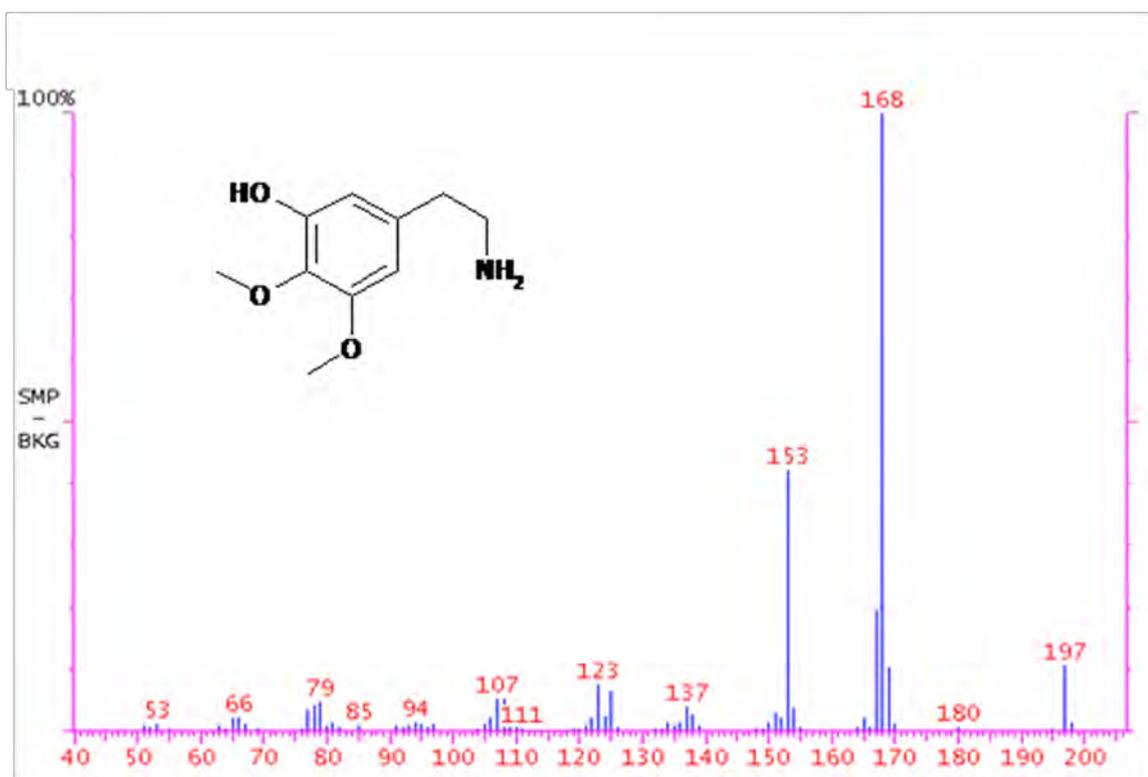


Figura 13. Espectro de masas en barrido completo de la 3,4-dimetoxi-5-hidroxifenetilamina.

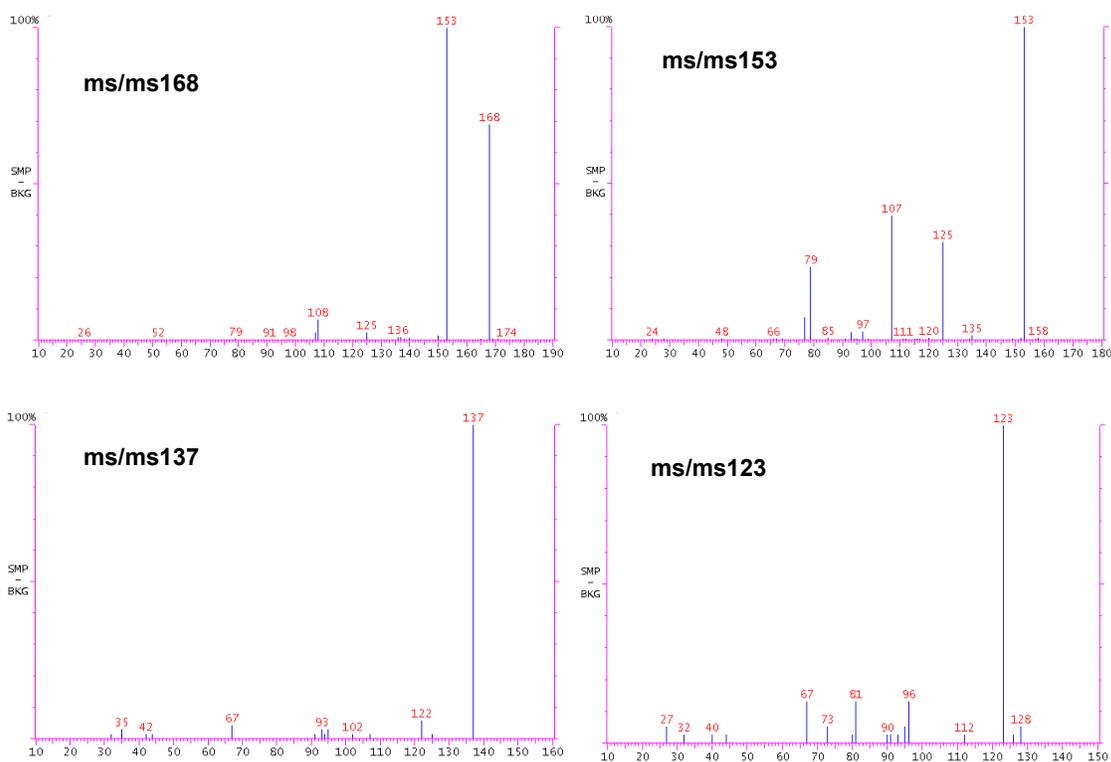


Figura 14. Análisis masas/masas de los iones m/z 168, 153, 137 y 123 de la 3,4-dimetoxi-5-hidroxifenetilamina.

Por otro lado, el espectro de masas en barrido completo de la 3,4-dimetoxifenetilamina se presenta en la figura 15. Como se puede observar en el espectro se reconoce el ion molecular M^+ a m/z 181, el cual corresponde a el peso molecular de la 3,4-dimetoxifenetilamina, que presenta un formula molecular $C_{10}H_{15}NO_2$, así mismo, se observa el pico base a m/z 152. Para el análisis de masas/masas se seleccionaron los iones a m/z 152, 137, 121 y 107, los espectros de fragmentación secundaria de estos iones se presentan en la figura 16, este mismo compuesto ha sido reportado por Lundström y Agurell en 1968, para la especie *Lophophora williamsii*.²⁶

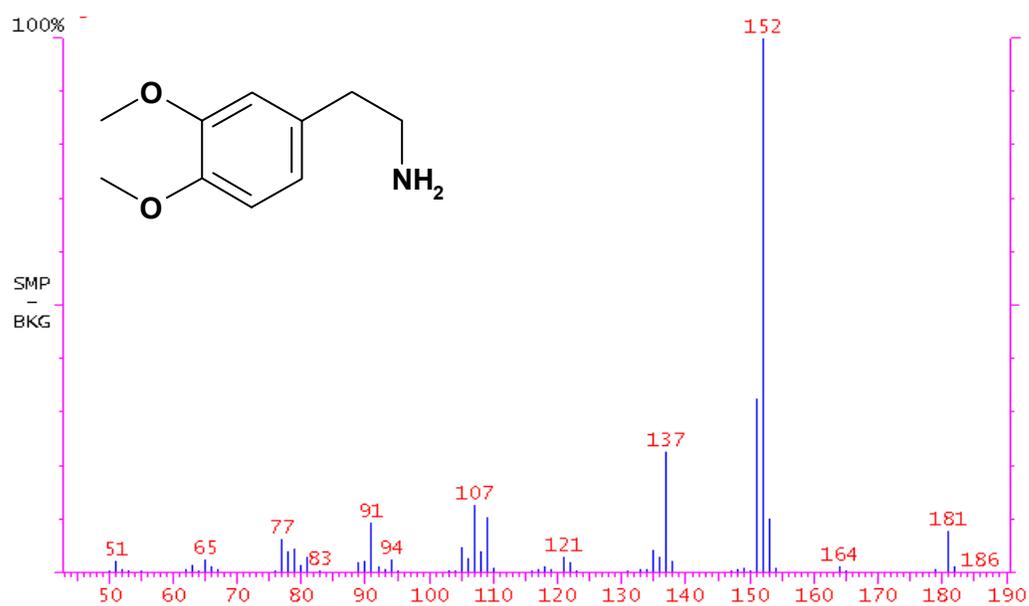


Figura 15. Espectro de masas en barrido completo de la 3,4-dimetoxifenetilamina.

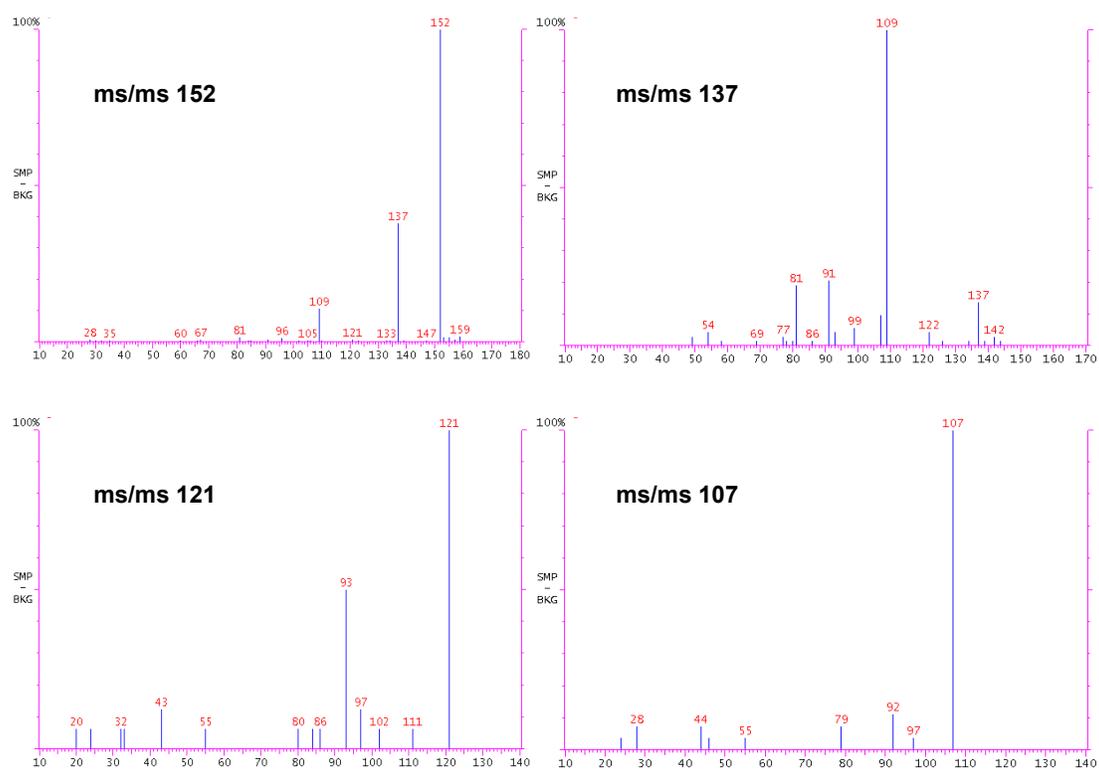


Figura 16. Análisis masas/masas de los iones m/z 152, 137, 121 y 107 de la 3,4-dimetoxifenetilamina.

El espectro de masas en barrido completo de la mescalina se presenta en la figura 17. Como se puede observar en el espectro, está presente el ion molecular M^+ a m/z 211, el cual corresponde con el peso molecular esperado para la molécula identificada, que presenta un formula molecular $C_{11}H_{17}NO_3$, así mismo, se observa el pico base de este compuesto a m/z 168. Para el análisis de masas/masas se seleccionaron los iones m/z 182, 168, 153 y 139, los espectros de fragmentación secundaria correspondientes a estos iones se presentan en la figura 18. Este mismo alcaloide ha sido reportada en *Lophophora williamsii* por Lindgren *et al.*, en 1971⁵⁰, y Lundström y Agurell, en 1968²⁶; en *Trichocereus pachanoi* por Crosby y McLaughlin, 1973⁴³; en *Trichocereus cuzcoensis* por Lindgren, Agurell, Lundström, y Svensson, 1971⁵³; en *Trichocereus pachanoi* y *Trichocereus werdermannianus* por Agurell, 1969⁴¹ y en *Ariocarpus trigonus* por Speir, Mihranian y McLaughlin, 1970⁶¹.

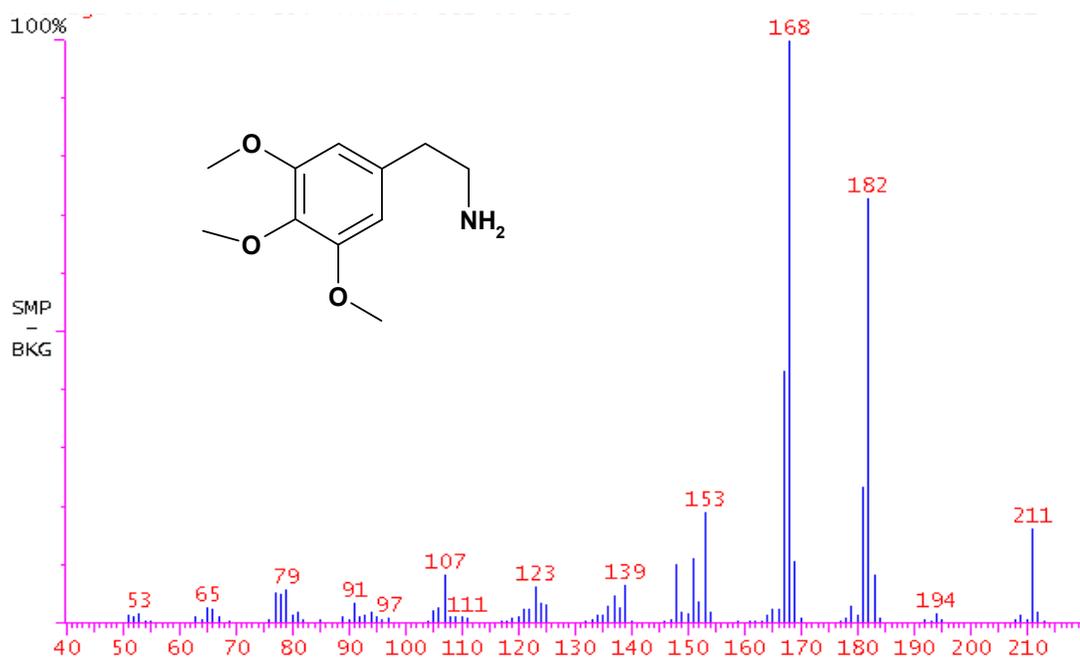


Figura 17. Espectro de masas en barrido completo de la mescalina

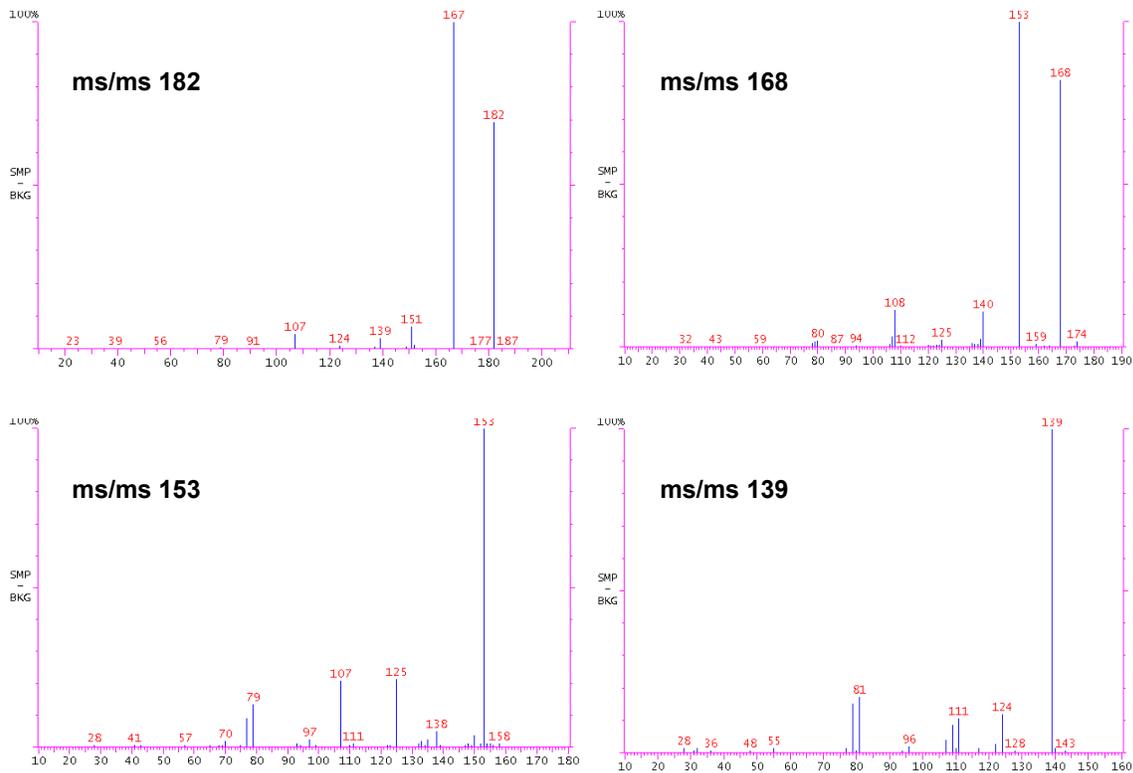


Figura 18. Análisis masas/masas de los iones m/z 182, 168, 153 y 139 de la mesalina

El espectro de masas en barrido completo de la *N*-metil-3,4-dimetoxifenetilamina se presenta en la figura 19. En este espectro de masas no se observa el ion molecular M^+ a m/z 195, probablemente debido a la elevada reactividad de éste en las condiciones de la cámara de ionización. Así mismo, se observa que el pico base para el compuesto es a m/z 152. Para el análisis de masas/masas fueron seleccionados los iones a m/z 152 y 137 y los espectros de fragmentación secundaria correspondientes a estos iones se presentan en la figura 20. Esta β -fenetilamina también fue reportada por Pummangura y colaboradores en 1977 en la especie *Pilosocereus maxonii*.⁵⁴

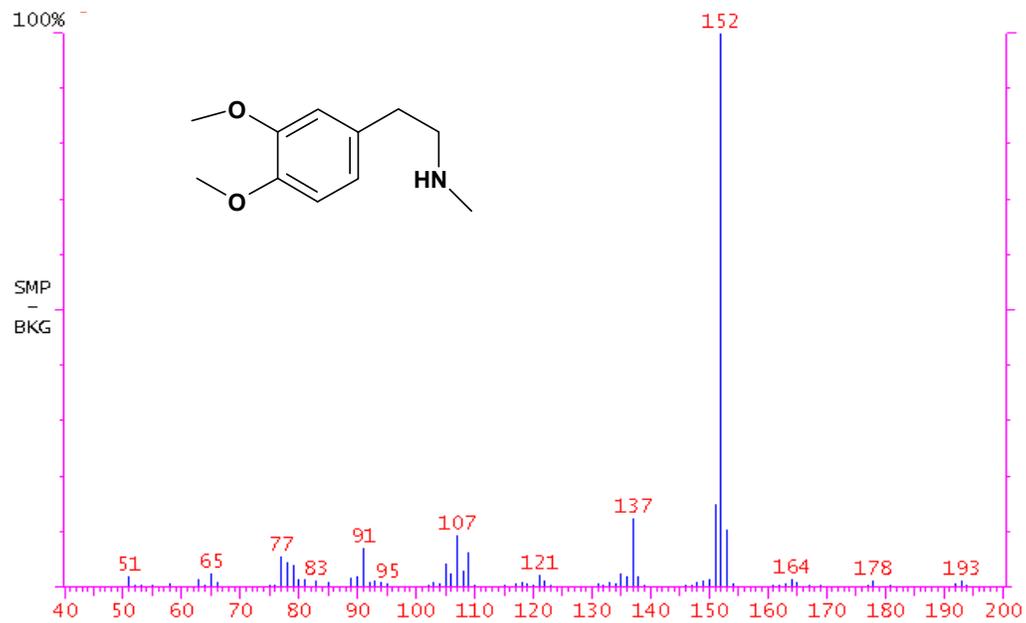


Figura 19. Espectro de masas en barrido completo de la *N*-metil-3,4-dimetoxifenetilamina.

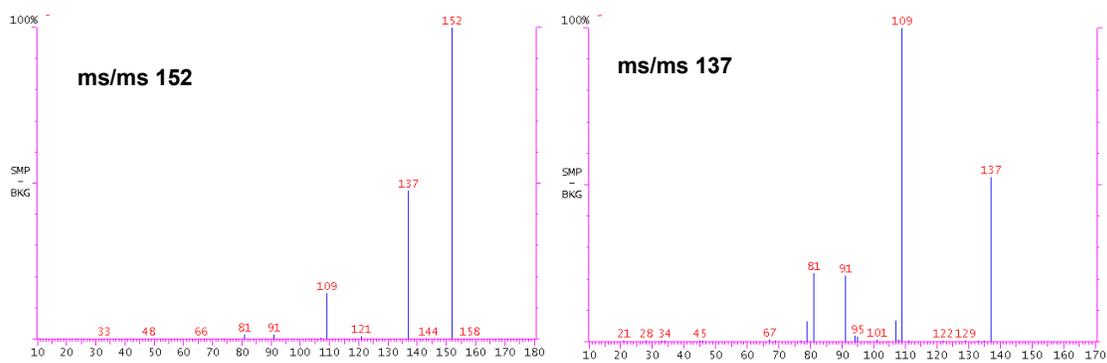


Figura 20. Análisis masas/masas de los iones m/z 152 y 137 de la *N*-metil-3,4-dimetoxifenetilamina.

En la figura 21 se presenta el espectro de masas en barrido completo. En este espectro de masas no se observa el ion molecular a m/z 225, mientras que el pico base se observa a m/z 182. Para el análisis de masas/masas de este alcaloide fueron seleccionados los iones a m/z 182 y 139 y los espectros de fragmentación secundaria correspondientes a estos iones se presentan en la figura 22, con estos datos se asignó a la N-metil-mescalina, la cual ha sido reportada en *Lophophora williamsii* por Lundström y Agurell, 1968²⁶; en *Gymnocalycium chubutense*, *G. gibbosum*, *G. marsoneri*, *G. monvielli*, *G. oenanthemum*, *G. quehlianum*, *G. stellatum*, *G. uebelmannianum* por Starha, Urbánková, Kuchyna, 1997⁵¹; en *Turbincarpus schmiedeckianus*, *T. schmiedeckianus* var. *schwarzii*, *T. lophophoroides*, *T. schmiedeckianus* var. *flaviflorus*, *T. pseudomacrochele* var. *krainzianus*, *T. pseudopectinatus*, por Starhá, Chybidziurová, y Lacný, 1999⁴. Además de encontrarse en la base de datos NIST.⁵⁵

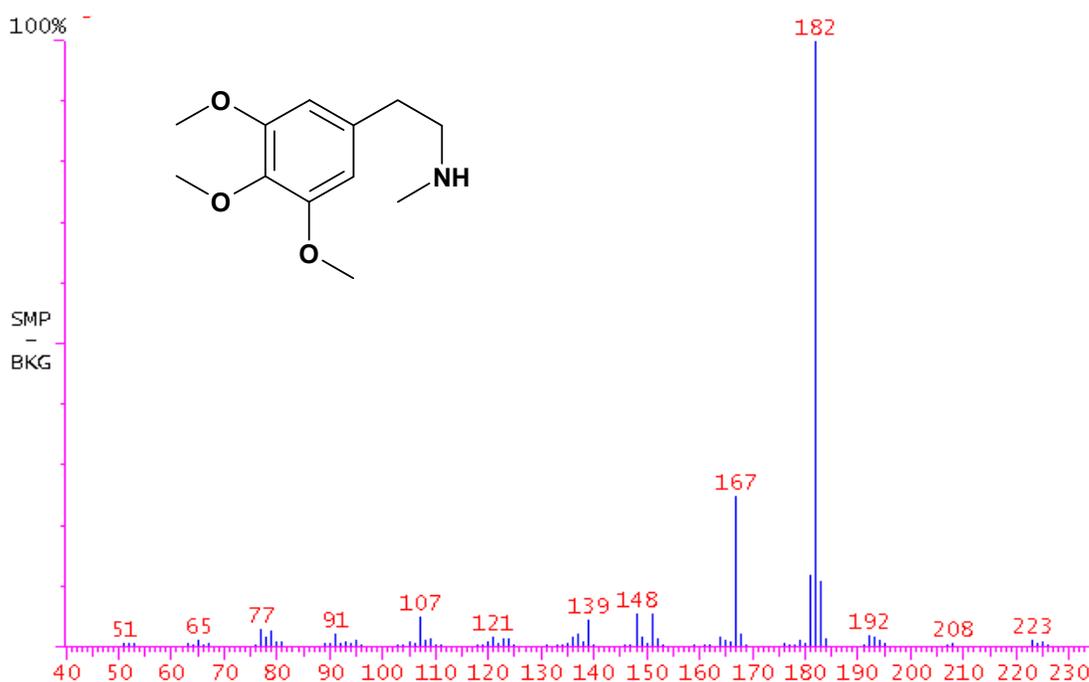


Figura 21. Espectro de masas en barrido completo de la N-metil-mescalina

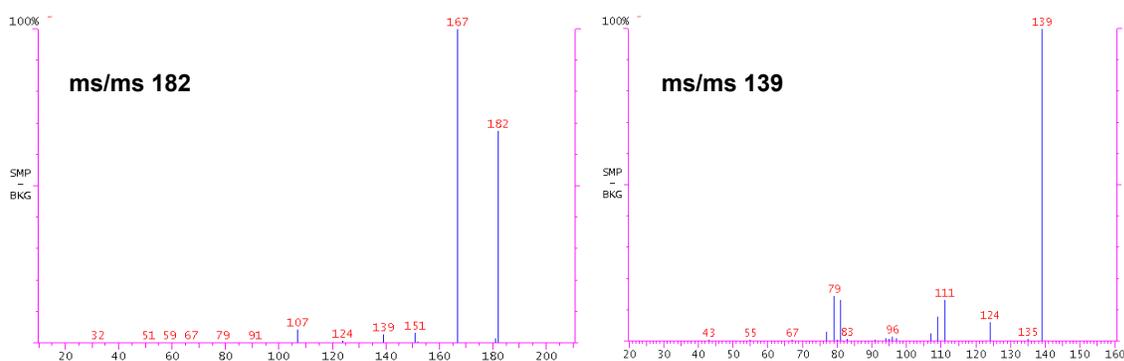


Figura 22. Análisis masas/masas de los iones m/z 182 y 139 de la *N*-metil-mescalina

Con relación a las tetrahydroisoquinolinas aisladas del extracto de *Lophophora williamsii*, en la figura 23 se presenta el espectro de masas en barrido completo del alcaloide 1-metil-5-hidroxi-6,7-dimetoxi-tetrahydroisoquinolina. En este espectro de masas no se observa el ion molecular $M^+ a$ m/z 223, mientras que el pico base a m/z 222, el cual corresponde al ion molecular menos uno. La inestabilidad del ion molecular a m/z 223 puede ser explicada por la estabilidad asociada al catión que se forma en las aminas disustituídas, así mismo la tendencia natural del par electrónico del catión, se promueve la eliminación del metilo dando lugar al ión m/z 207 el cual esta conjugado con el anillo aromático, cabe mencionar que se supone la resonancia del par electrónico del metileno bencílico y no del par electrónico del nitrógeno debido a que este se encuentra en posición ortogonal respecto del anillo, por lo cual no podría llevar a cabo la eliminación del metilo en posición anti. Y la fragmentación en masas/masas de los iones más importantes de este compuesto, m/z 207, 192, 180 y 165 se ilustra en la figura 24. Este compuesto no ha sido reportado en la literatura, lo cual contribuye a considerar que se trata de un alcaloide nuevo para la especie.

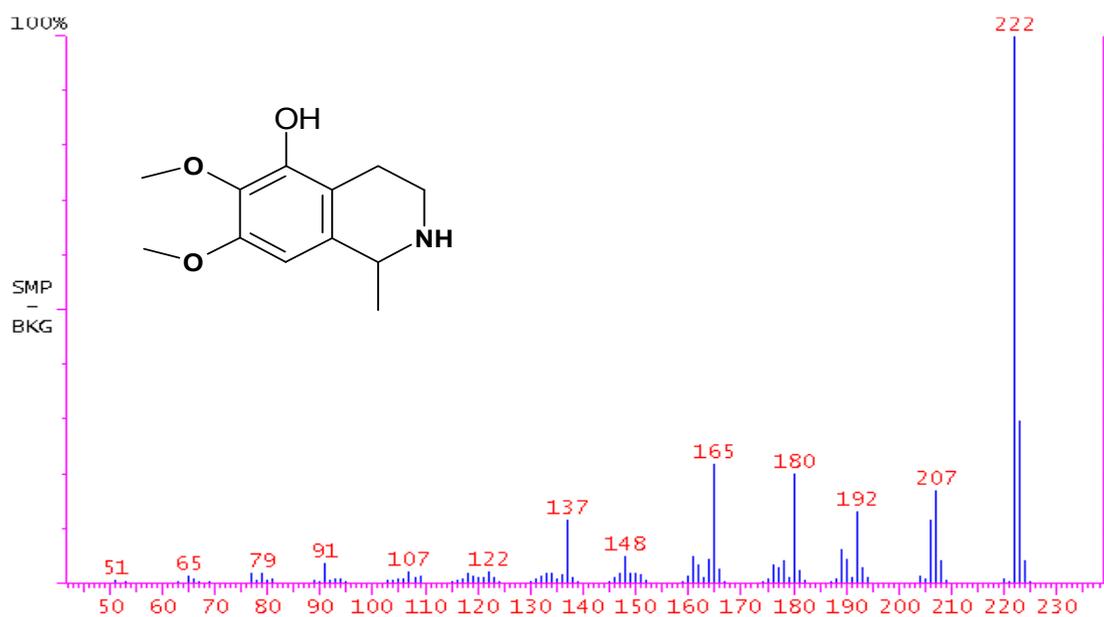


Figura 23. Espectro de masas en barrido completo de la 1-metil-5-hidroxi-6,7-dimetoxi-tetrahydroisoquinolina.

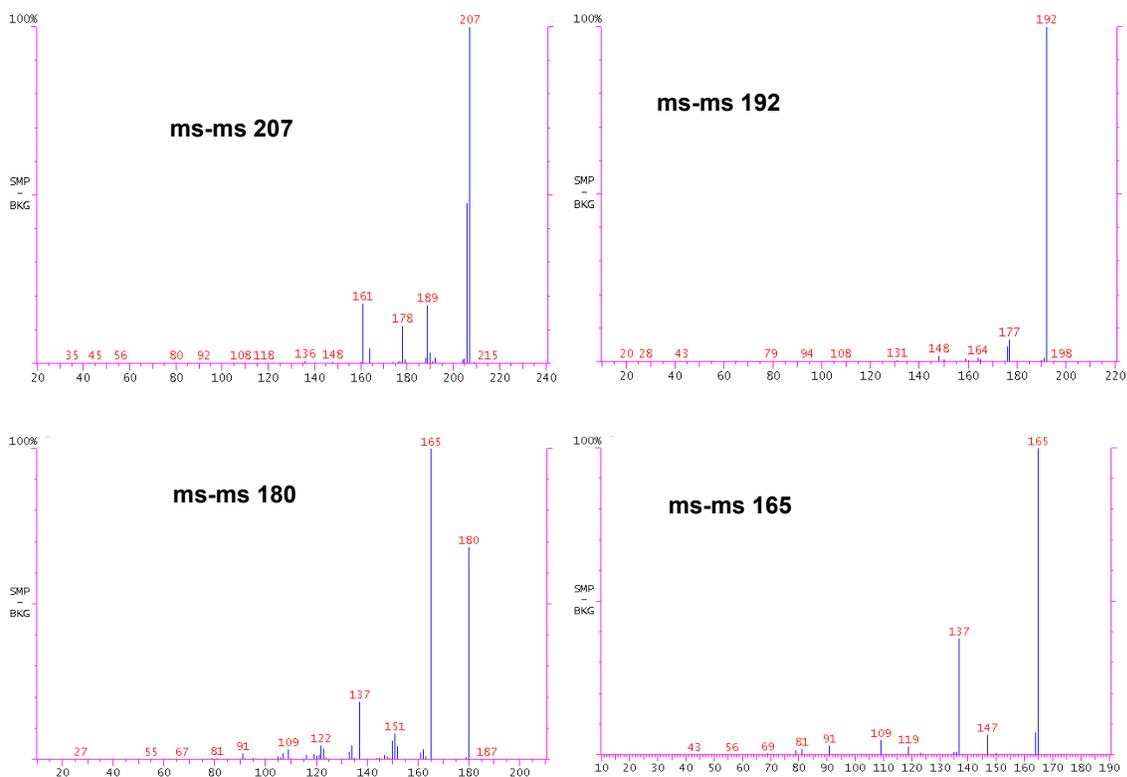


Figura 24. Análisis masas/masas de los iones m/z 207, 192, 180 y 165 de la 1-metil-5-hidroxi-6,7-dimetoxi-tetrahydroisoquinolina.

Dado lo anterior se propone el patrón de fragmentación que se muestra en la figura 25. Como ya se mencionó anteriormente el pico base a m/z 222 se produce de $M \pm 1$ el cual tiende a la eliminación del metilo en la posición C-1 de la tetrahydroisoquinolina y la conjugación con el anillo aromático para generar el ion a m/z 207; la estructura química del pico a m/z 207 se confirma a través de su fragmentación secundaria, en donde se observan dos rutas de fragmentación, la primera de ellas que se genera por la pérdida de OH (-17 uma) y su carbono base para generar el ión m/z 178, la segunda ruta se produce con la pérdida de una molécula de agua (18 uma), generando el ion a m/z 189 y confirma la presencia del oxidrilo sustituido sobre el anillo aromático.

Adicionalmente los espectros de masas/masas muestran que el ion a m/z 192 solo puede derivarse de la pérdida de el metoxilo directamente desde el ión molecular, la cual esta favorecida por el efecto inductivo que produce la posición *orto* del fenol y la posición *para* del anillo fusionado, estas sustituciones determinan una abundancia relativa elevada del pico a m/z 192. Por otro lado, la fragmentación secundaria de los iones a m/z 180 y 165 muestran la presencia a m/z 165, 161, 147 y 137 que se forman a partir del ión molecular como se muestra en la figura 24, la formación del ion a m/z 165 se observa por la pérdida del fragmento $\text{CH}_3\text{-CH-NHCH}_2$, la formación del ion a m/z 161 se da por la formación del ciclobutadieno del anillo, así como la pérdida del grupo oxidrilo de la posición C-5 de la tetrahydroisoquinolina. Así mismo, la formación del pico a m/z 165 se da por la pérdida de un metilo a partir del ion a m/z 180, para posteriormente perder el CO (28 uma) para formar el ion a m/z 137. Finalmente se produce el pico a m/z 147 a partir del ion a m/z 180 con la pérdida de H_2O .

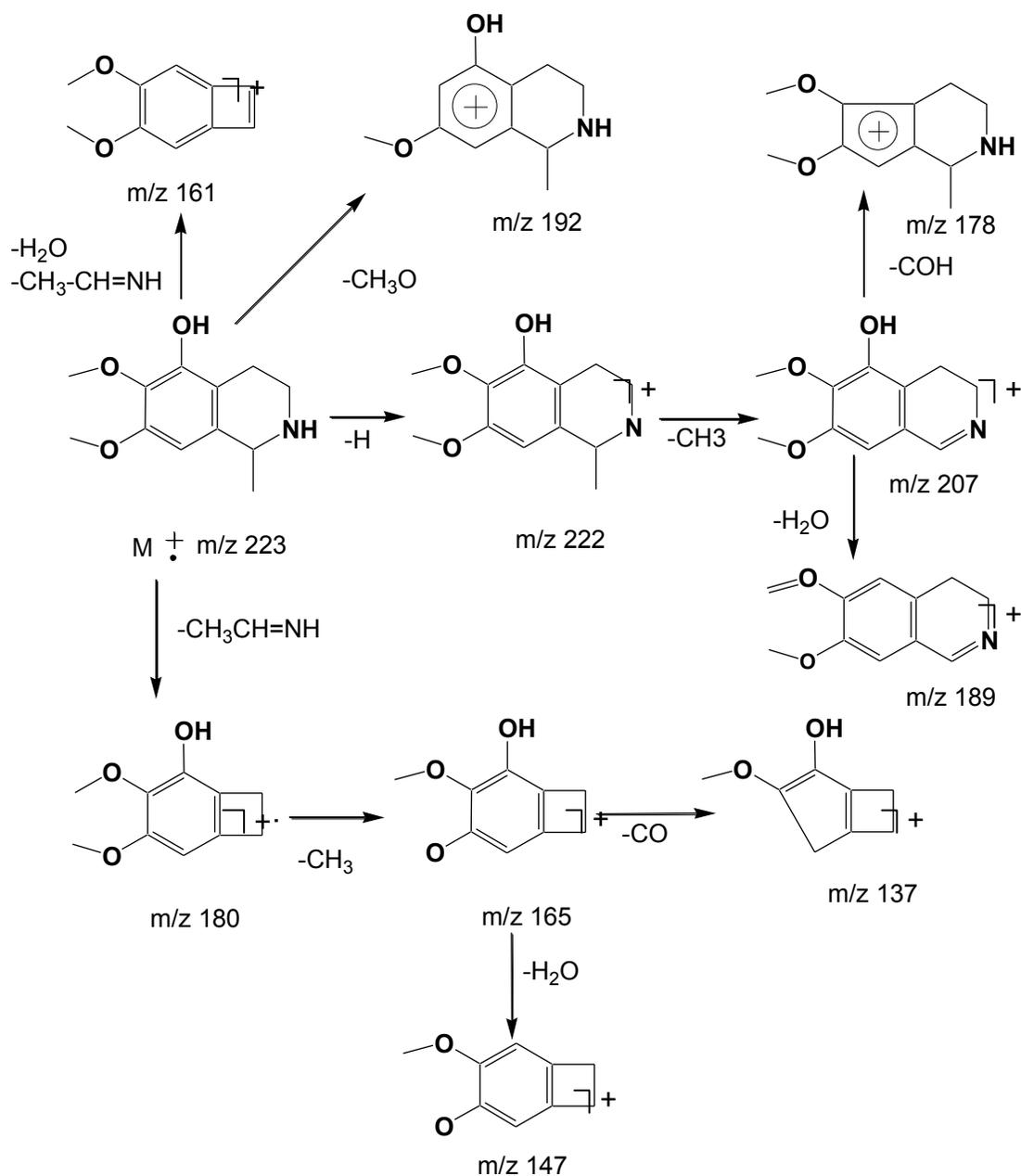


Figura 25. Patrón de fragmentación propuesto para la 1-metil-5-hidroxi-6,7-dimetoxi-tetrahydroisoquinolina.

Cabe mencionar que las posiciones de los metoxilos que se fragmentan no se pueden establecer inequívocamente a través de la inspección de patrón de masas en barrido completo, sin embargo, en este caso es posible suponer la posición del metilo a través de la fragmentación del ion a m/z 207 y las posiciones de los metoxilos se asumen con base a la activación inductiva que se produce por su posición relativa en el anillo aromático.

Para el caso de la tetrahydroisoquinolina anhalonidina, la cual es un isómero del compuesto anterior donde el hidroxilo se ubica en la posición C-5, el espectro de masas en barrido completo se muestra en la figura 26, en este se ven los mismos iones que el anterior, así mismo la fragmentación de masas/masas de los iones a m/z 207, 189, 165 y 148 que se observan en la figura 27, nos permiten establecer que la ruta de fragmentación de esta molécula, es muy similar, resaltando la diferencia de la ausencia del ion a m/z 192, esta ausencia puede ser explicada debido a que la posición de oxidrilo en el carbono C-8 inactiva la inducción de electrones para estabilizar la formación del catión a m/z 192, de esta manera la diferencia en la intensidad del ion a m/z 192 en la tetrahydroisoquinolina anterior contrasta con la ausencia de este ión en el alcaloide anhalonidina. La presencia de este compuesto ha sido reportada en las siguientes especies: *Lophophora williamsii* Lundström y Agurell, 1968²⁶; *Gymnocalycium albispinum*, *G. chubutense*, *G. gibbosum*, *G. monvielli*, *G. oenanthemum*, *G. quehlianum*, *G. stellatum*, *G. uebelmannianum*, Starha, Urbánková, Kuchyna, 1997⁵¹; *Turbinicarpus schmiedeckianus*, *T. schmiedeckianus* var. *schwarzii*, *T. lophophoroides*, *T. schmiedeckianus* var. *flaviflorus*, *T. pseudomacrochele* var. *krainzianus*, *T. schmiedeckianus* var. *Dickisoniae*, Stařtá, Chybidziurová, y Lacný, 1999⁴. Menachery y colaboradores en 1986.⁵⁶

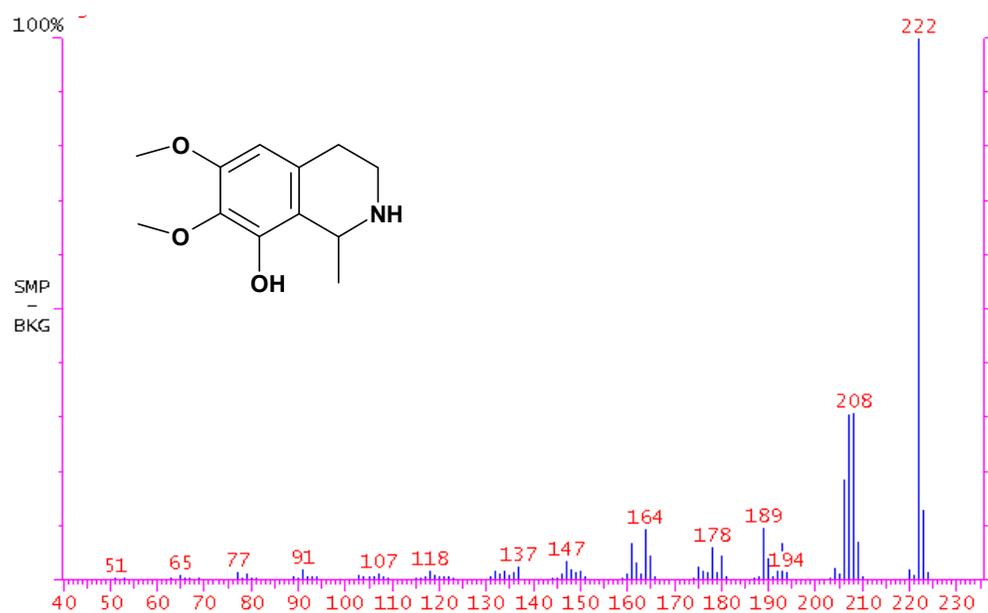


Figura 26. Espectro de masas en barrido completo de la tetrahydroisoquinolina anhalonidina

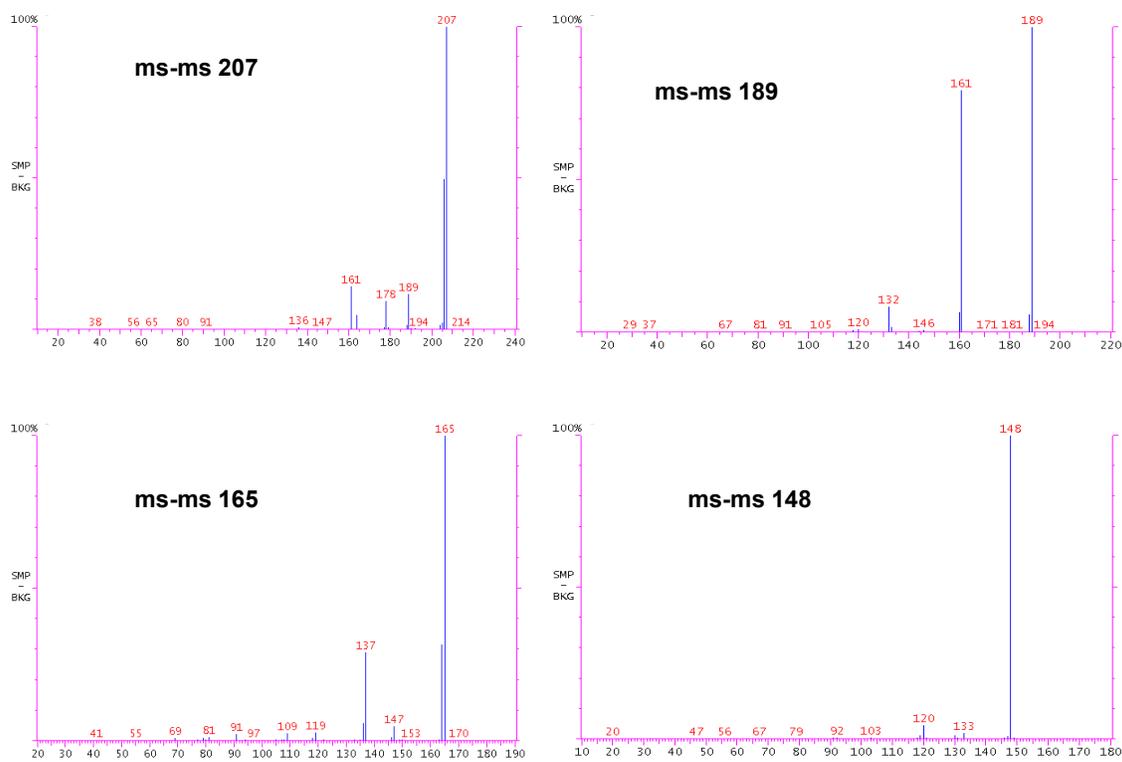


Figura 27. Análisis masas/masas de los iones m/z 207, 189, 165 y 148 de la tetrahydroisoquinolina anhalonidina

En la figura 28 se presenta el espectro de masas en barrido completo. En este espectro de masas no se observa el ion molecular M^+ a m/z 237, mientras que el pico base a m/z 222 se muestra por la pérdida del grupo metilo. La inestabilidad del ion molecular puede ser explicada por la estabilidad asociada al catión que se forma en las aminas trisustituídas, así mismo la tendencia natural del par electrónico del catión promueve la eliminación del metilo dando lugar al ion a m/z 207, el cual esta conjugado con el anillo aromático, cabe mencionar que se supone la resonancia del par electrónico del catión y no del par electrónico del nitrógeno debido a que este se encuentra en posición ortogonal respecto del anillo, por lo cual no podría llevar a cabo la eliminación del metilo en posición anti. A partir de la fragmentación de masas/masas de los iones más importantes de este compuesto a m/z 207, 192, 180 y 165 los cuales se muestran en la figura 29, se propone el compuesto gigantina. Este compuesto se reporta en *Carnegiea gigantea* por Menachery y colaboradores en 1986⁵⁶; Hodgkins, Brown y Massing, 1967⁴⁶ y por Bruhn, y Lundström, 1976²¹.

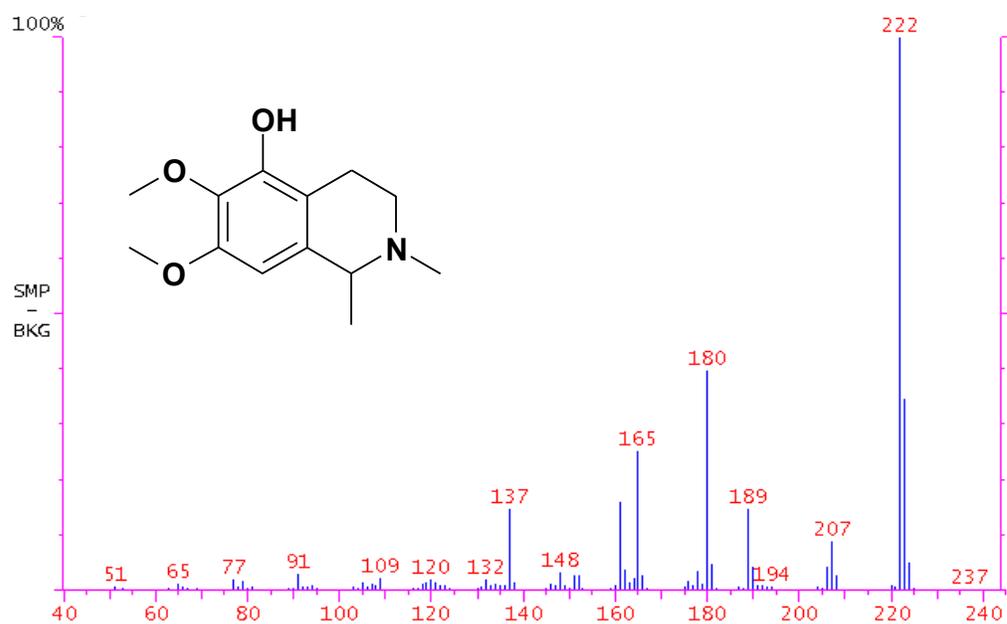


Figura 28. Espectro de masas en barrido completo de la tetrahidroisoquinolina gigantina

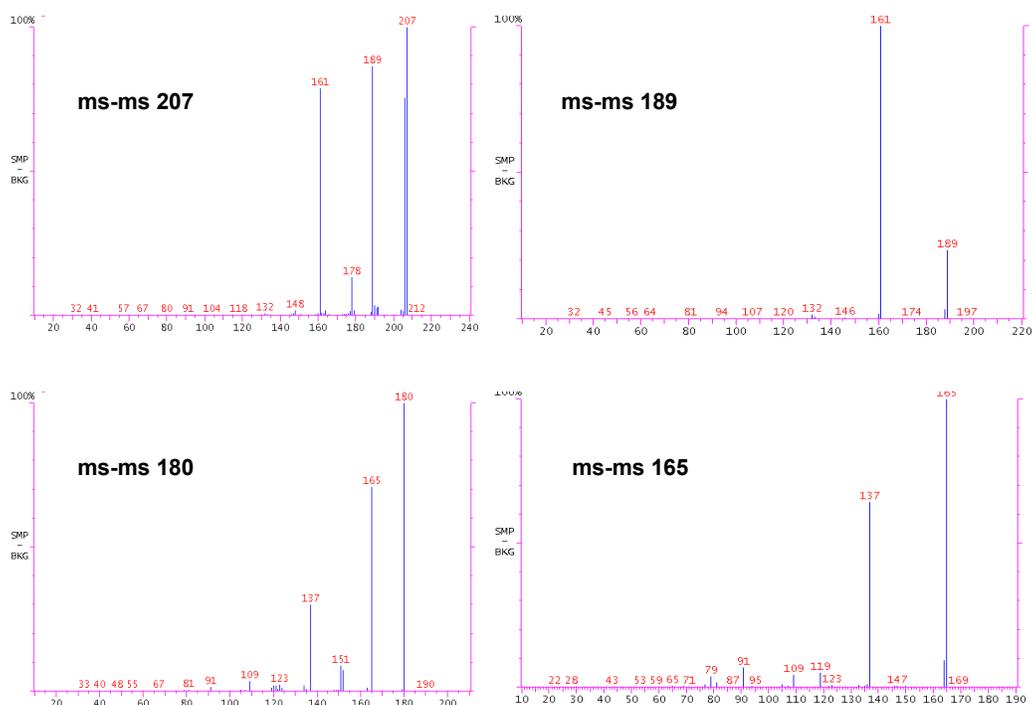


Figura 29. Análisis masas/masas de los iones m/z 207, 189, 165 y 148 de la tetrahydroisoquinolina gigantina

En la Figura 30 se presenta el espectro de masas en barrido completo. Se puede observar el ion molecular a m/z 209, y el pico base a m/z 208, el cual se origina por la pérdida de $M \pm 1$. Por otro lado, se observa el fragmento a m/z 193, el cual es producido por la pérdida del metilo en la posición C-6 de la tetrahydroisoquinolina $M \pm 1$. Así mismo, se observa el ion a m/z 180 que se origina por la pérdida de $NH=CH_2$ formando el ciclobutadieno fusionado al anillo aromático a partir del ion molecular $M \pm 1$ a m/z 209. Adicionalmente, se observa la pérdida de un metilo, el cual se encuentra en la posición C-6 de la tetrahydroisoquinolina dando el ion a m/z 165. A demás los iones a m/z 175 y 147 se forman a partir del ion a m/z 193 con la pérdida de H_2O y CO respectivamente. A partir de la fragmentación en masas/masas de los iones más importantes de este compuesto a m/z 193, 180, 175 y 165 que se ilustran en la figura 31, se propone para este compuesto a la anhalamina, misma que ha sido reportada por Lundström y Agurell, 1968²⁶ en *Lophophora williamsii*

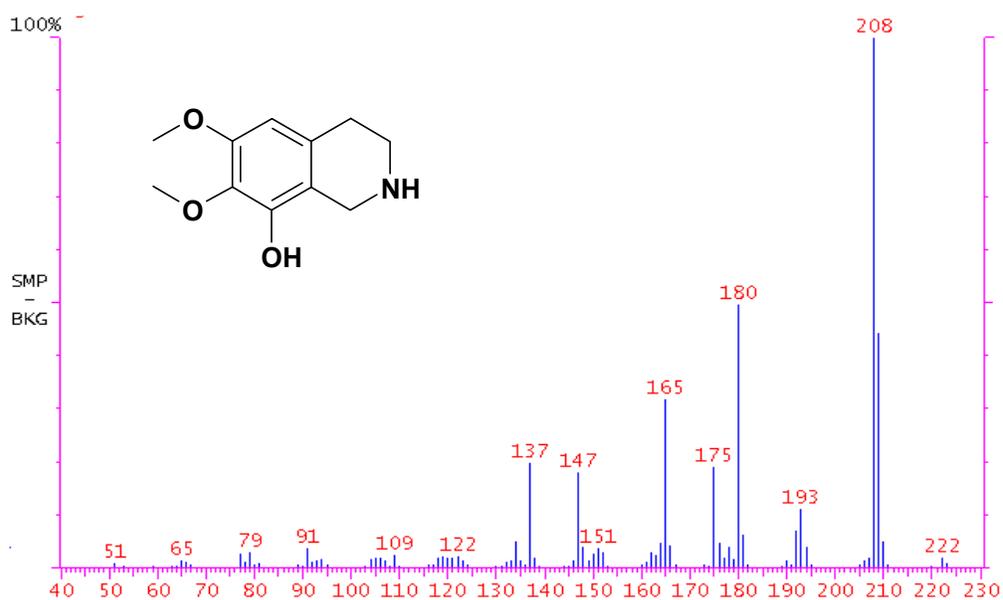


Figura 30. Espectro de masas en barrido completo de la tetrahidroisoquinolina anhalamina

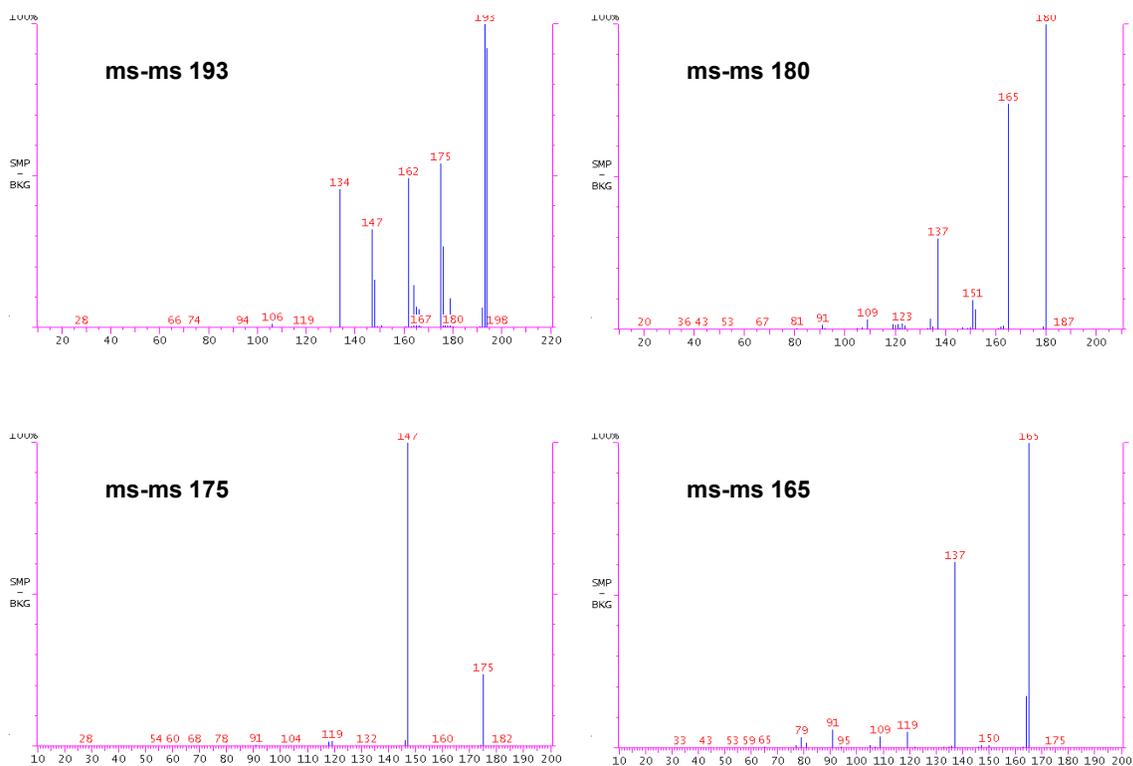


Figura 31. Análisis masas/masas de los iones m/z 207, 189, 165 y 148 de la tetrahidroisoquinolina anhalamina.

En la figura 32 se observa el espectro de masas en barrido completo, el cual presenta el ion molecular M^+ a m/z 223, el cual tiene una abundancia relativa pequeña. Adicionalmente, se puede reconocer el pico base a m/z 222, el cual se origina por la pérdida del hidrógeno del nitrógeno. A partir del estudio de fragmentación masas/masas realizado en los iones más abundantes en este compuesto a m/z 222, 207, 189 y 161 que se ilustran en la figura 33, se puede identificar la estructura de la isoanhalonidina, el cual fue encontrado en *Lophophora williamsii* por Lundström, en 1972²⁴.

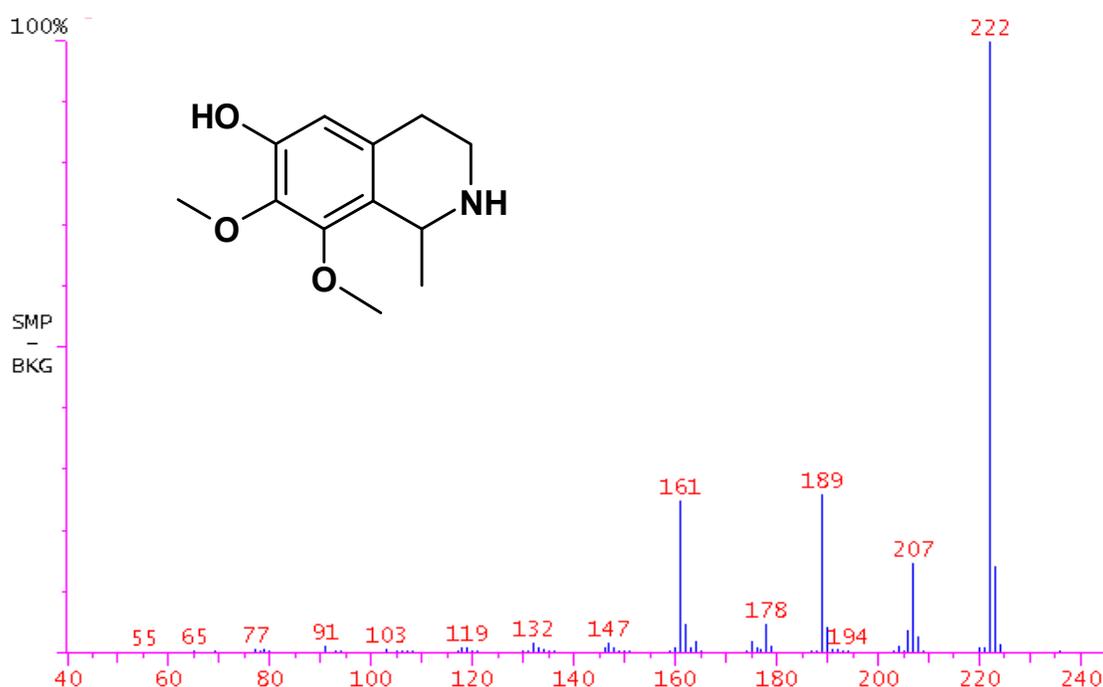


Figura 32. Espectro de masas en barrido completo de la tetrahidroisoquinolina isoanhalonidina

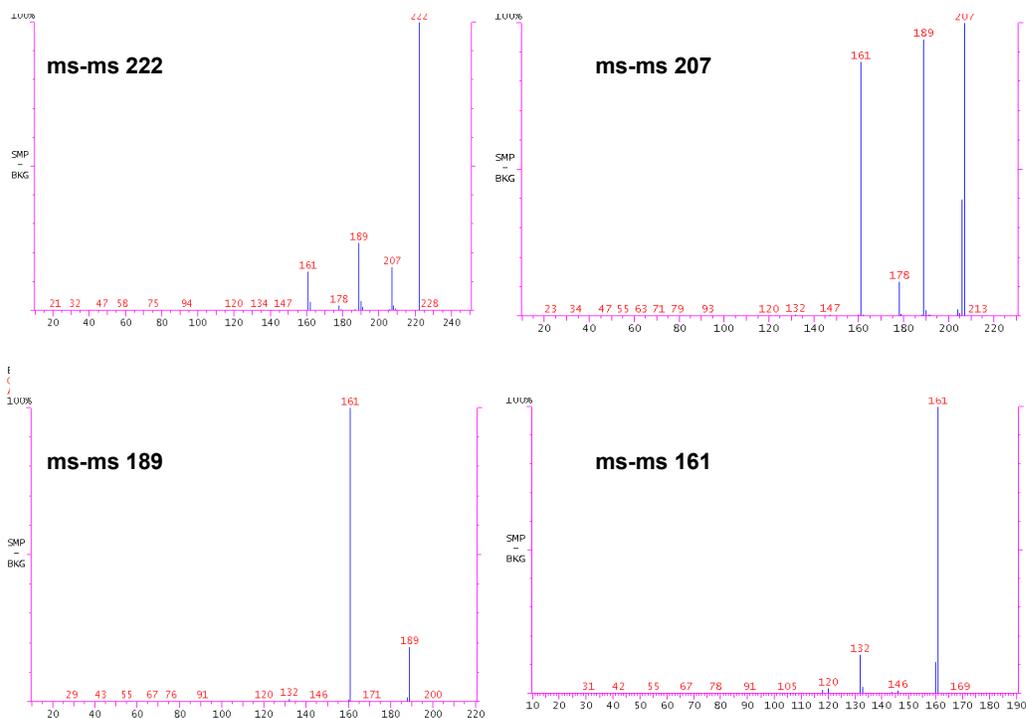


Figura 33 Análisis masas/masas de los iones m/z 222, 207, 189 y 161 de la tetrahydroisoquinolina isoanhalonidina.

En la figura 34 se observa el espectro de masas en barrido completo, el cual presenta el ion molecular M^+ a m/z 235, quien tiene una abundancia relativa pequeña debido a que pierde rápidamente el hidrogeno del carbono C-1 de la tetrahydroisoquinolina. Por otro lado, se puede observar el pico base a m/z 220, el cual se origina por la fragmentación del metilo sustituido en la posición C-1, en dicha posición se ve favorecida la ruptura debido a la estabilización del catión por la resonancia del par electrónico disponible en el heteroátomo. Así mismo, se observa la pérdida del grupo metilo de este fragmento, la cual se da en la posición C-2 de la tetrahydroisoquinolina formando un doble enlace entre el carbono 1 y el nitrógeno. Adicionalmente se observa en el espectro la presencia de una serie de iones que no tienen un origen lógico, a partir de los fragmentos a m/z 205 y 220 previamente descritos, dicha serie que se inicia con el pico a m/z 192, los cuales solo se pueden explicar a través de una transposición 1-4, la cual se favorece por

la estabilidad del carbocatión en la posición C-1, de esta forma se fragmenta la tetrahydroisoquinolina perdiendo 43 uma y generando el ciclobutano fusionado al anillo aromático como se muestra en el patrón de fragmentación. En este mismo sentido ocurre una serie de pérdidas de fragmentos a m/z 15 que corresponden a fragmentaciones de grupos metilo sucesivas del fragmento a m/z 192. Dado lo anterior el compuesto corresponde a la lofoforina. Este compuesto se reporta en *Lophophora williamsii* por Lundström y Agurell, en 1968²⁶; así como en *Gymnocalycium albispinum*, *G. chubutense*, *G. gibbosum*, *G. monvielli*, *G. oenanthemum*, *G. quehlianum*, *G. stellatum*, *G. uebelmannianum* reportadas por Starhá, Urbánková, Kuchyna, 1997⁵¹.

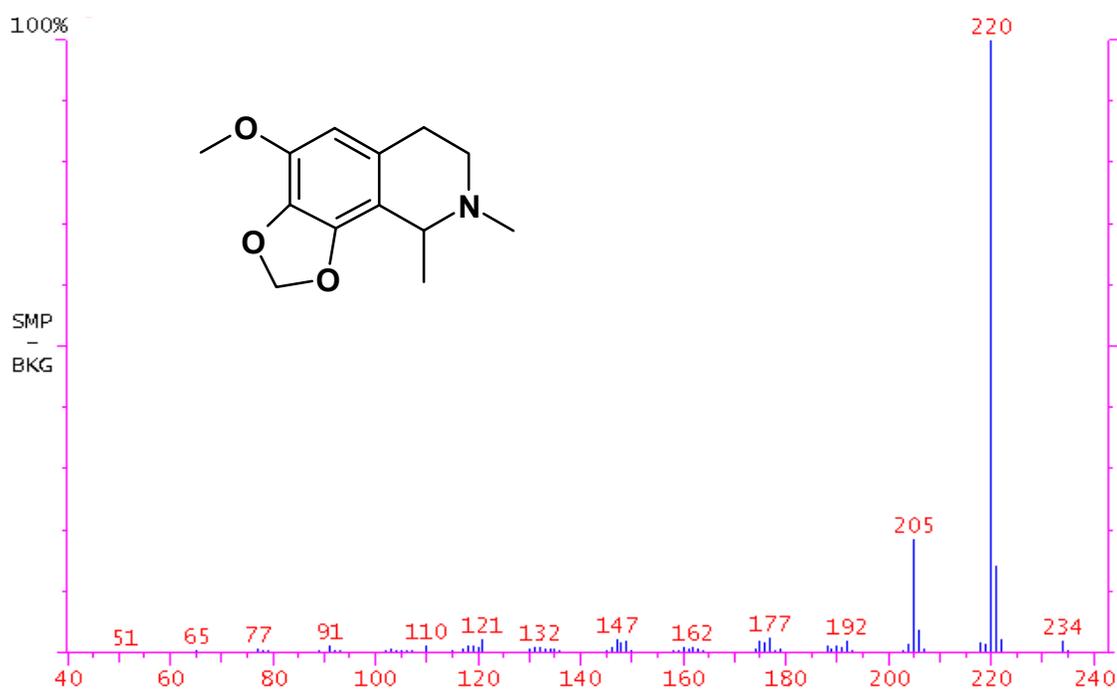


Figura 34. Espectro de masas en barrido completo de la tetrahydroisoquinolina lofoforina

En la figura 35 se puede observar el espectro de masas en barrido completo, este tiene el ion molecular M^+ a m/z 235. Así mismo, se observa que el pico base a m/z

219 el cual se origina por la pérdida heterolítica del *N*-metilo, generando un catión que se estabiliza a través de la deshidrogenación del carbono terciario en C-1, la conjugación del enlace con el anillo aromático fusionado confiere estabilidad al fragmento y por tanto su abundancia relativa es tan elevada. La fragmentación secundaria de los iones a *m/z* 219 y 204, los cuales se pueden observar en la figura 36. De tal forma que la inspección de los espectros de fragmentación secundaria de los iones, se confirma que a *m/z* 219 se fragmenta para producir los fragmentos a *m/z* 204 y 188 que corresponden a la pérdida del metilo y metoxilo respectivamente. Adicionalmente se sugiere que el fragmento a *m/z* 204 genera el fragmento a *m/z* 174, a través de un intermediario, el cual se hidroliza parcialmente el acetal formado por los fenoles adyacentes en las posiciones C-6 y C-7 de el compuesto, así mismo, el intermediario sufre un equilibrio en sus isómeros ceto-enólicos a partir de los cuales, en la forma de quinona pueden fragmentarse para producir el ion a *m/z* 174. De la información anterior se asignó al compuesto como la iso-lofoforina el cual se ha reportado por Menachery y colaboradores en 1986.⁵⁶

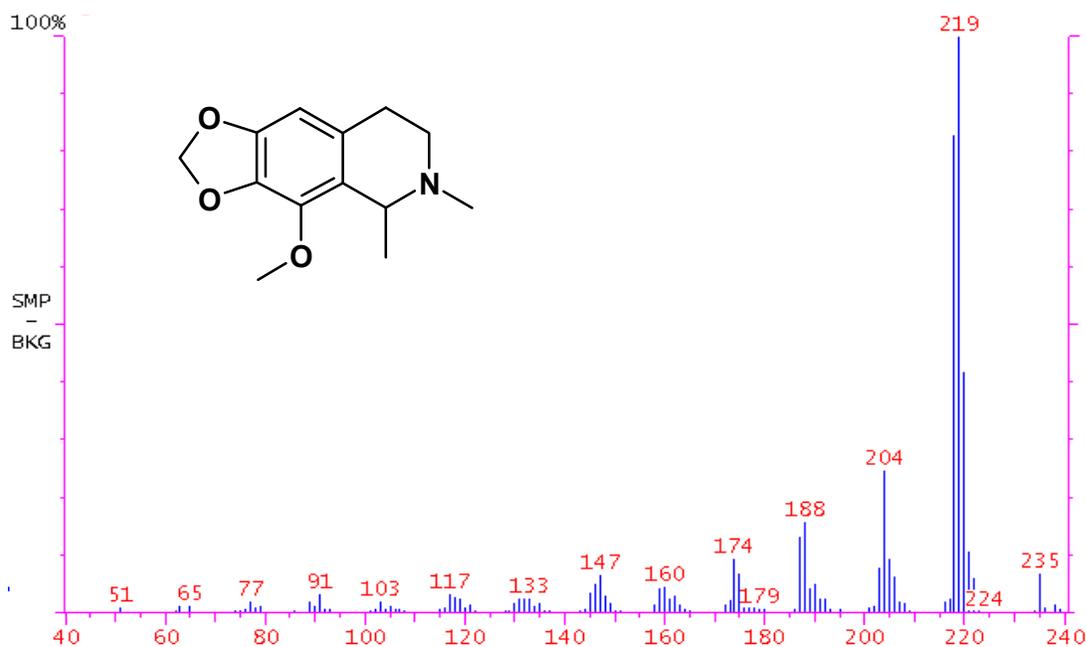


Figura 35. Espectro de masas en barrido completo de la tetrahydroisoquinolina iso-lofoforina

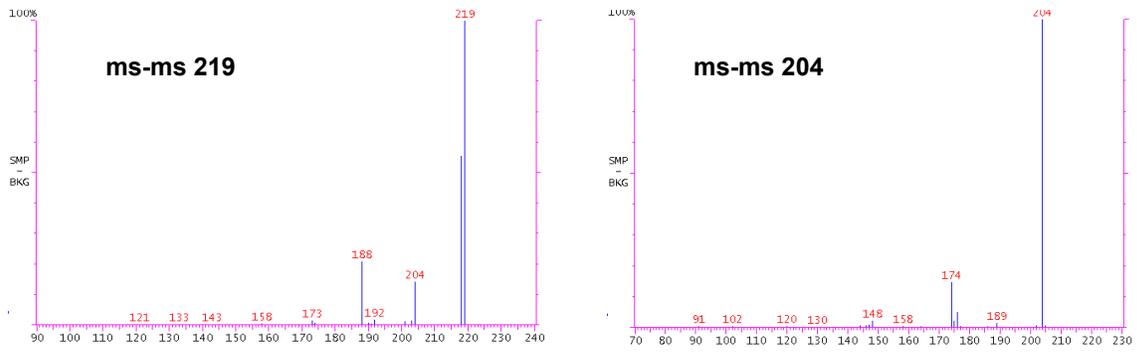


Figura 36 Análisis masas/masas de los iones m/z 219 y 204 de la tetrahydroisoquinolina iso-lofoforina.

8.2 ALCALOIDES DE *Carnegiea gigantea*

Para el estudio de los alcaloides de *Carnegiea gigantea* se partió de un extracto realizado como se describe en la metodología. Obteniendo 0.2359 g de extracto alcaloideo que corresponde a un 0.1573 %, y en el estudio realizado por Bruhn y Lundströmn 1976 reportan 0.6 % de alcaloides en peso fresco²¹, y en el trabajo de Ordaz *et al.*, reporta 3.086 % de fracción alcaloidea en tejido fresco.²⁰ La Figura 37A muestra el cromatograma correspondiente a esta muestra y en la Figura 37B se muestra una ampliación de la región donde se encuentran los alcaloides esperados, en estos cromatogramas se puede observar que se presentan 9 picos correspondientes a alcaloides del tipo tetrahydroisoquinolinas. En general se observa que la tetrahydroisoquinolina más abundante es la carnegina, mientras que, la menos abundante es la weberina.

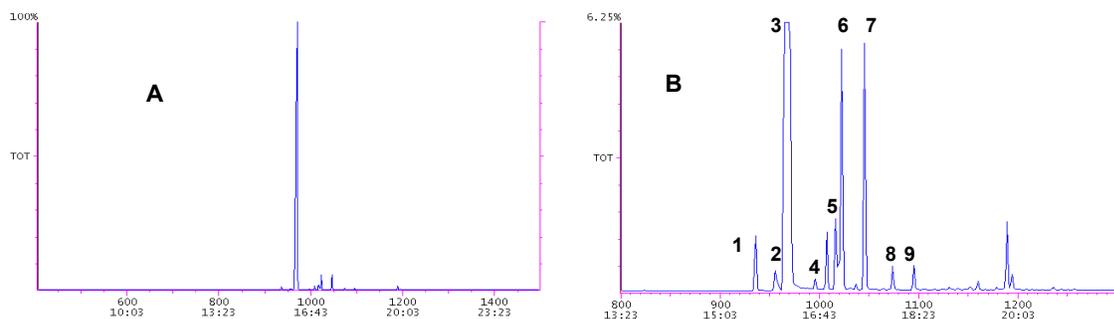


Figura 37- Cromatograma del extracto de alcaloides de *Carnegiea gigantea*. **A**, Cromatograma completo; **B**, ampliación de la región de alcaloides; Tetrahydroisoquinolinas.

En el Cuadro 2 se indica la asignación de los alcaloides correspondientes a cada pico del cromatograma, así como la cantidad expresada en microgramos por gramo de tejido fresco de cada uno de ellos. Se puede observar que los tiempos de retención de las tetrahydroisoquinolinas son entre los 15 y 19 minutos. La carnegina que es el alcaloide con mayor abundancia, encontrando 1441.8936 µg/g

mientras que la weberina, salsolidina, isopellotina, y pellotina, presentan las menores abundancias con 2.1571, 4.8517, 4.6652 y 5.2962 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

Cuadro 2. Tiempos de retención y alcaloides presentes en el extracto de *Carnegiea gigantea*.

T. R. (min)	Tipo de alcaloide	Nombre	$\mu\text{g/g}$
15:39	Tetrahydroisoquinolina	iso-salsolidina	11.3767
15:59	Tetrahydroisoquinolina	salsolidina	4.8517
16:13	Tetrahydroisoquinolina	carnegina	1441.8936
16:39	Tetrahydroisoquinolina	weberina	2.1571
17:00	Tetrahydroisoquinolina	gigantina	12.2551
17:06	Tetrahydroisoquinolina	o-metilpellotina	39.3805
17:29	Tetrahydroisoquinolina	isoanhalonidina	50.7905
17:57	Tetrahydroisoquinolina	isopellotina	4.6652
18:18	Tetrahydroisoquinolina	pellotina	5.2962

T.R.= Tiempo de retención (minutos).

$\mu\text{g/g}$ =microgramos por gramo de tejido fresco

La identificación de los alcaloides fue realizada mediante la comparación de los espectros obtenidos en barrido completo con la biblioteca NIST, como se describe en el apartado de materiales y métodos.

A continuación se presentan los patrones de fragmentación en barrido completo, y en algunos casos mediante la fragmentación secundaria de los iones más abundantes.

En la figura 38 se observa el espectro de masas en barrido completo. Como se puede ver en el espectro de masas, se reconoce el ion molecular M^+ a m/z 207, el cual corresponde con el de la fórmula molecular $C_{12}H_{17}NO_2$. Así mismo se observa el pico base a m/z 206 y el ion a m/z 164 como uno de los más abundantes. Para el análisis de masas/masas se seleccionaron los fragmentos a m/z 206, 192, 164 y 149, las fragmentaciones secundarias de estos iones se presentan en la figura 39.

De acuerdo a la inspección de los espectros de masas se asignó al compuesto como la iso-salsolidina, el cual previamente se ha identificado en las partes aéreas de *Hammada articulata* ss. *scoparia*, en un estudio con resonancia magnética nuclear de protones por Benkrief, y colaboradores, 1990.⁴⁵

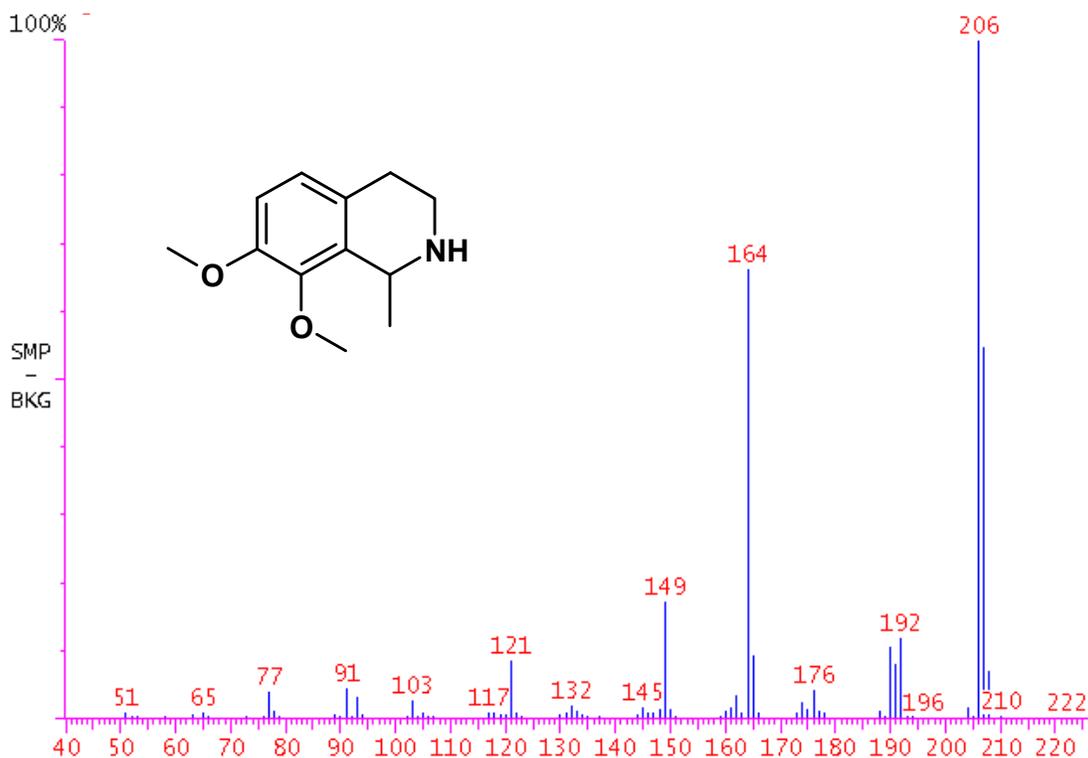


Figura 38. Espectro de masas en barrido completo de iso-salsolidina

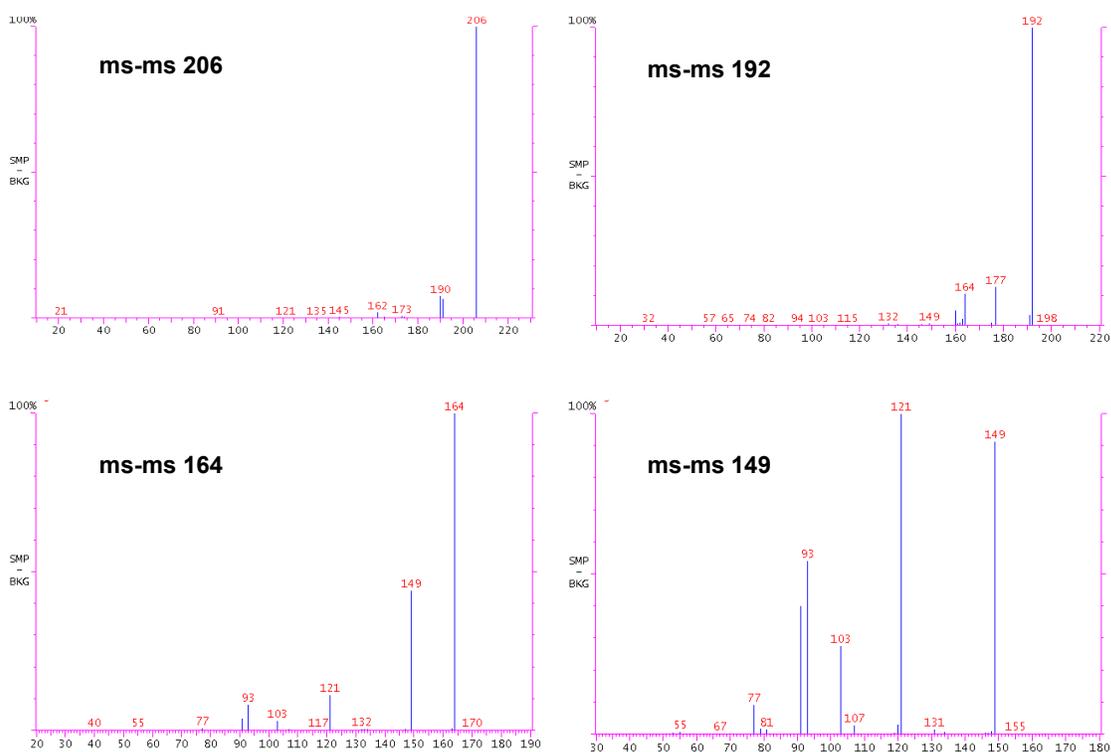


Figura 39. Análisis masas/masas de los iones m/z 206, 192, 164 y 149 de la iso-salsolidina.

A partir de la información obtenida de los espectros anteriores y de acuerdo con la fragmentación en masas/masas de los iones más importantes de este compuesto a m/z 206, 192, 164 y 149 (figura 39), se propone el patrón de fragmentación que se muestra en la figura 40. Como ya se mencionó anteriormente el pico base a m/z 206 se produce de $M \pm 1$. Por otro lado, a partir del ion molecular M^+ a m/z 207, ocurre la pérdida de 31 umas que corresponde al metoxilo en la posición C-8 de la tetrahydroisoquinolina originando un fragmento a m/z 176, este ión solo se puede originar a partir del ión molecular, ya que al realizar la fragmentación secundaria no existe la presencia de este. La estructura propuesta para el compuesto del pico a m/z 207 se confirma a través de su fragmentación secundaria en donde se observa que el ión generado a m/z 192 se genera por la pérdida del metilo en la posición C-8 de la tetrahydroisoquinolina. Adicionalmente, este sufre la pérdida del segundo metilo y esto origina el pico a m/z 177, además

el fragmento a m/z 192 posteriormente presenta una descarboxilación (CO), lo que origina el ion a m/z 164, y de este último se origina el un fragmento a m/z 149 por la pérdida del segundo metilo del metoxilo, el cual finalmente pierde monóxido de carbono para originar el ion a m/z 121.

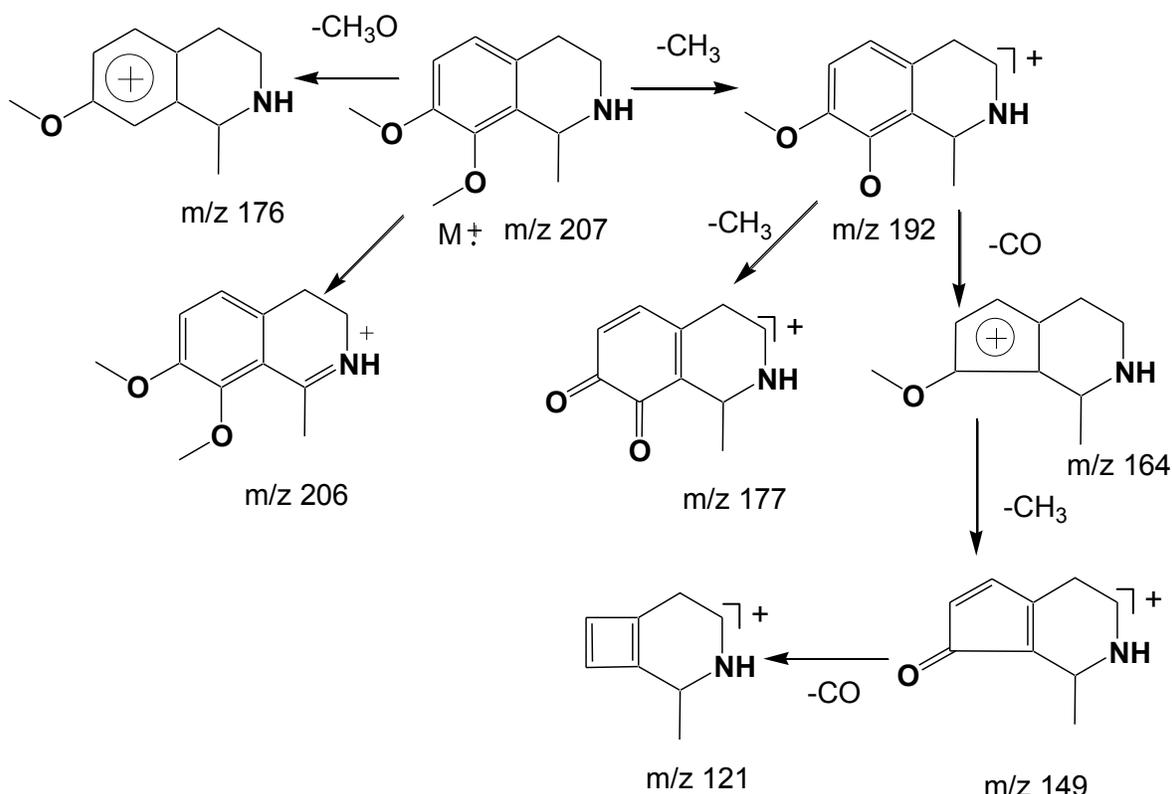


Figura 40. Patrón de fragmentación propuesto para la iso-salsolidina.

En el mismo extracto obtenido de *Carnegieia gigantea* se detectó la presencia del alcaloide salsolidina, el cual es isómero estructural del previamente descrito isosalsolidina, ambos se diferencian en la posición del metoxilo siendo C-8 para isosalsolidina y en el C-6 para salsolidina. La diferencia en la sustitución del metoxilo representa un efecto electroinductor significativo sobre el carbono

bencílico de la posición C-1, la cual se refleja en la menor abundancia relativa del ion a m/z 206 de la salsolidina. Con respecto a la interpretación del espectro de barrido completo (figura 41) que permite identificar a la salsolidina y la confirmación de esta estructura a través de los experimentos de fragmentación secundaria se puede mencionar que el espectro presenta M^+ a m/z 207, el cual corresponde al peso molecular de la salsolidina. El ión molecular produce el fragmento a m/z 206 a través de la eliminación del hidrogeno sustituido en el carbono C-1, esta eliminación se favorece por el carácter estable del carbocatión terciario que se produce, adicionalmente es estabilizado por el efecto electroinductor que se genera por el anillo aromático sustituido con los dos metoxilos.

Por otro lado se observa el pico base a m/z 192, el cual se produce por la pérdida del metilo del metoxilo en la posición C-6, y posteriormente la escisión del oxígeno para formar el fragmento a m/z 176. Por otro lado, se genera la ortoquinona a m/z 177, a través de la fragmentación del metilo restante, este fragmento provoca un fuerte efecto electroatractor sobre el anillo fusionado, lo cual induce la ruptura homolítica del fragmento a m/z 29 para producir el ciclobutano fusionado. Las fragmentaciones del pico base y del ion a m/z 177 se confirmaron a través de la inspección de los espectros de masas/masas correspondientes a m/z 192, 176 y 160 los cuales se presentan en la figura 42.

Este compuesto se ha reportado en numerosas especies entre ellas tenemos a: *Carnegiea gigantea* por Bruhn, *et al.*, 1970²²; Bruhn y Lundström 1976²¹; Pugmmara *et al.*, 1981⁶² y Ordaz *et al.*, 1983²⁰. En *Desmodium tiliaefolium* por Ghosal, y Srivastava 1973¹⁶. En *Haloxylon articulatum* por El-Seedi y colaboradores en 2005⁶⁴. Y finalmente ha sido reportada en las partes aéreas de *Hammada articulata*, por Benkrief y colaboradores en 1990⁴⁵.

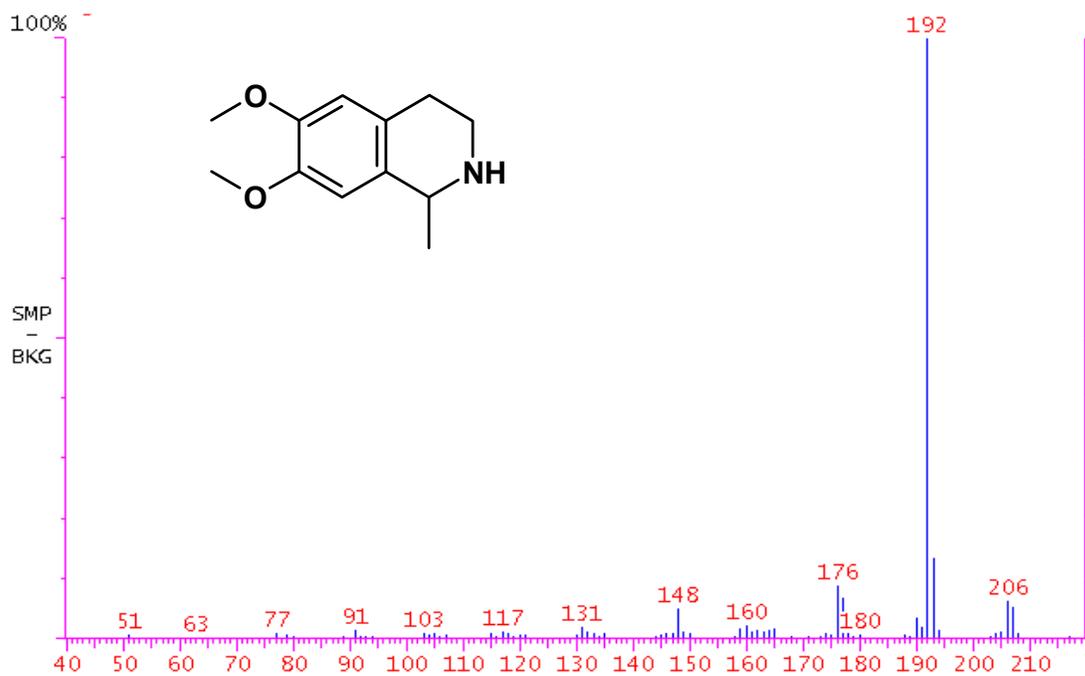


Figura 41. Espectro de masas en barrido completo de la salsolidina.

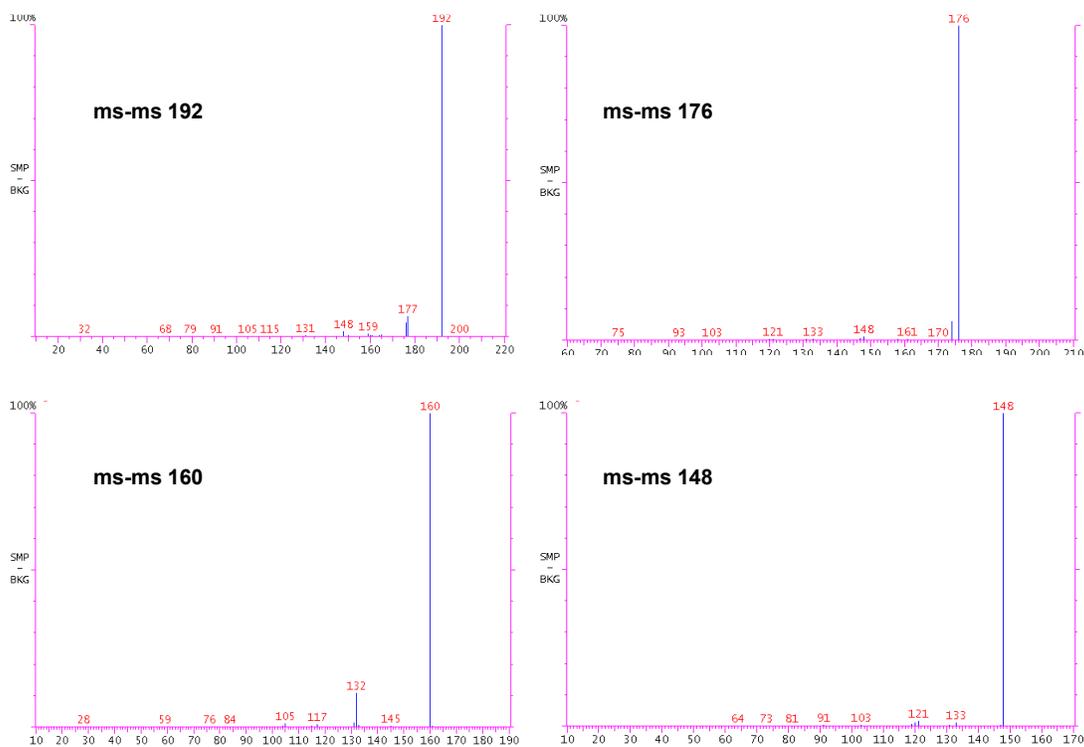


Figura 42 Análisis masas/masas de los iones m/z 192, 176, 160 y 148 de la salsolidina.

En la figura 43 podemos observar el espectro de masas de la carnegina, el cual fue identificado a través de la inspección de los espectros de fragmentación secundaria de los iones a m/z 206 y 190 que se muestran en la figura 44. El alcaloide carnegina tiene un ion molecular M^+ a m/z 221, el cual no se registra en el espectro de barrido completo, debido a que la molécula pierde rápidamente el hidrogeno sustituido en el carbono C-1, esta pérdida se ve favorecida por el carácter estable del carbocatión resultante y por el fuerte efecto electroinductor que producen los metoxilos sustituidos en las posiciones C-7 y C-8.

Por otro lado, la carnegina produce un fragmento a m/z 206 como pico base a través de la pérdida del metilo del metoxilo en la posición C-6, el cual se fragmenta produciendo los iones a m/z 178 y 191 a través de la pérdida de monóxido de carbono y del metilo en la posición C-1 respectivamente, dichas fragmentaciones se pueden confirmar en la fragmentación secundaria del ion a m/z 206, adicionalmente la fragmentación de este muestra la presencia a m/z 145, el cual ya no está presente en el espectro a m/z 190, lo cual puede ser explicable a través de la ruptura homolítica de ambos metilos para generar el bencino correspondiente. Posteriormente el fragmento a m/z 191 pierde la masa a m/z 29 de la ruptura homolítica del nitrógeno y su metilo sustituido. Este compuesto se reporta en *Carnegiea gigantea* por Bruhn y Lundström, 1976²¹; Ordaz *et al.*, 1983²⁰; así como en la especie *Hammada articulata* ss. *Scoparia* por Benkrief *et al.*, 1990⁴⁵.

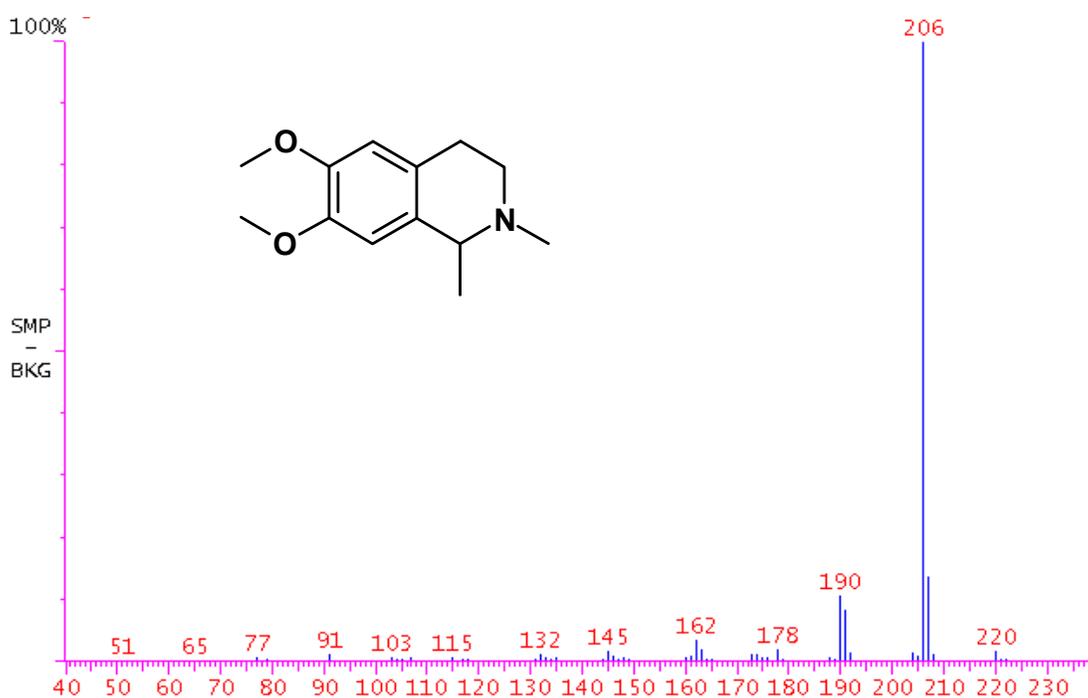


Figura 43. Espectro de masas en barrido completo de la carnegina.

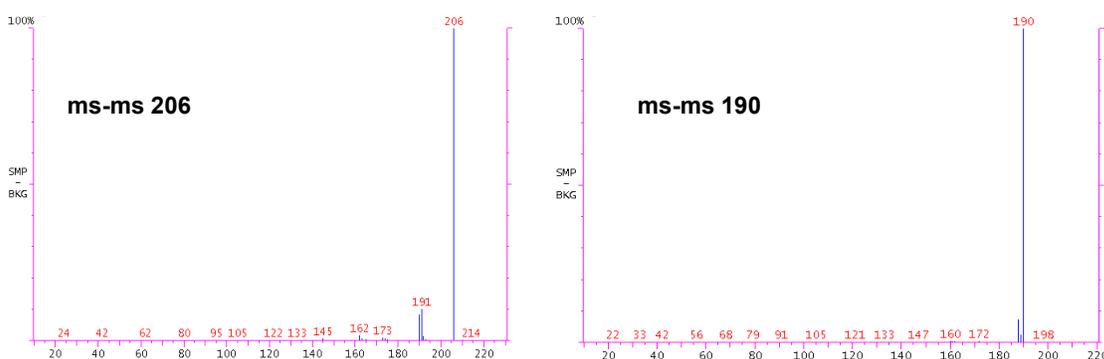


Figura 44. Análisis masas/masas de los iones m/z 206 y 190 de la carnegina.

Por otro lado en la figura 45 podemos observar el espectro de masas de la weberina, la cual fue identificada a través de la inspección de los patrones de fragmentación secundaria de los iones a m/z 222 y 206 que se muestran en la

figura 46. El alcaloide identificado como weberina tiene un ion molecular M^+ a m/z 253 el cual no se registra en el espectro de barrido completo, debido a que la molécula pierde el hidrogeno sustituido en el nitrógeno de la tetrahidroisoquinolina, originando el ion a m/z 252. Adicionalmente, a partir del ion molecular a m/z 253 ocurre una pérdida de un grupo metoxilo de la posición C-7 originando el fragmento a m/z 222. En el espectro de masas observado para la weberina se encontró como pico base el ión a m/z 236, que se origina a través de la pérdida del metilo del metoxilo en la posición C-6, el cual se fragmenta produciendo los picos a m/z 194 y 162 a través de la pérdida de $N-CH_2-CH_2$ y de los fragmentos CO , CH_3O y CH_3 , sustituidos en la tetrahidroisoquinolina, respectivamente. De la fragmentación secundaria se puede establecer la formación de los iones a m/z 207 y 179 a partir de m/z 222, así mismo, se puede confirmar en la fragmentación secundaria del fragmento m/z 206, la presencia del ión m/z 162 por la pérdida de hidrógeno, monóxido de carbono y de un grupo metilo, este compuesto ha sido reportado previamente por Mata y MaLaughlin, en *Pachycereus weberi* en el año 1980⁴⁸ y por Menachery en 1986.⁵⁶

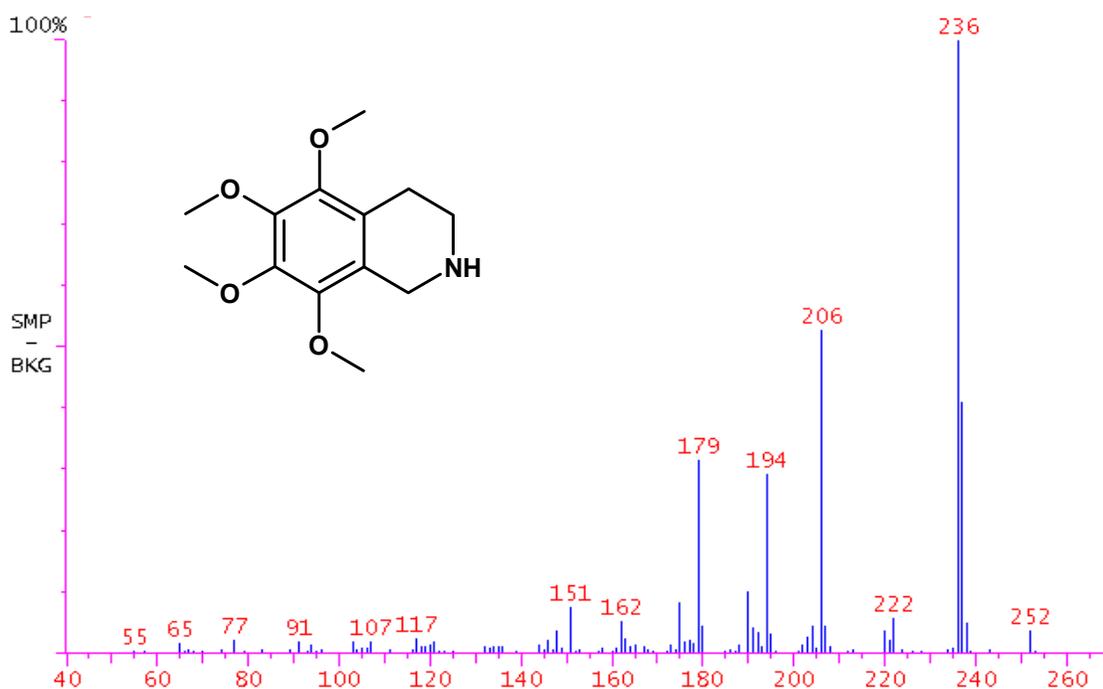


Figura 45. Espectro de masas en barrido completo de la weberina.

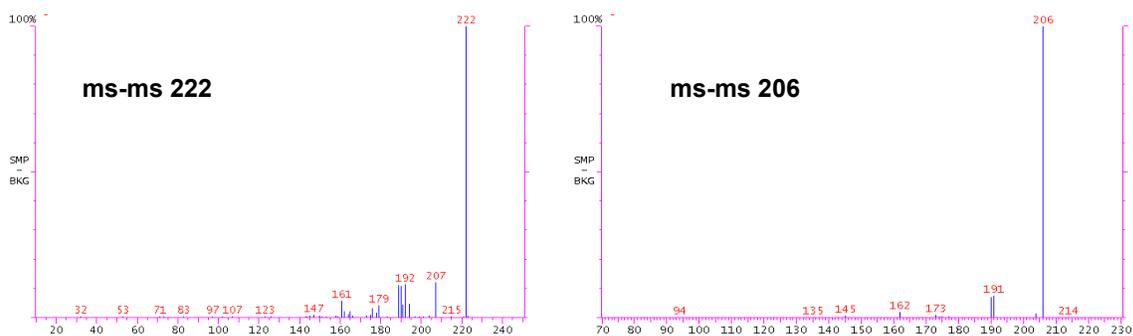


Figura 46. Análisis masas/masas de los iones m/z 222 y 206 de la weberina.

En la figura 47, se puede observar el espectro de masas en barrido completo de la tetrahydroisoquinolina gigantina con el ion molecular M^+ a m/z 237, el cual no se observa, y con una abundancia relativa pequeña se observa el ion molecular menos uno a m/z 236, el cual se produce a partir de la eliminación nucleofílica del hidrogeno en la posición C-1, esta reacción se ve favorecida por la presencia del par electrónico libre del nitrógeno, así mismo, se registra el fragmento a m/z 222 que se genera por la eliminación del metilo en la posición C-1, probablemente esta reacción se lleva a cabo a través de una ruptura homolítica, en ambos casos, la formación de los iones a m/z 236 y m/z 222 se ve favorecida por la conjugación del doble enlace con el sistema aromático de benceno fusionado. Por otro lado, mediante la inspección de la fragmentación secundaria de los iones a m/z 222 y 207, los cuales se muestran en la figura 48, se observa que la fragmentación del ion a m/z 222, presenta la ruptura del metilo metoxílico en la posición C-7 y se genera el ion a m/z 207, el cual a su vez genera a m/z 189 y 178 mediante la deshidratación y la pérdida de el alcohol con su carbono base respectivamente. Finalmente, el ion a m/z 161 se produce por la eliminación de un fragmento oxidrilo en la posición C-7, este alcaloide ha sido reportado por Hodgkins y colaboradores en 1967⁴⁶, y por Bruhn y Lundstróm, 1976²¹ en *Carnegiea gigantea*.

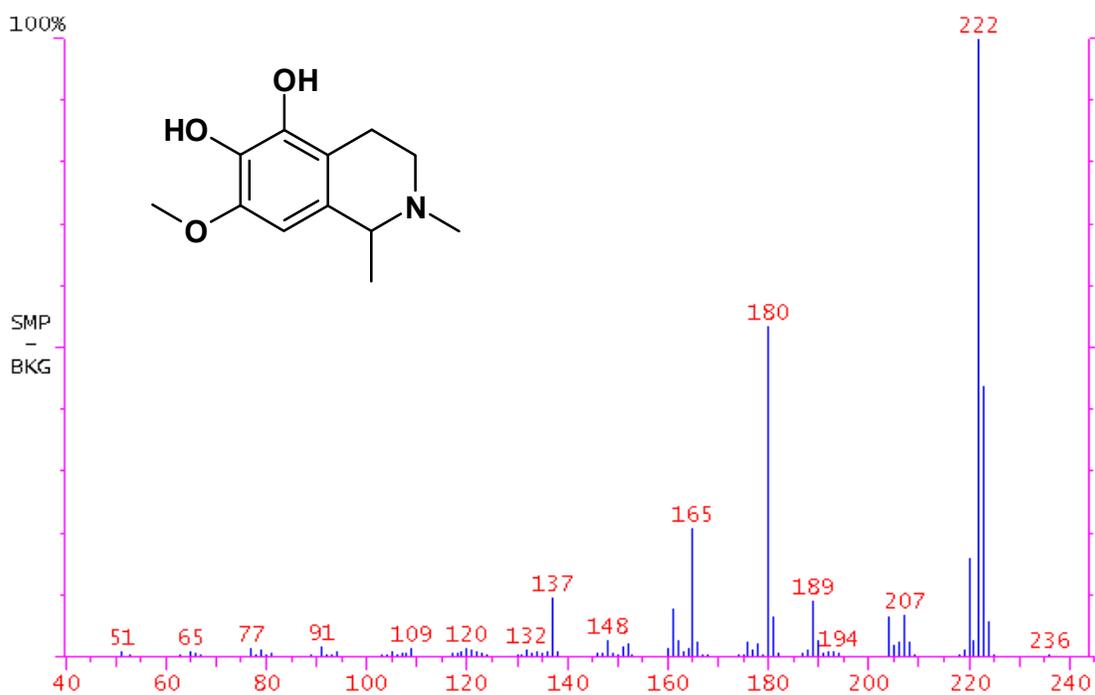


Figura 47. Espectro de masas en barrido completo de la gigantina.

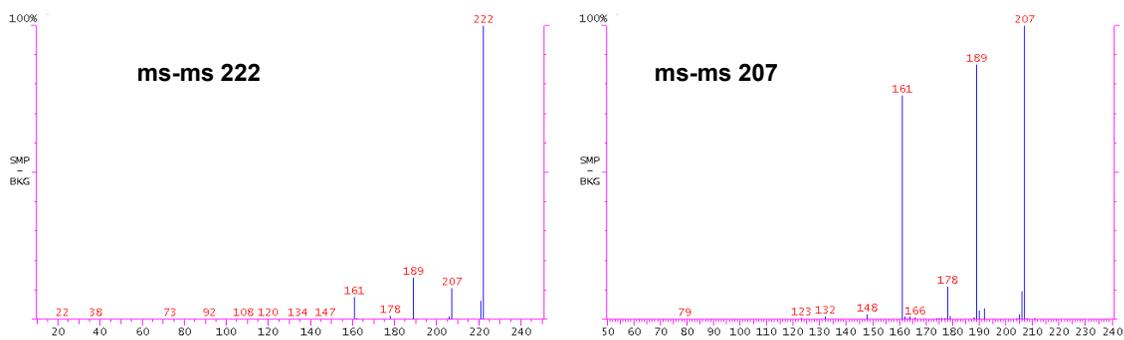


Figura 48. Análisis masas/masas de los iones m/z 222 y 207 de la gigantina.

En la figura 49 se muestra el espectro de masas en barrido completo, para el alcaloide identificado como O-metilpeltotina. Este alcaloide presenta el ion molecular M^+ a m/z 251, el cual pierde un hidrogeno en la posición C-1 para originar el fragmento a m/z 250. Posteriormente se pierde el metoxilo de la posición C-6 en el metilo o el grupo funcional completo para generar los fragmentos a m/z 236 y 220 respectivamente. Adicionalmente, el ion a m/z 236 puede isomerizarse a través de un mecanismo de transposición 1-5 de un hidrogeno del metoxilo de la posición C-7 para así perder 30 uma, lo que lleva a formar el ion a m/z 206. Este por las fragmentaciones de metoxilo y de ruptura homolítica del anillo aromático genera los fragmentos a m/z 175 y 165. Cabe mencionar que en este compuesto la fragmentación secundaria a m/z 206 y 192 que se presentan en la figura 50 no contribuyen con información de la estructura química del alcaloide. Este alcaloide se ha reportado por Atta-ur-Rahman, 1994.⁵⁷

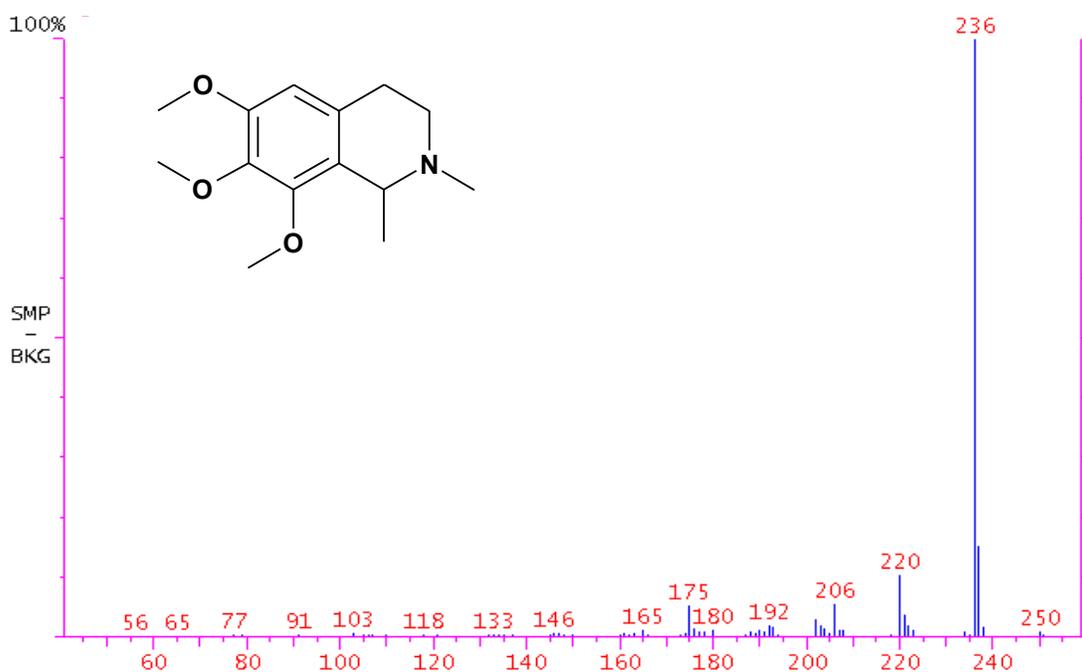


Figura 49. Espectro de masas en barrido completo de la *o*-metilpeltotina.

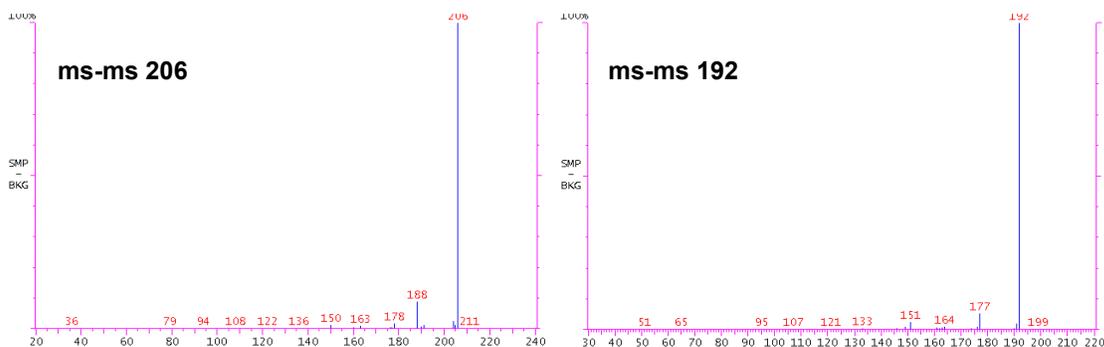


Figura 50. Análisis masas/masas de los iones m/z 206 y 192 de la O-metilpeltina.

En la figura 51 se observa el espectro de masas en barrido completo de la isoanhalonidina, la cual presenta el ion molecular M^+ a m/z 223, el cual presenta una abundancia relativa pequeña debido a que pierde rápidamente el hidrogeno del nitrógeno. Adicionalmente, se puede reconocer el pico base a m/z 222, el cual se origina por la pérdida del hidrógeno del nitrógeno. A partir del estudio de fragmentación masas/masas a m/z 222 y 207 (figura 52) se puede identificar la estructura de este alcaloide. En el espectro de masas/masas para el ion a m/z 222, se observan los iones a m/z 207, 189, 178 y 161, los cuales confirman la estructura propuesta para la isoanhalonidina, en este sentido el fragmento a m/z 207 produce a los iones a m/z 189 y 178, los cuales corresponden por un lado a la deshidratación y por otro a la pérdida del alcohol con su base respectivamente. Finalmente, el fragmento a m/z 161 se produce por la ruptura hemolítica del anillo pirimidínico fusionado. Al igual que en el caso de *Lophophora williamsii*, este alcaloide ha sido reportado por Lundström en 1972²⁴.

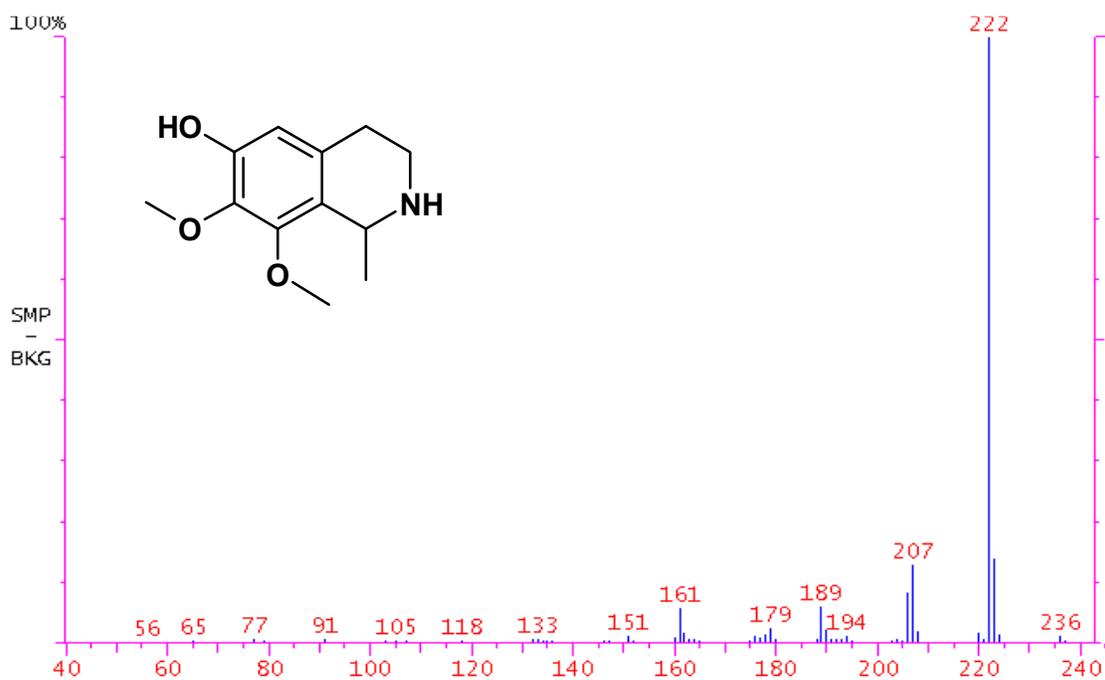


Figura 51. Espectro de masas en barrido completo de la isoanhalonidina.

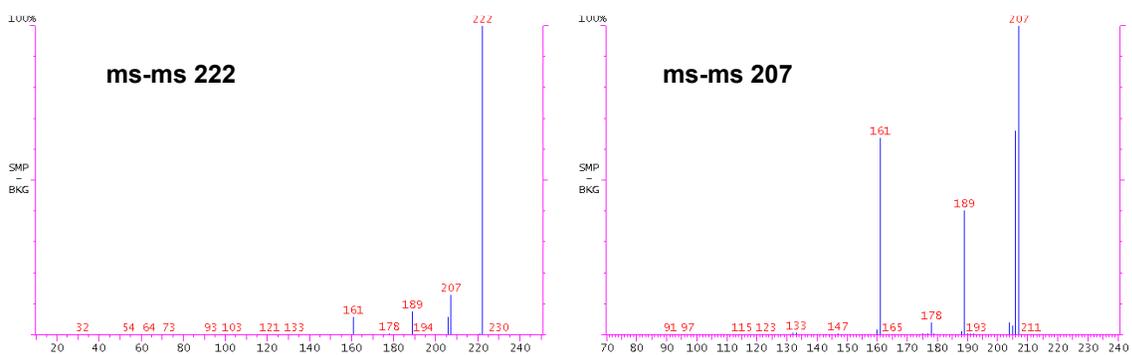


Figura 52. Análisis masas/masas de los iones m/z 222 y 207 de la isoanhalonidina.

En el extracto alcaloideo de *Carnegiea gigantea* se registran dos alcaloides que presentan el espectro de masas en barrido completo muy semejante (figura 53, y figura 55), estos alcaloides corresponden a estructuras de tetrahidroisoquinolinas con el mismo ion molecular M^+ a m/z 237, y el mismo pico base a m/z 222, la similitud en el patrón de fragmentación y la mínima diferencia que presentan los dos compuestos en sus tiempos de retención hace pensar que se trata de dos isómeros estructurales muy relacionados. La fórmula mínima y la inspección general de los patrones de fragmentación, permiten asignar a los compuestos las estructuras de pelletina e isopelletina, siendo el criterio principal de diferenciación entre los dos isómeros la posición del alcohol en los carbonos C-6 y C-8, dicha posición fue asignada a través de la inspección de los espectros de fragmentación secundaria de los iones a m/z 222, los cuales se presentan en las figuras 54 y 56, en dichos espectros la única diferencia es la presencia de un fragmento a m/z 178, el cual solo puede ser explicado a través de la fragmentación del alcohol con su base en la posición C-6 de la isopelletina, este fragmento puede presentarse en la isopelletina debido a que el plano de simetría de la molécula genera una polaridad significativa por el efecto electroattractor e inductor de los dos metoxilos del anillo aromático y el anillo pirimidínico fusionado, dicha condición no se cumple en el isómero pelletina. Al compuesto pelletina se le ha reportado en *Lophophora williamsii* por Lundström y Agurell 1968²⁶, en *Pelecocyphora aselliformis* por Bruhn y Bruhn 1973²; en *Turbinicarpus schmiedeckianus*, *T. schmiedeckianus* var. *schwarzii*, *T. lophophoroides*, *T. schmiedeckianus* var. *flaviflorus*, *T. pseudomacrochele* var. *krainzianus*, *T. schmiedeckianus* var. *dickisoniae* por Starhá, Chybidziurová, y Lacný, 1999⁴; en *Gymnocalycium albispinum*, *G. chubutense*, *G. gibbosum*, *G. monvielli*, *G. oenanthemum*, *G. quehlianum*, *G. stellatum*, *G. uebelmannianum* por Starhá, Urbánková, Kuchyna, 1997⁵¹; mientras que para la isopelletina se ha reportado en *Lophophora williamsii* por Lundström 1972²⁴.

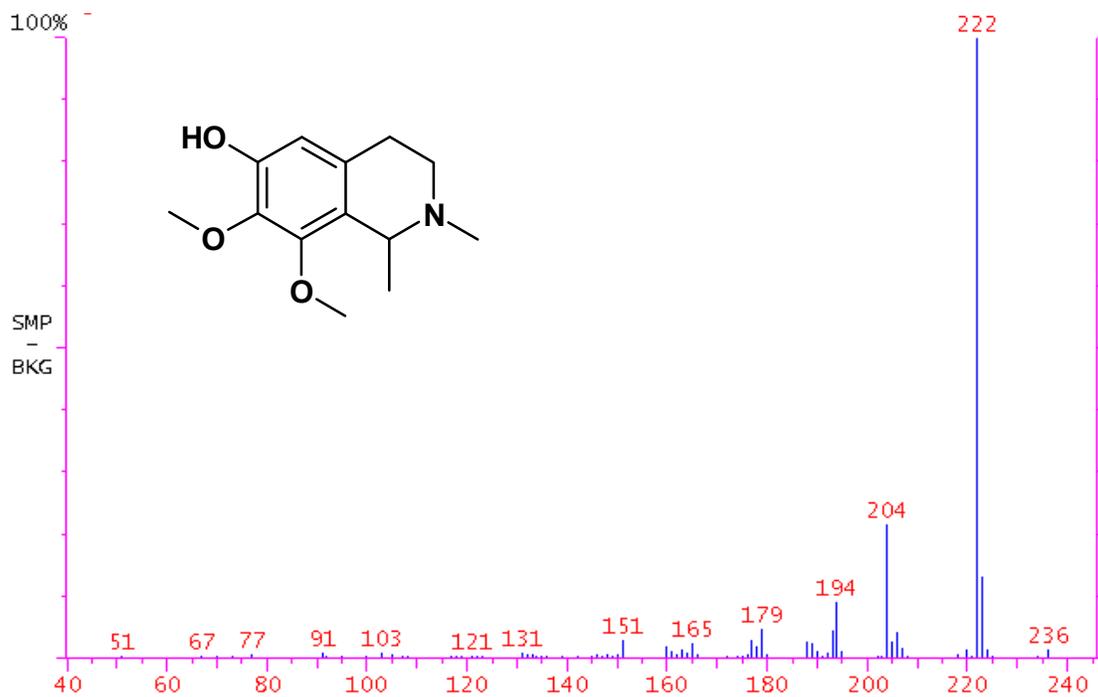


Figura 53. Espectro de masas en barrido completo de la isopelletina.

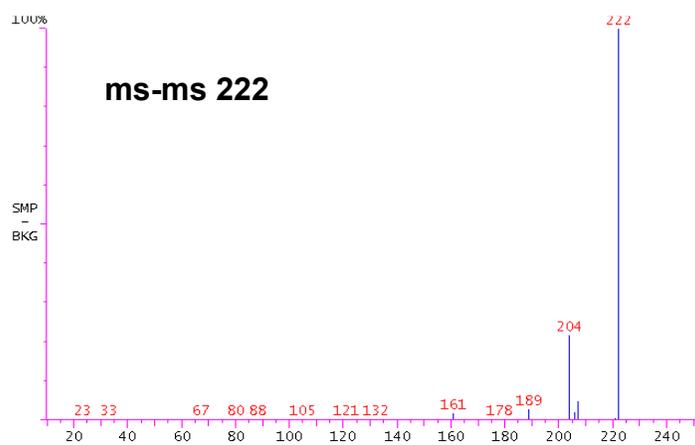


Figura 54. Análisis masas/masas del ion m/z 222 de la isopelletina.

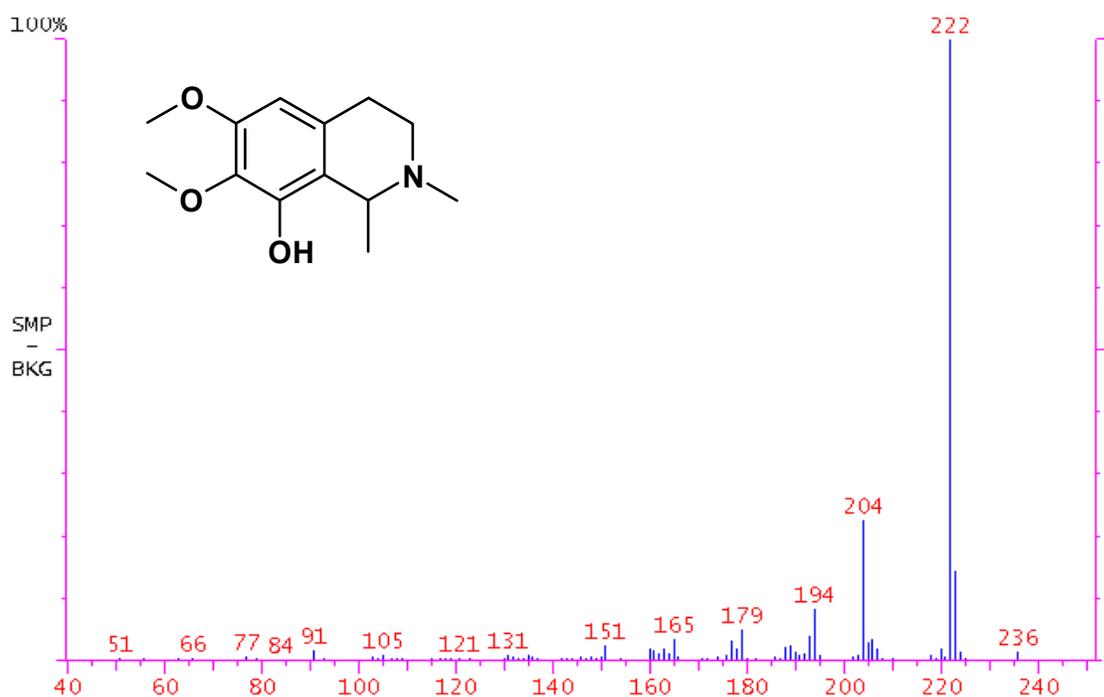


Figura 55. Espectro de masas en barrido completo de la pelletina.

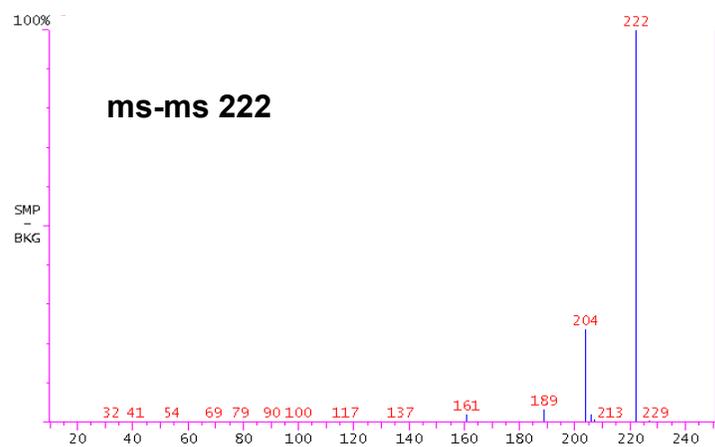


Figura 56. Análisis masas/masas del ion m/z 222 de la pelletina.

8.3 IMPLICACIONES ANALÍTICAS DEL TRABAJO

La identificación y caracterización de alcaloides en cactáceas son de suma importancia biológica, fotoquímica e instrumental, ya que con base en el reconocimiento del tipo de alcaloides presentes en una especie se puede complementar estudios quimotaxonómicos, los cuales adquieren relevancia por la gran diversidad biológica de cactáceas en el país.

Finalmente, el estudio de fragmentación de masas de los alcaloides presentes en las dos especies estudiadas en este trabajo, es uno de los primeros trabajos sistemáticos que se realizan empleando la fragmentación secundaria de iones seleccionados (m_s/m_s), y del modo de inyección splitless lo cual permite la identificación de compuestos que se encuentran en bajas proporciones, de tal forma que al no tener la confirmación por el análisis de alta resolución de masas, es una de las principales aportaciones del estudio.

9. CONCLUSIONES

Del presente estudio se puede concluir que la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es un técnica adecuada para el estudio de alcaloides aislados de *Lophophora williamsii* y *Carnegiea gigantea*.

Por otro lado se logró identificar la presencia de 5 β -fenetilaminas y 7 tetrahidroisoquinolinas en la especie de *Lophophora williamsii*; mientras que en la especie de *Carnegiea gigantea* solo se identificaron 9 tetrahidroisoquinolinas.

Para el caso particular de *Lophophora williamsii* se identificó el alcaloide 1-metil-5-hidroxi-6,7-dimetoxi-tetrahidroisoquinolina; este compuesto no se ha reportado en la literatura, por lo que se puede considerar como un reporte nuevo.

Para *Carnegiea gigantea* se lograron identificar 9 tetrahidroisoquinolinas.

10.- REFERENCIAS

1. Dewick, P. M. 2001. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 2a ed. Ed John Wiley & Sons Ltd. Chichester. Pp 509.
2. Bruhn, J. G. and Bruhn, C. 1973. *Economic Botany*. 27:241-251.
3. Gibson, A. C and Nobel, P. 1986. Harvard University Press. Cambridge. Pp 286.
4. Starhá, R.; Chybidziurová, A. and Lacný, Z. 1999. *Biochemical Systematics and Ecology*. 27:839-841.
5. Stammel, W.; Müller, R. and Thomas, H. 1993. *International Journal of Biochemistry*. 25:917-927.
6. Helmlin, H. J.; Bourquin, D. and Brenneisen, R. 1992. *Journal of Chromatography A*. 623:381-385.
7. Gonzalez, A. G.; Ferro, E. E. and Ravelo, A. G. 1987. *Phytochemistry*. 26:2785-2788.
8. Mata, R.; Chang, C. and McLaughlin, J. 1983. *Phytochemistry*. 22:1263-1270.
9. Ferrigni, N. R.; Nichols, D. E.; J. L. McLaughlin, and R. A. Bye. 1982. *Journal of Ethnopharmacology*. 5:359-364.
10. Pummangura, S.; McLaughlin, L.; Davis, D. and Cooks, R. 1982. *Journal of Natural Products*. 45:277-282.
11. Mata, R. and McLaughlin, J. 1980. *Planta Medica*. 38:180-182.
12. Mata, R. and McLaughlin, J. 1980. *Journal of Natural Products*. 43:411-413.

13. Neme, G.; Nieto, M.; Arcangelo A. T. D. and Gros, E. G. 1977. *Phytochemistry*. 16:277-278.
14. Kruger, T.; Cooks, R.; McLaughlin, J. and Ranieri, R. 1977. *Journal of Organic Chemistry*. 42:4162-4143.
15. West, L. G. and McLaughlin, J. L. 1973. *Lloydia*. 36:346-348.
16. Ghosal, S. and Srivastava, R. S. 1973. *Phytochemistry*. 12:193-197.
17. McFarlane, I. J. and Slaytor, M. 1972. *Phytochemistry*. 11:235-238.
18. Fong, H. and Farnsworth, N. 1969. *Lloydia*. 32:110-112.
19. Fishbein, L. and Falk, H. L. 1969. *Chromatographic Reviews*. 11:1-100.
20. Ordaz, C.; Ferrigni, N. and McLaughlin, J. 1983. *Phytochemistry*. 22:2101-2102.
21. Bruhn, J. G. and Lunström, J. 1976. *Lloydia*. 39:197-203.
22. Bruhn, J. G.; Svensson, U. and Agurell, S. 1970. *Acta Chemica Scandinavica*. 24:3775-3777.
23. Rosenberg, H.; McLaughlin, J. L. and Paul, A. G. 1967. *Lloydia*. 30:100-105.
24. Lundström, J. 1972. *Acta Chemica Scandinavica*. 26:1295-1297.
25. Lundström, J. 1971. *Acta Chemica Scandinavica*. 25:3489-3499.
26. Lundström, J. and Agurell, S. 1968. *Journal of Chromatography*. 36:105-108.

27. Bruhn, J. G. and Lindgren, J. E. 1976. *Lloydia*. 39:175-177.
28. Mata, R. and McLaughlin, J. 1976. *Lloydia* 39:461-463.
29. Mata, R. and McLaughlin, L. 1982. *Revista Latinoamericana de Química*. 12:95-117.
30. Britton, N.L. and Rose, J. N. 1920. *The Cactaceae*. New York: Dover Publications. Vol 4.
31. Benson, L. 1982. *The cacti of the united States and Canada*. Stanford, C.A. Stanford University, Press. Pp 1044.
32. Ortega-Nieblas, M. Molina-Freaner, F.; Robles-Burguenño, M. R. and Vázquez-Moreno, L. 2001. *Journal of Food Composition and Analysis*. 14:575-584.
33. Kee, S. C. and Nobel, P. S. 1985. *Biochimica et Biophysica Acta*. 820:100-106.
34. Standifer, I. N.; Devys, M. and Barbier, M. 1968. *Phytochemistry*. 7:1361-1365.
35. McLauling, J. L. 1973. *Lloydia*. 36:1-8.
36. Kringstad, R.; Singaas, A. O.; Rusten, G.; Baekkemoen, G.; Paulsen, B. S. and Nordal, A. 1980. *Phytochemistry*. 19:543-545.
37. Basmadjian, G. P.; Hussain, S. F. and Paul, A. G. 1978. *Lloydia*. 41:375-380.
38. Rosenberg, H. and Stohs, J. S. 1974. *Phytochemistry*. 13:1861-1863.
39. McLaughlin, J. L. and Paul, A. G. 1967. *Lloydia*. 30:91-99.

40. Unger, S. E.; Cooks, R. G.; Mata, R. and McLaughlin, J. L. 1980. *Journal of Natural Products*. 43:288-293.
41. Agurell, S. 1969. *Lloydia*. 32:40-45.
42. Agurell, S.; Bruhn, J. G. Lundström, J. and Svensson, U. 1971. *Lloydia*. 34:183-187.
43. Crosby, D. M. and McLaughlin, J. L. 1973. *Lloydia*. 36:416-418.
44. Pardanani, J. H.; McLaughlin, J. L.; Kondrat, R. W. and Cooks, R. G. 1977. *Lloydia*. 40:585-590.
45. Benkrief, R.; Brum-Bousquet, M.; Tillequin, F. and Koch, M. 1990. *Ann. Pharmaceutiques francaises*.48:219-224.
46. Hodgkins, J. E.; Brown, S. D. and Massing, J. L. 1967. *Tetrahedron Letters*. 8:1321-1324.
47. Bruhn, J. G. and Agurell, S. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 63:574-576.
48. Mata, R. and McLaughlin, J. L. 1980. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 69:94-95.
49. Ranieri, R. L. and McLaughlin, J. L. 1976. *Lloydia*. 39:172-174.
50. Lindgren, J. E.; Agurell, S.; Lunström, J. and Svensson, U. 1971. *Febs Letters*. 13:21-27.

51. Starhá, R.; Urbánková, K. and Kuchyna, J. 1997. *Biochemical Systematics and Ecology*. 25:363-364.
52. Kapadia, G. J. and Fayez, M. B. E. *Lloydia*. 1973. 36:9-35.
53. Lindgren, J. E.; Agurell, S. Lundström, J. and Svensson, U. 1971. *Febs Letters*. 13:21-27.
54. Pummangura, S.; Nichols, D. E. and McLaughlin, J. L. 1977. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 66:1485-1487.
55. NIST. <http://webbook.nist.gov>
56. Menachery, M. D.; Lavanier, G. L.; Wetherly, M. L.; Guinaudeau, H. and Shamma, M. 1986. *Journal of Natural Products*. 49:745-778.
57. Atta-ur-Rahman. 1994. Handbook of Natural Products Data:Isoquinoline Alkaloids. Vol. 3. Amsterdam. pp. 1-71.
58. Mohamed, Y. A. H.; Chan, C-J. and McLaughlin, J. L. *Journal of Natural Products*. 42:197-202.
59. Meyer, B. N.; Mohamed, Y. A. H. and McLaughlin, J. L. 1980. *Phytochemistry*. 19:719-720.
60. Neal, J. M. and McLaughlin, J. L. 1970. *Lloydia*. 33:395-396.
61. Speir, W. W. Mihranian, V. and McLaughlin, J. L. 1970. *Lloydia*. 33:15-25.
62. Pummangura, S.; McLaughlin, J. L. and Schifferdecker, R. C. 1981. *Journal of Natural Products*. 44:614-616.

63. Ranieri, R. L. and McLaughlin, J. L. 1977. *Lloydia*. 40:173-177.

64. El-Seedi, H. R.; De Smet, P. A. G. M.; Beck, O.; Possnert, G. and Bruhn, J. G.
2005. *Journal of Ethnopharmacology*. 101:238-242.