



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“PURIFICACIÓN MEDIANTE HPLC DE LOS GLICOLÍPIDOS MAYORITARIOS DE LA RESINA
COMERCIAL DE *Ipomoea purga*”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. JOSÉ JUAN CASTILLO ORTEGA

DR. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, MAYO DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. Manuel Jiménez Estrada
VOCAL	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez
VOCAL	Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
VOCAL	Dr. Mamadou Moustapha Bah
SECRETARIO	Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123, Conjunto E, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

AGRADECIMIENTOS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto CB220535) por el financiamiento parcial de la investigación y la beca otorgada (Número de becario: 606091) durante el periodo agosto de 2016 a enero de 2018.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (IN215016) por el financiamiento parcial de esta investigación.

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por el apoyo, por la atención y asesoría constante que generosamente me brindó durante mis estudios de maestría.

A la Dra. Mabel Fragoso Serrano por el apoyo, por el tiempo, dedicación, por la guía y observaciones acertadas en el trabajo de laboratorio.

Al Dr. John Castañeda Gómez por su ayuda, tiempo y conocimientos brindados durante su estancia.

Al Dr. Mario A. Figueroa Saldívar por todo el apoyo brindado para la obtención de los espectros de masas.

A los miembros del jurado que generosamente obsequiaron su tiempo en lo relativo a la revisión del presente texto y cuyas observaciones han permitido la mejora del mismo.

Al personal de la USAII (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria) por la atención y prontitud en la entrega de resultados con respecto a los espectros de resonancia magnética nuclear.

A la coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, por la paciencia, la asistencia constante y la información oportuna brindada a todos los estudiantes que formamos parte del programa.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por la amplia formación brindada durante estos dos años.

CONTENIDO.

AGRADECIMIENTOS.	i
CONTENIDO.	ii
ABREVIATURAS.	v
LISTA DE CUADROS.	viii
LISTA DE FIGURAS.	ix
1. INTRODUCCION.	13
2. ANTECEDENTES TEÓRICOS.	14
2.1 Familia Convolvulaceae.	14
2.2 Género <i>Ipomoea</i> .	15
2.3 <i>Ipomoea purga</i> .	15
2.4 Falsas jalapas.	17
2.5 Usos y propiedades medicinales de <i>Ipomoea purga</i> .	18
2.6 Distribución y descripción botánica.	19
2.7 Composición química.	20
2.8 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC).	23
2.8.1 Bases de la separación.	23
2.8.2 Modalidades de la Cromatografía.	25
2.8.3 Formas de Cromatografía Líquida.	26
2.8.4 Instrumentación.	28

2.8.4.1 Tuberías.	29
2.8.4.2 Uniones.	29
2.8.4.3 Bombas.	30
2.8.4.4 Sistemas de gradientes.	30
2.8.4.5 Inyectores.	31
2.8.4.6 Detectores.	31
2.8.4.6.1 Detector de índice de refracción.	32
2.8.4.6.2 Detector UV.	32
2.8.4.7 Sistema de toma y procesamiento de datos.	33
2.8.5 Propiedades de los disolventes.	33
2.8.6 Disolventes y aditivos comúnmente utilizados en Cromatografía en fase reversa.	34
2.8.7 Disolventes para Cromatografía en fase normal.	35
2.8.8 Cromatografía en fase ligada.	35
2.8.9 El material de relleno.	37
2.8.10 Ventajas de la cromatografía en fase reversa.	37
2.8.11 Mecanismo de retención.	37
2.9 Resinas glicosídicas.	38
2.10 Métodos de separación de las resinas glicosídicas.	40
2.11 Elucidación estructural de las resinas glicosídicas.	42
3. JUSTIFICACIÓN.	46
4. HIPÓTESIS.	47

5. OBJETIVOS.	47
5.1 Objetivo general.	47
5.2 Objetivos específicos.	47
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.	48
6.1 Procedimientos generales.	48
6.1.1 Métodos cromatográficos.	48
6.1.2 Material vegetal.	48
6.1.3 Preparación del extracto orgánico.	48
6.2 Reacción de acetilación.	49
6.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia a nivel analítico.	49
6.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia a nivel preparativo.	52
6.5 Determinación de las constantes físicas y propiedades espectroscópicas y espectrométricas.	53
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	55
7.1 Preparación del extracto.	55
7.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia a nivel analítico.	55
7.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia a nivel preparativo.	56
7.4. Análisis estructural de las fracciones purificadas.	61
8. CONCLUSIONES.	72
9. BIBLIOGRAFÍA.	73

LISTA DE ABREVIATURAS.

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
°C	Grados Celsius
2D	Dos dimensiones
Å	Amstrong
CD ₃ OD	Metanol Deuterado
C ₅ D ₅ N	Piridina deuterada
CH ₃ Cl	Cloroformo
CH ₃ CN	Acetonitrilo
cm	Centímetro
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Doblete
dd	Doble de doble
ddd	doble de doble de doble
MS	Mass Spectrometry
ESI	Electrospray ionization
eV	Electrón volts
FAB	Fast Atom Bombardment
Fuc	Fucosa
g	Gramo

Glu	Glucosa
H₂O	Agua
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
Hz	Hertz
I.R.	Índice de Refracción
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KOH	Hidróxido de potasio
kV	Kilovolt
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
mL	Mililitro

mm	Milímetro
Na₂CO₃	Carbonato de sodio
Na₂SO₄	Sulfato de sodio
Ram	Ramnosa
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Total correlation spectroscopy
t_r	Tiempo de retención
uma	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta
[M+H]⁺	Ión pseudomolecular positivo
[M-H]⁻	Ión pseudomolecular negativo
δ	Desplazamiento Químico
μg	Microgramo
μm	Micrómetro

LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1	Métodos de Cromatografía Líquida.	27
Cuadro 2	Propiedades de los disolventes habituales en HPLC. ³⁵	34
Cuadro 3	Lista de propiedades de disolventes habituales en HPLC. ³⁷	34
Cuadro 4	Características de la Cromatografía en fase normal y fase reversa. ³⁵	36
Cuadro 5	Columnas utilizadas a nivel analítico.	50
Cuadro 6	Condiciones cromatográficas (nivel analítico) para el fraccionamiento del extracto orgánico.	50
Cuadro 7	Condiciones cromatográficas a nivel analítico.	51
Cuadro 8	Condiciones Cromatográficas a nivel preparativo.	53
Cuadro 9	Fracciones separadas mediante HPLC a nivel analítico.	55
Cuadro 10	Cantidad obtenida de cada eluato.	57
Cuadro 11	Cantidad obtenida de cada fracción, después de inyectar de manera sucesiva la muestra disuelta previamente en la misma fase móvil de trabajo MeOH:H ₂ O, (4:1).	59
Cuadro 12	Constantes espectroscópicas de RMN ¹ H (700 MHz) y ¹³ C (175 MHz) del jalapinósido II en piridina- <i>d</i> ₅ (δ en ppm, <i>J</i> en Hertz).	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Enredadera de la familia Convolvulaceae.	14
Figura 2.	Ilustración de <i>Ipomoea purga</i> : del lado izquierdo, la raíz en color café; del lado derecho, flores y hojas.	16
Figura 3.	<i>Ipomoea orizabensis</i> . Especie con una raíz purgante y restringida a las zonas tropicales de Veracruz, es utilizada para sustituir a la jalapa verdadera (<i>Ipomoea purga</i>).	17
Figura 4.	Ácido operculínico A.	22
Figura 5.	Estructura de la purgina I (izquierda) y el purginósido IV en la parte derecha.	22
Figura 6.	Separación hipotética de los solutos A, B y C, en equilibrio entre la fase móvil (m) y la fase estacionaria (e). S representa las moléculas de la fase móvil. ³⁷	24
Figura 7.	Representa los equilibrios hipotéticos en una columna de las especies A, B y C. El subíndice “m” representa la fracción del soluto disuelta en la fase móvil y el subíndice “e” la disuelta en la fase estacionaria. ³⁷	24
Figura 8.	Esquema general de un sistema HPLC.	29
Figura 9.	Estructura general de un glicolípido.	38
Figura 10.	Carbohidratos comunes en las resinas glicosídicas.	39
Figura 11.	Ilustra el cromatograma obtenido por la técnica de reciclaje durante la purificación de la purgina I por HPLC (izquierda) ^{59,60} y válvula de reciclaje (derecha).	42

- Figura 12.** Cromatograma obtenido mediante HPLC a nivel analítico 56
usando como disolvente del extracto seco la misma fase móvil
de trabajo. Condiciones instrumentales: columna C₁₈ (250 ×
4.6 mm × 5 μm); fase móvil: MeOH:H₂O (4:1); flujo: 0.4 mL
min⁻¹; detector IR; volumen de inyección de la muestra: 20 μL
(0.4 mg).
- Figura 13.** Cromatograma obtenido mediante HPLC a nivel preparativo. 57
Condiciones instrumentales: Columna C₁₈(300 × 19 mm × 7
μm), fase móvil: MeCN-H₂O, 9:1; flujo: 8 mL min⁻¹; detector IR;
volumen de inyección de la muestra disuelta en metanol: 500
μL (50 mg).
- Figura 14.** Purificación de la fracción 4, mediante “rasurado de pico” y 58
“reciclaje de muestra”. Condiciones instrumentales: Columna
C₁₈ (300 × 19 mm × 7 μm); fase móvil: MeCN-H₂O 9:1; flujo: 8
mL min⁻¹; detector UV; volumen de inyección de la muestra:
200 μL (15 mg).
- Figura 15.** Purificación de la fracción 7 mediante “rasurado de pico” y 58
“reciclaje de muestra”. Condiciones instrumentales: Columna
C₁₈ (300 × 19 mm × 7 μm); fase móvil: MeCN-H₂O 9:1; flujo: 8
mL min⁻¹; detector UV; volumen de inyección de la muestra:
200 μL (15 mg).
- Figura 16.** Purificación de la fracción 11 mediante “rasurado de pico” y 59
“reciclaje de muestra”. Condiciones instrumentales: Columna
C₁₈ (300 × 19 mm × 7 μm), flujo: 8 mL min⁻¹; fase móvil: MeCN-
H₂O, 9:1; detector UV; volumen de inyección de la muestra:
200 μL (15 mg).

Figura 17.	Cromatograma obtenido mediante HPLC a nivel preparativo, utilizando como disolvente de la muestra la misma fase móvil de trabajo (MeOH-H ₂ O, 4:1). Condiciones instrumentales: Columna C ₁₈ (300 × 19 mm × 7 μm), flujo: 6 mL min ⁻¹ ; detector IR; volumen de inyección de la muestra: 500 μL (25 mg).	60
Figura 18.	Purificación de la fracción 1(figura 17), mediante “rasurado de pico” y “reciclaje de muestra”. Condiciones instrumentales: Columna C ₁₈ (300 × 19 mm × 7 μm), fase móvil: MeOH-H ₂ O (4:1); flujo: 6 mL min ⁻¹ ; detector IR; volumen de inyección de la muestra: 200 μL (15 mg).	60
Figura 19.	Purificación de la fracción 2 (figura 17) acetilada, mediante “rasurado de pico” y “reciclaje de muestra”. Condiciones instrumentales: Columna C ₁₈ (300 × 19 mm × 7 μm); fase móvil: MeOH; flujo: 8 mL min ⁻¹ ; detector IR; volumen de inyección de la muestra: 200 μL (15 mg).	61
Figura 20.	Espectro de masas de baja resolución (ESI-MS modo positivo) del componente purificado de la fracción 4.	62
Figura 21.	Espectro de RMN ¹ H del jalapinósido II (700 MHz, piridina- <i>d</i> ₅).	64
Figura 22.	Espectro de RMN ¹³ C del jalapinósido II (175 MHz, piridina- <i>d</i> ₅).	64
Figura 23.	Espectro de masas de baja resolución (ESI-MS modo positivo) del componente purificado de la fracción 7.	65
Figura 24.	Estructura de los jalapinósidos I y II.	65
Figura 25.	Espectro de RMN ¹ H de la fracción 7 intacta purificada (400 MHz, C ₅ D ₅ N).	66
Figura 26.	Espectro de RMN ¹ H de la fracción 11 intacta purificada (400 MHz, C ₅ D ₅ N).	67

Figura 27.	Espectro de masas de baja resolución (ESI-MS modo positivo) del componente purificado de la fracción 11.	68
Figura 28.	Espectro de RMN ^1H de la fracción 1 intacta que se obtuvo cuando se utilizó la fase móvil como disolvente de la muestra (400 MHz, CD_3OD).	69
Figura 29.	Espectro de RMN ^1H de la fracción 2 acetilada que se obtuvo cuando se utilizó la fase móvil como disolvente de la muestra (400 MHz, CD_3OD).	70
Figura 30.	Espectro de RMN ^{13}C de la fracción 2 acetilada que se obtuvo cuando se utilizó la fase móvil como disolvente de la muestra (400 MHz, CD_3OD).	71

1. INTRODUCCIÓN.

México es considerado un país megadiverso debido a su amplia variedad de especies. En efecto, el privilegiado quinto lugar que ocupa a nivel mundial en lo que respecta a plantas vasculares¹ ha sido determinante para inferir y comprender los usos de su flora que desde tiempos prehispánicos han sido medicinales, alimenticios, higiénicos, textiles, estimulantes, ornamentales, como aromatizantes, entre muchos otros.²

El uso de las plantas con fines medicinales se debe a que contienen una serie de compuestos químicos denominados metabolitos secundarios; que aparentemente no le son indispensables para vivir y se caracterizan porque presentan una distribución taxonómica restringida; tal es el caso de las resinas glicosídicas que forman parte de un grupo de metabolitos secundarios conocido como glicolípidos, cuyo origen biosintético es mixto. Estos glicolípidos presentan alto peso molecular, una elevada complejidad estructural y son únicos en la familia de las convolvuláceas.³

Estudios farmacológicos de los extractos orgánicos de estas plantas han demostrado actividad analgésica, espasmolítica, antimicrobiana, hipotensiva y efectos anticancerígenos.⁴ Los glicolípidos de este género constituyen una serie de oligosacáridos que tienen la particularidad de ser moléculas anfipáticas por la presencia simultánea en su estructura de un oligosacárido hidrofílico y una porción hidrófoba constituida por la aglicona. Debido a esta característica estructural, se ha postulado que estos glicolípidos desempeñan un papel importante en la química de la familia de las convolvuláceas ya que un gran número de sus propiedades biológicas pueden explicarse como resultado de su posible acción ionofórica.⁴

Por otra parte, uno de los propósitos de mayor relevancia en las ciencias médicas y farmacéuticas es la búsqueda de nuevos prototipos de fármacos, cuyo origen sea plantas previamente seleccionadas bajo un criterio etnomédico.⁵

De esta manera, en la presente disertación, se describe la resolución, mediante el uso de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia HPLC, (por sus siglas en inglés) de la porción soluble en metanol de la resina comercial de *Ipomoea purga*.

2. ANTECEDENTES TEÓRICOS.

2.1 Familia Convolvulaceae.

Las especies pertenecientes a la familia Convolvulaceae incluyen cinco géneros representativos por sus usos medicinales como agentes purgantes en la medicina tradicional: *Ipomoea*, *Merremia*, *Convolvulus*, *Opeculina*, y *Calystegia*.⁴ Esta familia pertenece al grupo de las angiospermas y posee alrededor de 55 géneros y 1650 especies con distribución cosmopolita, especialmente en las regiones de clima tropical y subtropical de Asia y América. La familia incluye a especies herbáceas trepadoras, arbustivas y arbóreas bajas con látex, que presentan hojas simples, alternas y enteras; flores grandes con pétalos fusionados (simpétalas) en forma de embudo radial y simétrico (de ahí su nombre vulgar de campanitas), solitarias o en inflorescencias en forma de cimas, racimos o panículas; y frutos capsulares con semilla cubierta por vellosidades. El vástago de estas plantas generalmente está enrollado, característica que deriva su nombre latino la palabra “convolvo” (convolvere = enrollar) que significa entrelazado y se refiere al crecimiento en forma de enredaderas (**Figura 1**) que se sujetan alrededor de un soporte. Dentro del reino vegetal, esta familia es la que mejor representa las propiedades medicinales purgantes (resinas glicosídicas) y alucinógenas (alcaloides tipo ergolinas).^{6,4} Una de las características más notable de esta familia es la presencia de células secretoras de resinas glicosídicas en sus tejidos foliares y radiculares.⁷



Figura 1. Enredadera de la familia Convolvulaceae.

2.2 Género *Ipomoea*.

El género *Ipomoea* es el más grande de la familia, con 500 a 700 especies a nivel mundial, con su mayor diversidad en los trópicos. La distribución del género *Ipomoea* en México es de aproximadamente 160 especies de las cuales el 65% se consideran endémicas (104 especies) y se distinguen por sus propiedades nutricionales (*Ipomoea batatas*, el camote), medicinales (*Ipomoea purga*), alucinógenas en rituales religiosos (*Ipomoea violacea*) y alelopáticas de importancia agrícola (*Ipomoea tricolor*).⁴ El nombre de este género proviene de las raíces griegas “*Ips*” o “*Ipos*” que significa gusano o enredadera y “*homoios*” que significa similar o semejante y esto sugiere la forma de crecimiento de la mayor parte de sus especies. El género *Ipomoea* no presentan variabilidad importante en su morfología, siendo que la mayoría de éstas son enredaderas con tallos enroscados que alcanzan de 1 a 5 metros. Las flores del grupo son típicamente conocidas por su aspecto tubular y sus colores brillantes.⁸

La actividad alucinógena propia de algunas especies de debe a la presencia de alcaloides derivados del ácido lisérgico. La actividad purgante y citotóxica está asociada a la presencia de resinas glicosídicas de sus tejidos foliares y radiculares. Los estudios farmacológicos han confirmado algunos usos en la medicina tradicional. Por ejemplo, un estudio realizado en ratas con el extracto acuoso de las raíces de *Ipomoea stans* indicó la presencia de sustancias activas que pueden ejercer un efecto vasodilatador confirmando su uso popular como agente antiespasmódico.⁸

2.3 *Ipomoea purga*.

La raíz de jalapa (**Figura 2**) es una planta medicinal cuyas propiedades fueron conocidas y aprovechadas por los aztecas y tlaxcaltecas en México antes de la conquista.⁹ El código Cruz-Badiano¹⁰ es tal vez la referencia más antigua del uso de la raíz de jalapa.



Figura 2. Ilustración de *Ipomoea purga*: del lado izquierdo, la raíz en color café; del lado derecho, flores y hojas.

Por su parte, Nicolás Monardés, en su obra *Historia Medicinal de las Cosas que Traen de Nuestras Indias Occidentales que Sirven en Medicina*,¹¹ hace mención de que la raíz de jalapa se exportaba de México a Europa, en donde tuvo una gran demanda. Miranda y Valdés¹² llegaron a la conclusión, basada en el estudio del códice Cruz-Badiano, que la planta del códice corresponde a la especie *Ipomoea purga*. El empleo de la planta llamó la atención de los españoles por su efectividad purgante. La noticia de tales propiedades medicinales se propagó rápidamente entre los conquistadores, quienes iniciaron la comercialización a gran escala de la raíz de jalapa.¹⁴ El nombre de raíz de jalapa se debe a que en los alrededores de esta ciudad veracruzana fue el lugar de mayor distribución de esta planta medicinal y, en donde, posteriormente, se desarrolló con mayor escala el cultivo de la misma. En la década de 1940, la región de Xico Veracruz, cultivaba y exportaba cerca de 40 toneladas de raíz seca de *Ipomoea purga* a los Estados Unidos, por año, manteniéndose hasta la década de 1990, después su exportación se redujo hasta casi cero.¹⁵

Fue tal el auge de esta planta que incluso cuando la población de Jalapa fue nombrada villa por el Rey Carlos IV en el año de 1791, en el edicto se describe lo valiosa que fue considerada en Europa y están representadas las hojas, tubérculos y flores de la raíz de jalapa en el escudo de armas de la recién nombrada villa.¹⁶ Probablemente, la ubicación de la especie *Ipomoea purga* como la que producía la jalapa verdadera, se estableció poco antes de la segunda mitad del siglo XVIII ya que Balfour¹⁷ menciona

que después de ser usada por casi dos siglos y medio como purgante en Europa, se aclaró su origen botánico pocos años atrás de la fecha de su publicación, aunque ya se conocían varios sucedáneos²⁷ para la raíz de jalapa auténtica, *I. purga* (Wender.) Hayne: *I. orizabensis* (Pelletan) Lebed. ex Steud., *I. stans* Cav., *I. jalapa* (L.) Pursh., *I. batatas* (L.) Lam., e *I. simulans* Hanbury, entre otros. La difusión internacional que consiguió la raíz de jalapa, a partir de la conquista española y el éxito de sus aplicaciones como purgante, que continua vigente hasta hoy, trajo como consecuencia la búsqueda de especies que sirvieran para sustituir la mencionada raíz.¹⁴

2.4 Falsas jalapas.

En general, el término jalapas se emplea para designar a las plantas con propiedades purgantes o laxantes pertenecientes a la familia de las convolvuláceas;¹⁸ la mayor parte de las cuales son del género *Ipomoea*. En el pasado, se distinguieron muchas especies, pero sólo una fue la verdadera: la *Ipomoea purga*; las otras, aunque muy frecuentemente usadas, han sido llamadas falsas jalapas.^{18,19} A continuación, se mencionan las más usadas en la época: jalapa de tampico (*Ipomoea simulans*), jalapa macho, jalapa de orizaba o escamonea mexicana (**Figura 3**) (*Ipomoea orizabensis*; sinónimo de *Convolvulus orizabensis* Pellet).^{18,19,20}



Figura3. *Ipomoea orizabensis*. Especie con una raíz purgante y restringida a las zonas tropicales de Veracruz, es utilizada para sustituir a la jalapa verdadera (*Ipomoea purga*).

Otras jalapas falsas son *Exogonium arenarum* Choisy; sinónimo de *Ipomoea arenaria* Steud; así como *Convolvulus jalapa*, cuyo sinónimo es *Ipomoea macrorhiza* Michx. (jalapa monstruosa).¹⁴ Es común confundir la *Ipomoea dumosa* L.O. Williams con la *I. purga*, pero la primera no posee el principio activo y lleva a cabo su vegetación en lugares de menor altitud (1300-1700 metros sobre el nivel del mar); en Xico y las comunidades aledañas; recibe el nombre de xonequi y sus hojas son usadas como condimento en la preparación de diversas comidas, frecuentemente combinadas con epazote y otras hierbas aromáticas.¹⁴

2.5 Usos y propiedades medicinales de *Ipomoea purga*.

La raíz de jalapa se usa como purgante suave y es emética, antihelmíntica y emenagoga; el extracto acuoso es conocido como diurético;²⁰ se ha utilizado también para curar llagas y úlceras. Farmacológicamente, está clasificada como catártico drástico hidragogo^{21,22} y es empleada para tratar hidrocefalias, fiebres gastronerviosas, enteromeningitis e incluso disentería.^{9,20} Así mismo, se le atribuyen propiedades curativas para padecimientos cardiacos, hemorragias cerebrales y estados inflamatorios.¹⁴

Aunque la jalapa fue conocida principalmente por sus propiedades purgantes, algunos autores mencionan diversas aplicaciones no medicinales de la planta. Por ejemplo, en el siglo XVIII en Londres, la raíz de jalapa fue utilizada en la elaboración de cerveza durante la fermentación y se hace referencia a su uso en la medicina veterinaria.²³ Por su parte, Casas²⁴ hace referencia a su uso para fijar tintes en la industria textil en Europa. El tubérculo puede ser transformado para ser utilizado de diversas formas, como es el polvo estandarizado a partir de la raíz triturada; de igual manera, se puede aplicar la resina obtenida por extracción alcohólica como jalapina, que es la porción insoluble en éter y decolorada de la resina.²⁵ Cabe mencionar que la forma más común de empleo según De Jáuregui¹⁹ fue como polvo suministrada disuelta en vino o en agua. Eran comunes tres presentaciones: azúcar anaranjada, polvos católicos y el aguardiente alemán; también, las tinturas y pastillas como la coluquintida y las píldoras catárticas compuestas. Además, se usaba en polvo asociada al calomel (HgCl) o a otros

purgantes de su género más enérgicos. La dosis es de 1.3 a 2 g; si la cantidad es mayor, puede ocasionar cólicos intensos, vómitos y aún la inflamación de las vías digestivas.⁹ La resina aplicada sobre la piel y en inyecciones hipodérmicas produce irritación local.

Como purgante actúa solamente en medio alcalino, estimulando la secreción intestinal,²² comenzando su acción en las primeras porciones del intestino delgado. Por su acción, se le agrupa entre los purgantes lipolíticos.²⁶ En el hombre, hay variaciones según la sensibilidad individual a las diferentes dosis. De 0.5 a 1 ó 2 g de polvo de raíz produce efectos intensos, acompañados de náuseas, a veces con vómitos y tenesmos. Con 4 ó 5 g, la resina produce la muerte con fenómenos coleriformes. Como laxante suave, debe tomarse en dosis de 0.5 g surtiendo el efecto en aproximadamente 24 horas.²⁶ Algunas experiencias en farmacología, usando jalapina (0.01 al 1000) en intestino delgado y 0.03 % en útero de conejo produce movimientos que aumentan el tono y modifican la amplitud de las contracciones. La acetilcolina, la pilocarpina y la arecolina pueden ser inhibidas, mientras que persisten las acciones de la adrenalina y de la atropina.²⁶

La demanda de estas raíces disminuyó debido a la introducción de productos herbolarios de origen italiano y alemán preparados con otras plantas como la jalapa brasileña (*Ipomoea operculata*) y la jalapa de la India (*Ipomoea turpethum*).²⁷

2.6 Distribución y descripción botánica.

La raíz de jalapa se encuentra distribuida en la vertiente oriente de la Sierra Madre Oriental, en altitudes entre 1800 a 2400 metros sobre el nivel del mar, generalmente en sitios de exposición al Sur y en sitios donde la precipitación promedio anual es de 1500-2100 mm. Los estados de la república en los que se encuentra distribuida son: Veracruz, Hidalgo y Puebla. Se le ha mencionado también para los estados de Jalisco, Guerrero, Michoacán y Estado de México, pero los ejemplares herborizados de dichos estados pertenecen a otra especie que es *Ipomoea dumosa*, la cual se confunde fácilmente con *Ipomoea purga* por la gran semejanza que existe entre ellas.¹³

Es una planta trepadora anual, con rizoma tuberoso perenne. Presenta tallos cilíndricos color purpúreo o enredadores glabros al igual que toda la planta. Raíz redonda piriforme o fusiforme; exteriormente amarillenta o bien negra y blanco amarillenta en su interior. Hojas alterna, simples, oblongo, cordiformes, de 9-11 cm de largo y 5-7 cm de ancho, acuminadas y profundamente sinuadas en la base; las hojas inferiores casi astadas o con puntos angulares divergentes; venación prominente en el envés. Peciolos cilíndricos de 5.5-6.5 cm pedúnculos axilares de 4-6 cm de largo, dos brácteas inconspícuas. Pedicelos engrosados de 1.5-2 cm de largo; una o dos flores cimosas, sépalos desiguales, ovoides, obtusos, los exteriores de 8 cm y los interiores de 5 cm corola salveriforme, tubo delgado de 5-8 cm de largo, limbo de 4.5-5.5 cm de largo, rosa traslúcido cuando viva rosa azulado frecuentemente cuando está herborizada. Estambres fértiles exsertos, blancos, filamentos apipétalos, estigmas biglobosos, blanco exserto igual o más que los estambres. Fruto capsular dehiscente, axilar, capitado, clavado, aovado, con la base del estilo y sépalos persistentes, verde blanquecino y de apariencia de grasa antes de madurar, coriáceo y café oscuro cuando madura. Semillas cuatro o menos por aborto, bilocular, negras, pulverulentas, con dos caras planas y una dorsal convexa.¹³

2.7 Composición química.

La resina contenida en el tubérculo está formada por una porción soluble en éter llamada jalapina y otra, soluble en metanol, llamada convolvulina.¹⁴ La resina contiene además materia colorante, manitol, azúcar, almidón, β -metil esculentina, fitoesterinas, oxalato de calcio, ipuranol, ácido butírico, isovalérico y tíglico.²² Además, se ha estudiado la composición de la resina de tubérculos comerciales por métodos cromatográficos y colorimétricos encontrando e identificando nuevas sustancias que constituyen el principio activo.²⁸

A partir de la jalapina o porción soluble en cloroformo obtenida de las resinas glicosídicas presentes en las partes aéreas de *Ipomoea purga*, se han caracterizado dos núcleos oligosacáridos: el ácido operculínico A (**Figura 4**) (11-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-O-[α -L-

ramnopiranosil-(1→2)]-β-D-fucopiranosido del ácido (S)-11-hidroxihexadecanoico) y el ácido operculínico B (11-O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→4)]-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→4)]-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→2)]-β-D-glucopiranosido del ácido (S)-11-hidroxihexadecanoico).³³ Estos núcleos oligosacáridos se identificaron como los ácidos glicosídicos constitutivos de siete glicolípidos novedosos, los purginósidos I-IV y las purginas I-III (**Figura 5**), las purginas son dímeros de oligosacáridos, cuyas diferencias residen en el tipo de sustituyente ácido que se encuentra acilando la posición C₄ de la ramnosa terminal. Las principales diferencias entre los purginósidos es el tipo de sustituyente acilante de las posiciones C₂ o C₃ y C₄ de la unidad ramnosa terminal.³³ Las purginas como dímeros de oligosacáridos del ácido operculínico B, tienen tres residuos acilantes en ambas unidades monoméricas: los ácidos trans-cinámico, (S)-2-metilbutírico, *n*-hexanoico y/o *n*-dodecanoico. La macrolactonización se ubicó en la posición C-2 de la segunda unidad sacárida.

De la convolvulina, se han aislado los ácidos púrgicos A-D²⁷, así como los jalapínosidos I y II²⁹ que representan los primeros oligosacáridos macrocíclicos intactos caracterizados a partir de las fracciones ricas en resinas glicosídicas insolubles en cloroformo, la convolvulina (fracción soluble en metanol).

Los ácidos púrgicos son heterohexasacáridos no lineales y se componen de dos unidades de D-glucosa, dos de D-quinovosa, una de D-fructosa y una de L-ramnosa²⁷.

Estos ácidos se diferencian en el tipo de aglicona que se encuentra unida al núcleo oligosacárido, identificándose al ácido (S)-11-hidroxitetradecanoico en el ácido púrgico A y el ácido (S)-11-hidroxihexadecanoico en el ácido púrgico B. El ácido púrgico A³¹ se caracterizó como el ácido (11S)-11-[O-β-D-quinovopiranosil-(1→2)-O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-O-[β-D-fuco-piranosil-(1→4)]-O-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-O-β-D-quinovopiranosido]-hidroxitetradecanoico; así que el ácido púrgico B³² representó al homólogo que presenta al ácido (S)-11-hidroxi-hexadecanoico como la aglicona pero que contiene la misma secuencia de glicosidación en el núcleo oligosacárido.²⁷ La estructura química del jalapínosido corresponde a un bidesmósido del ácido ipurólico (ácido (3S,11S)

dihidroxitetradecanoico) donde un residuo monosacárido se une en la posición C-3 y el mismo hexasacárido de los ácidos púrgicos en la posición C-11.³⁰

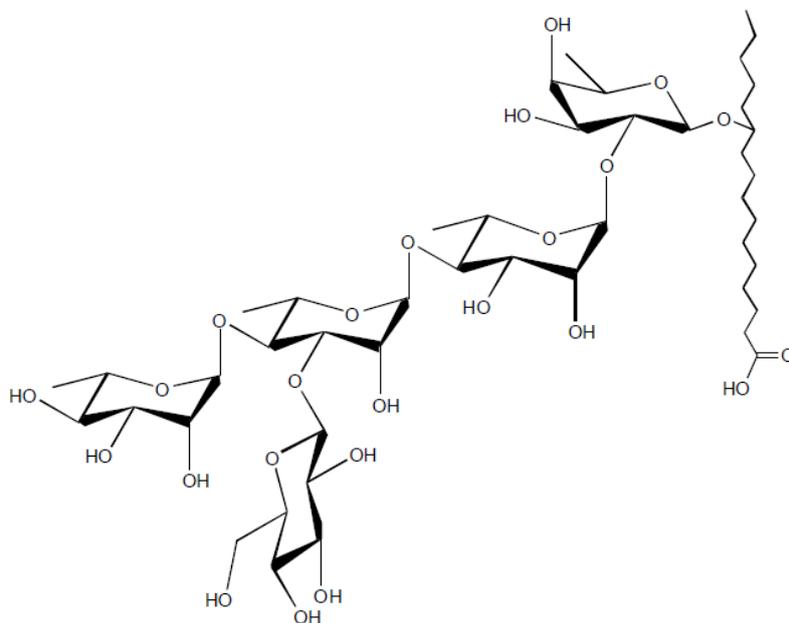


Figura 4. Ácido operculínico A.

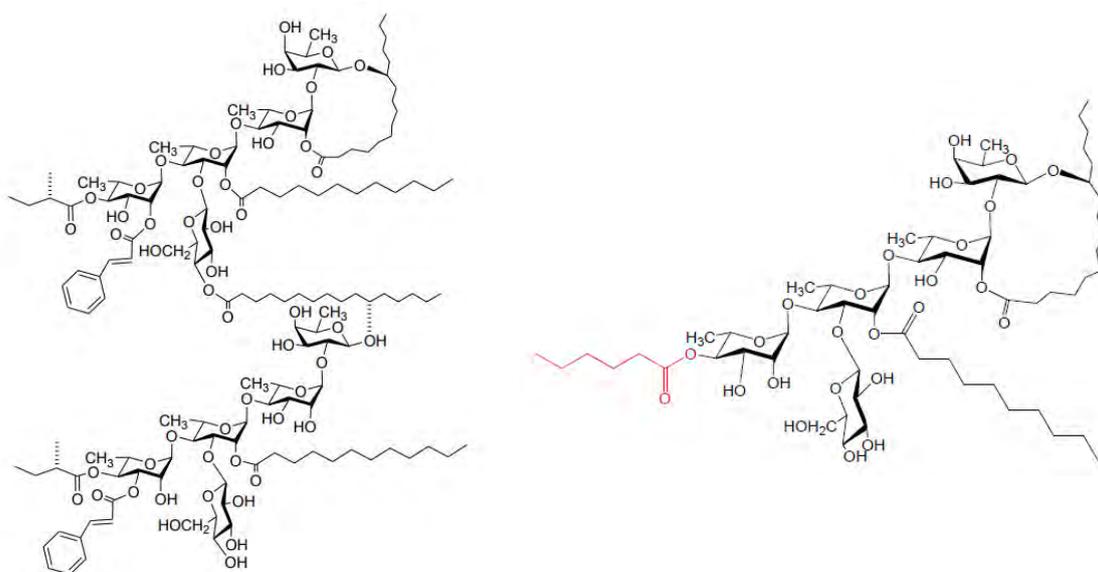


Figura 5. Estructura de la purgina I (izquierda) y el purginósido IV en la parte derecha.

2.8 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC).

Según define la IUPAC³⁴ “La cromatografía es un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en el cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra es móvil; esta característica distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación.³⁵ La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película, etc. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa”. En 1965 Guiddings define la cromatografía como un “método de migración en zonas”.

Las especies de la muestra experimentan interacciones repetidas (repartos) entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuando ambas fases se han escogido en forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil. Al final del proceso, los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retardado emerge primero, el retenido con mayor fuerza, eluye al último. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y químicas de los componentes de la muestra.³⁶

2.8.1 Bases de la separación.

La columna de separación es el corazón del cromatógrafo. Proporciona versatilidad en los tipos de análisis que pueden realizarse. Esta característica, debida a la amplia gama de selección de materiales para la fase móvil y estacionaria, permite separar moléculas que difieren muy poco en sus propiedades físicas y químicas. En un sentido amplio, la distribución de un soluto entre dos fases es el resultado del balance de fuerzas entre las moléculas del soluto y las moléculas de cada fase. La columna refleja las fuerzas de atracción o de repulsión relativas que presentan las moléculas o iones de las fases competidoras por el soluto y entre sí. Estas fuerzas pueden ser de naturaleza polar,

provinendo de momentos dipolares permanentes o inducidos, o pueden deberse a fuerzas de dispersión del tipo London.³⁶

Cuando la muestra y la fase móvil son forzados a atravesar la fase estacionaria (**Figura 6**), entran en acción distintos tipos de interacciones entre cada uno de estos componentes: interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares y electrostáticas: éstas son las responsables de la mayor o menor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria.³⁵

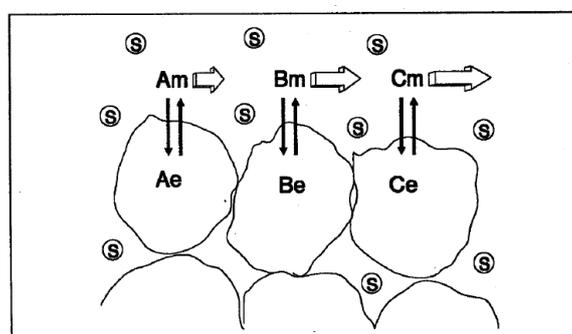


Figura 6. Separación hipotética de los solutos A, B y C, en equilibrio entre la fase móvil (m) y la fase estacionaria (e). S representa las moléculas de la fase móvil.³⁷

Para cada caso, en la columna se establecerá un equilibrio que involucra la fracción de cada especie “disuelta” por cada fase en equilibrio (**Figura 7**). Por ejemplo, para A, B y C:

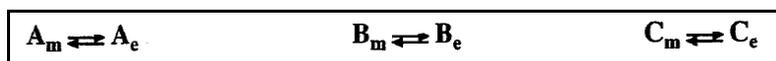


Figura 7. Representa los equilibrios hipotéticos en una columna de las especies A, B y C. El subíndice “m” representa la fracción del soluto disuelta en la fase móvil y el subíndice “e” la disuelta en la fase estacionaria.³⁷

2.8.2 Modalidades de la Cromatografía.

La clasificación de las modalidades cromatográficas está en función de varios parámetros:

a) La naturaleza de la fase móvil. Si la fase móvil es un gas, la modalidad cromatográfica se denomina gaseosa GC (por sus siglas en inglés) y si es un líquido, cromatografía líquida (LC). A este último grupo pertenecen la cromatografía en capa delgada (TLC), la cromatografía líquida en columna abierta y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). A pesar de las diferencias entre las distintas modalidades, los principios que gobiernan la separación son los mismos en todos los casos.³⁵

La cromatografía de gases se emplea para separar mezclas que contienen compuestos orgánicos volátiles, pero suele presentar grandes dificultades si las sustancias a analizar no son volátiles, si se descomponen a altas temperaturas o poseen alto peso molecular. Se ha estimado que sólo un 20 % de las sustancias orgánicas conocidas pueden separarse por GC sin tratamiento previo.³⁸

La diferencia fundamental entre HPLC y GC se encuentra en el tipo de detectores y en la influencia de la fase móvil. En GC es muy simple encontrar detectores que permitan diferenciar la muestra de la fase móvil, cualquier dispositivo que mida una propiedad física del soluto (conductividad térmica, ionización en una llama, captura de electrones) es apropiado como detector en GC. A diferencia de la cromatografía de gases, en HPLC es necesario encontrar dispositivos que diferencien al soluto en solución de la fase móvil. Los más difundidos son los detectores UV y, en menor proporción, los de fluorescencia, el de índice de refracción y el electroquímico. En HPLC la fase móvil es el parámetro fundamental que gobierna la separación. En consecuencia, en GC se necesitan diferentes columnas para abarcar el rango de separaciones posibles, mientras que en HPLC con una sola columna es posible separar sustancias polares, iónicas, ionizables y no polares simplemente modificando la composición de la fase móvil. Si bien la resolución puede ser mayor con los materiales actuales de HPLC, la eficiencia global es mayor en GC dado que la menor viscosidad de la fase móvil permite usar columnas con una mayor extensión. Sin embargo, la selectividad aportada por la amplia variedad de disolventes aptos para su empleo

como fase móvil en HPLC, le confieren a esta técnica de separación una mayor versatilidad.³⁵

b) La naturaleza de la fase estacionaria. Si la fase estacionaria es un sólido y la fase móvil un líquido, la modalidad cromatográfica se denomina cromatografía líquido-sólido (LSC). De la misma forma, existirá una cromatografía líquido-líquido (LLC), gas-líquido (GLC) y gas sólido (GC).

c) El fenómeno que ocurre dentro de la columna. Así, la cromatografía puede clasificarse en dos modalidades: de afinidad y por tamaño molecular. En la primera modalidad se encuentran la cromatografía en fase normal, en fase ligada y la de intercambio iónico. En la modalidad por tamaño molecular se encuentran la cromatografía de filtración en gel (GFC) y la cromatografía de permeación en gel (GPC).

d) La cantidad de muestra aplicada. Si la cromatografía seleccionada para una separación no destruye la muestra (TLC, HPLC o columna abierta) es posible recuperar al analito separado de su matriz a la salida de la columna. Aumentando la cantidad de muestra es posible obtener desde microgramos hasta kilogramos de una sustancia pura en una sola corrida. Evidentemente las escalas de trabajo son diferentes, pero las bases que gobiernan a la separación son exactamente las mismas. Así es posible definir la cromatografía analítica en el rango de pg hasta μg , un rango semipreparativo que abarca desde los μg hasta los gramos y un rango preparativo, que comprende las separaciones de analitos cuyas cantidades son mayores a un gramo.^{39,40}

2.8.3 Formas de la Cromatografía Líquida.

Todas las formas de la cromatografía de líquidos (**Cuadro 1**) son procesos de migración diferencial, donde los componentes de la muestra son selectivamente retenidos por una fase estacionaria.³⁶

Cuadro 1. Métodos de la Cromatografía Líquida.³⁶

Método	Abreviatura (en inglés)	Mecanismo predominante
Líquido-sólido o de adsorción	LSC	Adsorción sobre la superficie
Líquido-Líquido	LLC	Reparto entre fases líquidas, una móvil y la otra estacionaria.
Fase enlazada	BPC	Reparto y/o adsorción entre las fases móvil y enlazada.
Pares de iones	IPC	Separación de pares de iones entre las fases móvil y enlazada.
Intercambio iónico	IEC	Uso de la carga por adsorción sobre un sitio iónico fijo por medio de intercambio de cationes o de aniones.
Exclusión estérica	EC	Aprovechamiento del tamaño de las moléculas por su difusión dentro de poros de tamaño adecuado.
Afinidad		Uso de la estructura de ligantes inmovilizados para unir bioselectivamente la proteína deseada.

2.8.4 Instrumentación.

El notorio avance que la cromatografía líquida moderna ha experimentado en los últimos años, en especial, en lo referente al desarrollo de nuevas fases estacionarias, ha permitido al analista acceder a un nivel instrumental de alta precisión, compuesto por bombas que permiten entregar (en un sólo instrumento) caudales muy estables que varían entre el microlitro y varios mililitros; detectores con celdas intercambiables en las cuales el volumen puede escogerse, generalmente entre 1 y 12 μL ; válvulas accionadas por microprocesadores que permiten direccionar la fase móvil para automatizar procesos; integradores versátiles, aislados o conectados a una computadora que puede permitir no sólo el control global de uno o más equipos cromatográficos sino la libre manipulación y almacenamiento de datos; generación de reportes e incluso el desarrollo automático de métodos, entre muchas otras funciones. Básicamente, los equipos de HPLC pueden clasificarse en integrados y modulares. En los primeros, cada una de sus partes (reservorio de disolventes, bomba, inyector y detector) están reunidas en un gabinete y su intercambio o conexión con otros componentes de la misma o diferente marca es difícil. Permiten en cambio un mejor aprovechamiento del espacio, menos cables, tuberías y conexiones expuestas y quizás menores riesgos frente a operadores ocasionales o poco experimentados. En los equipos modulares, los módulos son instrumentos individuales que permiten no sólo armar el equipo según la necesidad del analista sino aumentar su complejidad en función de las necesidades experimentales. Esta conformación es además una buena defensa ante el “síndrome de la caja negra”. Dicho de otro modo, la visualización de cada componente permite no sólo el mejor conocimiento y control visual del equipo (**Figura 8**), sino el mejor aislamiento y la resolución de problemas cuando éstos se producen.³⁵

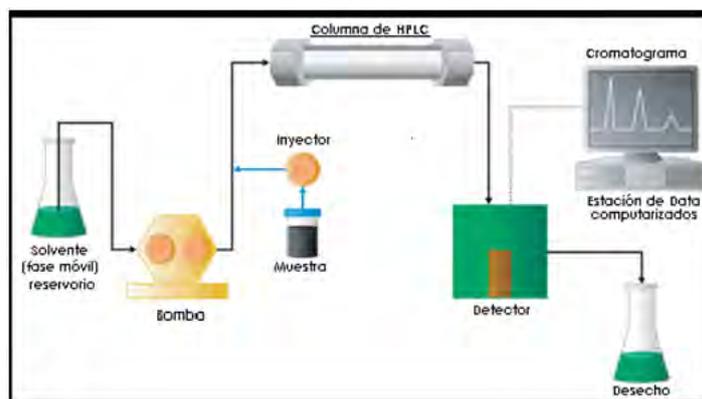


Figura 8. Esquema general de un sistema HPLC.

2.8.4.1 Tuberías.

La fase móvil empleada en HPLC debe circular por tuberías que conecten al reservorio del disolvente con la bomba, la bomba con el inyector, éste con uno o más detectores conectados en serie y, eventualmente, con un colector de fracciones o válvulas de distribución. Estas tuberías deben ser inertes y, de acuerdo a su ubicación en el sistema cromatográfico, resistentes a altas presiones.³⁵

2.8.4.2 Uniones.

Las uniones permiten conectar las tuberías y con ellas los distintos componentes del sistema cromatográfico. Una unión consiste en dos piezas de acople perfecto, la unión “macho”, consistente en una férula que se afirma a la tubería conectora y un tornillo que se ajusta a la unión “hembra”, presente en un conector o componente de un módulo, dejando un volumen interno libre al disolvente prácticamente nulo (volumen muerto ó cero). Básicamente, existen dos tipos de uniones, las convencionales y las universales. En las uniones universales la férula está constituida por un polímero deformable y el tornillo posee una cabeza algo mayor y fresada, de manera que permite el ajuste manual de la unión, a diferencia de las convencionales que necesitan el empleo de llaves apropiadas.³⁵

2.8.4.3 Bombas.

Las bombas en HPLC impulsan a la fase móvil proveniente del reservorio de disolvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna. Su caudal de trabajo puede ser muy variable, según la escala escogida. Existen bombas capaces de entregar caudales muy pequeños, del orden de microlitros/minuto para la cromatografía microbore pasando a caudales de unos pocos mililitros/minuto para la cromatografía analítica convencional hasta valores mucho mayores para separaciones semipreparativas y preparativas. Básicamente existen dos tipos de bombas: las de pistón (bombas reciprocantes) y las desplazamiento continuo (bomba jeringa). Las primeras son las de uso más difundido; son muy versátiles y fáciles de adaptar a la rutina de laboratorio. Las bombas de desplazamiento continuo no emiten pulsos en la entrega del disolvente.³⁵

2.8.4.4 Sistemas de gradientes.

Una separación que utiliza un único disolvente ó mezcla de disolventes de composición constante se denomina una elución isocrática. Con frecuencia, la eficacia de la separación se aumenta notablemente por una elución con gradiente. En este caso se utilizan dos o tres sistemas de disolventes con una polaridad significativamente distinta. Una vez que comienza la elución, se varía la relación de los disolventes de forma programada, a veces continuamente, y en ocasiones mediante una serie de etapas escalonadas.⁴¹ Mediante un sistema de elución isocrática se puede separar un número limitado de picos, típicamente 10 ó 12.³⁵ Para matrices más complejas, o cuando la polaridad de los componentes a separar es muy diferente, se puede optar por dos alternativas: la corrida multidimensional (column switching) o el uso de un gradiente de disolventes. El gradiente de disolventes es comparable a la programación de temperaturas en cromatografía gaseosa.³⁵

2.8.4.5 Inyectores.

A menudo, el factor limitante en la precisión de las medidas en cromatografía de líquidos es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna.⁴¹

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal del disolvente a través del sistema. En la actualidad, la totalidad de los inyectores en HPLC son válvulas que orientan el caudal hacia la columna, pasando o no según su posición, a través de un loop en el cual se introduce la solución a inyectar. Las válvulas pueden accionarse manual o automáticamente.³⁵

2.8.4.6 Detectores.

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite “ver” y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.⁴² Los detectores deben reunir ciertas características ampliamente tratadas en la literatura,^{43,44} entre ellas:

- Tener un amplio rango dinámico de respuesta.
- Poseer una respuesta lineal.
- No contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar.
- Responder a todos los solutos.
- Tener la sensibilidad apropiada.
- No afectarse por cambios de temperatura.
- Poseer una buena relación señal/ruido
- No destruir la muestra
- Tener una constante de tiempo baja.

Los detectores pueden clasificarse en generales y selectivos.^{43,44} Los detectores generales miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene al analito en comparación con la misma fase móvil pura., e.g., el detector de índice de refracción y el de conductividad. Los detectores selectivos son aquellos sensibles a alguna propiedad del soluto; por ejemplo, el detector UV, que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda dada.

2.8.4.6.1 Detector de índice de refracción.

Este detector mide la diferencia de índice de refracción entre el disolvente puro y el disolvente que contiene la muestra. Es un detector universal (ya que es altamente improbable que el índice de refracción del soluto sea similar al del disolvente) y no destructivo. Como contrapartida, es muy poco sensible, lo cual limita su campo de aplicación y es muy afectado por cambios de temperatura. No puede utilizarse con programación de disolventes porque el cambio de la composición de la fase móvil se acompaña del cambio de su índice de refracción. Como consecuencia, no puede estabilizarse la línea base. Existen tres tipos diferentes de detectores de Índice de Refracción: Fresnel, Deflexión, Interferométrico.³⁵

2.8.4.6.2 Detector UV.

Los detectores ópticos basados en la absorción de la zona ultravioleta-visible del espectro electromagnético constituyen el 70 % de todos los sistemas de detección en uso. Básicamente, se encuentran disponibles tres tipos de detectores de absorbancia: detector de longitud de onda fija, detector de longitud de onda variable y detector de barrido de longitud de onda (en tiempo real).³⁶ En los detectores de ordenamiento de fotodiodos se emplea un sistema óptico invertido: la celda se ilumina con luz “blanca”, es decir, no monocromada y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción donde es dispersada hacia el elemento fotosensible. En lugar de una fotocelda, se emplea un conjunto de fotoceldas o fotodiodos soportados en un chip de silicio. De esta forma, se consigue medir no sólo la luz transmitida a una longitud de onda, sino todo el espectro de absorción del eluato en tiempo real. El detector UV posee buena sensibilidad y buen rango lineal, permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de disolventes, con la única limitación de que éstos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo. Es un detector poco sensible a los cambios de caudal y de temperatura, la concentración del analito en la muestra se determina por la aplicación de la ley de Beer: $A=abC$, donde A es la absorbancia, a es la absortividad molar del analito, b es el camino óptico de la celda y C es la concentración del analito en la muestra.³⁵

Además de los detectores IR y UV, otro tipo de detectores son: de fluorescencia, electroquímico, conductividad, espectrometría de masas, FT-IR, de dispersión de la luz, actividad óptica, selectivo de elementos y fotoionización, estos últimos tres no están disponibles comercialmente.⁴¹

2.8.4.7 Sistema de toma y procesamiento de datos.

El resultado del ensayo cromatográfico es, por un lado, la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra y, por el otro, la de un gráfico o cromatograma de cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas. Este registro y la eventual manipulación se obtienen a partir de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos, entre los que se pueden citar los siguientes:

- Registrados gráfico
- Integrador
- Computadora (requiere una interfase analógica-digital)³⁵

2.8.5 Propiedades de los disolventes.

La fase móvil en HPLC cumple un papel fundamental, ya que puede por sí misma modificar completamente la selectividad de las separaciones en fase normal y es, a la vez, el verdadero “motor” de las separaciones por cromatografía en fase reversa.^{45,46}

Un disolvente apropiado debe cumplir con algunos requisitos (**Cuadro 2**):

- Alto poder solubilizante de las muestras
- Baja reactividad
- Compatibilidad con el detector utilizado
- Adecuado punto de ebullición
- Baja viscosidad
- Seguridad
- Alto grado de pureza

Cuadro 2. Propiedades de los disolventes habituales en HPLC.³⁵

Disolvente	Límite inferior de detección de soluto en UV (nm)	IR 25 °C	P.E. (°C)	Viscosidad (cps a 25 °C)
Acetonitrilo	190	1.341	82	0.34
Agua		1.333	100	0.89
Metanol	205	1.326	65	0.54

2.8.6 Disolventes y aditivos comúnmente utilizados en cromatografía en fase reversa.

Las fases móviles (**Cuadro 3**) en cromatografía en fase reversa están constituidas por mezclas de disolventes polares, en general agua, y un modificador orgánico (metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano) con y sin el agregado de aditivos (sales inorgánicas o reactivos de apareamiento iónico).

Cuadro 3. Lista de propiedades de disolventes habituales en HPLC.³⁷

Disolvente	Indice de Polaridad	Fuerza Dispersiva	Donador de Protones	Aceptor de Protones	Momento Dipolar	Grupo
Acetonitrilo	6.2	0.04	0.33	0.26	0.41	6
Agua	9.0	-	0.4	0.34	0.26	2
Metanol	6.0	0.03	0.51	0.19	0.30	-

2.8.7 Disolventes para Cromatografía en fase normal.

En cromatografía en fase normal, donde se emplean disolventes no polares, el problema más frecuente es la desactivación de la columna de sílice o alúmina por adsorción de agua que produce cambios profundos en la retención y selectividad.⁴⁷

2.8.8 Cromatografía en fase ligada.

El primer trabajo efectuado en cromatografía en fase ligada se debe a Howard y Martin⁴⁸, que en 1950 trataron tierra de diatomeas con dimetilclorosilano en fase vapor, obteniendo un material hidrofóbico estable. En realidad, emplearon este material en modalidad LLC (cromatografía de partición o líquido-líquido), como soporte de octano, la fase estacionaria verdadera, y usaron como fase móvil mezclas hidro-metanólicas. Como la polaridad de las fases se invertía, este proceso fue llamado cromatografía de partición en fase reversa. Esta técnica tuvo gran difusión y a mediados de la década de los sesentas, la silanización fue “exportada” a la cromatografía gaseosa. Sin embargo, el mayor impacto de la fase ligada en cromatografía líquida se produjo en 1970, cuando Kirkland y De Stefano,⁴⁹ combinaron el método descrito por Abel⁵⁰ para silanización y el material peculiar de Horváth,⁵¹ para crear el primer relleno para cromatografía en fase reversa, que llamaron Permanase ODS.

El notable aumento de calidad del material de relleno y el avance en la instrumentación, llevaron al nacimiento y rápido crecimiento de una nueva modalidad: la HPLC o cromatografía líquida de alta eficiencia, en la cual los principales logros se concentraron en tres parámetros fundamentales: resolución, reproducibilidad y rapidez. Actualmente, el método dominante es la cromatografía de fase ligada (BPC, bonded phase chromatography) que puede clasificarse en fase normal (NP-BPC) y fase reversa (RP-BPC, RPLC- reversed phase liquid chromatography- o simplemente RP), de acuerdo a la polaridad relativa de la fase móvil y de los grupos funcionales químicamente ligados a la matriz. Cerca del 80 % de las separaciones cromatográficas se efectúan con material de fase ligada y más del 70 % corresponde a cromatografía en

fase reversa. En cromatografía de fase ligada, la partícula base de silicagel se modifica químicamente para reemplazar sus grupos funcionales activos, los silanoles, de características polares, por determinados grupos funcionales: octadecilsilano (frecuentemente llamado ODS o C18), octilsilano (C8), fenilo, ciano (CN), amino, diol, etc. En algunos casos, la misma fase ligada puede ser empleada en fase normal o reversa según el tipo de fase móvil usada. Por ejemplo, un relleno ligado a grupos ciano funcionará en fase normal si la fase móvil es hidrófoba (por ejemplo, el isooctano) o en fase reversa, cuando se emplean mezclas hidroalcohólicas.³⁵

En cromatografía de líquidos en fase reversa, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil polar. Este cambio de la polaridad de fases resulta, naturalmente, en un cambio en el orden de elución (**Cuadro 4**) de los componentes de las muestras en estudio. La cromatografía en fase reversa ha desplazado no sólo a la cromatografía en fase normal (aunque nunca podrá hacerlo totalmente), sino que también ocupa terrenos hasta hace poco exclusivos de la cromatografía de intercambio iónico y su empleo es progresivo para el análisis de macromoléculas, antiguamente tratadas sólo por técnicas de filtración molecular, intercambio iónico y electroforesis.

Cuadro 4. Características de la Cromatografía en fase normal y fase inversa³⁵.

Fase	Normal	Inversa
Polaridad del relleno	Alta	Baja
Polaridad del disolvente	Baja	Alta
Orden de elución	Primero el menos polar	Primero el más polar
Efecto del incremento de polaridad del disolvente	Reduce los tiempos de retención	Aumenta los tiempos de retención.

2.8.9 El material de relleno.

El material de relleno de una columna de cromatografía de fase ligada está constituido por partículas, definidas por una serie de características:

- Morfología
- Tamaño
- Porosidad
- Estructura química

2.8.10 Ventajas de la cromatografía en fase reversa.

- Compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna, con la misma fase móvil
- La fuerza de atracción entre la superficie no polar y el soluto es débil
- La adsorción irreversible, frecuente en gel de sílice, raramente ocurre
- La fase móvil predominante es agua, abundante y económica
- El modificador orgánico predominante, metanol, es asequible en calidad y precios adecuados.
- El orden de elución es predecible, en función de la hidrofobicidad del analito
- Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio de fase móvil³⁵

2.8.11 Mecanismo de retención.

Se ha sugerido que el modo de interacción entre el soluto y la fase ligada puede ser de tres tipos: partición del soluto entre la fase móvil y una fase estacionaria líquida, adsorción sobre una fase estacionaria sólida, o bien un proceso mixto de partición-adsorción.³⁵

La teoría solvofóbica de Horváth^{52,53} es probablemente la de mayor aceptación. Según ésta, la fuerza de retención en fase reversa se debe al aumento de entropía que

acompaña a la transferencia del soluto de la fase móvil (polar) a la fase estacionaria (no polar). Dicho de otro modo, la interacción entre moléculas de soluto y de disolvente es mucho más débil que la interacción de las moléculas de disolvente entre sí. Como consecuencia, el soluto es expulsado de la fase móvil y forzado a penetrar en la fase estacionaria, que actúa como receptor pasivo. Sin embargo, en la práctica, el mecanismo de retención se complica por la presencia de silanoles residuales. Así, para comprender el fenómeno de retención deberían considerarse dos mecanismos, el silanofóbico y el silanofílico.³⁵

2.9 Resinas glicosídicas.

Las resinas glicosídicas constituyen un conjunto de glicolípidos de alto peso molecular, cuya porción hidrofílica está compuesta por un núcleo oligosacárido y la porción hidrofóbica por una aglicona que está representada por un ácido graso mono o dihidroxilado de 16 ó 14 átomos de carbono unidos a través de un éster cíclico intramolecular (**Figura 9**). La mayoría de las veces, el núcleo oligosacárido se encuentra esterificado por ácidos grasos saturados con diferentes longitudes de cadena.⁴

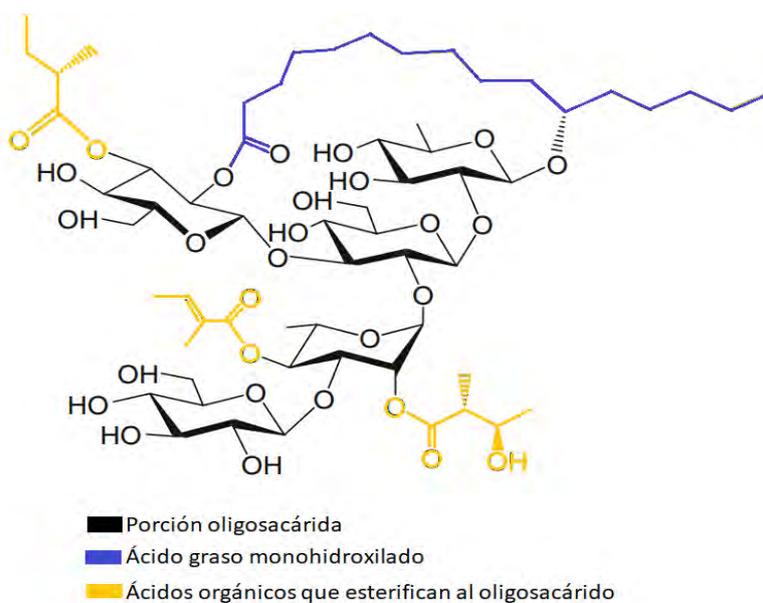


Figura 9. Estructura general de un glicolípido.

La diversidad estructural de las resinas glicosídicas surge de las variaciones en el número y tipo de unidades sacáridas que componen el núcleo oligosacárido, en la secuencia de glicosidación, en la posición de lactonización y en el tipo, número y posición de los ácidos que se encuentran acilando al núcleo oligosacárido. Así, se han podido identificar desde disacáridos hasta heptasacáridos y dímeros tipo éster constituidos por tres hasta cinco azúcares en cada unidad oligomérica. Estos se componen principalmente de cuatro carbohidratos, tres 6-desoxihexosas como son la D-fucosa, D-quinovosa, L-ramnosa, D-xilosa, y la D-glucosa como la única hexosa presente en esta clase de metabolitos aislados de plantas pertenecientes a la familia Convolvulaceae (**Figura 10**).⁴

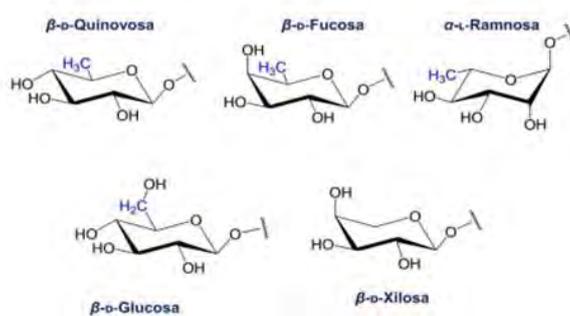


Figura 10. Carbohidratos comunes en las resinas glicosídicas.

En cuanto a la secuencia de glicosidación, se han encontrado lipooligosacáridos lineales o ramificados y los ácidos que con mayor frecuencia representan a las agliconas de las macrolactonas son los ácidos (S)-11-hidroxihexadecanoico (ácido jalapínico) y el (S)-11-hidroxitetradecanoico (ácido convolvulinico).⁴ Sin embargo, otras agliconas han sido identificadas como son el ácido 3,11-dihidroxitetradecanoico (ácido ipurólico) y el ácido (S)-11-hidroxi-4-oxotetradecanoico, las cuales han sido encontradas en las resinas glicosídicas de las semillas de la planta *Pharbitis nil* y en las hojas de la planta *Ipomoea squamosa*, respectivamente. Los ácidos (S)-12-hidroxipentadecanoico, (S)-12-hidroxihexadecanoico y (S)-12-hidroxieptadecanoico fueron identificados en las resinas glicosídicas de la planta *Ipomoea turpethum*.⁵⁴

Los ácidos carboxílicos que frecuentemente se encuentran acilando los núcleos oligosacáridos son derivados de cadena corta que incluyen a los ácidos acético, propiónico, *n*-butírico, isobutírico, (2*S*)-2-metilbutanoico, 3-metilbutanoico, (-)-(2*R*,3*R*)-3-hidroxi-2-metilbutanoico (ácido nílico) y 2-metil-2-butenoico (tíglico). También, se han encontrado ésteres derivados de ácidos arilalquílicos como el (E)-3-fenil-2-propenoico (ácido cinámico) y ésteres derivados de ácidos grasos con diferentes longitudes de cadena, tales como, el *n*-hexanoico (caproico), *n*-octanoico (caprílico), *n*-decanoico (cáprico), *n*-dodecanoico (láurico), *n*-hexadecanoico (palmítico), *n*-octadecanoico (esteárico) y *n*-eicosanoico o ácidos araquidónicos.⁴ Cabe mencionar que los constituyentes individuales que componen las resinas glicosídicas de una misma especie comparten, en la mayoría de los casos, un mismo núcleo oligosacárido. Por lo tanto, los núcleos oligosacáridos de las resinas glicosídicas pueden ser identificados a través de métodos de degradación (hidrólisis alcalina), permitiendo la obtención de los ácidos glicosídicos que son distintivos de las especies que los biosintetizan.⁵⁵

2.10 Métodos de separación de las resinas glicosídicas.

Las resinas glicosídicas son compuestos anfipáticos debido a la presencia de las largas cadenas alifáticas enlazadas a un extremo polar. Esta clase de moléculas no es muy fácil de aislar y purificar, ya que siempre se presentan como mezclas complejas de homólogos constituidas por el mismo núcleo oligosacárido pero con diferentes sustituyentes alquilo o arilo que difieren en la longitud de la cadena. Aunque, existen muy pocas descripciones sobre el aislamiento de glicolípidos a través de la cromatografía en capa delgada, este procedimiento no es adecuado para la purificación de los constituyentes individuales.⁵⁵ Los métodos de separación, como la cromatografía en columna abierta, empleando gel de sílice, sephadex, intercambio iónico y filtración en gel fueron también explorados para la separación de esta clase de compuestos, pero sin resultados exitosos.⁴ La naturaleza química y la complejidad de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas han determinado el empleo de métodos cromatográficos y espectroscópicos de alta resolución para el aislamiento de sus

constituyentes individuales y su posterior caracterización estructural mediante resonancia magnética nuclear.^{4,56}

El principal desafío técnico durante la separación de macromoléculas, como los glicolípidos, mediante HPLC, consiste en el desarrollo de las mejores condiciones analíticas instrumentales. Es decir, establecer las mejores condiciones de operación para la selección de las fases estacionaria y móvil, el modo de elución (gradiente o isocrático) y la carga de muestra máxima que se requiere para que se obtengan picos adecuados correspondientes a los congéneres individuales de las complejas matrices en estudio. La ventaja del empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia es el escalamiento a nivel semipreparativo que permite la purificación de grandes cantidades de muestra sin afectar la resolución.

Columnas de fase normal y columnas de fase modificada como la octilsilano(C₈), octadecilsilano(C₁₈), ciano y fenilo han demostrado ser fases estacionarias adecuadas para el aislamiento de macromoléculas, como los glicolípidos.^{57,58}

Las técnicas cromatográficas de corte de núcleo y rasurado de pico, empleadas individualmente o combinadas, han sido usadas en la purificación de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas. Inicialmente, cada pico del conjunto total mostrado en el cromatograma se colecta mediante una válvula a nivel semipreparativo o preparativo (cantidad de muestra: 50 mg/500 µL).⁵⁵

La técnica de cromatografía de reciclaje de la muestra ha permitido la purificación de cada pico colectado, hasta que los componentes sobrepuestos son separados. Esta técnica consiste en hacer pasar la muestra por la columna o fase estacionaria durante varios ciclos de manera manual o automática a través de una válvula de reciclaje. El procedimiento finaliza hasta que se observe un pico de comportamiento gaussiano (**Figura 11**), sin la presencia de picos minoritarios, como indicativos de impurezas en la muestra.⁴

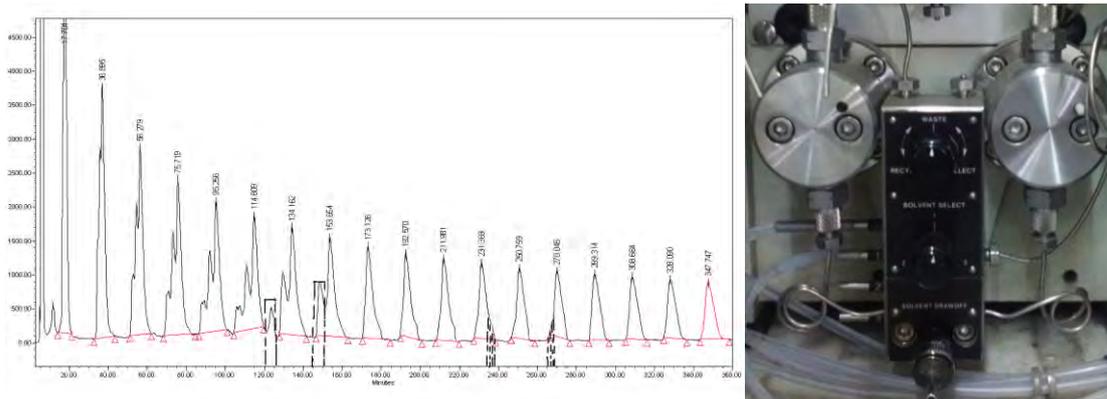


Figura 11. Ilustra el cromatograma obtenido por la técnica de reciclaje durante la purificación de la purgina I por HPLC (izquierda)^{59,60} y válvula de reciclaje (derecha).

2.11 Elucidación estructural de las resinas glicosídicas.

Los principales métodos para la elucidación de las resinas glicosídicas involucran el uso de reacciones químicas degradativas o la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas de alta resolución, como el mejor camino para la caracterización completa de estas moléculas complejas.⁴

La ruptura de polisacáridos a moléculas simples mediante reacciones químicas, como la saponificación, fue una metodología que se empleó en el pasado debido a la carencia de métodos para el aislamiento de glicolípidos en sus constituyentes intactos. La saponificación del material crudo libera los ácidos grasos correspondientes a los sustituyentes que esterifican a los núcleos oligosacáridos. De esta manera, los ácidos glicosídicos obtenidos son sometidos a una segunda reacción de hidrólisis en medio ácido para la liberación de los carbohidratos correspondientes y la aglicona perteneciente al fragmento que forma la macrolactona en las resinas glicosídicas intactas. Los ácidos grasos libres o sus derivados metilados o etil ésteres son analizados mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.⁴

La longitud de la cadena de la aglicona que forma la macrolactona y su posición de hidroxilación son determinados mediante el análisis directo por espectrometría de masa mediante impacto electrónico (EIMS) o por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de gases (GC-EIMS) de la aglicona (ácidos grasos hidroxilados C₁₄ ó

C₁₆metilados) derivatizada mediante sililación.⁶¹ Las unidades de azúcar son convertidas a sus derivados volátiles por tratamiento con clorotrimetilsilano y luego analizadas por GC-MS.^{62,63} Para evitar la anomerización de los monosacáridos se recomienda realizar la sililación de los grupos hidroxilo y la mercaptalación de la función aldehído. Los monosacáridos pueden ser también detectados mediante cromatografía líquida de alta eficiencia usando una columna analítica para carbohidratos. Procedimientos como la permetilación de los ácidos glicosídicos, seguido por hidrólisis ácida, reducción del anillo de piranosa a los correspondientes alditoles y acetilación deben ser usados para establecer el número y las posiciones relativas de los enlaces glicosídicos. Esta estrategia permite la discriminación entre los grupos hidroxilo libres los cuales son metilados en los alditoles y los grupos hidroxilo involucrados en los enlaces glicosídicos (acetilados en los alditoles).⁴

Las glicoresinas naturales son sólidos polares con puntos de fusión generalmente por encima de los 100 °C, por lo tanto, no son volátiles y son difíciles de vaporizar en una fuente de ionización por impacto electrónico sin que ocasione daño térmico. El método de ionización química no es un método adecuado para estos compuestos, aun para sus derivados peracetilados y permetilados que son fácilmente volatilizados o ionizados. Las técnicas de ionización suave como la ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB), la ionización por electrospray (ESI) y el MALDI han hecho una contribución grandiosa al campo de la elucidación de glicolípidos. La muestra se ioniza a especies moleculares protonadas (modo positivo) o desprotonadas (modo negativo).⁶⁴

Los espectros unidimensionales de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H) y de carbono (RMN ¹³C) proporcionan una información general acerca de las estructuras químicas de los glicolípidos. Así, el análisis de los espectros por RMN ¹³C permite determinar el número de señales anoméricas en la región comprendida entre 95-110 ppm, que indican el número de monosacáridos que se encuentran constituyendo al núcleo oligosacárido en estas moléculas. Las resonancias de protones correspondientes a las señales anoméricas en el espectro de RMN ¹H en la región comprendida entre 4.5-6.0 ppm pueden ser identificadas mediante el experimento HSQC, que permite la correlación C-H a un enlace de distancia (¹J_{CH}). Una vez que se

determinan las señales de los protones anoméricos, se analizan sus multiplicidades para identificar el tipo de azúcar mediante los patrones de acoplamiento. De esta forma, las señales que se presentan como singuletes anchos pueden ser atribuidos a las unidades monosacáridas de L-ramnosa, siendo que las señales anoméricas que se presentan como dobletes con constantes de acoplamiento de 7.5 Hz ($^3J_{H-H}$) son atribuidas a la unidad de D-fucosa, cuya presencia se confirma mediante la señal generada por el protón localizado en el carbono C₅ como un cuarteto con constantes de acoplamiento de 6.5 Hz ($^3J_{H-H}$) y centrada en 3.7 ppm aproximadamente.^{4,56}

Las señales anoméricas correspondientes a las unidades de D-glucosa se asignan debido a su multiplicidad como dobletes con constantes de acoplamiento de 7.5 Hz ($^3J_{H-H}$). Todas las señales vecinales a los protones anoméricos de estas unidades deben presentar concordancia con las características determinadas por los patrones de acoplamiento como doblete de dobletes (pseudo-tripletes) con constantes de acoplamiento aproximadamente de 9.5 Hz ($^3J_{H-H}$) y que resultan de la orientación ecuatorial de los constituyentes en el anillo glucopiranosido.^{4,56} Otras señales de diagnóstico para identificar glicolípidos son las señales dobles observadas entre 1.4-1.7 ppm en el espectro de RMN 1H y que corresponden a los protones de los grupos metilo de las 6-desoxihexosas.⁵⁵

El empleo de las técnicas bidimensionales en la RMN (1H -H COSY y TOCSY) permite la asignación de las señales restantes de cada uno de los protones metinos en cada monosacárido. El procedimiento de asignación de señales mediante estas técnicas se inicia con la localización de los protones anoméricos y el establecimiento de los cuadros de conectividad de cada uno de los protones con su metino vecinal correspondiente a lo largo de toda la unidad sacárida.⁵⁷ El procedimiento de asignación de señales mediante el empleo de la técnica TOCSY, se complementa con las señales espectroscópicas asignadas a través del espectro COSY, que de igual manera, se inicia con las posiciones de los protones anoméricos o cualquier señal oligosacárida diagnóstica y resuelta en el espectro, siguiendo en línea recta las señales de conectividad que determinan las interacciones con todos los protones pertenecientes a cada unidad de azúcar. De esta manera se realiza la asignación inequívoca de las señales de cada unidad sacárida específica.^{4,57}

Después de llevarse a cabo la identificación de los protones correspondientes a las unidades sacáridas a través de las técnicas RMN ^1H bidimensionales (COSY y TOCSY), se procede con la asignación de los desplazamientos químicos de los carbonos correspondientes a los protones oligosacáridos mediante la técnica de RMN bidimensional heteronuclear ^{13}C - ^1H a un enlace de distancia ($^1J_{\text{C-H}}$) HSQC. Este procedimiento se inicia con la localización de los carbonos anoméricos en la región comprendida entre 95-110 ppm en el espectro de carbono obtenido a través de la técnica de RMN ^{13}C . Posteriormente, se establece la conectividad entre cada carbono anomérico con su correspondiente protón.^{65,66} Una vez que se han identificado cada uno de los grupos carbonilo correspondientes a los sustituyentes y a la aglicona, se lleva a cabo su localización en el núcleo oligosacárido por el establecimiento de las conectividades mediante las correlaciones C-H a tres enlaces de distancia con el espectro HMBC.^{4,57}

3. JUSTIFICACIÓN.

Las sociedades modernas están sujetas a un ritmo de vida exigido por un mundo globalizado; esto ha traído, entre otras consecuencias, el surgimiento y resurgimiento de diversas enfermedades que en cierta forma contribuyen a disminuir la longevidad promedio, por lo que se hace necesario recurrir a diversas alternativas terapéuticas que permitan contrarrestar dichos efectos. Tal es el caso de la medicina tradicional enfocada en el uso de productos naturales y, principalmente, los obtenidos de plantas que constituyen una alternativa ampliamente prometedora, ya que mientras se lleva a cabo la validación científica que avala su uso etnomédico, de manera simultánea, se pueden aislar, purificar y caracterizar estructuralmente los metabolitos secundarios responsables de sus efectos biológicos con la idea de desarrollar productos herbolarios.

Las resinas glicosídicas del género *Ipomoea* constituyen una fuente potencial de principios biodinámicos con aplicación terapéutica y agroquímica debido a sus propiedades purgantes, laxantes, citotóxicas, antimicrobianas y fitoinhedoras.⁴ Por otra parte, es necesario contribuir al decremento en la importación de principios activos con la finalidad de aumentar la producción nacional de medicamentos, por ejemplo, laxantes que incluyan en su formulación farmacéutica a las resinas glicosídicas y que, de igual manera, se implemente de manera sistemática el cultivo de plantas pertenecientes al género *Ipomoea*, lo cual de igual forma desemboca en la generación de empleos. Tomando en cuenta los trabajos de aislamiento de principios anfipáticos a partir de extractos no polares ampliamente descritos en la literatura científica, en nuestro grupo de trabajo desde hace tiempo se está enfrentado el reto de estudiar extractos polares tratando de evitar en medida de lo posible la derivatización con la finalidad de obtener resinas glicosídicas intactas como productos naturales y facilitar el estudio de sus efectos sobre células cancerígenas.⁶⁷ El presente proyecto de tesis se centra en la separación a través del uso de HPLC de los constituyentes individuales del extracto soluble en metanol de la resina comercial de *Ipomoea purga*.

4. HIPÓTESIS.

El extracto soluble en metanol de la resina comercial de *Ipomoea purga* presenta un alto contenido en resinas glicosídicas, las cuales pueden ser aisladas y purificadas mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) a través de la técnica de corte de núcleo en combinación con las técnicas de rasurado de pico y reciclaje de muestra.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

Optimizar un procedimiento para la purificación mediante HPLC en escala preparativa de los constituyentes mayoritarios de un extracto metanólico obtenido a partir de la resina comercial de *Ipomoea purga*.

5.2 Objetivos específicos.

- Obtener el extracto soluble en metanol a partir de la resina comercial de *Ipomoea purga*.
- Establecer las condiciones instrumentales en la cromatografía de líquidos de alta eficiencia a nivel analítico que permitan la máxima separación de los constituyentes mayoritarios del extracto soluble en metanol.
- Escalar las condiciones instrumentales de nivel analítico a nivel preparativo para el aislamiento de los componentes mayoritarios del extracto soluble en metanol de la resina comercial de *Ipomoea purga* en cantidades que permitan su elucidación estructural.
- Purificar las fracciones aisladas mediante la técnica de “reciclaje y rasurado de pico”.
- Realizar la elucidación estructural de los compuestos aislados y purificados.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

6.1 Procedimientos generales.

6.1.1 Métodos cromatográficos.

Mediante el uso de la cromatografía en capa fina, se diagnosticó la presencia de resinas glicosídicas. Las placas utilizadas se constituyen de aluminio recubiertas con gel de sílice (sílica gel F₂₅₄, Merck), que se eluyeron con una solución de diclorometano:metanol (4:1). El revelado de las placas cromatográficas se llevó a cabo por degradación oxidativa térmica a 80 °C con una mezcla de H₂SO₄-Ce(SO₄)₂ (sulfato cérico) como agente cromógeno.

Para la separación y la purificación de las fracciones mediante HPLC, se utilizó un cromatógrafo marca Waters compuesto de un sistema de liberación de disolventes 600 E, equipado con un detector de índice de refracción modelo 414 integrado a un equipo de computo (Optiplex GX-280, Dell). De manera adicional, el cromatógrafo contó con una válvula para la recirculación del analito y el disolvente en línea. El control del equipo, la adquisición y el procesamiento de la información cromatográfica fueron realizados por el software Empower 2 (Waters).

6.1.2 Material vegetal.

Muestra comercial de las raíces pulverizadas de *Ipomoea purga* obtenida de los laboratorios Mixim, S.A. de C.V. México.

6.1.3 Preparación del extracto orgánico.

Se llevó a cabo la maceración exhaustiva de 630.4 g de la muestra seca y pulverizada utilizando metanol como disolvente de extracción. El extracto obtenido se filtró y el filtrado fue secado a presión reducida. El peso del extracto seco fue de 63.4 g. Posteriormente, sobre el extracto pulverizado se realizaron tres lavados sucesivos con agua desionizada mediante un sonicador Fisher Scientific FS1104. Los lavados

realizados permiten optimizar el desecho de azúcares simples, proteínas y sales, es decir, los compuestos de mayor polaridad solubles en agua. El producto de los lavados se secó a presión reducida, se pesó y la cantidad obtenida fue de 60.23 g del extracto.

6.2 Reacción de acetilación.

Se disolvió una cantidad de 8 mg de una de las fracciones aisladas (por HPLC) del extracto en 145 μ L de piridina y 290 μ L de anhídrido acético. La mezcla permaneció en agitación a temperatura ambiente durante 48 horas. Concluido el tiempo de la reacción, se midieron volúmenes de 2 mL de agua destilada y acetato de etilo, ambos se adicionaron a la mezcla de reacción para su posterior agitación durante cinco minutos. Las fases orgánica y acuosa fueron separadas mediante un embudo de separación. Sobre la fase acuosa, se realizaron dos extracciones sucesivas utilizando 2 mL de acetato de etilo. Se adicionó (2×4 mL) una disolución de HCl 1 N a la fase orgánica, posteriormente, ésta se lavó con (2×400 mL) una disolución saturada de NaHCO₃. Finalmente, la fase orgánica obtenida de ambos tratamientos fue tratada con 4 mL de agua destilada, se separó y se le adicionó Na₂SO₄ anhidro para secar; por último, se concentró a presión reducida y se obtuvo una cantidad de 9.4 mg de fracción acetilada; a partir de la misma se realizó el análisis por HPLC.

6.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia a nivel analítico.

Se realizaron diversas pruebas por HPLC utilizando una columna analítica, haciendo modificaciones en la constitución de la fase móvil, tanto en proporción como en los disolventes utilizados (**Cuadro 6**), de igual forma se cambió la fase estacionaria (**Cuadro 5**) a fin de obtener las condiciones óptimas de separación de los constituyentes mayoritarios de la muestra.

Cuadro 5. Columnas utilizadas a nivel analítico.

Tipo de columna	Dimensiones	Tamaño de partícula	Marca
Octadecilsilano (C-18)	4.6 × 250 mm	5 µm	Waters Symmetry®C18
Amino-propil-silano (NH ₂)	10 × 150 mm	5 µm	Waters YMC
Amino-propil-silano (*NH ₂)	3.9 × 300 mm	10 µm	Waters Bondpack

Cuadro 6. Condiciones cromatográficas (nivel analítico) para el fraccionamiento del extracto orgánico.

Tipo de columna	Fase Móvil	Flujo y sensibilidad	Concentración de la muestra	Volumen de inyección	Detector
C-18	MeCN/H ₂ O 9:1	0.4 mL min ⁻¹ 1024 RIU	0.02 mg µL ⁻¹	20 µL	IR
C-18	MeCN/H ₂ O 3:1	0.4 mL min ⁻¹ 1024 RIU	0.02 mg µL ⁻¹	20 µL	IR
C-18	MeCN/H ₂ O 1:1	0.4 mL min ⁻¹ 1024 RIU	0.02 mg µL ⁻¹	20 µL	IR
C-18	MeCN/H ₂ O 3:7	0.4 mL min ⁻¹ 1024 RIU	0.02 mg µL ⁻¹	20 µL	IR
C-18	MeOH	0.4 mL min ⁻¹ 1024 RIU	0.02 mg µL ⁻¹	20 µL	IR
C-18	MeOH/H ₂ O 3:2	0.4 mL min ⁻¹ 1024 RIU	0.02 mg µL ⁻¹	20 µL	IR
C18	MeOH/H ₂ O 9:1	0.4 mL min ⁻¹ 1024 RIU	0.02 mg µL ⁻¹	20 µL	IR
C-18	MeCN/H ₂ O 4:1	0.4 mL min ⁻¹ 1024 RIU	0.02 mg µL ⁻¹	20 µL	IR
*NH ₂	MeCN/H ₂ O 7:3	0.4 mL min ⁻¹ 1024 RIU	0.02 mg µL ⁻¹	20 µL	IR
*NH ₂	MeCN/H ₂ O 1:1	0.4 mL min ⁻¹ 1024 RIU	0.02 mg µL ⁻¹	20 µL	IR
NH ₂	MeCN/H ₂ O 7:3	0.4 mL min ⁻¹ 1024 RIU	0.02 mg µL ⁻¹	20 µL	IR
NH ₂	MeCN/MeOH 9:1	0.4 mL min ⁻¹ 1024 RIU	0.02 mg µL ⁻¹	20 µL	IR
NH ₂	MeCN/H ₂ O 1:9	0.4 mL min ⁻¹ 1024 RIU	0.02 mg µL ⁻¹	20 µL	IR

Se seleccionaron las condiciones cromatográficas que a nivel analítico mostraron la mejor separación de la muestra analizada (**Cuadro 7**) para su posterior extrapolación a la condiciones cromatográficas en escala preparativa.

Cuadro 7. Condiciones cromatográficas a nivel analítico.

Columna	Fase reversa C ₁₈ , Symmetry sílica octadecilsilano (250 × 4.6 mm × 5 μm) Waters
Fase móvil	MeCN-H ₂ O (9:1)
Flujo	0.4 mL min ⁻¹
Detector	Índice de refracción
Temperatura del detector	40 °C
Sensibilidad	1024
Concentración de la muestra	0.02 mg μL ⁻¹
Disolvente	MeOH
Volumen de inyección	20 μL
Tipo de elución	Isocrática

Una vez realizados los ensayos analíticos (**Cuadro 6**), teniendo en cuenta que los compuestos a separar son de alta polaridad en función de su propia solubilidad en metanol, se decidió eliminar la posibilidad de la existencia de algún traslape entre la señal observada con el detector de índice de refracción que fuese debida al disolvente (metanol) con señales generadas por compuestos químicos pertenecientes al extracto cuyos tiempos de retención fuesen similares al tiempo de retención del metanol en la condiciones de trabajo establecidas, por lo que de manera independiente el extracto

seco se disolvió en una solución binaria de MeOH:H₂O (4:1). Para de ésta manera utilizar la misma mezcla de disolventes como fase móvil, lo que permitió realizar los ensayos por HPLC en escala preparativa.

6.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia a nivel preparativo.

El escalamiento de las condiciones cromatográficas a nivel preparativo se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$F_p = F_a \left(\frac{l_p}{l_a} \right) \left(\frac{d_p^2}{d_a^2} \right)$$

De donde:

F_p= flujo de trabajo (mL min⁻¹) con la columna preparativa

F_a= flujo de trabajo (mL min⁻¹) con la columna analítica

l_p= longitud de la columna preparativa

l_a= longitud de la columna analítica

d_p= diámetro interno de la columna preparativa

d_a= diámetro interno de la columna analítica

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas a nivel preparativo (**Cuadro 8**), mediante la técnica de corte de núcleo y reciclaje de la muestra se realizó el aislamiento y la purificación de los constituyentes individuales del extracto soluble en metanol.⁵⁹

Cuadro 8. Condiciones cromatográficas a nivel preparativo.

Columna	Fase reversa C ₁₈ , Symmetry sílicaoctadecilsilano(300 × 19 mm × 7 μm) Waters
Fase móvil	MeCN-H ₂ O (9:1)
Flujo	8 mL min ⁻¹
Detector	Índice de refracción
Temperatura del detector	40 °C
Sensibilidad	1024 RIU
Concentración de la muestra	0.1 mg μL ⁻¹
Disolvente	MeOH
Volumen de inyección	500 μL
Tipo de elución	Isocrática

De manera similar, se estableció para el ensayo experimental que consistió en disolver el extracto seco en una mezcla binaria de MeOH-H₂O (4:1) (fase móvil), un flujo de trabajo de 6 mL min⁻¹ sin cambio en el resto de las condiciones instrumentales (**Cuadro 8**).

6.5 Determinación de las constantes físicas y propiedades espectroscópicas y espectrométricas.

Para la determinación de los puntos de fusión de los compuestos químicos purificados se utilizó un aparato Fisher-Jhons. La determinación de la rotación óptica se llevó a cabo con un polarímetro modelo Perkin-Elmer 341, con metanol como disolvente.

La obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H) y de carbono (^{13}C) se realizó mediante un equipo Varian Innova a una frecuencia de 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C . Las muestras se registraron en metanol deuterado (CD_3OD) y los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm tomando como referencia interna la señal del tetrametilsilano (TMS).

Los espectros de masas de baja resolución se registraron en un aparato Waters Acquity UPLC clase H (Waters Co., Milford, MA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de masas cuadrupolo simple SQD2 (Waters Co., Milford, MA, USA) con una cámara de ionización por electrospray (ESI). La inyección de la muestra se realizó por introducción directa en metanol a una concentración de 2 mg mL^{-1} , con un volumen de inyección de $10 \mu\text{L}$. El espectrómetro de masas SQD2 fue acondicionado para detectar iones entre 150 y 2000 m/z . El voltaje para ambos modos de ionización positivo y negativo fue de 3.7 kV, con nitrógeno como gas nebulizador a 25 bar junto con un gas auxiliar a 5 bar.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Preparación del extracto.

Se obtuvieron 60.23 g del extracto soluble en metanol libre de fracción soluble en agua; una parte se fraccionó mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia a nivel preparativo. Cada una de las fracciones colectadas se purificó mediante la técnica de rasurado de pico y reciclaje de muestra.³⁰

7.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia a nivel analítico.

Las condiciones analíticas de elución (isocrática) seleccionadas (véase, **Cuadro 7** desarrollo experimental), en donde se observó una mejor separación, permitieron la obtención de once picos (**Cuadro 9**) que corresponden a las fracciones primarias separadas y enriquecidas mediante HPLC a nivel preparativo.

Cuadro 9. Fracciones separadas mediante HPLC a nivel analítico.

Fracción	Tiempo de retención (minutos)
1	4
2	6.3
3	7.7
4	10.2
5	12
6	15.5
7	20
8	22.5
9	25.5
10	29
11	33.7

De igual manera, se observaron 2 picos mayoritarios (**Figura 12**) generados por el ensayo que consistió en disolver el extracto seco en una solución binaria de MeOH:H₂O (4:1); en el cual la misma mezcla de disolventes se utilizó como fase móvil.

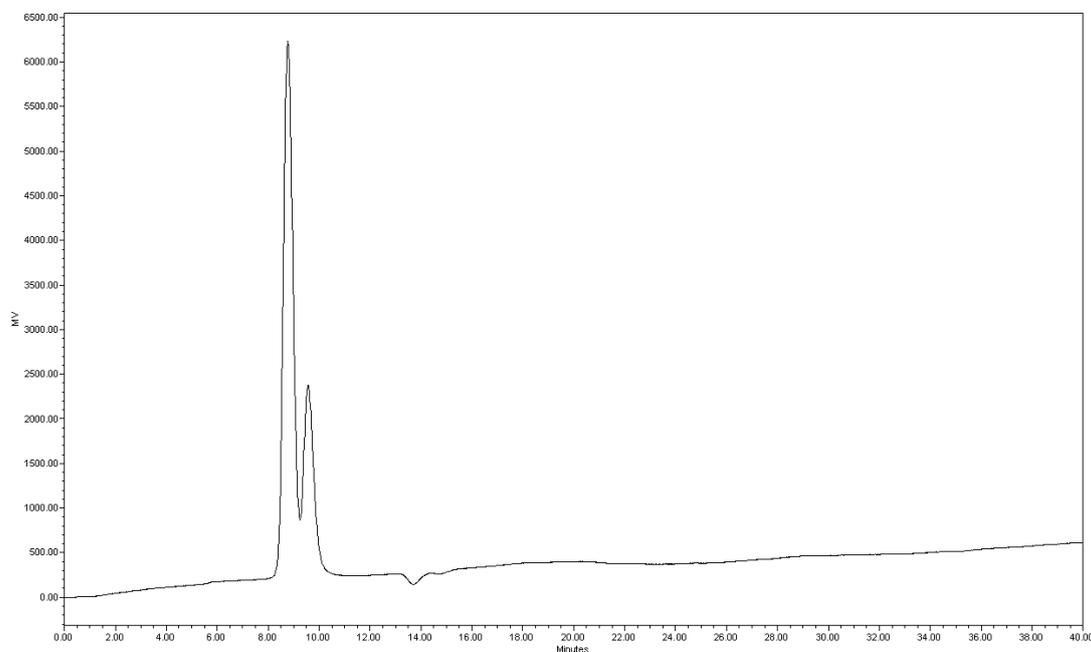


Figura 12. Cromatograma obtenido mediante HPLC a nivel analítico usando como disolvente del extracto seco la misma fase móvil de trabajo. Condiciones instrumentales: columna C₁₈ (250 × 4.6 mm × 5 μm); fase móvil: MeOH:H₂O (4:1); flujo: 0.4 mL min⁻¹; detector IR; volumen de inyección de la muestra: 20 μL (0.4 mg).

7.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia a nivel preparativo.

Las condiciones cromatográficas a nivel analítico fueron extrapoladas a nivel preparativo (Véase **Cuadro 8** desarrollo experimental). De esta manera, se llevó a cabo la separación de los componentes mayoritarios (**Figura 13**).

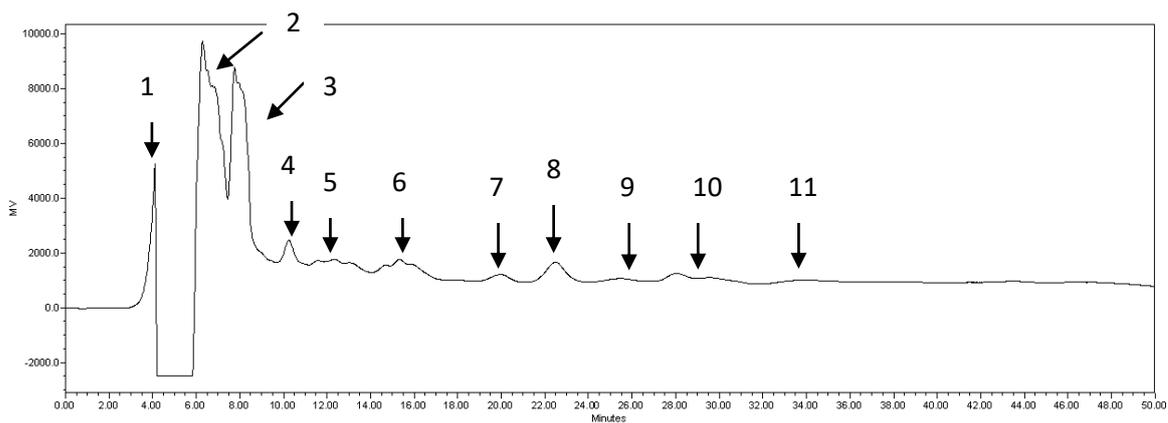


Figura 13. Cromatograma obtenido mediante HPLC a nivel preparativo. Condiciones instrumentales: Columna C_{18} ($300 \times 19 \text{ mm} \times 7 \mu\text{m}$), fase móvil: MeCN- H_2O , 9:1; flujo: 8 mL min^{-1} ; detector IR; volumen de inyección de la muestra disuelta en metanol: $500 \mu\text{L}$ (50 mg).

A partir de los fraccionamientos que se realizaron por medio de inyecciones sucesivas del extracto soluble en metanol obtenido inicialmente, se obtuvieron diferentes cantidades de cada fracción (**Cuadro 10**).

Cuadro 10. Cantidad obtenida de cada eluato.

Fracción	Cantidad obtenida (mg)
1	5
2	310
3	11.3
4	15.2
5	6.9
6	5.9
7	35.3
8	11.9
9	9.7
10	8.5
11	43.1

A partir de las fracciones obtenidas por cromatografía de líquidos de alta eficiencia a nivel preparativo (**Cuadro 10**), se purificaron las que fueron rotuladas como 4, 7 y 11 (**Figuras 14, 15 y 16**). Cada fracción se reinyectó utilizando las técnicas de sobrecarga de columna y corte de núcleo, en combinación con el rasurado y reciclaje de pico.

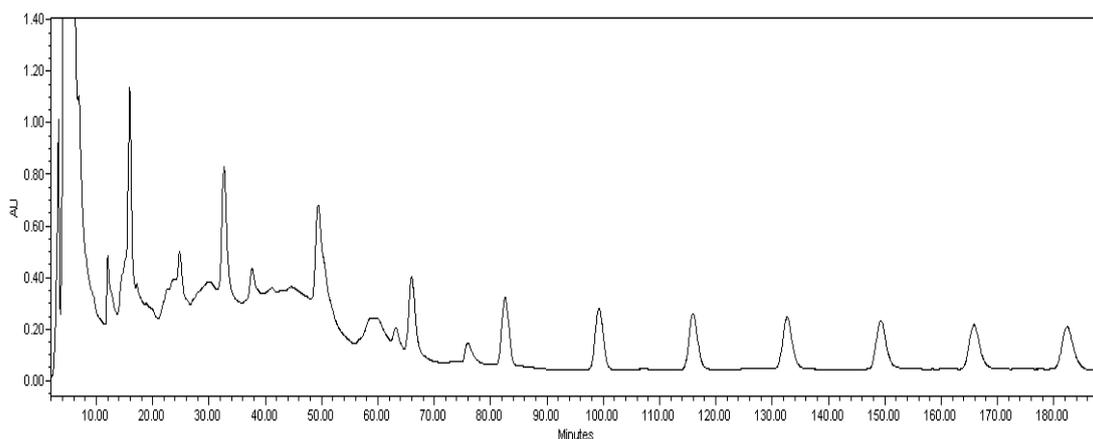


Figura 14. Purificación de la fracción 4, mediante “rasurado de pico” y “reciclaje de muestra”. Condiciones instrumentales: Columna C_{18} ($300 \times 19 \text{ mm} \times 7 \mu\text{m}$); fase móvil: $\text{MeCN-H}_2\text{O}$ 9:1; flujo: 8 mL min^{-1} ; detector UV; volumen de inyección de la muestra: $200 \mu\text{L}$ (15 mg).

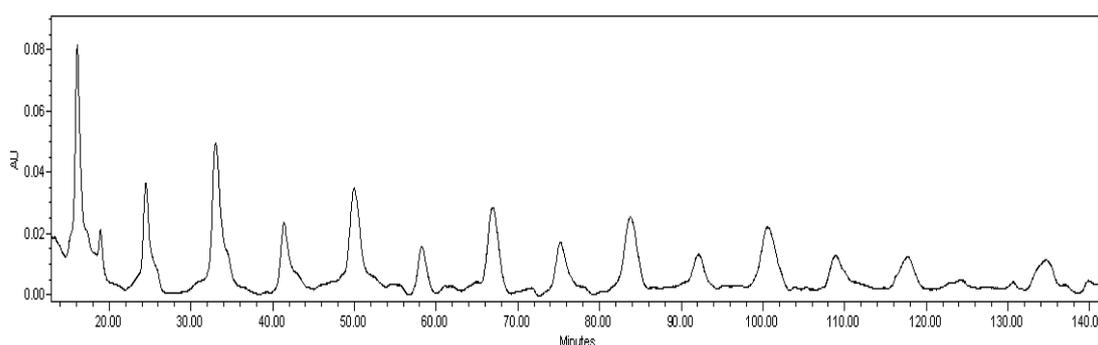


Figura 15. Purificación de la fracción 7 mediante “rasurado de pico” y “reciclaje de muestra”. Condiciones instrumentales: Columna C_{18} ($300 \times 19 \text{ mm} \times 7 \mu\text{m}$); fase móvil: $\text{MeCN-H}_2\text{O}$ 9:1; flujo: 8 mL min^{-1} ; detector UV; volumen de inyección de la muestra: $200 \mu\text{L}$ (15 mg).

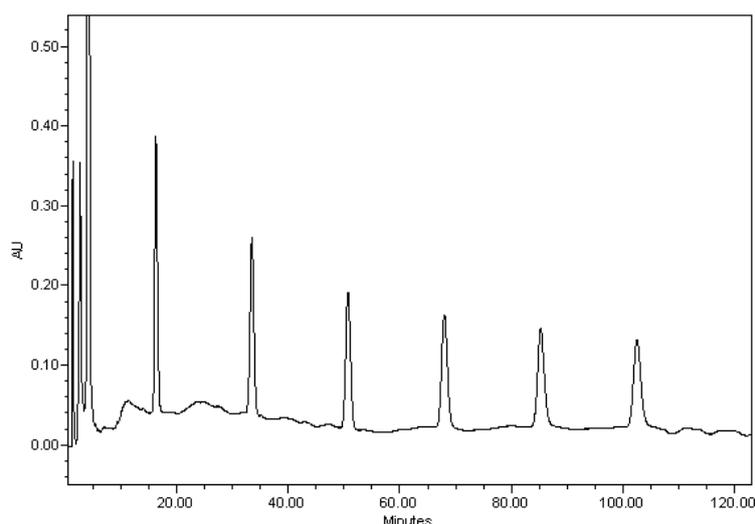


Figura 16. Purificación de la fracción 11 mediante “rasurado de pico” y “reciclaje de muestra”. Condiciones instrumentales: Columna C₁₈ (300 × 19 mm × 7 μm), flujo: 8 mL min⁻¹; fase móvil: MeCN-H₂O, 9:1; detector UV; volumen de inyección de la muestra: 200 μL (15 mg).

En cuanto al extracto seco disuelto en la mezcla de disolventes que se usó como fase móvil (metanol-agua, 4:1), se obtuvieron dos fracciones mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia a nivel preparativo (**Figura 17**). La fracción minoritaria, debido a su bajo rendimiento (**Cuadro 11**), se sometió a una reacción de acetilación con la finalidad de incrementar el rendimiento en peso y de esta forma optimizar su purificación. La fracción mayoritaria se purificó sin derivatizar, al igual que las fracciones purificadas en donde se utilizó como fase móvil una solución binaria constituida por acetonitrilo-agua (9:1).

Cuadro 11. Cantidad obtenida de cada fracción, después de inyectar de manera sucesiva la muestra disuelta previamente en la misma fase móvil de trabajo (MeOH-H₂O, 4:1).

Fracción	Tiempo de retención (minutos)	Cantidad (mg)
1	6.2	62.9
2	7.7	8

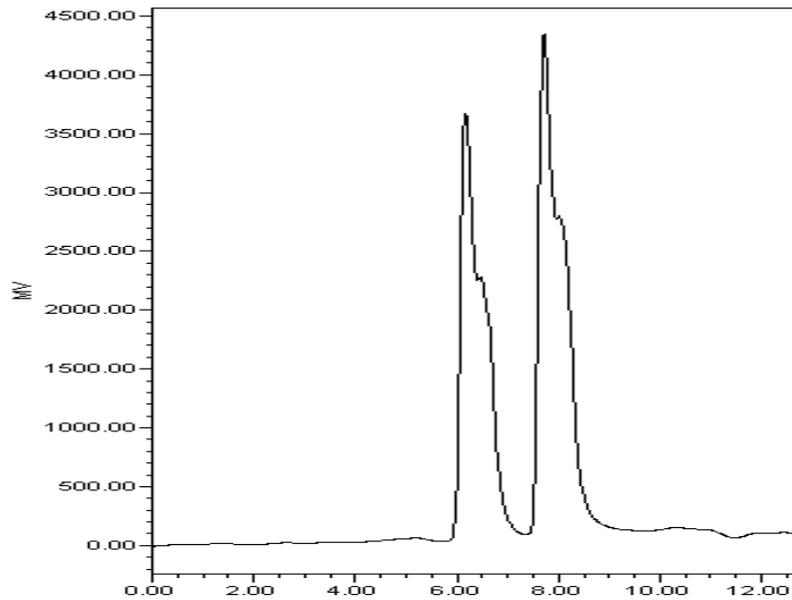


Figura 17. Cromatograma obtenido mediante HPLC a nivel preparativo, utilizando como disolvente de la muestra la misma fase móvil de trabajo (MeOH-H₂O, 4:1). Condiciones instrumentales: Columna C₁₈ (300 × 19 mm × 7 μm), flujo: 6 mL min⁻¹; detector IR; volumen de inyección de la muestra: 500 μL (25 mg).

Se llevó a cabo la purificación de las dos fracciones obtenidas (**Figura 17**) mediante la técnica de reciclaje (**Figuras 18 y 19**).

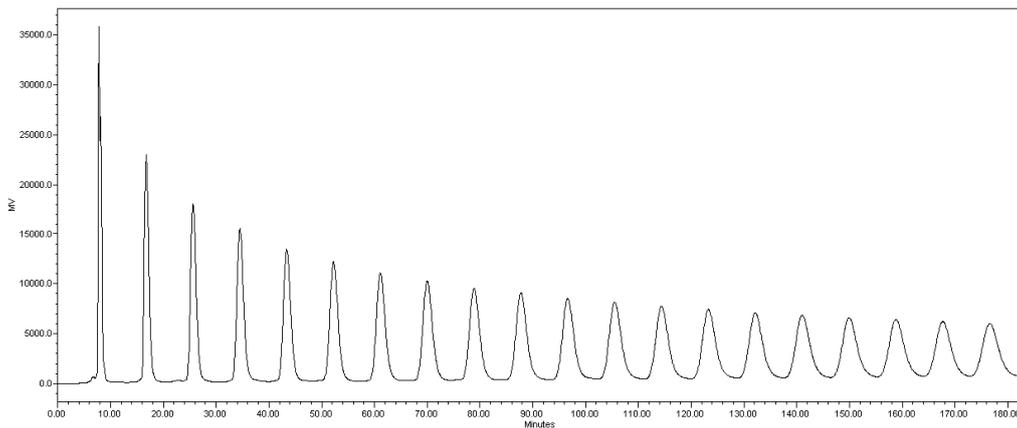


Figura 18. Purificación de la fracción 1(**Figura 17**), mediante “rasurado de pico” y “reciclaje de muestra”. Condiciones instrumentales: Columna C₁₈ (300 × 19 mm × 7 μm), fase móvil: MeOH-H₂O (4:1); flujo: 6 mL min⁻¹; detector IR; volumen de inyección de la muestra: 200 μL (15 mg).

Para la purificación de la fracción 2 (**Figura 17**), previamente se llevó a cabo una reacción de acetilación logrando aumentar su rendimiento en peso. A partir de una cantidad de 8 mg de fracción intacta, se obtuvieron 9.4 mg de fracción acetilada. Subsecuentemente, esta fracción fue sometida a un proceso de reciclaje (**Figura 19**).

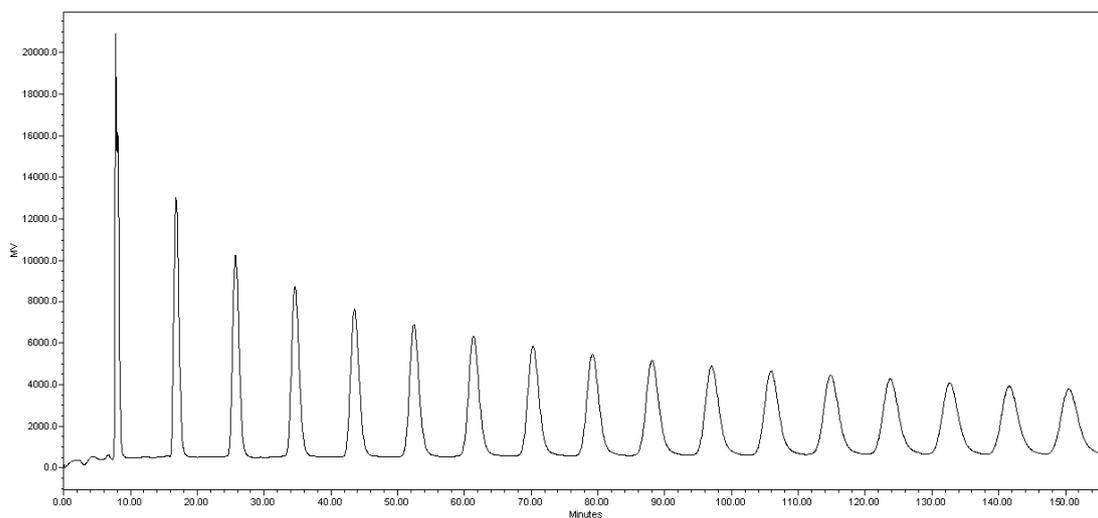


Figura 19. Purificación de la fracción 2 (**Figura 17**) acetilada, mediante “rasurado de pico” y “reciclaje de muestra”. Condiciones instrumentales: Columna C₁₈ (300 × 19 mm × 7 μm); fase móvil: MeOH; flujo: 8 mL min⁻¹; detector IR; volumen de inyección de la muestra: 200 μL (15 mg).

7.4. Análisis estructural de las fracciones purificadas.

En el espectro de masas (ESI-MS) de baja resolución de la fracción 4, se observó un pico característico de la especie $[M + H]^+$ de m/z 1705 (**Figura 20**), que coincide con la especie $[M + H]^+$ previamente registrada para el jalapinósido II.²⁹ El reciclaje de esta muestra permitió la purificación de este principio en cantidades suficientes para registrar sus espectros de resonancia magnética nuclear. El **cuadro 12** resume las constantes espectroscópicas en la resonancia magnética nuclear ¹H (**Figura 21**) y ¹³C (**Figura 22**) registradas para el jalapinósido II.

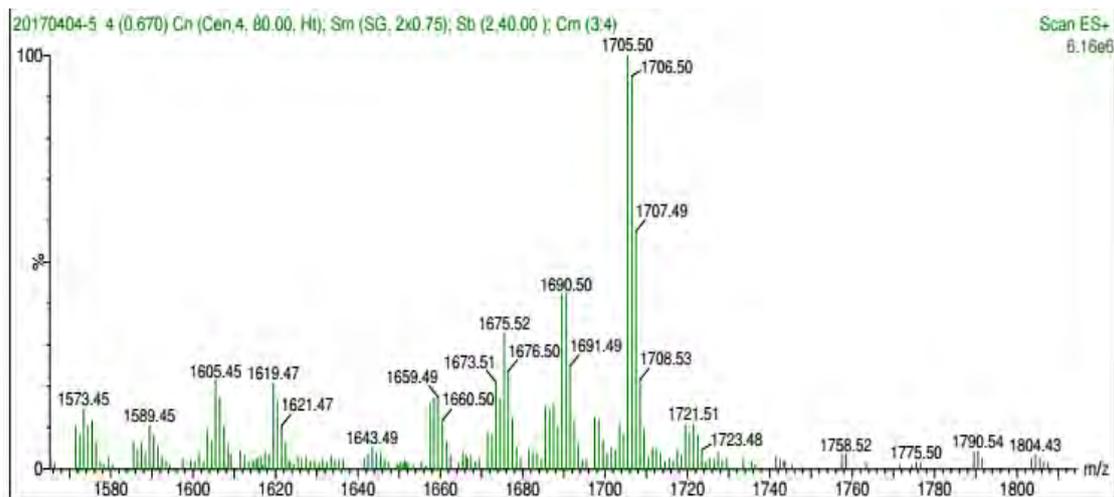


Figura 20. Espectro de masas de baja resolución (ESI-MS modo positivo) del componente purificado de la fracción 4.

El espectro de masas de la fracción 7 mostró un ion de m/z 1689 $[M + H]^+$ (**Figura 23**) que corresponde a una diferencia de 16 uma (un átomo de oxígeno) con el pico mayoritario de la fracción 4 y, por lo tanto, es probable que la unidad de ácido nílico corresponda a un metilbutirato como en el jalapínosodio I (**Figura 24**).³⁰

Cuadro 12. Constantes espectroscópicas de RMN ^1H (700 MHz) y ^{13}C (175 MHz) del jalapínosido II (Fracción 4) en piridina- d_5 (δ en ppm, J en Hertz).

Posición	δ_{H}	δ_{C}	Posición	δ_{H}	δ_{C}
Qui-1	4.90 d (7.6)	103.0	Fuc-1	5.78 d (7.8)	102.1
2	4.27-4.22 ^a	80.4	2	4.27-4.23 ^a	74.3
3	4.79 dd (8.8, 7.6)	78.5	3	5.96 d (7.8)	74.1
4	3.55 dd (9.9, 7.6)	77.2	4	4.33-4.27 ^a	73.6
5	3.92 dd (9.9, 6.2) ^a	72.6	5	3.68 m	77.7
6	1.55 d (6.2)	18.3	6	1.66 d (6.0)	18.8
Glc-1	5.86 d (7.8)	101.7	Qui''-1	4.82 d (7.7)	103.5
2	4.23-4.27 ^a	75.6	2	4.05-3.99 ^a	75.6
3	5.98 dd (7.7, 7.7) ^a	74.1	3	4.17 dd (8.8, 8.0)	78.2
4	4.33-4.28 ^a	69.4	4	4.50-4.47 ^a	72.7
5	4.42 dd (8.0, 5.5)	63.1	5	3.75 dd (9.1, 6.2)	77.1
6a	5.70 dd (10.3, 3.2)	74.4	6	1.44 d (6.2)	16.4
6b	5.66 dd (10.3, 5.5)		Ipur-1		173.1
Rha-1	6.46 d (1.8)	97.0	2a	2.71 ddd (14.2, 8.8, 3.3)	43.4
2	5.91 dd (3.6, 1.8)	74.1	2b	2.73 ddd (14.2, 8.8, 3.3)	
3	5.50 dd (9.2, 3.6)	74.0	3	4.42-4.38 ^a	68.3
4	4.61 dd (9.5, 9.2)	80.1	11	3.92-3.88 ^a	81.1
5	5.20 dd (9.5, 6.2)	67.5	14	1.01 t (7.4)	11.9
6	1.96 d (6.2)	19.2	Ac-1		168.2
Glc'-1	6.37 d (7.8)	101.5	2	2.04 s	12.3
2	3.99-4.04 ^a	86.1	Mba-1		176.6
3	4.53 dd (9.0, 7.8)	72.7	2	2.64 ddd (7.0, 6.8, 2.5)	41.5
4	3.85 dd (9.5, 9.0)	72.4	2-Me	1.22 d (7.0)	16.9
5	4.34 dd (9.5, 7.2)	78.1	3-Me	0.96 t (7.1)	14.4
6a	4.55-4.49 ^a	62.9	Nla-1		175.2
6b	4.05-3.98 ^a		2	2.91 ddd (7.1, 7.1, 2.6)	48.9
Qui'-1	5.14 d (7.8)	107.1	2-Me	1.35 t (7.0)	21.1
2	4.10-4.03 ^a	75.9	3	4.38-4.30 ^a	69.3
3	5.38 dd (9.5, 9.5)	76.7	3-Me	1.22 d (7.0)	16.9
4	4.27-4.22 ^a	76.4	Dodeca-1		173.8
5	3.75 dd (9.1, 6.2)	77.1	2a	2.35 dd (15.6, 7.0)	34.3
6	1.74 d (6.2)	18.4	2b	2.27 dd (15.6, 6.8)	

^aSeñales sobrepuestas.

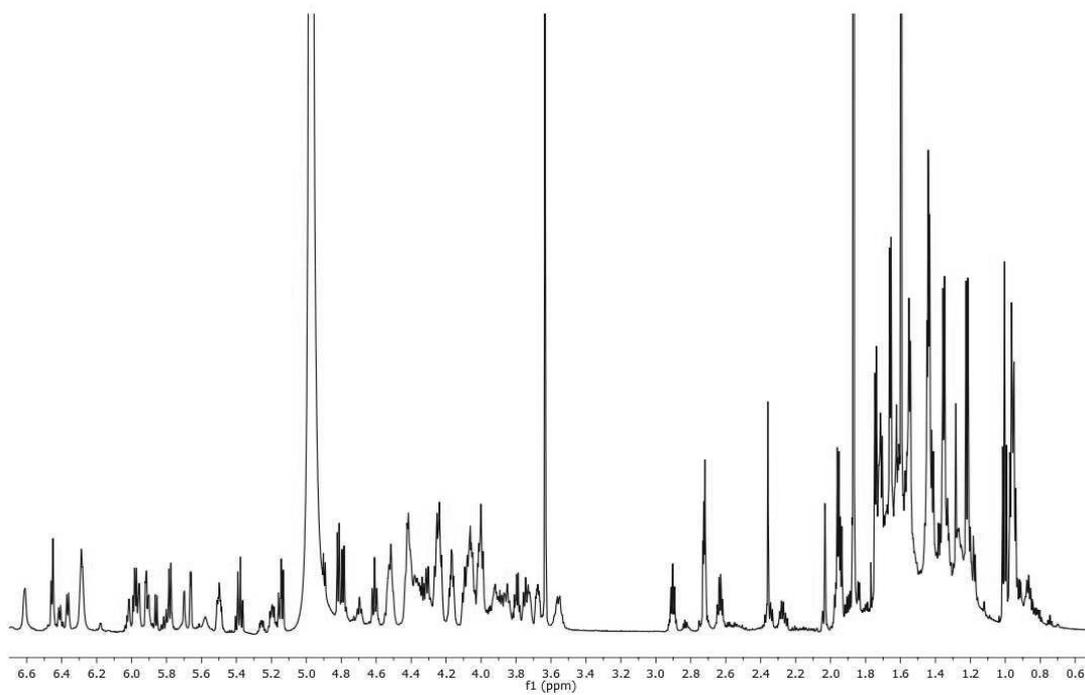


Figura 21. Espectro de RMN ^1H del jalapinosido II (700 MHz, piridina- d_5).

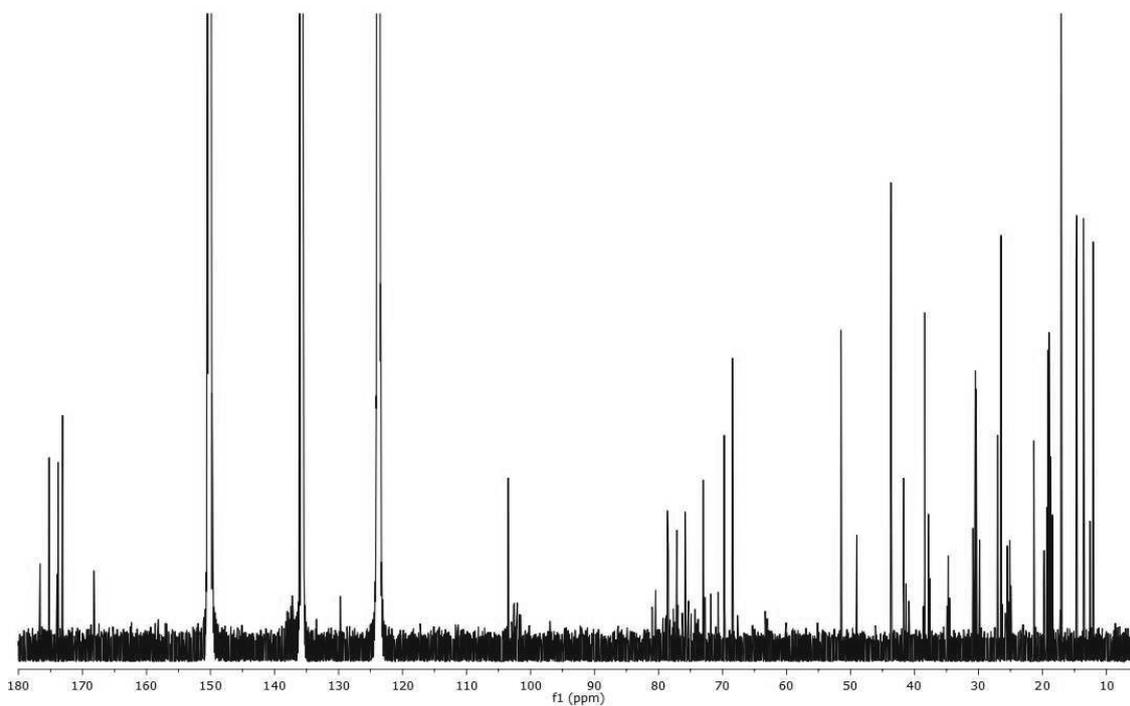


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C del jalapinosido II (175 MHz, piridina- d_5).

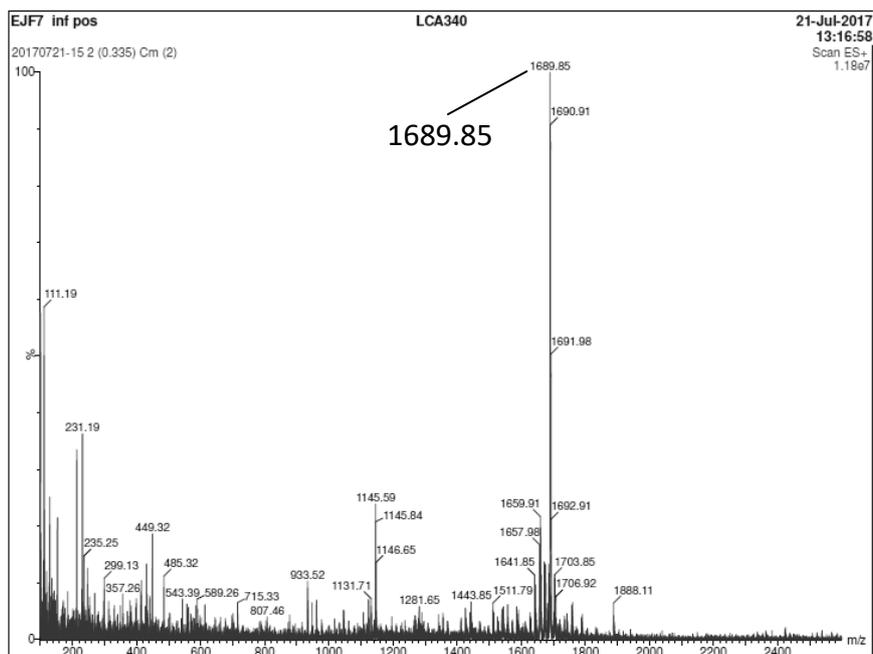


Figura 23. Espectro de masas de baja resolución (ESI-MS modo positivo) del componente purificado de la fracción 7.

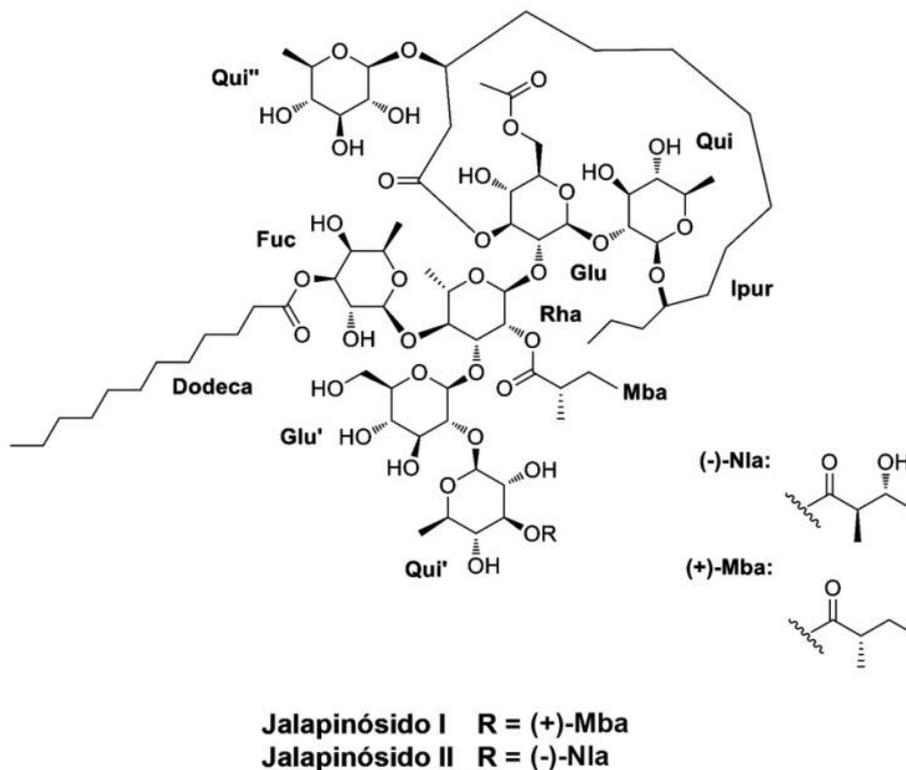


Figura 24. Estructura de los jalapinósidos I y II.

En el espectro de RMN ^1H de la fracción 7 (**Figura 25**), se observa un triplete en δ_{H} 0.95 con una constante de acoplamiento de 7.2 Hz ($^3J_{\text{H-H}}$) correspondiente al grupo metilo terminal del ácido graso que forma la aglicona; un triplete en δ_{H} 2.30 con una constante de acoplamiento de 7.8 Hz ($^3J_{\text{H-H}}$) que indica al metileno adyacente al grupo carbonilo del mismo ácido graso. En cuanto al núcleo oligosacárido, se observa un doblete en δ_{H} 1.37 ($^3J_{\text{H-H}} = 6.4$ Hz) que sugiere la presencia de una 6-desoxihexosa. De igual manera, se aprecia un cuarteto con δ_{H} 3.75 ($^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz) característico del protón H_5 de una unidad de D-fucosa. Finalmente, una señal ancha con δ_{H} 5.66 indica la presencia de un carbono anomérico de una unidad de L-ramnosa. Estas evidencias espectroscópicas sugieren una similitud estructural con el jalapínosido I y, por lo tanto, debe corresponder a un diastereoisómero del jalapínosido I. Es necesario registrar el espectro de RMN ^1H en un equipo de alta resolución (> 700 MHz) para mejorar la resolución y, de esta forma, conseguir una asignación adecuada de cada una de las unidades sacáridas del oligosacárido.

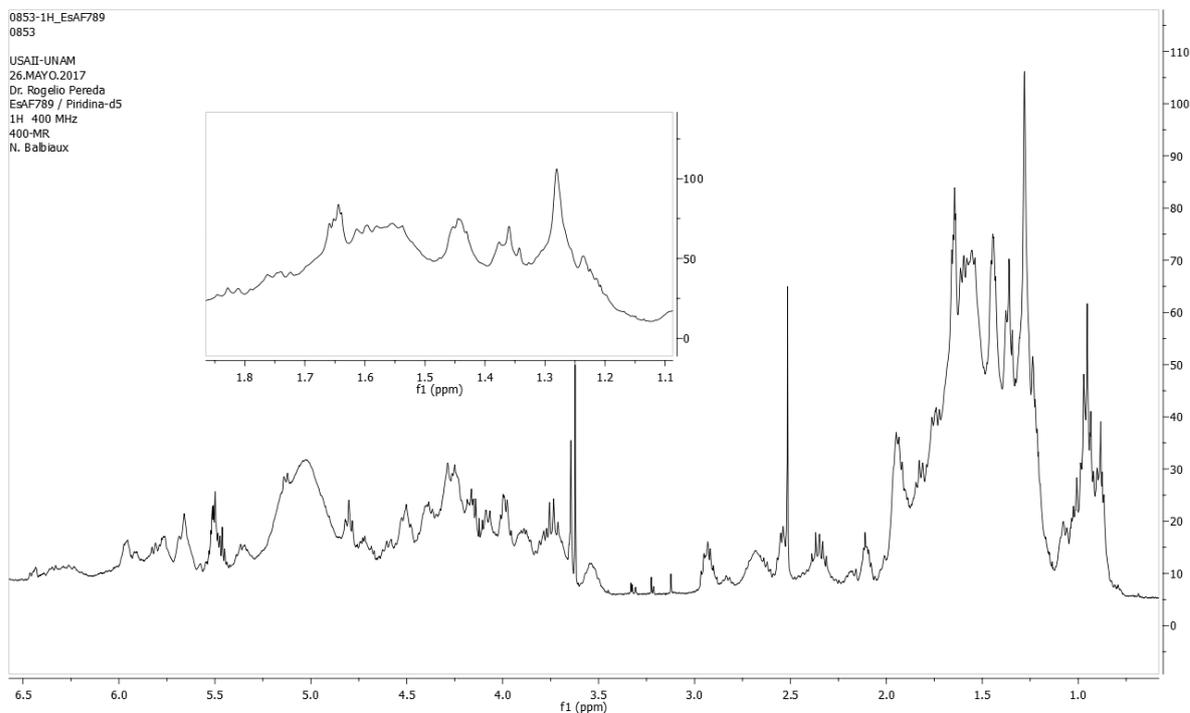


Figura 25. Espectro de RMN ^1H de la fracción 7 intacta purificada (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

En el espectro de RMN ^1H correspondiente a la fracción 11 (**Figura 26**) se observa un triplete δ_{H} 0.92 ($^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz) que indica la presencia de un grupo metilo terminal de la aglicona. Así mismo el triplete en δ_{H} 2.11 ($^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz) indica al carbono C_2 del ácido graso de la aglicona. En lo que respecta al núcleo oligosacárido, se observan señales dobles centradas entre 1.25 y 2.0 ppm, claramente 1.45 ppm ($^3J_{\text{H-H}} = 5.6$ Hz) y δ_{H} 1.65 ($^3J_{\text{H-H}} = 5.6$ Hz)] indicativas de unidades de 6-desoxihexosas. El doblete observado en δ_{H} 5.13 ($^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz) es diagnóstico del carbono anomérico de una unidad de D-fucosa, cuya presencia queda confirmada con el cuarteto observado en δ_{H} 3.74 ($^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz). Finalmente, la señal ancha δ_{H} 5.66 sugiere la presencia de un carbono anomérico de una unidad de L-ramnosa. El espectro de masas mostró un ion de m/z 1657 $[\text{M} + \text{H}]^+$ correspondiente a 32 unidades de masa (dos átomos de oxígeno) de diferencia del jalapinósido I (**Figura 27**).

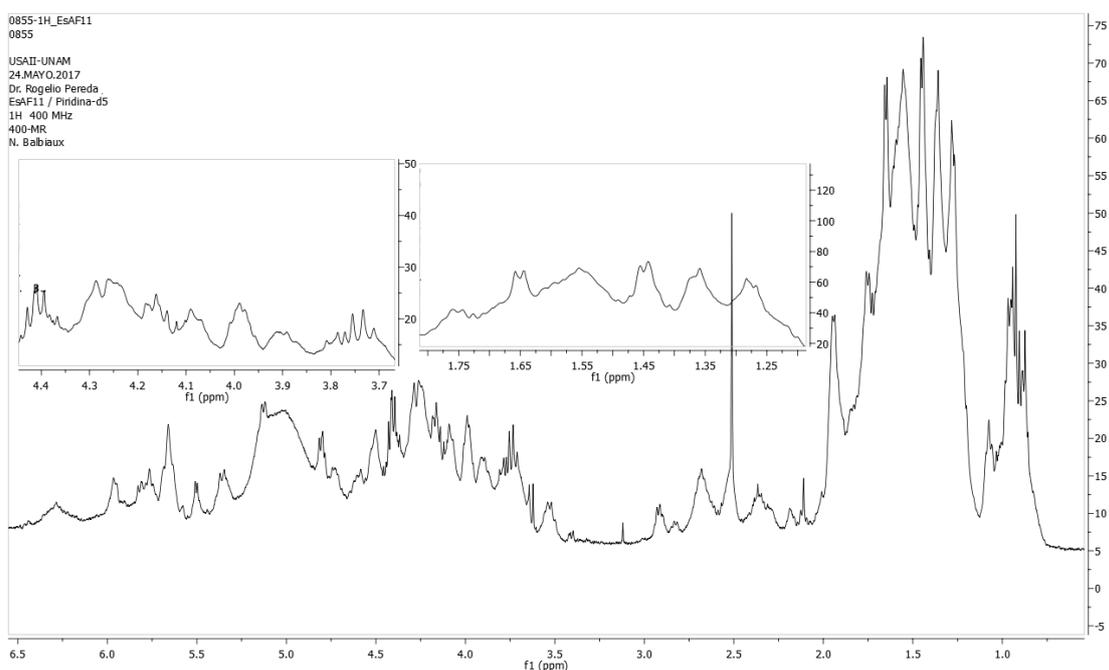


Figura 26. Espectro de RMN ^1H de la fracción 11 intacta purificada (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

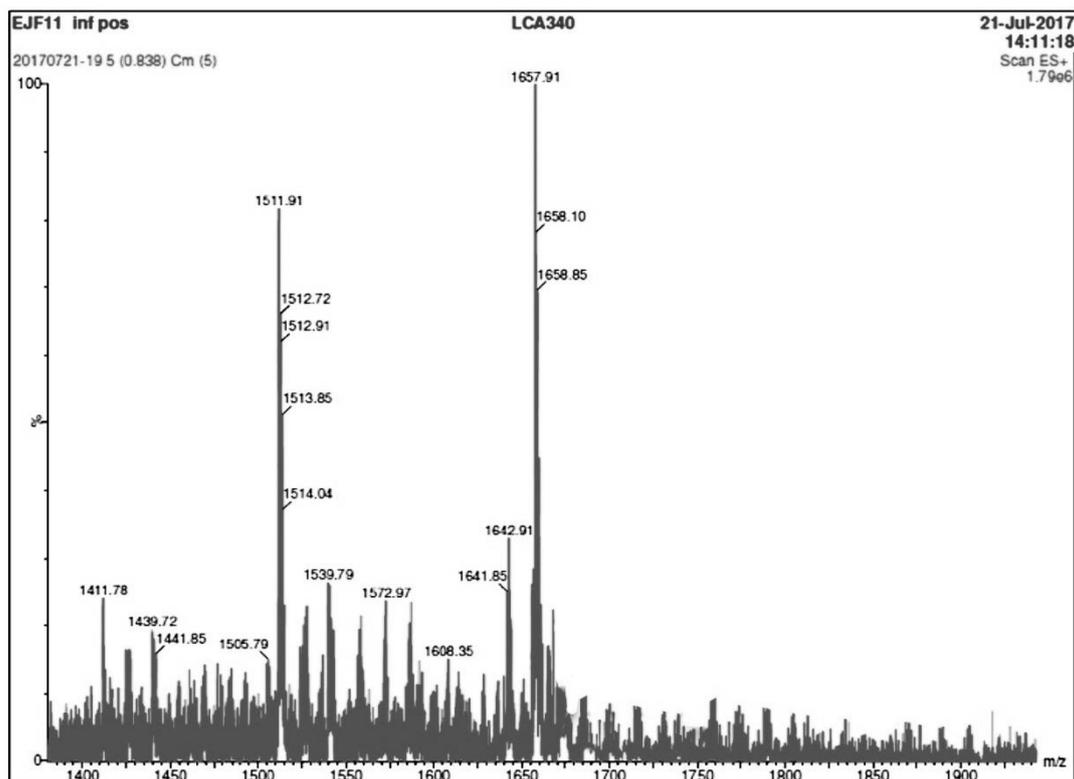


Figura 27. Espectro de masas de baja resolución (ESI-MS modo positivo) del componente purificado de la fracción 11.

En el espectro de RMN ^1H de la fracción 1 intacta (**Figura 28**), la cual fue aislada y purificada mediante el ensayo en el que se disolvió el extracto seco en una mezcla de MeOH:H₂O (4:1) (**Figura 18**), se observan las señales características que sugieren la presencia de la aglicona, es decir un triplete δ_{H} 0.92 ($^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz) que corresponde al grupo metilo terminal y un triplete en δ_{H} 2.32 ($^3J_{\text{H-H}} = 7.6$ Hz) referente a un metileno adyacente al carbono carbonilo del ácido graso que forma la aglicona. En relación al núcleo oligosacárido se sugiere la presencia de 3 unidades de 6-desoxihexosas por los dobletes observados en δ_{H} 1.10 ($^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz), δ_{H} 1.16 ($^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz) y δ_{H} 1.26 ($^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz); por último, se observan dos singuletes anchos en δ_{H} 4.57 y δ_{H} 5.1, los cuales son diagnóstico de dos unidades de L-ramnosa, finalmente un doblete en δ_{H} 4.28 ($^3J_{\text{H-H}} = 7.8$ Hz) indica al protón del carbono anomérico de una unidad de D-fucosa.

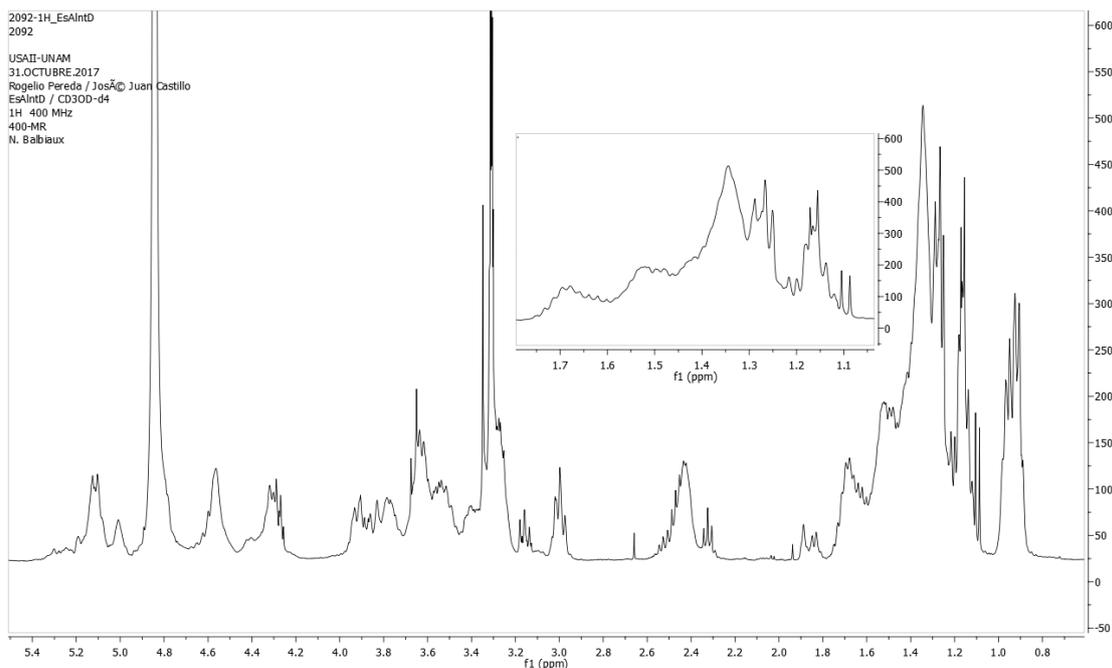


Figura 28. Espectro de RMN ^1H de la fracción 1 intacta que se obtuvo cuando se utilizó la fase móvil como disolvente de la muestra (400 MHz, CD_3OD).

El espectro de RMN ^1H de la fracción 2 acetilada (**Figura 29**), la cual fue aislada y purificada de la misma manera que la fracción 1 (**Figura 19**), muestra que es diferente a los espectros de RMN ^1H de las fracciones anteriores debido a que en la región δ_{H} 1.9-2.2 ppm se observan al menos 10 singuletes que corresponden a los grupos metilo en posición alfa al carbonilo de los residuos acetilo. Estas señales indican que la reacción de acetilación se llevó a cabo; de igual forma, se observan las señales características del ácido graso que forma la aglicona, es decir un triplete δ_{H} 0.98 ($^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz) que corresponde al grupo metilo terminal y un triplete en δ_{H} 2.80 ($^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz) correspondiente al metileno adyacente al carbono carbonilo. En lo que respecta al núcleo oligosacárido, se observan dos dobletes en la región de la ventana espectral característica para los grupos metilo de las 6-desoxihexosas δ_{H} 1.13 ($^3J_{\text{H-H}} = 6.8$ Hz) y δ_{H} 1.2 ($^3J_{\text{H-H}} = 6.0$ Hz), lo que sugiere que el núcleo oligosacárido está formado por al menos dos unidades de este tipo de monosacáridos. El doblete centrado en δ_{H} 5.16 ($^3J_{\text{H-H}} = 9.6$ Hz) es característico del protón perteneciente al carbono anomérico de una unidad de D-glucosa. Finalmente, los singuletes anchos centrados en δ_{H} 5.27 y δ_{H} 5.19 que corresponden a protones anoméricos de dos unidades de L-ramnosa.

En el espectro de RMN ^{13}C de la fracción 2 acetilada (**Figura 30**), la cual fue aislada y purificada utilizando la fase móvil de trabajo como disolvente de la muestra (**Figura 19**). Se pueden observar en la región de la ventana espectral δ_{C} 96-103 siete señales que corresponden a carbonos anoméricos, lo que sugiere que el compuesto corresponde a un bidesmósido de la serie homóloga de los jalapinósidos con un núcleo hexasacárido enlazado mediante un enlace glicosídico en C-11 con la aglicona que cuenta con una sustitución adicional en C-3 en donde se enlaza una quinovosa.

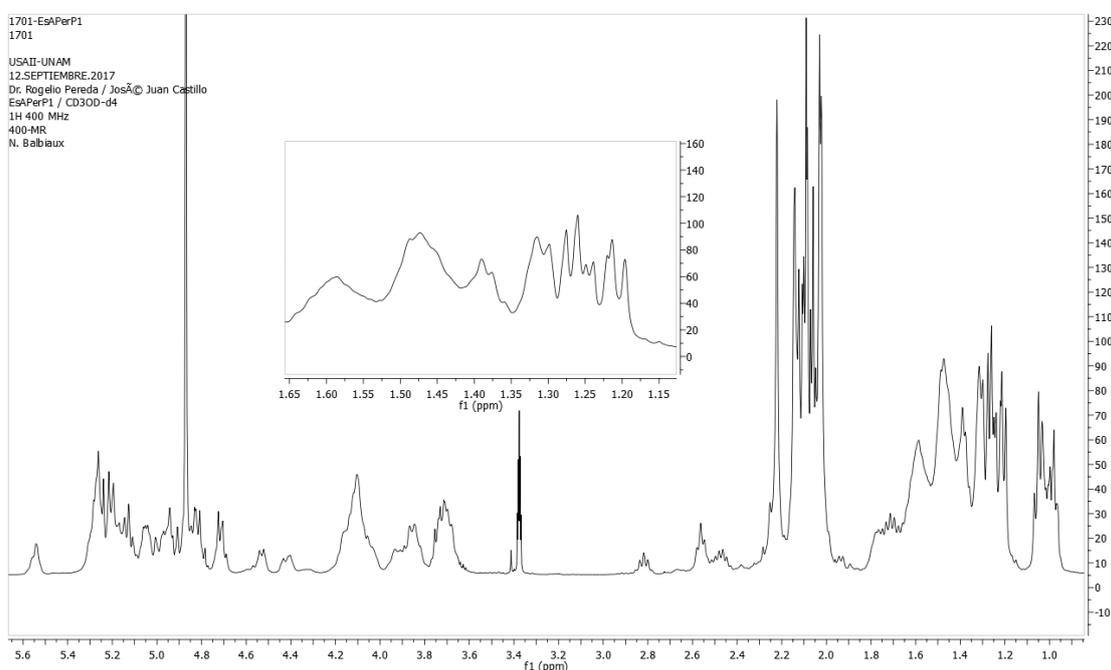


Figura 29. Espectro de RMN ^1H de la fracción 2 acetilada que se obtuvo cuando se utilizó la fase móvil como disolvente de la muestra (400 MHz, CD_3OD).

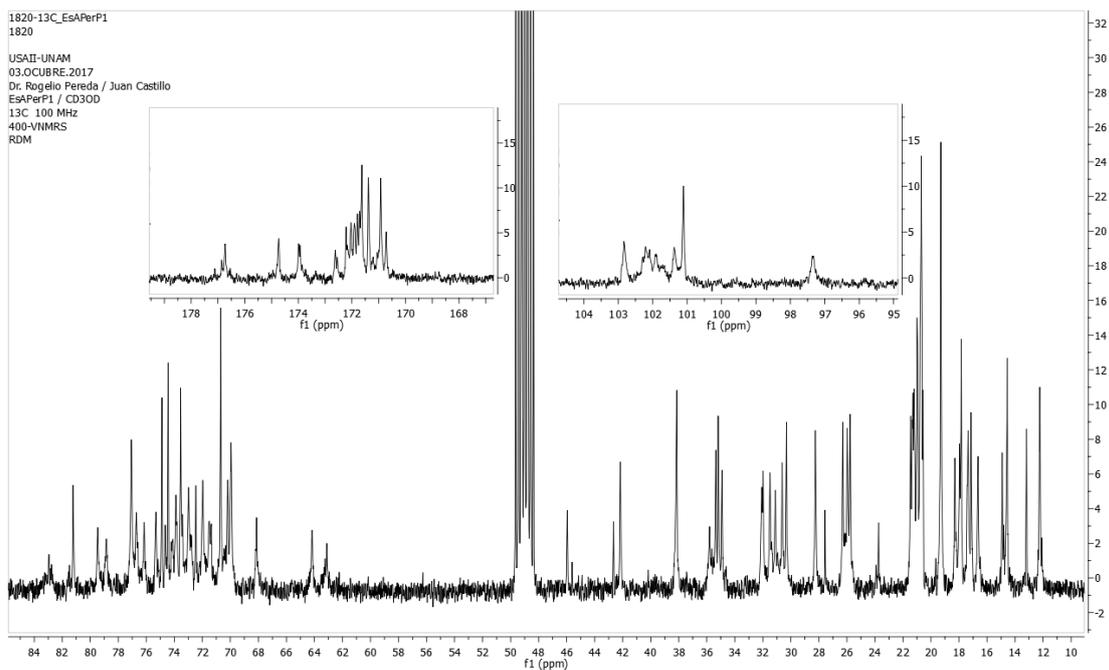


Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción 2 acetilada que se obtuvo cuando se utilizó la fase móvil como disolvente de la muestra (400 MHz, CD_3OD).

8. CONCLUSIONES.

- A partir de la resina comercial de la raíz de jalapa se obtuvo un extracto soluble en metanol que contiene resinas glicosídicas de alta polaridad.
- Mediante el desarrollo e implementación de técnicas analíticas en la cromatografía de líquidos de alta eficiencia tales como el “rasurado de pico”, “corte de núcleo” y “reciclaje de muestra”, así como la disponibilidad de muestra en cantidades a nivel semipreparativo, se puede llevar a cabo la resolución de mezclas complejas de resinas glicosídicas de alta polaridad que permitirán la obtención de cantidades significativas de los principios individuales en forma pura para su posterior caracterización estructural.
- La espectroscopia de resonancia magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C) mediante el número de señales denominadas anoméricas en la región δ_{C} 95-110, permite el diagnóstico estructural en cuanto a la cantidad de monosacáridos que constituyen el núcleo oligosacárido de las resinas glicosídicas.
- Las señales observadas en un espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) que se encuentran en la región δ_{H} 1.4-1.7 ppm corresponden a los protones de los grupos metilo de las 6-desoxihexosas, por lo que también pueden usarse como picos diagnóstico para la caracterización de la porción oligosacárida de las resinas glicosídicas.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Llorente-Bousquets, J., Ocegueda, S. (2008). Estado del conocimiento de la biota, en Capital natural de México, Conocimiento actual de la biodiversidad, Conabio, vol. I México, pp. 283-322.
2. Cox, P.A. (1994). The ethnobotanical approach to drug discovery: Strengths and limitations. En: Ethnobotany and the Search for New Drugs. Ciba Foundation Symposium 185. John Wiley and Sons, Gran Bretaña, pp. 25-41.
3. Langenhiem, J. (2003). Plants Resins. Chemistry, Evolution, Ecology and Ethnobotany., pp. 418.
4. Pereda-Miranda, R., Rosas-Ramírez, D., Castañeda-Gómez, J., (2010). Resin glycosides from the morning glory family, in: Kinghorn A, Falk H, Kobayashi J. (Eds.) Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, vol. 92. Springer Verlag, New York, pp. 77–153.
5. Buenz, E.J., Verpoorte, R., Bauer, B.A. (2018). The Ethnopharmacologic Contribution to Bioprospecting Natural Products. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 58, 19.1-19.2.
6. Eich, E. (2008), Solanaceae and Colvolvulaceae: Secondary Metabolites. Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance (A Handbook), p. 532.
7. Bruneton J. (1993) "Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes Medicinales". Paris: Techique et documentation-Lavoisier.
8. Perrusquia, M. Mendoza, S., Bye, R., Linares, E., Mata, R. (1995). Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *J. Ethnofarmacol.* 46, 63-69.
9. Martinez, M. (1959). Plantas útiles de la flora mexicana. Ed. Botas, pp. 539-542.
10. Cruz, de la, M., (1552). Libellus de Medicinalibus indorum herbis (código Cruz-Badiano). Pub. Del IMSS 1964. México.

11. Monardes, N. (1565). Historia Medicinal de las cosas que traen de nuestras Indias occidentales que sirven en Medicina. Sevilla.
12. Miranda, F.; Valdés, J. (1964) En Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis; Instituto Mexicano del Seguro Social: Ciudad de Mexico, pp 243-282.
13. Pedraza, R.A. (1981). La raíz de Jalapa: recurso tradicional mal aprovechado. Trabajo interno de la materia "Recursos Bióticos". Material no publicado. INIREB. México.
14. Linajes-Palacios, Juan A. (1991). La raíz de Jalapa *Ipomoea purga* (Wender.) Hayne (Convolvulaceae) en el municipio de Xico, Veracruz, México: su sistema de producción. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Veracruz México.
15. Linares, A., Rico-Gray, V., Carrión, G. (1994). Traditional Production System of the Root of Jalap, *Ipomoea purga* (Convolvulaceae), in Central Veracruz, Mexico. *Econ. Bot.*, 48, 84-89.
16. González de Cossio, F. (1957). Xalapa: Breve reseña histórica. Talleres gráficos de la nación. México.
17. Balfour, J. H. (1848). Notice of some plants which flowered recently in the Edinburgh Botanical Garden. Edinb. *New Philos. Jour.* 44: 200-205.
18. Velasco, I. (1887). La naturaleza VII, México, 19: 127-152.
19. Jauregui de, M. F. (1871). Estudios de algunos purgantes indígenas. La Naturaleza VII: 104-113.
20. Martínez, M. (1959). Plantas útiles de la flora mexicana. Ed. Botas, pp. 539-542.
21. Bausor, S. C. (1937). A review of some medicinal plants. *Torreya*: 37(2): 25-32.
22. Wallis, T. E. (1966). Manual de farmacognosia. CECSA. México, pp. 477-481.
23. Desfontaines, S. F. Memoire Sur le jalap. *Ann. Mus. Hist. Nat.* s/n: 120-130. France.
24. Casas, C. (1868). La raíz de Jalapa. *Bol. Soc. Mex. Geo. Y Est.*, pp. 6-8.

25. Martindale, W. (1977). Extra Farmacopea. Corrigenda 27 th. Ed. London Pharmaceutical Press. Great Britain., pp. 2077.
26. Casamaldi, R.S. (1968). Farmacognosia con farmacodinámica Ed. p. 321-326.
27. Pereda-Miranda, R., Fragoso-Serrano, M., Escalante-Sánchez, E., Hernández-Carlos, B., Linares, E., Bye, R. (2006). Profiling of the resin glycoside content of Mexican jalap roots with purgative activity. *J. Nat. Prod.* 69, 1460-1466.
28. Singh, S. and Stancey, B. (1972). Thin-Layer chromatographic separation and colorimetric determination of rhamnosa, quinovose, fucose and glucose of *Exogonium purga*. *Analyst* 97 (1161): 977-980.
29. E. Bautista, M. Fragoso-Serrano, R. Pereda-Miranda. (2016). Jalapinoside II, a Bisdesmoside Resin Glycoside, and Related Glycosidic Acids from the Official Jalap Root (*Ipomoea purga*). *Phytochemistry Letters*. 17, 85-93.
30. Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Pereda-Miranda, R. (2015). Jalapinoside, macrocyclic bisdemoside from the resin glycosides of *Ipomoea purga* as a modulator of Multidrug Resistance in human cancer cells. *J. Nat. Prod.* 78, 168-172.
31. Herbolaria Mexicana <http://arantzamitesoro.blogspot.mx/2011/09/herbolaria-mexicana-fuente-natural-de.html> Consultado el 31 de octubre de 2017.
32. Muñetón-Pérez, P. (2009). Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Dr. Erick Estrada Lugo. *Revista Digital Universitaria*, 10 (9).
33. Castañeda-Gómez, Jhon F. (2012). Caracterización de la composición química de las resinas glicosídicas de *Ipomoea purga*. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM, México, pp. 29.
34. IUPAC. (1974) "Recommendations on Nomenclature for Chromatography". *Pure Appl. Chem.* 37, 447.
35. Quattrocchi, O. A., Andrizzi de, S. A., Laba, R. F. (1992). Introducción a la HPLC, Aplicación y práctica. Ed. Artes graficas Farro S.A. Argentina.

36. Willard, H.H., Merritt, L.L., Dean, J.A., Settle, F. A. (1988). Métodos Instrumentales de Análisis. Ed. grupo editorial Iberoamericana, México.
37. Snyder, L., Kirkland, J. (1979) "Introduction to Modern Liquid Chromatography". Segunda edición. Ed. J. Wiley, N. Y.
38. Snyder, L. (1974). Classification of the solvent properties of common liquids. *J. Chrom A.* 92, (2), 223-230.
39. De Stefano, J., Kirkland J. (1975). Preparative High-Performance Liquid Chromatography. *Ana. Chem.* 47 (13), 1103A.
40. Cretier, G., Rocca, J. (1986). Mass overload in preparative liquid chromatography: Choice of column dimensions and optimum working conditions. *Chromatographia.* 21 (3), 143-148.
41. Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. (1992). Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición. Ed. Mcgraw Hill. España.
42. Annual Book of ASTM Standards. (1988). American Society for Testing and Materials. Philadelphia. Vol. 14.01, pp. 235-245.
43. Snyder, L.R. (1978). Classification of the Solvent Properties of Common Liquids. *J. Chrom. Sci.* 16(6), 223-234.
44. Scott, R. P. W. (1986) Liquid Chromatography Detectors. *Journal of Chromatography Library.* Vol. 33. 2nd Ed. Elsevier Science Publishers.
45. Horvath, Cs., Melander, W., Molnar, I. (1976). Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *J. Chromatogr. A.* 125(1), 129-156.
46. Horvath, Cs., Melander, W. (1977). Liquid chromatography with hydrocarbonaceous bonded phases; theory and practice of reversed phase chromatography. *J. Anal.Chem.* 15(9), 393-404.
47. Snyder L.R. (1968). Principles of adsorption chromatography. The Separation of Nonionic Organic Compounds. Vol. 3, Chromatographic Science Series. Marcel Dekker, Inc., New York.

48. Howard, G., Martin, A. (1950). The separation of the C12-C18 fatty acids by reversed-phase partition chromatography. *Biochem. J.* 46, 532.
49. Kirkland, J., De Stefano, J. (1970). Controlled Surface Porosity Supports with Chemically-Bonded Organic Stationary Phases for Gas and Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 8 (6), 309-314.
50. Abel, E. W., Pollard, F. H., Uden, P. C., Nickless, G. (1966). A new gas-liquid chromatographic phase. *J. Chromatogr. A.* 22, 23-28.
51. Horvath, Cs. G., Preiss, B. A., Lipsky, S. R. (1967). Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. *Anal. Chem.* 39 (12), 1422-1428.
52. Melander, W., Campbell, D. E., Horvath, Cs. (1978). Enthalpy-entropy compensation in reversed-phase chromatography. *J. Chromatogr. A.* 158, 215-225.
53. Molnar, I., Horvath, Cs. (1977). Separation of amino acids and peptides on non-polar stationary phases by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 142, 623-640.
54. Ding, W., Jiang, Z-H., Wu, P., Xu, L., Wei X. (2012). Resin glycosides from the aerial parts of *Operculina turpethum*. *Phytochemistry.* (81): 165-184.
55. Castañeda-Gómez, J. F., Charry, P.A., Pereda Miranda, R. (2013). Empleo de métodos analíticos modernos para el aislamiento y la identificación de resinas glicosídicas de la familia Convolvulaceae. *Rev. Invest. Univ. Quindío.* (Col.), 24(1): 19-29.
56. Pereda-Miranda, R.; Bah, M. (2003) Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies Transcending Boundaries. *Curr. Top. Med. Chem.* 3: 111.
57. Castañeda-Gómez, J., Pereda-Miranda, R. (2011) Resin Glycosides from the Herbal Drug Jalap. *J. Nat. Prod.* (74): 1148-1153.
58. Chérigo, L., Pereda-Miranda, R. (2006) Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* 69: 595.

59. Pereda-Miranda, R., Hernández-Carlos, B. (2002). HPLC isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. *Tetrahedron* 58, 3145–3154.
60. Sidana, J., Joshi, L.K. (2013). Recycle HPLC: A Powerful Tool for the Purification of Natural Products. *Chromatography Research International*. 2013.
61. Chérigo, L., Pereda-Miranda, R., Fragoso-Serrano, M., Jacobo-Herrera, N., Kaatz, G. W., Gibbons, S. (2008). Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps from the Resin Glycosides of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* 71: 1037.
62. Cruz-Morales, S., Castañeda-Gómez, J., Figueroa-González, G., Mendoza-García, A.D., Lorence, A., Pereda-Miranda, R. (2012). Mammalian multidrug resistance lipo pentasaccharide inhibitors from *Ipomoea alba* seeds. *J. Nat. Prod.* 75, 1603–1611.
63. Cruz-Morales, S., Castañeda-Gómez, J., Rosas-Ramírez, D., Fragoso-Serrano, M., Figueroa-González, G., Lorence, A., Pereda-Miranda, R. (2016). Resin glycosides from *Ipomoea alba* seeds as potential chemosensitizers in breast carcinoma cells. *J. Nat. Prod.* 79, 3093–3104.
64. Castañeda-Gómez, J., Rosas-Ramírez, D., Cruz-Morales, S., Fragoso-Serrano, M., Pereda-Miranda, R. (2017) HPLC-MS profiling of the multidrug-resistance modifying resin glycoside content of *Ipomoea alba* seeds. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 27, 434-439.
65. Trease, G.E., Evans, W.C. (2002). "Pharmacognosy". 15a ed. Edinburgo: W.B. Saunders.
66. Linares, E. L. (2001). Aproximación al conocimiento de los bejuocos de Colombia. *Caldasia*. 23(1), 169-179.
67. Figueroa-González, G., Jacobo-Herrera, N., Zentella-Dehesa, A., Pereda-Miranda, R. (2011) Reversal of multidrug resistance by morning glory resin glycosides in human breast cancer cells. *J. Nat. Prod.* 75(1), 93-97.