

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"APLICACION ANALITICA DE LA RMN MODERNA
EN LA ELUCIDACION DE ESTRUCTURAS
ORGANICAS COMPLEJAS. ESTUDIO DE UN
OLIGOSACARIDO DE IPOMOEA STANS"

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS.
PRESENTA EL QUIMICO

ISMAEL LEON RIVERA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A B S T R A C T

In the present work, the structure of glycoside A of Ipomoea stans was elucidated by uni and bidimensional NMR techniques.

The ^1H and ^{13}C chemical shifts were assigned unequivocally, with RELAY COHERENCE, COSY and HETCOR experiments. The linking sites between monosaccharides were determined from relaxation experimentes (NOE and measurement of T_1).

The XCORFE experiment of peracetylated glycoside A was a further prove to the assignment of the linking sites between the monosaccharides.

The structure of the monohydroxilated fatty acid was elucidated using GC - MS and GC - FTIR.

R E S U M E N

El presente trabajo experimental describe la elucidación estructural del glucósido A de Ipomoea stans utilizando técnicas de RMN uni y bidimensionales.

Los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C de los monosacáridos fueron asignados inequívocamente con las técnicas de : Transferencia de Coherencia por Relevó, Correlación Homonuclear y Correlación Heteronuclear de desplazamientos químicos. Los sitios de unión entre los monosacáridos se determinaron realizando experimentos de relajación (ENO y medición de T_1).

El experimento XCORFE aplicado al derivado peracetilado del glucósido A, permitió corroborar los sitios de unión de los monosacáridos.

La estructura del ácido graso monohidroxiado fué elucidada con las técnicas : cromatografía de gases - espectrometría de masas y cromatografía de gases - infrarrojo con transformada de Fourier.

C O N T E N I D O .

- I. - OBJETIVOS
- II. - INTRODUCCION
 - GENERALIDADES SOBRE SACARIDOS Y GLUCOSIDOS
 - GENERALIDADES SOBRE RMN DE SACARIDOS
 - GENERALIDADES SOBRE GLUCOSIDOS DEL GENERO IPOMOEA
- III. - TEORIA
 - LA RMN DE PULSOS
 - EFFECTO NUCLEAR OVERHAUSER
 - RELAJACION DE ESPINES
 - TECNICAS DE PULSOS UNIDIMENSIONALES
 - ECO DE ESPINES
 - TRANSFORMADA DE FOURIER DEL ECO DE ESPINES
 - TECNICAS DE PULSOS BIDIMENSIONALES
 - CORRELACION HOMONUCLEAR DE DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS (COSY)
 - CORRELACION HETERONUCLEAR DE DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DIRECTA (HETCOR) E INDIRECTA (XCORFE)
 - TRANSFERENCIA DE COHERENCIA POR RELEVO
- IV. - DESARROLLO EXPERIMENTAL
- V. - RESULTADOS Y DISCUSION
- VI. - CONCLUSIONES
- VII. - BIBLIOGRAFIA

O B J E T I V O S

1. Elucidar las estructuras de los oligosacáridos de Ipomoea stans por RMN de ^{13}C e ^1H .
2. Aplicar una metodología de estudio espectroscópico que utilice lo menos posible reacciones degradativas, permitiendo el estudio de moléculas de oligosacáridos completas.
3. Aplicar técnicas de RMN de pulsos unidimensionales y bidimensionales, para la asignación de la conectividad $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ de la molécula del oligosacárido.
4. Conocer la secuencia de los sacáridos en la molécula del oligosacárido, mediante el uso de experimentos de relajación (T_1 y ENO).
5. Llevar a cabo el estudio de la estructura mediante reacciones químicas y los sistemas analíticos acoplados a cromatografía de gases - infrarrojo (FT) y cromatografía de gases - espectrometría de masas.
6. Evaluar el potencial de la metodología de RMN bidimensional, para estudiar la estructura química intacta de oligosacáridos en sustitución de métodos químicos degradativos.

I N T R O D U C C I O N

GENERALIDADES SOBRE SACARIDOS Y GLUCOSIDOS

Los sacáridos son aldehídos o cetonas polihidroxiladas o aquéllas moléculas que por hidrólisis generan a las anteriores. A los aldehídos polihidroxilados se les conoce como aldosas y a las cetonas polihidroxiladas como cetosas. La aldosa y cetosa más importantes son la D-(+)-glucosa y D-(-)-fructosa respectivamente.

Algunas de las reacciones químicas características de los sacáridos son (1, 2):

- oxidación de las aldosas y cetosas con los reactivos de Fehling, Benedict y Tollens,
- la reacción de aldosas y cetosas con un exceso de fenilhidrazina para producir osazonas,
- la oxidación de aldosas y cetosas con HIO_4 , producen formaldehído y ácido fórmico.
- la oxidación de las aldosas con HNO_3 , producen los ácidos aldáricos respectivos.

Los sacáridos no presentan todas las reacciones de los aldehídos y cetonas, debido a su estructura cíclica (por la formación de hemi(a)cetales intramoleculares), que se encuentran en equilibrio con la estructura lineal.

Para la determinación del tamaño del anillo de los hemi-(a)cetales, se utilizan las dos secuencias de reacciones químicas descritas a continuación.

a) Formación del cetal,

- oxidación de cetal con HIO_4 , produciendo HCO_2H y un dialdehído. La identificación de la estructura del dialdehído permite establecer el tamaño del anillo.

b) Formación de cetales y acetales,

- permetilación del acetal o cetal con $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2/\text{NaOH}$,
- liberación del hemi(a)cetal con una hidrólisis ácida,
- oxidación del hemi(a)cetal con HNO_3 , para formar dos productos de degradación en torno al átomo de carbono que contenía el $-\text{OH}$ unido al carbonilo. La identificación de los dos fragmentos permite determinar el tamaño del anillo.

A los (a)cetales indicados anteriormente también se les conoce como glucósidos. En un glucósido se conoce como aglicón al fragmento correspondiente al alcohol, que puede ser alifático, aromático, esteroideal, etc. El enlace que une al alcohol con el sacárido se conoce como "enlace glucosídico".

Las técnicas clásicas de análisis de glucósidos involucran los siguientes pasos:

- hidrólisis ácida total para la separación del aglicón y de los sacáridos.

- hidrólisis parcial para establecer la secuencia de los monosacáridos en el glucósido.
- permetilación e hidrólisis total para establecer el sitio de unión de los monosacáridos entre sí.
- hidrólisis enzimática para conocer la estereoquímica de las uniones entre los monosacáridos.

GENERALIDADES SOBRE RMN DE SACARIDOS

La utilización de reacciones químicas para la elucidación de estructuras, puede alterar la configuración y/o funcionalidad de la molécula bajo estudio. La técnica espectroscópica de RMN ampliamente utilizada para el estudio de moléculas orgánicas ofrece la posibilidad de estudiarlas mediante la observación de dos espines nucleares diferentes (^1H y ^{13}C).

En la RMN de ^1H , la mayoría de las señales de los sacáridos se localizan en la región de 3.0 a 5.5 ppm. Debido a los acoplamientos $^1\text{H} - ^1\text{H}$ y a los hidrógenos de los oxhidrilos, usualmente los espectros presentan gran sobreposición de señales resultando difícil su interpretación.

Para atenuar el problema de la sobreposición de las señales se puede recurrir a lo siguiente:

- utilizar espectrómetros de alto campo (> 7 Teslas), que incrementan la dispersión espectral.

- la formación de derivados (acetatos, éteres trimetilsililados), que modifican los desplazamientos químicos de los hidrógenos,
- sustitución de ^1H por ^2H , para eliminar señales y acoplamientos,
- cambio de disolvente, para modificar los desplazamientos químicos con interacciones específicas soluto - disolvente.

Cuando un glucósido contiene dos o más monosacáridos, la sobreposición de señales en el espectro de ^1H , complica la interpretación del espectro.

En la RMN de ^{13}C las señales de los sacáridos se ubican en la región de 60 - 100 ppm, y a partir de la multiplicidad generada por el acoplamiento $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$, se puede establecer el número de hidrógenos que posee cada carbono.

Para la asignación de las señales de ^{13}C se emplean relaciones semiempíricas (3), que permiten estimar sus desplazamientos químicos.

Una ventaja importante de la RMN de ^{13}C es su ventana espectral 20 veces mayor que la de ^1H . En estas condiciones la sobreposición accidental de singuletes en el espectro de ^{13}C totalmente desacoplado es más difícil.

GENERALIDADES SOBRE GLUCOSIDOS DEL GENERO IPOMOEA

Del género *Ipomoea* se han aislado e identificado diversos glucósidos denominados "resinas glucosídicas", que están constituidos por un ácido graso mono o dihidroxilado 14, 15 o 16 átomos de C y los monosacáridos glucosa, ramnosa, fucosa y quinovosa. En algunos glucósidos los sacáridos se encuentran esterificados con ácidos carboxílicos de bajo peso molecular. Algunas estructuras de los glucósidos identificados se muestran en la figura 1.

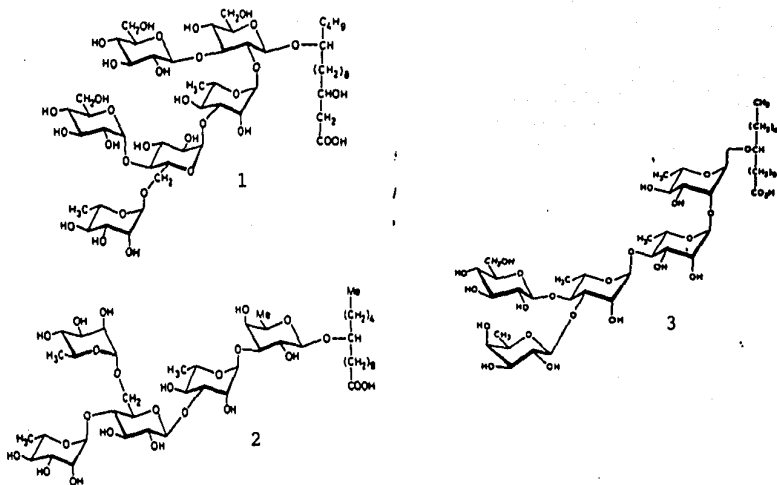


Figura 1. Estructura de 1) ácido operculínico, 2) ácido microfílico, 3) diglicósido D3.

Algunas Ipomoeas en que se han encontrado "resinas glucosídicas" son las siguientes: *Ipomoea parasítica* (4), *Ipomoea fistulosa* (5), *Ipomoea leari* (6), *Ipomoea purga* (7, 8, 9), *Ipomoea purpurea* (10), *Ipomoea muricata* (11, 12), *Pharbitis nil* CHOISY (13, 14), *Ipomoea operculata* (15, 16), *Convolvulus microphyllus* (17), *Ipomoea quamoclit*, *Ipomoea lacunosa*, *Ipomoea pandurata*, *Convolvulus al sirensis* (18), *Ipomoea dichroa* (19), *Ipomoea bahiensis* (20).

Se han reportado actividades farmacológicas en diversas especies del género *Ipomoea* (6, 19, 20).

Ipomoea stans es una planta de uso médico tradicional en México para el tratamiento de la epilepsia, como sedante y purgante, así como para aliviar cólicos intestinales y menstruales (21, 22). Se le localiza en los estados de: México, Hidalgo, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Veracruz y Zacatecas.

La sinonimia popular de *Ipomoea stans* es: tumbavaqueros, espantavaqueros, tripa de Judas, mataliste, cascatlapa, corriuelas, temecatli, espantalobos, tanibata, pegajosa y limpia-tunas.

Dado el uso popular actual que tiene esta planta se consideró interesante realizar su estudio químico.

T E O R I A

RMN DE PULSOS

La forma de excitación con que se desarrolló la RMN se denomina de "onda continua". En ella las distintas frecuencias de resonancia son observadas barriendo lentamente (~ 1 Hz/seg), la región espectral con una onda de radiofrecuencia de longitud de onda apropiada.

En la RMN de pulsos la excitación de la ventana espectral es simultánea, incorporando con ello grandes ventajas en cuanto a sensibilidad y control sobre la selectividad de la excitación.

La ecuación de Boltzman establece la distribución poblacional de espines entre los niveles energéticos nucleares por efecto de la interacción del núcleo con un campo magnético B_0 , y su representación matemática esta dada en la ecuación 1:

$$\frac{N_+}{N_-} = \exp \frac{\Delta E}{KT} = 1 + \frac{2 \mu_0 B_0}{K T} \quad \text{ec. 1}$$

siendo N_+ el nivel de menor energía.

Un conjunto de núcleos idénticos con $I = 1/2$, tienen dos orientaciones posibles respecto a B_0 , una a favor y la otra en contra de él. Debido al exceso de espines en el nivel de menor energía, se origina una magnetización macroscópica neta M_0

en la dirección de B_0 (definida como eje z).

Un campo magnético B_1 aplicado perpendicularmente al eje z , desplaza a M_0 de su posición de equilibrio y el vector resultante de M tiene componentes sobre los tres ejes de coordenadas (figura 2), denominándose a M_z magnetización longitudinal y a $M_{x,y}$ magnetización transversal.

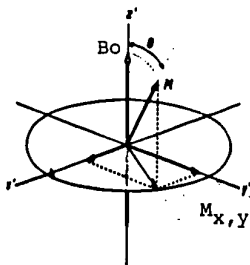


Figura 2.- Generación de la magnetización $M_{x,y}$.

Por acción de B_1 la posición de M_0 varía respecto a B_0 , esta variación se representa en la ecuación 2 :

$$dM/dt = \bar{M} \times \bar{B} \quad \text{ec. 2}$$

considerando como sistema de referencia el del laboratorio en el que sus ejes de coordenadas son fijos.

La representación del fenómeno de la resonancia en un sistema de coordenadas rotantes x' , y' , z' que giran en torno al eje z , con una frecuencia de rotación $\nu = \omega$, simplifica la descripción del mismo.

La descripción de la física clásica para la interacción de B_1 con M_0 , conduce a la ecuación 3 que representa la precesión de M en torno a un campo magnético B_{ef} en un sistema de coordenadas rotantes (21).

$$dM/dt = M \times (B_0 + B_1 + \omega / \gamma) = M \times B_{ef} \quad \text{ec. 3}$$

Cuando $B_1 = 0$ la posición de M no cambia respecto al tiempo por lo que $dM/dt = 0$ y $B_{ef} = B_0 + \omega / \gamma$, como M no es cero

$B_0 + w/ = 0$, que representa la oposición del sistema de coordenadas rotantes a B_0 .

Cuando B_1 y el sistema de coordenadas tienen la misma frecuencia que B_0 , el campo magnético efectivo es B_1 , por lo que M precesiona en torno a B_1 .

El tiempo de duración de B_1 (t_p) es proporcional al desplazamiento θ de M con respecto al eje z' , como lo indica la ecuación 4:

$$\theta = w_1 t_p = B_1 t_p \quad \text{ec. 4}$$

cuando $\theta = 90^\circ$ ocurre el fenómeno de resonancia.

Por la duración tan corta de la excitación (t_p es del orden de los μseg), a estos experimentos se les como RMN de pulsos. La intensidad de B_1 es tal que excita simultáneamente todos los núcleos de un isotópo, en un rango de frecuencias $\Delta\nu$ que esta dada por la relación $1/t_p = \Delta\nu$.

Al dejar de interactuar B_1 con M , los espines excitados liberan la energía absorbida que es captada en el detector como un potencial cuya intensidad tiene una disminución constante de características exponenciales y que se conoce como disminución libre de la inducción (FID).

La información registrada es un interferograma cuya interpretación visual es imposible. Mediante una operación matemática conocida como Transformada de Fourier se transfiere la información del dominio de tiempo al dominio de frecuencias (figura 3).

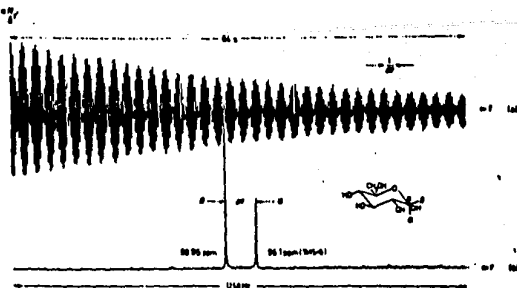


Figura 3.- Transformada de Fourier aplicada a las señales de los hidrógenos anoméricos.

EFFECTO NUCLEAR OVERHAUSER

Cuando un sistema de espines A X , se irradia el espín X con una radiofrecuencia secundaria, se aceleran sus transiciones energéticas nucleares observándose un incremento en la intensidad de la señal de A. El efecto es máximo en las condiciones ideales en que la relajación de A y de X esta mediada solamente por interacciones dipolo - dipolo. A este experimento se le conoce como Efecto Nuclear Overhauser (24 a).

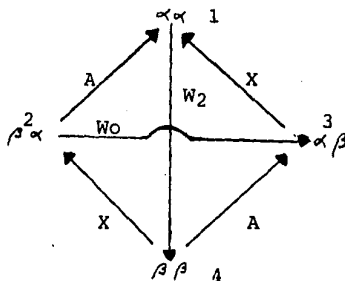


Figura 4.- Transiciones energéticas de A y de X.

Cuando las transiciones de X (4-2 y 3-1) son saturadas las poblaciones de los cuatro estados se alteran y el resultado es un incremento poblacional en 1 y 2, así como una disminución en las poblaciones de 3 y 4. Este sistema se equilibra mediante un incremento en las transiciones de relajación, despoblándose 1 e incrementándose la población en 4, incrementándose la diferencia poblacional entre los niveles 4 - 3 y 2 - 1 que determinan la intensidad de la señal de A.

La ecuación de Solomón (ec. 5) permite calcular el incremento de M_z^A respecto a M_0^A al irradiar al espín X

$$\frac{M_z^A}{M_0^A} = 1 + \frac{W_2 - W_0}{2W_1 + W_2 + W_0} \quad \text{ec. 5}$$

cuando el mecanismo de relajación es dipolar $W_2 : W_1 : W_0$ es 1 : 1/4 : 1/6 y para un sistema $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ $\gamma/\gamma' = 4$. En su valor máximo $M_z^A = M_0^A \times 2$, lo que representa un incremento de 200 % en la intensidad normal de la transición afectada.

Este experimento debe realizarse con disolventes que participen lo menos posible en la relajación de los núcleos (como CS_2 y CCl_4). Así como en total ausencia de O_2 disuelto, puesto que su paramagnetismo acelera inconvenientemente la relajación de los espines.

RELAJACION DE ESPINES

La relajación espín - entorno químico, es la tendencia de la magnetización para regresar a su posición de equilibrio a lo largo del eje z', después de haber sido perturbada por un campo magnético B_1 . Matemáticamente la relajación longitudinal se expresa como

$$dM / dt = (M_0 - M_z) / T_1 \quad \text{ec. 6}$$

siendo T_1 el tiempo de relajación longitudinal.

MEDICION DE T_1

La técnica mas común para la determinación de T_1 es recuperación de la inversión, cuya secuencia de pulsos es: 180°_x -- τ -- 90°_x . En esta secuencia se muestrea la recuperación de la magnetización totalmente invertida por el pulso inicial de 180°_x el sistema se deja evolucionar un tiempo variable τ , antes de aplicar el pulso de lectura de 90°_x .

El resultado es una serie de valores de M_z , que van desde $-M_0$ hasta M_0 (ref. 23). En la práctica la ecuación que permite calcular T_1 es :

$$\ln (A_{inf} - A) = \ln 2A_{inf} - \tau/T_1 \quad \text{ec. 7}$$

donde A es la intensidad de la señal y la representación gráfica de $\ln (A_{inf} - A)$ contra τ es una línea recta en la que el valor de la pendiente permite determinar T_1 .

Se han descrito cinco factores que contribuyen a la relación espín - entorno químico (26) y que son :

- relajación por anisotropía del tensor de desplazamiento químico,
- relajación por acoplamiento escalar,
- relajación por rotación de espines,
- relajación espín nuclear - espín electrónico,
- relajación por interacciones dipolo - dipolo internucleares.

APLICACIONES DE LA DETERMINACION DE T_1

- Determinación de estructuras moleculares

En la molécula de mezcalina (ref. 27), se identificaron las señales de los átomos de carbono 1, 3 y 4 a partir del conocimiento de los tiempos de relajación.

El átomo de carbono en posición 4 tiene el mayor T_1 por su lejanía a los átomos de hidrógeno 2 y 6 ($T_1 = 14.2$ seg) en tanto que los átomos de hidrógeno 3 y 5 tienen cerca a un átomo de hidrógeno y su T_1 es menor (11.1 seg), y finalmente el átomo de carbono 1 tiene cerca dos átomos de hidrógeno lo cual acelera su relajación ($T_1 = 4.2$ seg).

La asignación de señales en el espectro de RMN de ^{13}C del alcaloide de la figura 5, se facilitó deuterando en la posición 7, incrementándose los valores de T_1 en C_{7a} en 100% y la deuteración en C_{12b} incrementó el T_1 de C_{12a} en 45%.

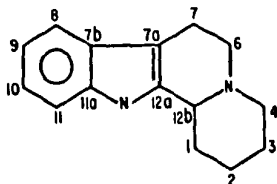


Figura 5.- Asignación de señales en la molécula deuterando en diferentes posiciones.

- Dinámica molecular (28).

En bencenos monosustituídos la rotación de la molécula por el eje C_2 es más rápida que sobre cualquier otro eje de la molécula, siendo los valores de T_1 para el átomo de ^{13}C en posición para menores que en las posiciones orto y meta.

El movimiento segmental se define como el movimiento localizado en una parte de la molécula. En la molécula de n - decano los átomos de carbono centrales tienen el menor T_1 por la restricción en el movimiento de esa parte de la molécula (figura 6).

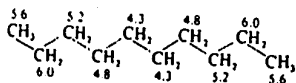


Figura 6.- T₁ de los átomos de ^{13}C de la molécula de n - decano.

TECNICAS DE PULSOS UNIDIMENSIONALES

Los experimentos unidimensionales se desarrollan en las etapas que se describen a continuación.

Preparación.- Esta fase permite que los espines se encuentren en equilibrio térmico o en un estado estacionario, que puede incluir la saturación de algunas transiciones del sistema de espines.

Evolución.- Esta fase se inicia con la aplicación de un pulso que genera la magnetización transversal, cuyas componentes se agrupan y desagrupan periódicamente por la diversidad de frecuencias de resonancia contenidas en M_0 . Durante la evolución de los espines se puede transferir magnetización entre las especies isotópicas o modificar la coherencia con que evolucionan los espines.

Detección.- En esta fase se realiza la medición de la magnetización transversal con respecto a una frecuencia de referencia. La fase de las señales detectadas es variable y puede ser modificada al final del proceso.

ECO DE ESPINES

Esta secuencia de pulsos es importante porque permite comprender el fenómeno de desenfoque y reenfoque de las componentes de la magnetización transversal.

La secuencia de pulsos es :

$$90^\circ_x \text{ --- } \tau \text{ --- } 180^\circ_x \text{ --- } \tau \text{ --- DETECCION}$$

y su representación vectorial se muestra en la figura 7.

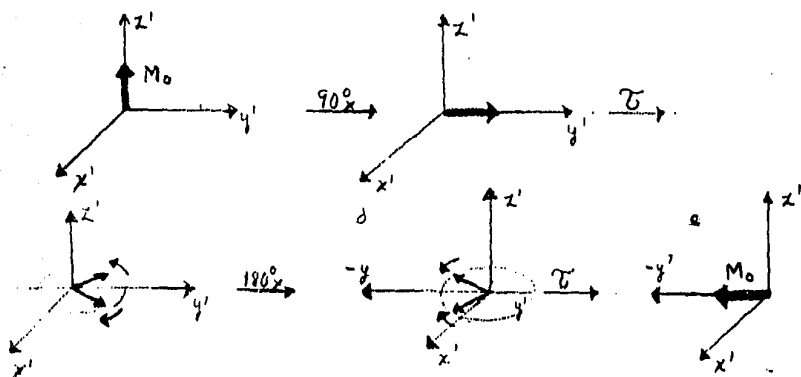


Figura 7.- Desenfoque y reenfoque de los vectores en la secuencia de pulsos Eco de Espines.

El pulso de 90°_x desplaza a M_z sobre el plano x', y' cuyos vectores se desagrupan en el transcurso del tiempo por efecto de tres factores (29):

- la diferencia de frecuencias de resonancia,
- la inhomogeneidad del campo magnético B_0 ,
- los acoplamientos espín - espín.

El pulso de 180°_x " refleja " los vectores que han evolucionado en el plano $x' y'$ sin alterar el sentido rotacional

de los vectores. Al final de otro tiempo τ igual al primero los vectores se reagrupan en el eje - y'.

Esta secuencia de pulsos permite: eliminar los efectos de la inhomogeneidad del campo magnético, detectar las señales con la misma fase y posibilita la determinación de T_2 .

El acoplamiento espín - espín tiene diferentes efectos durante el reenfoque de los vectores como se describe a continuación:

Acoplamiento homonuclear .- El pulso de 180°_x deja de ser selectivo, invirtiendo los estados poblacionales de A y de X, por lo que los vectores continúan divergiendo.

Acoplamiento heteronuclear .- Los vectores de X que han evolucionado un ángulo ψ sobre el plano x'y'. invierten su sentido rotacional al aplicarse un pulso de 180°_x sobre A, ocurriendo el reenfoque sobre el eje y'.

TRANSFORMADA DE FOURIER DEL ECO DE ESPINES

(S E F T)

Como una extensión del fenómeno de desenfoque y reenfoque de los vectores de la magnetización, la descripción de la Transformada de Fourier del Eco de Espines es útil para la comprensión de los experimentos de RMN 2D.

La secuencia de pulsos SEFT es :

^{13}C	90°	---	τ	---	180°	---	τ	---	DETECCION
^1H	-----		[]				-----		
	DESACOPLADOR						DESACOPL		

La secuencia de pulsos SEFT permite identificar las señales de C, CH, CH₂, CH₃ en base a su evolución característica por efecto de su acoplamiento con los átomos de hidrógeno directamente enlazados, como se muestra en la figura 8.

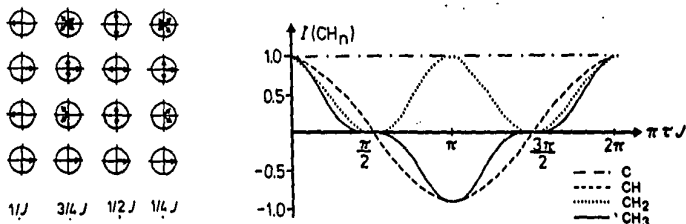


Figura 8.- Diagramas de evolución de los multipletes de ¹³C en función del tiempo.

La diferenciación de los átomos de carbono con diferente número de hidrógenos unidos directamente, hace de esta técnica una de las más importantes en el proceso de edición espectral. En la secuencia de pulsos se reenfocan las diferencias de desplazamiento químico, pero no la información de las constantes de acoplamiento.

Para la obtención de un espectro SEFT se requiere de una concentración de 70 mg/ml, el tiempo de almacenamiento de las señales es de 1 - 2 horas con una relación señal/ruido mínima de 7 (31).

TECNICAS DE PULSOS BIDIMENSIONALES

La RMN bidimensional surge como una extensión de la edición espectral en donde se repite una secuencia de pulsos va-

riando el tiempo de evolución de los espines. Los experimentos bidimensionales también se desarrollan en las tres etapas indicadas en los experimentos unidimensionales (preparación, evolución y detección).

En los experimentos bidimensionales se introduce una nueva variable (el tiempo de evolución t_1), realizándose dos Transformaciones de Fourier, obteniéndose dos variables F_1 y F_2 . La información sobre el acoplamiento espín - espín queda contenida en t_1 (F_1) y la información de los desplazamientos químicos queda contenida en t_2 (F_2).

En la figura 9 se muestra el proceso de adquisición y procesamiento de la información adquirida en un experimento de RMN bidimensional.

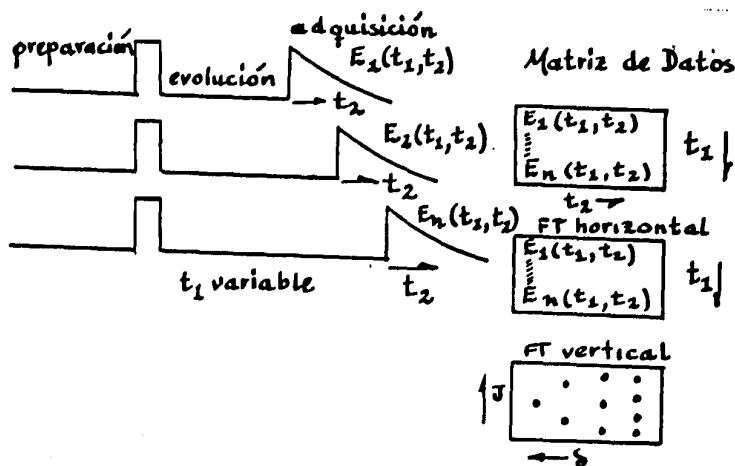


Figura 9.- Experimento de RMN bidimensional.

Dos clases de experimentos son comunes en RMN 2D: experimentos con resolución de la constante de acoplamiento, en los que un eje de coordenadas es el desplazamiento químico y el

otro eje de coordenadas es J; y los experimentos de correlación de desplazamientos químicos en los que ambos ejes de coordenadas son desplazamientos químicos de especies isotópicas iguales o diferentes.

CORRELACION HOMONUCLEAR DE DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS
(C O S Y)

La secuencia de pulsos que dió origen a la RMN 2D, fué propuesta por Jeener (32) y esta constituida por d^0 pulsos de 90° separados por un tiempo de evolución variable. La secuencia fué propuesta en 1971, pero comenzó a desarrollarse hasta 1976 cuando Aue (33) realizó el análisis del experimento.

El experimento COSY se ha simplificado, permitiendo realizar una asignación rápida de los espines nucleares que se encuentran acoplados.

La secuencia generalmente aplicada a hidrógenos consiste de los siguientes pulsos ;

90° --- t_1 --- 90° DETECCION
--- t_2 ---

el valor máximo que t_1 puede adquirir es T_2 , que representa el tiempo de vida de la magnetización transversal. Dependiendo de T_2 la sensibilidad que puede alcanzarse durante el período de adquisición.

El primer pulso genera componentes de la magnetización transversal, iniciandose el desenfoque de las componentes por efecto de las diferentes frecuencias y de los acoplamientos. El segundo pulso invierte las poblaciones de todos los núcleos, provocando una interacción de las coherencias cuánticas sencillas de los espines por efecto de su acoplamiento escalar. De esta forma la magnetización de una transición de A puede ser transferida a otro espín a través del acoplamiento escalar (34).

El resultado es un espectro que contiene los desplazamientos químicos de los espines en una diagonal y señales simétricas fuera de la diagonal que indican las interacciones (acoplamiento) entre los espines (35).

La figura 10 muestra el espectro COSY simulado de la molécula de n - propanol, en el que se aprecian los dos tipos de señales indicados anteriormente.

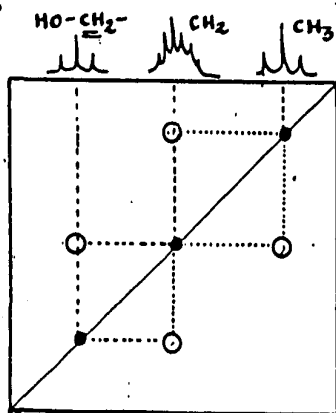


Figura 10.- Espectro COSY de n - propanol.

CORRELACION HETERONUCLEAR DE DESPLAZAMIENTOS
QUIMICOS (H E T C O R).

El acoplamiento $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ es un parámetro útil para establecer una conectividad entre ambos espines nucleares, de esta forma se pueden realizar asignaciones en el espectro RMN de ^{13}C a partir de la información proporcionada por el espectro

de ^1H y viceversa.

La secuencia de pulsos HETCOR (36) es :

^1H 90°_x --- t_1 --- Δ_1 --- 90°_y - - ~~DESACOPLADOR~~ ---
 ^{13}C 180°_x - τ - - 90°_x - Δ_2 - DETECCION

la representación vectorial de esta secuencia de pulsos es mostrado en la figura 11.

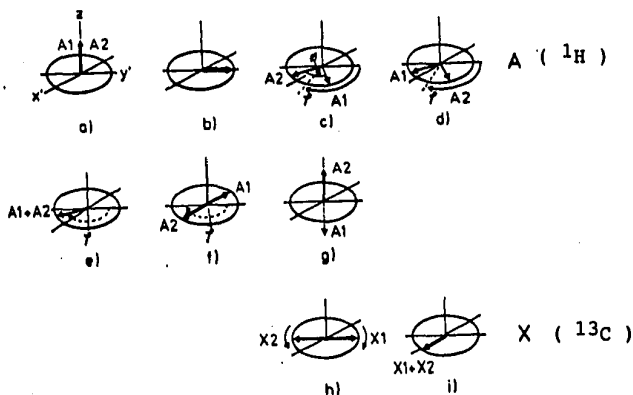


Figura 11.- Representación vectorial de la secuencia de pulsos HETCOR.

El pulso de 90°_x sobre ^1H genera la magnetización transversal, cuyas componentes se desagrupan por la diferencia de frecuencias así como por los acoplamientos homo y heteronucleares.

El pulso de 180° sobre ^{13}C invierte el sentido rotacional de los vectores de ^1H , reenfocondolos al final del tiempo t_1 . Con el primer tiempo de mezclado Δ_1 los vectores se desenfocon un ángulo 180° , el segundo pulso de 90° transforma la magnetización transversal en longitudinal, polarizando la magnetización de ^1H que a su vez polariza la magnetización de ^{13}C . El pulso de 90° aplicado a ^{13}C regenera la magnetización transversal.

Una característica de la transferencia de magnetización es que la rapidez de relajación de los espines esta gobernada por el núcleo de ^1H , el cual por su menor tiempo de relajación incrementa la rapidez de aplicación de los pulsos.

La figura 12 muestra el espectro simulado HETCOR de n - propanol en el que se observan las señales de correlación $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$.

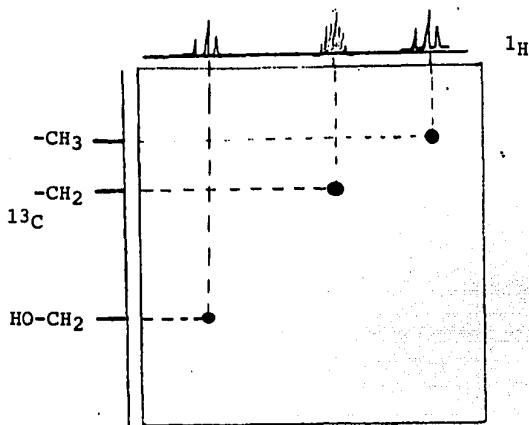


Figura 12.- Espectro HETCOR de n - propanol.

La asignación inequívoca de las señales en el espectro de ^{13}C puede lograrse con el experimento INADEQUATE 2D (37), que permite identificar el esqueleto de la molécula a partir del acoplamiento $^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$, pero la baja sensibilidad de este experimento limita su utilización.

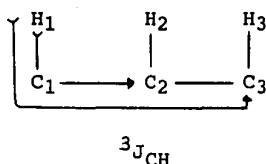
Una alternativa para la asignación inequívoca de señales en el espectro de ^{13}C es la transferencia de magnetización de ^1H a ^{13}C a través de dos y tres enlaces de distancia, que se logra con el experimento XCORFE (38).

La secuencia de pulsos es :

^1H	90°_x	90°	180°	90°	90°	90°	180°	90°	DESACOP
^{13}C	T - $t_{1/2}$	180°	$t_{1/2}$	90°			180°		

las dos secuencias de pulsos $90^\circ 180^\circ 90^\circ$ corresponden a dos secuencias BIRD (39), cuyo efecto es excitar a los hidrógenos que no se encuentran directamente unidos al átomo de carbono observado, dejando intactos a los hidrógenos que se encuentran a dos y tres enlaces de distancia.

El uso de un tiempo de evolución corto aumenta la sensibilidad del experimento. La trayectoria de transferencia de polarización es la siguiente :



TRANSFERENCIA DE COHERENCIA POR RELEVO

El experimento de transferencia de coherencia por relevo (40, 41), permite detectar señales de núcleos pertenecientes a un sistema de espines aunque no exista acoplamiento entre ellos.

La secuencia de pulsos es :

90°_x --- t_1 --- 90° -- 180° -- 90° DETECCION

Cuando esta secuencia de pulsos es aplicada a un sistema A M X (en el que A y X pueden no estar acoplados), el primer pulso de 90° genera la magnetización transversal. El segundo pulso de 90° transfiere la magnetización de A a M, manteniendo la misma fase que el núcleo X. El pulso de 180° elimina los efectos que tienden a cancelar la magnetización transversal y el tercer pulso de 90° transfiere la magnetización de M a X.

El espectro obtenido muestra que la señal de X esta modulada por las frecuencias de A y de M, por lo que se agruparán las señales de A, M, X en una línea. Las intensidades de las señales " relevadas " dependen de las constantes de acoplamiento J_{AM} y J_{MX} como se muestra en la ecuación 8 (42):

$$I = \text{sen}(J_{AM} t) \text{sen}(J_{MX} t) \exp (-t/ T_2) \quad \text{ec.8}$$

por las diferencias de T_2 y de las constantes de acoplamiento las intensidades de las señales serán diferentes, para los diferentes núcleos presentes en la molécula.

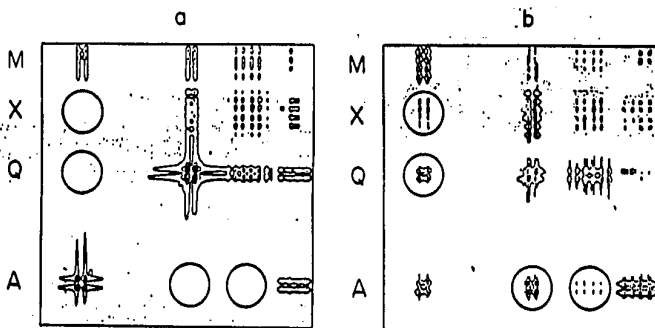


Figura 13.- Espectro COSY de un sistema AMQX (a)
Espectro RELAY COHERENCE para el mismo sistema (b).

El material vegetal fué adquirido en el mercado de Sonora de la ciudad de México y clasificado botánicamente por la M. en C. Abigail Aguilar, en el Herbario de la Unidad de Investigación Biomédica en Medicina Tradicional y Herbolaria del I.M.S.S.

La raíz de Ipomoea stans se secó y molió, para ser macerados 2 kg del material vegetal en 4 litros de los siguientes disolventes : éter de petróleo, acetato de etilo y metanol. Los extractos obtenidos se concentraron a presión reducida y se analizaron por cromatografía en placa fina y RMN.

El extracto obtenido con acetato de etilo se separó en una columna de vidrio empacada con gel de sílice, utilizando como eluyente CHCl_3 y se aumentó la polaridad con metanol hasta la proporción 9 : 1. En las primeras fracciones colectadas se separaron carotenos y en las siguientes fracciones eluyeron dos compuestos con características espectroscópicas similares, que fueron designados A y B.

El compuesto A es aproximadamente diez veces mas abundante que B y fué el que se utilizó para el trabajo experimental que se describe a continuación.

El compuesto A es un sólido blanco, amorfo con p. f. 115-117 °C (sin corregir), soluble en los disolventes : THF, CH_2Cl_2 , CHCl_3 , acetato de etilo, acetona y metanol. El espectro IR del compuesto A (figura 14), tiene las bandas de oxhidrilos asociados y de carbonilos esterificados como señales sobresalientes.

El espectro RMN de ^1H del compuesto A (figura 15), muestra sobreposición de señales en la región de 3 a 5.7 ppm que son asignadas a hidrógenos en posición gemela a oxhidrilos. En la región de campo alto se observan señales correspondientes a hidrógenos alifáticos similares a las de una cadena lineal larga. El disolvente utilizado es CDCl_3 y la referencia interna TMS.

El espectro RMN de ^{13}C del compuesto A (figura 16), presenta señales agrupadas en las regiones de : carbonilo de ester, enlace C - O y las señales alifáticas. La región de carbonilos muestra que el compuesto contiene diferentes esteres.

A partir de los datos espectroscópicos anteriores y de la información bibliográfica revisada se postuló que el compuesto A es un glucósido.

Para facilitar la elucidación estructural del compuesto A, se le hidrolizó en condiciones básicas para eliminar los ácidos carboxílicos que se encontraban esterificados. Las condiciones experimentales utilizadas fueron : 40 mg del compuesto A se agregaron a una disolución de NaOH 0.1 N en agua/etanol (1 : 1), calentando a baño maría durante 3 horas a 70 °C.

La mezcla de reacción se neutralizó con HCl 0.1 N y se realizó una extracción con éter etílico. La disolución acuosa fue liofilizada y disuelta en metanol para percolarse en gel de sílice y eliminar las sales inorgánicas. El residuo obtenido al final de esta etapa de purificación fue un sólido blanco cuyo espectro IR (figura 17), demostró que la saponificación fue cuantitativa. El espectro de RMN de ^1H también mostró una simplificación en la región de hidrógenos alifáticos (figura 18) y en el espectro de RMN de ^{13}C disminuyeron el número de señales de carbonilo de ester (figura 19), al compuesto A hidrolizado le denominaremos glucósido AH.

Para la identificación de los azúcares se hidrolizaron 250 mg del compuesto A con HCl 2N en la mezcla de agua/etanol 1 : 1 en volumen a reflujo durante 4 horas. La mezcla de reacción se neutralizó con KOH 1.5 N y se extrajo con CHCl_3 , la fase orgánica se utilizó para la determinación de los ácidos presentes en la molécula del compuesto A. La fase acuosa se liofilizó y por cromatografía en placa fina (sílice) utilizando como fase móvil butanol/ ác. acético/ agua en la proporción 8:1:1, identificandose glucosa y ramnosa.

Para el sistema acoplado cromatografía de gases - infrarrojo se utilizaron las siguientes condiciones :

Cromatógrafo	Hewlett Packard modelo 5890	
Columna	Megaboro de 5 m de longitud, 0.5 mm de diámetro interior.	
Fase estacionaria	Metil silicón	
Temperatura inyector	250 °C	
Temperatura horno	40 °C	2 min.
	40 - 240 °C	10 °C/min
	240 °C	8 min.
Presión de He	8 psi	

La interfase del infrarrojo corresponde al modelo Nicolet 20SXB y es del tipo " light pipe ", que se encontraba a 230 °C y como gas auxiliar se utilizó He con un flujo de 10 ml/min. El cromatograma obtenido se muestra en la figura 20.

El sistema acoplado cromatografía de gases - espectrometría de masas, tenía las siguientes características :

Cromatógrafo	Hewlett Packard modelo 5890	
Columna	Capilar de 25m de longitud, 0.2 mm de diámetro interno.	
Fase estacionaria	Metil silicón	
Temperatura inyector	250 °C	
Temperatura horno	40 °C	2 min.
	40 - 250 °C	15 °C/min.
	250 °C	7 min.
Presión de He	15 psi	
Split	1 : 50	

El detector utilizado fué un Detector Selectivo de Masas Hewlett Packard modelo 5970, la temperatura de la línea de transferencia fué de 230 °C. El cromatograma obtenido se muestra en la figura 21.

Los espectros de RMN bidimensionales que se describen posteriormente fueron obtenidos en un espectrómetro Varian XL 400.

RESULTADOS Y DISCUSION

- ASIGNACION DE LAS SEÑALES DE ^1H PARA LOS MONOSACARIDOS

La elucidación estructural de oligosacáridos por RMN requiere del reconocimiento de las señales pertenecientes a cada monosacárido, así como de la identificación de los sacáridos con los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento y finalmente la secuencia de unión de los monosacáridos con experimentos de relajación. Para obtener esta información la RMN tiene muchos experimentos uni y bidimensionales, algunos de ellos se describen a continuación para la elucidación estructural del glucósido AH.

El experimento de Transferencia de Coherencia por Relevamiento (40, 41), aplicado al glucósido AH permitió diferenciar las señales de RMN de ^1H de cada uno de los monosacáridos (figura 22), en este espectro se observan gran cantidad de señales fuera de la diagonal, para facilitar la interpretación del espectro se realizó la edición espectral del mismo (figura 23).

Con la edición espectral es posible determinar con exactitud los desplazamientos químicos de los hidrógenos correspondientes a los cuatro sacáridos. La carencia de metilos en el sistema IV, lo identifica como glucosa, entanto que los demás sacáridos se identificarán a partir de sus desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento.

El experimento COSY permite identificar el acoplamiento entre espines, con las señales fuera de la diagonal. La aplicación de COSY a la elucidación estructural de oligosacáridos tiene poco uso a pesar de la valiosa información que proporciona (43, 44).

El espectro COSY del glucósido AH (figura 24), permite identificar los desplazamientos químicos y la secuencia de acoplamiento en cada monosacárido. A partir de la información proporcionada por el experimento Relay Coherence y que los hidrógenos anoméricos se encuentran desplazados a campo bajo, con estas señales se

inició la conectividad de hidrógenos.

El procedimiento de interpretación del espectro COSY se describe para la molécula de glucosa en el glucósido AH. En 4.97 ppm se encuentra la señal del hidrógeno H_1 que tiene un contorno en la diagonal de la figura 24a, tanto en sentido vertical como horizontal se localiza un contorno que revela conectividad con H_2 , al proyectar los contornos simétricos sobre la diagonal se conoce el desplazamiento químico de H_2 en 3.41 ppm. Al cuadrado generado en esta secuencia le conoce como " cuadro de conectividad ".

H_2 a su vez tiene interacción con otro espín, como se deduce del contorno ubicado en 3.49 ppm mostrado en el cuadro de conectividad correspondiente a H_3 . A partir de este contorno prolongando la horizontal y la vertical se tiene otro cuadro de conectividad con un contorno en la diagonal en 3.13 ppm correspondiente a H_4 .

Con la misma secuencia se determina el desplazamiento químico de H_5 que se da de 3.25 ppm. Y al prolongar la vertical y la horizontal a partir del contorno en 3.25 ppm se observan interacciones con dos núcleos, cuyos cuadros de conectividad corresponden a H_6 y H_{6a} , con desplazamientos químicos de 3.55 y 3.85 ppm.

Para los otros sacáridos se desarrolló la misma secuencia de obtención de cuadros de conectividad y la representación gráfica de los mismos se muestra en las figuras 24b, 24c, 24d. En la tabla I se presentan los desplazamientos químicos de 1H para los cuatro monosacáridos.

- ASIGNACION DE LAS SEÑALES DE ^{13}C PARA LOS MONOSACARIDOS

La interpretación del espectro de RMN de ^{13}C para el glucósido AH se realizó con ayuda del espectro HETCOR (figura 25), en el cual se deducen los desplazamientos químicos del átomo de ^{13}C a partir del desplazamiento químico del átomo de 1H unido directamente a él.

La intersección de ambos ejes de coordenadas (desplazamientos químicos de 1H y de ^{13}C), permitió determinar los desplazamientos

químicos de ^{13}C , que son presentados en la tabla I.

Con experimentos de relajación y con los valores de las constantes de acoplamiento obtenidos, para la molécula de quinovosa pura y su derivado peracetilado se logró identificarla en el glucósido AH presente con dos unidades y una de ramnosa.

- DETERMINACION DEL SITIO DE UNION DE LOS MONOSACARIDOS

La RMN permite establecer el sitio de unión de los monosacáridos entre sí con el experimento de Efecto Nuclear Overhauser, en el que se irradia un espín con una radiofrecuencia secundaria y a partir del incremento en la intensidad de algunas señales se deduce cuales núcleos se encuentran espacialmente cercanos y conociendo sus desplazamientos químicos se establece la secuencia de unión.

El espectro de la figura 26 muestra el efecto causado al irradiar H_1 de ramnosa, observándose interacción intramolecular con H_2 (3.94 ppm), así como con H_2 de glucosa (3.40 ppm). La ausencia de interacciones de H_1 de ramnosa con H_3 y H_4 intramolecular, indican la posición alfa de H_1 . Deduciéndose de este experimento la secuencia de unión : α ramnosa-(1-2)-glucosa.

En la figura 27 se representa la irradiación sobre H_1 de glucosa, que interactúa con H_2 , H_3 y H_5 intramolecularmente mostrando una configuración beta en H_1 . También se observa una interacción con H_2 de quinovosa¹, teniendo la secuencia : glucosa-(1-2)-quinovosa¹.

En la irradiación sobre H_1 de quinovosa se observa incremento en las señales de H_2 , H_3 y H_5 intramoleculares que indican la posición beta de H_1 . El efecto sobre la ramnosa se observa en el incremento de la señal de H_4 , siendo la secuencia de unión : β quinovosa-(1-4)- ramnosa. (figura 28).

Y finalmente la irradiación sobre H_1 de quinovosa¹ demuestra la configuración beta por el incremento en las intensidades intramoleculares de H_2 , H_3 y H_5 . El incremento en la señal localizada en 3.61 ppm correspondiente al ácido graso, completa la

secuencia de unión : β quinovosa - (1-4) - α ramnosa - (1-2) - β glucosa - (1-2) - β quinovosa¹ - ácido graso hidroxilado.

- MOVILIDAD SEGMENTAL DEL GLUCOSIDO AH

Los valores de T_1 proporcionan información valiosa sobre la movilidad del glucósido AH. Utilizando la técnica de " recuperación de la inversión ", se conocieron los tiempos de relajación promedio de los átomos de ^{13}C de los monosacáridos, deduciéndose de ellos que la molécula de quinovosa se encuentra al final de la cadena del oligosacárido por tener un $T_1 = 0.34$ seg. mayor que el de los demás monosacáridos $T_1 = 0.24$ seg. Hecho que concuerda con lo reportado en el experimento ENO.

- IDENTIFICACION DE LOS ACIDOS CARBOXILICOS

Los productos de la hidrólisis ácida del glucósido A extraídos con CHCl_3 , se analizaron con los sistemas analíticos acoplados cromatografía de gases - espectrometría de masas y cromatografía de gases - infrarrojo. Con los espectros obtenidos se identificaron los esteres etílicos de los ácidos carboxílicos presentes en el glucósido A.

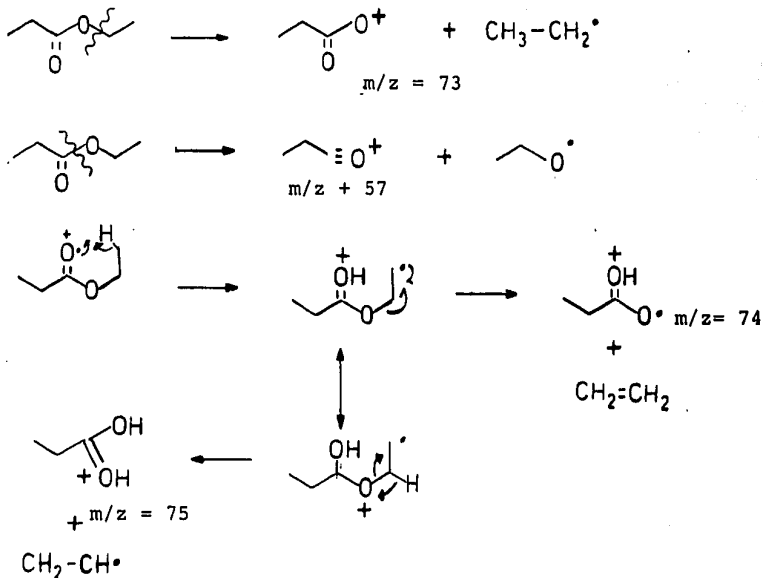
La comparación espectral que se muestra para los espectros de infrarrojo tienen como fuente la Biblioteca Aldrich en fase vapor (EPA) y con los espectros de masas se tiene como fuente la Biblioteca de la NBS.

En la figura 30 se muestra el espectro de IR para el compuesto con $t_r = 1.71$ min. en el sistema CG - FTIR, destacando la banda de carbonilo de ester (1732 cm^{-1}), una banda en 1150 cm^{-1} de la elongación C-O y las señales de baja intensidad en 2985 cm^{-1} sugieren que la molécula es de cadena corta.

En la figura 31 se presenta el espectro de masas del mismo ester, en el que se tienen como señales importantes las siguientes : $m/z = 102$ el ión molecular con una fórmula condensada de

C₅ H₁₀ O₂ , el pico base se localiza en m/z = 29 para un ión etilo la señal en m/z = 57 se asignó al ión CH₃-CH₂-C=O⁺. Con base en la asignación de señales y con la comparación de espectros se identificó a este compuesto como propanoato de etilo.

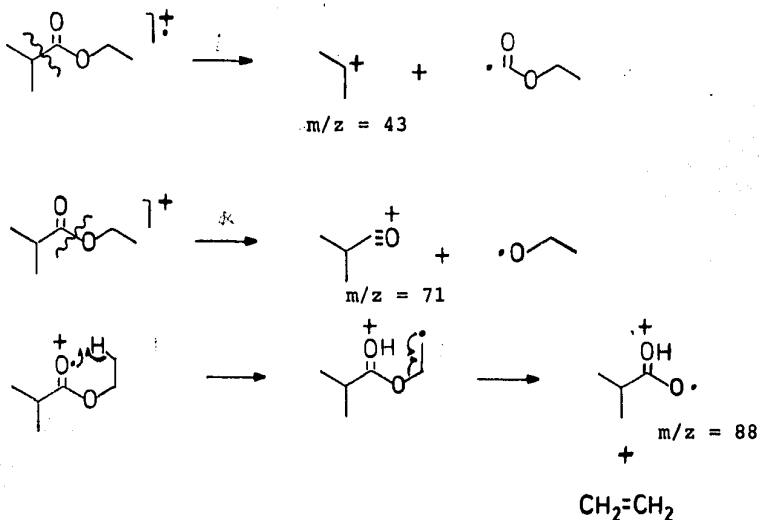
Para explicar algunas de las señales en el espectro de masas se tienen los siguientes mecanismos (45):



- El espectro de IR con tr = 2.25 min. en el sistema CG - FTIR muestra una banda de carbonilo de ester intensa en 1731 cm⁻¹, las bandas en 1325 y 1375 cm⁻¹ de un radical isopropilo (figura 32).

El espectro de masas correspondiente (figura 33), tiene en m/z = 116 el ión molecular, el pico base se localiza en m/z = 43 de un ión isopropilo.

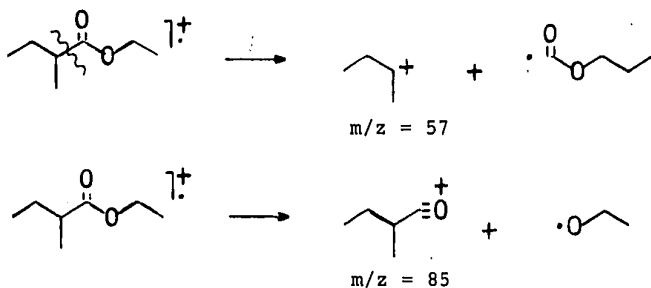
Se interpreta el espectro de masas con los mecanismos siguientes ;

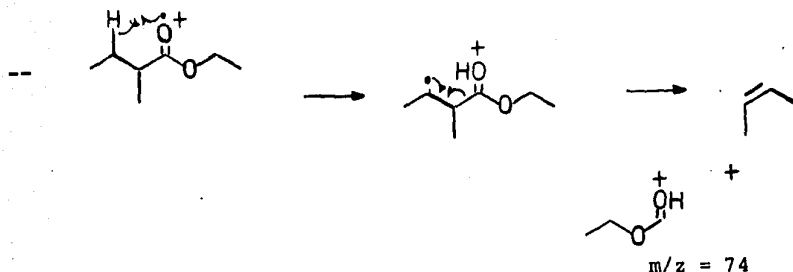
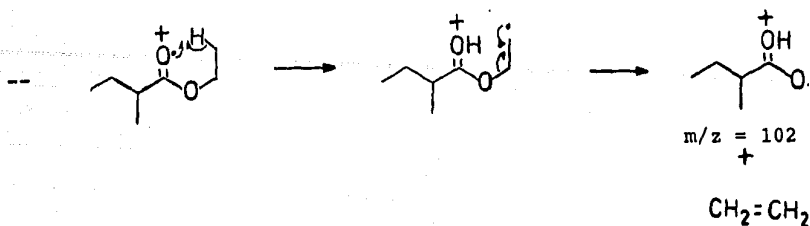


Con la ayuda de la comparación espectral se corrobora la estructura de 2-metil propanoato de etilo.

- En el compuesto con $t_r = 4.02$ min. del espectro IR sobresale la banda de carbonilo de ester en 1730 cm^{-1} (figura 34).

El espectro de masas de este compuesto (figura 35), muestra el ión molecular en $m/z = 130$ que corresponde a una fórmula condensada de $\text{C}_7 \text{H}_{14} \text{O}_2$, el pico base corresponde a un ión etilo y los demás iones se explican con los mecanismos :

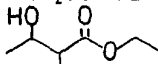




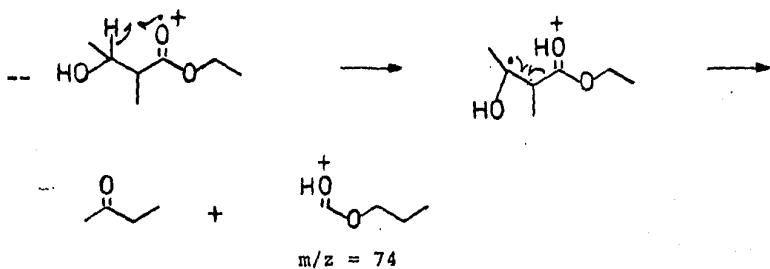
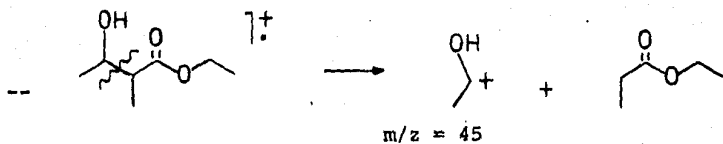
Con esta información se establece la estructura de 2-metil butanoato de etilo.

- En el espectro IR de la figura 36 sobresale una banda de -OH en 3550 cm^{-1} y la banda de carbonilo de ester en 1736 cm^{-1} .

El espectro de RMN de ^1H de este compuesto como ácido libre (figura 38), tiene una señal en 2.49 ppm (multiplete), correspondiente a un hidrógeno adyacente a carbonilo y a una funcionalidad C-OH que lo desplaza a campo bajo. La señal en 3.92 ppm (multiplete) corresponde a un hidrógeno en posición gemela a oxhidrilo. Las señales en 1.25 ppm corresponden a dos metilos que son desplazados a campo bajo por su cercanía a grupos desprotectores (carbonilos y oxhidrilos) y la señal en 2.18 ppm corresponde a un -OH. Siendo una estructura probable la siguiente :



Para corroborar la estructura anterior se interpreta el espectro de masas (figura 37), con los siguientes mecanismos:



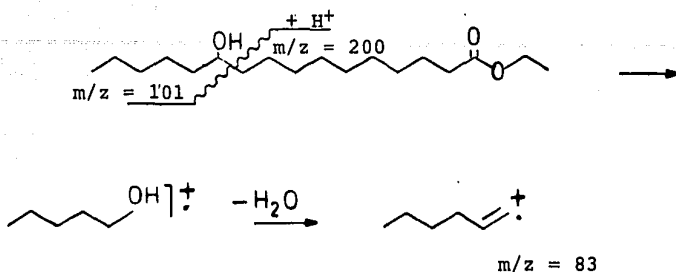
- Para elucidar la estructura del ácido graso se utilizó el espectro de IR (figura 39), en el que sobresale la banda de -OH en 3650 cm^{-1} , la banda de carbonilo de ester en 1731 cm^{-1} y la intensidad de la banda de elongación de metilenos indica una cadena con mas de ocho metilenos.

La espectrometría de masas ha sido ampliamente utilizada para conocer la posición del oxhidrilo en la cadena, así como para establecer la longitud de la cadena (17,19). Se han utilizado los esteres metflicos y etflicos por su mayor presión de vapor respecto al ácido libre para obtener los espectros de masas.

A partir de la información proporcionada sobre la identificación de las resinas glucosídicas, la señal con $m/z = 101$ del espectro de masas (figura 40), se produce por una fragmentación alfa al oxhidrilo. La señal con $m/z = 200$ se produce por fragmentación alfa al hidroxilo (ión complementario al de $m/z = 100$) con rearrreglo de un protón y la señal en $m/z = 83$ se genera en dos etapas en la primera se forma el ión con $m/z = 101$ que posteriormente se deshidrata. Los mecanismos de los iones anteriores se describen posteriormente.

Con estos iones se deduce que el ácido graso tiene una longitud de 16 átomos de carbono y que el oxhidrilo se encuentra en la posición 11. En el espectro de masas hay varios iones cuyas señales tienen gran intensidad ($m/z = 157, 183, 229$), pero no pueden explicarse directamente de la molécula, por lo que se supone que estos iones son formados por rearrreglo.

Otro punto interesante es que Walker (46) en su libro presenta espectros de masas de ácidos grasos hidroxilados, en que los picos mas intensos corresponden a la fragmentación alfa a oxhidrilo, hecho que no concuerda con el espectro de la figura 40 , una explicación de este fenómeno puede ser la diferencia de sensibilidad en los detectores utilizados.



Con esta información se tiene completa la estructura del glucósido AH y que es : β quinovosa - (1-4) - α ramnosa - (1-2) - β glucosa - (1-2) - β quinovosa¹ - (1-11) - ácido 11-hidroxi hexadecanoico.

- ESTUDIO XCORFE DEL GLUCOSIDO AH PERACETILADO

El experimento XCORFE permite realizar la asignación inequívoca de los átomos de ^{13}C y por consiguiente determinar el esqueleto de la molécula, gracias a la transferencia de magnetización de los átomos de hidrógeno al átomo de ^{13}C ubicado a dos y tres enlaces de distancia. Debido a la sobreposición de señales en el espectro de RMN de ^1H y de ^{13}C del glucósido A no se pudo realizar este experimento sobre dicha molécula. Sin embargo el derivado peracetilado del glucósido AH presentó mejor resolución en sus espectros así como menores tiempos de relajación, favoreciendo la realización del experimento XCORFE.

La figura 41 muestra el espectro RMN de ^1H del glucósido AH peracetilado y la figura 42 presenta el espectro RMN de ^{13}C del mismo compuesto.

Para establecer los desplazamientos químicos de los hidrógenos se utilizó el espectro COSY (figura 43), que con el mismo procedimiento descrito para la interpretación del glucósido AH se ob-

tuvieron los desplazamientos químicos presentados en la Tabla II.

Con el espectro HETCOR del glucósido AH peracetilado se conocieron los desplazamientos químicos de los átomos de ^{13}C , basándose en la información del espectro COSY, y los valores obtenidos se resumen en la Tabla II.

En las figuras 45 - 50 se muestra la edición del experimento XCORFE del glucósido AH peracetilado, en los que se indica el átomo de hidrógeno que transfirió la magnetización y el átomo de ^{13}C que recibió la magnetización. Como puede observarse en los espectros el tiempo de evolución y mezclado de los pulsos se optimizó para detectar la transferencia a través de tres enlaces de distancia.

Sobresalen los espectros en que se transfiere magnetización a través de heteroátomos que unen a los monosacáridos, confirmando la secuencia de unión establecida con los experimentos ENO.

Con los resultados mostrados se demuestra la capacidad del experimento XCORFE para asignar inequívocamente las señales de ^{13}C y con ello construir el esqueleto de la molécula (ayudado con el experimento COSY) y además establecer la secuencia de unión de los monosacáridos sin realizar experimentos de relajación.

T A B L A I

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DE LOS SACARIDOS EN EL
GLUCOSIDO AH

	GLUCOSA		RAMNOSA	
	1 _H	13 _C	1 _H	13 _C
1	4.97	101.8	5.30	101.0
2	3.41	77.8	3.93	72.0
3	3.49	79.0	4.02	72.0
4	3.13	72.6	3.59	83.0
5	3.25	77.8	4.30	67.5
6	3.55	63.2	1.27	18.0
6a	3.85			

	QUINOVOSA		QUINOVOSA ¹	
	1 _H	13 _C	1 _H	13 _C
1	4.59	104.9	4.36	103.0
2	3.20	76.0	3.56	78.7
3	3.34	77.8	3.65	78.0
4	3.0	73.0	2.96	77.1
5	3.34	73.0	3.25	73.2
6	1.30	18.0	1.28	18.1

T A B L A I I

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS EN LOS SACARIDOS DEL
GLUCOSIDO AH PERACETILADO.

GLUCOSA		RAMNOSA		
1H	13C	1H	13C	
1	4.82	100.7	4.87	98.9
2	3.62	76.5	5.02	70.8
3	5.24	71.8	5.25	75.5
4	4.89	69.9	3.74	70.1
5	3.91	72.0	4.12	67.5
6	4.06	62.9	1.33	18.1
6a	4.28			

QUINOVOSA		QUINOVOSA ¹		
1H	13C	1H	13C	
1	4.96	100.8	4.48	101.5
2	4.86	69.8	3.80	71.8
3	5.16	73.9	5.12	73.7
4	4.77	74.2	4.61	74.6
5	3.75	70.2	3.63	69.9
6	1.20	17.6	1.15	17.7

CONCLUSIONES

- 1.- Se elucidó la estructura del glucósido AH con los experimentos : Transferencia de Coherencia por Relevó, Correlación homonuclear de desplazamientos químicos, Efecto Nuclear Overhauser y con espectrometría de masas. La fórmula del glucósido AH es : quinovosa - (1-4) - ramnosa - (1-2) - glucosa - (1-2) - quinovosa - (1-11) - ácido 11 - hidroxí hexadecanoico.
- 2.- Se asignaron los desplazamientos químicos de ^1H de cada uno de los monosacáridos, con los experimentos de Relay Coherence y COSY.
- 3.- Se asignaron los desplazamientos químicos de ^{13}C de cada uno de los monosacáridos, con el experimento HETCOR.
- 4.- La medición de los T_1 promedio de cada monosacárido permitió conocer la movilidad segmental del glucósido, corroborando que la quinovosa se encuentra en la parte terminal del glucósido.
- 5.- El experimento XCORFE del glucósido AH peracetilado, permitió determinar los sitios de unión de los monosacáridos y al mismo tiempo asignar inequívocamente los desplazamientos químicos de ^{13}C de los monosacáridos.
- 6.- Se demostró la aplicabilidad de los experimentos uni y bidimensionales de RMN para el estudio de moléculas orgánicas complejas, sin ninguna reacción química degradativa.

7.- Los sistemas analíticos acoplados CG - FTIR y CG - EM facilitaron la identificación de los ácidos carboxílicos presentes en la molécula del glucósido A.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- S. Pine, J. Hendrickson, D. Cram, G. Hammond " Organic Chemistry " 4th Edition Mc. Graw Hill.
- 2.- R. Morrison y R. Boyd " Química Orgánica " . Fondo Educativo Interamericano. 1976.
- 3.- J. Cooper " Spectroscopic Techniques for Organic Chemists " John Wiley & Sons. 1980.
- 4.- C.R. Smith Jr., L.H. Niece, H.F. Zobel and I.A. Wolf. Phytochem. 3 289 (1964).
- 5.- L. Gunther. Phytochem. 4 29 (1965).
- 6.- P.S. Jagat, S.G. Hari, M.K. Nandu and M.D. Manojit Phytochem. 12 2461 (1973).
- 7.- S. Singh and B. E. Stacey. Phytochem. 12 1701 (1973).
- 8.- L. A. Davies and R. Adams. J. Am. Chem. Soc. 1749 (1928).
- 9.- F. B. Power and H. Rogerson. J. Am. Chem. Soc. 80 (1910).
- 10.- A. Nikolin, B. Nikolin and M. Jankovic . Phytochem. 17 451 (1978).
- 11.- S. N. Khana and P. C. Gupta. Phytochem. 6 735 (1967).
- 12.- A. L. Misra and J. D. Tewari. Journal of Indian Chemical Society. 30 391 (1953).
- 13.- H. Okabe and T. Kawasaki. Tetrahedron Lettres 3123 (1970).
- 14.- H. Okabe, N. Koshito, K. Tanaka and T. Kawasaki. Chem. Pharm. Bull. 19 2394 (1971).
- 15.- H. Wagner und P. Kazmaier. Tetrahedron Letters 3233 (1971).

- 16.- H. Wagner und P. Kazmaier. Phytochem. 16 711 (1977).
- 17.- H. Wagner und G. Schwarting. Phytochem. 16 715 (1977).
- 18.- H. Wagner, G. Schwarting, J. Varljen, R. Bauer, M. E. Hamdard
M. Z. El-Faer and J. Beal. Planta medica 49 154
(1983).
- 19.- H. A. Darwin, K. P. Madhusudan and D. K. Kulshreshita.
Carbohyd. Res. 143 207 (1985).
- 20.- L. W. Bieber et al. Phytochem. 25 1077 (1985).
- 21.- Bolado Torres, Cecilia. " Estudio de los efectos del
extracto de raíz de tumbavaqueros sobre las cisuras
epilépticas ". Tesis de licenciatura Q.F.B. Escuela
de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila.
- 22.- Martínez, Maximino. " Las plantas medicinales de México "
Editorial Botas 5a. Edición. México 1969.
- 23.- Breitmaier, E. " ^{13}C NMR Spectroscopy ". Verlag Chemie
2nd Edition. New York 1978.
- 24.- Gunther, H. " NMR Spectroscopy. An Introduction "
Chapter VII a) Chapter IX. John Wiley & Sons.
Malta 1980.
- 25.- Gadian, D. " Nuclear Magnetic Resonance and its applica-
tions to living systems ". Clarendon Press. 1982
- 26.- E. Breitmaier, K. H. Spohn and S. Berger. Angew.
Chem. Internat. Ed. 14 144 (1975).
- 27.- G. Levy . " Topics in Carbon ^{13}C NMR Spectroscopy "
Vol. 1 John Wiley & Sons. 1980.
- 28.- D. Hey and L. Jackman. International Review of Science
Structure Determination in Organic Chemistry. Organic
Chemistry Series two. Vol. 1 Butterworth & Co.
London 1980.

- 29.- R. Behn and H. Gunther . Angew. Chem. Internat. Edit.
14 350 (1983).
- 30.- D. L. Rabenstein and T. Nakashima . Analyt. Chem.
51 1465 A (1979).
- 31.- Marion Perpick-Dumont. " A comparison of the sensitivity
and information contenet of various one and two dimensio--
nal NMR experiments ". Departamento de Química,
Universidad de Toronto. Comunicación personal.
- 32.- T. Jeneer. Ampere International Summer School.
Basko Polje, Yugoslavia (1971).
- 33.- W. P. Auer, E. Bartholdi and R. Ernst. J. Chem. Phys.
64 2229 (1976).
- 34.- G. A. Morris. Magn. Res. Chem. 24 371 (1986).
- 35.- A. Bax and R. Freeman. J. Magn. Res. 44 542 (1981).
- 36.- R. Freeman and G. Morris. J. Chem. Soc. Chemical
Communications. 684 (1978).
- 37.- T. Mareci and R. Freeman. J. Magn. Res. 48 158 (1982)
- 38.- W. F. Reynolds, D. Hughes, M. Perpick-Dumont and R. Enríquez
J. Magn. Res. 63 413 (1985).
- 39.- C. Bauer, R. Freeman and S. Wimperis. J. Magn. Res.
58 526 (1984).
- 40.- G. Eich, G. Bodenhausen and R. Ernst. J. Am. Chem. Soc.
104 3731 (1982).
- 41.- D. Hughes, R. Bell, T. Neilson and A. Bain. Can. J. Chem.
63 3133 (1985).
- 42.- A. Bax and G. Drobny. J. Magn. Res. 61 306 (1985).
- 43.- J. Dabrowsky, A. Ejchart, M. Kordowicz and P. Hanfland.
Org. Magn. Res. 25 338 (1987).

- 44.- M. Bernstein and L. Hall. J. Am. Chem. Soc.
104 5553 (1982).
- 45.- F. W. Mc Lafferty. " Interpretation of mass spectra "
3rd. Edition. University Science Books. California.
- 46.- G. Waller. " Biochemical applications of mass spectro-
metry ". 1976.

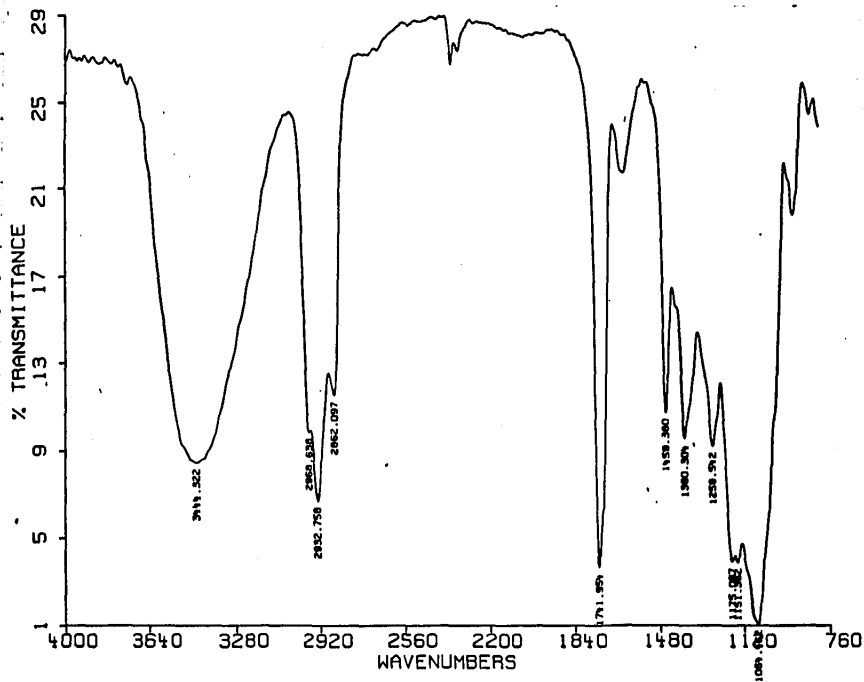


Figura 14.- Espectro IR del glucósido A

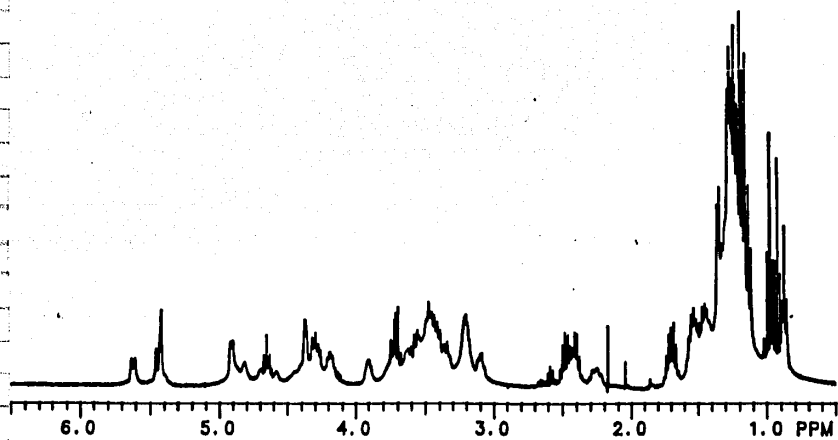


Figura 15.- Espectro RMN de ^1H del glucósido A.

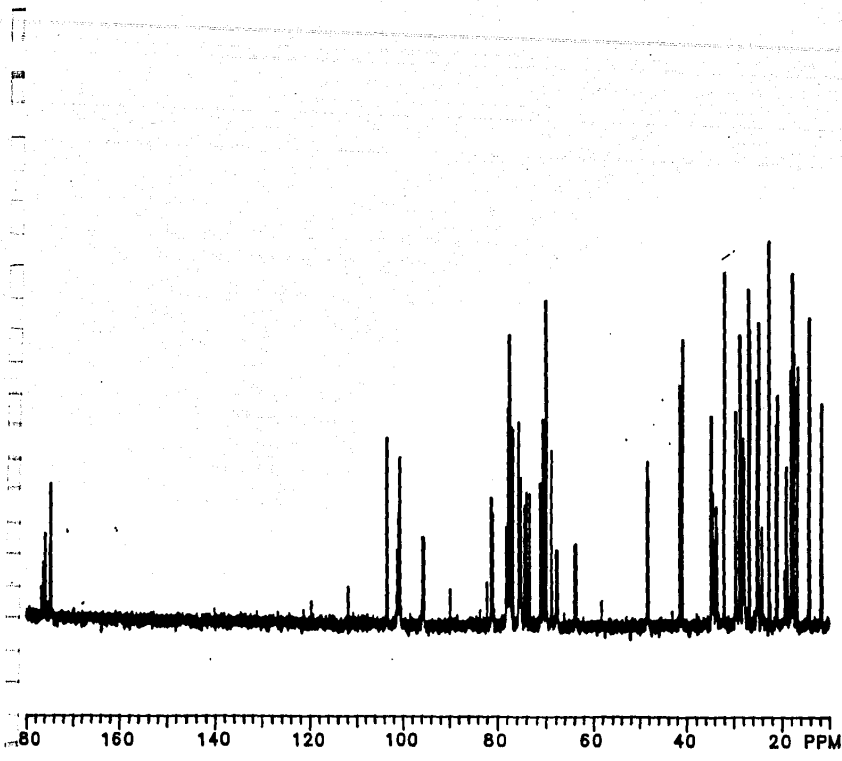


Figura 16.- Espectro RMN de ^{13}C del glucósido A.

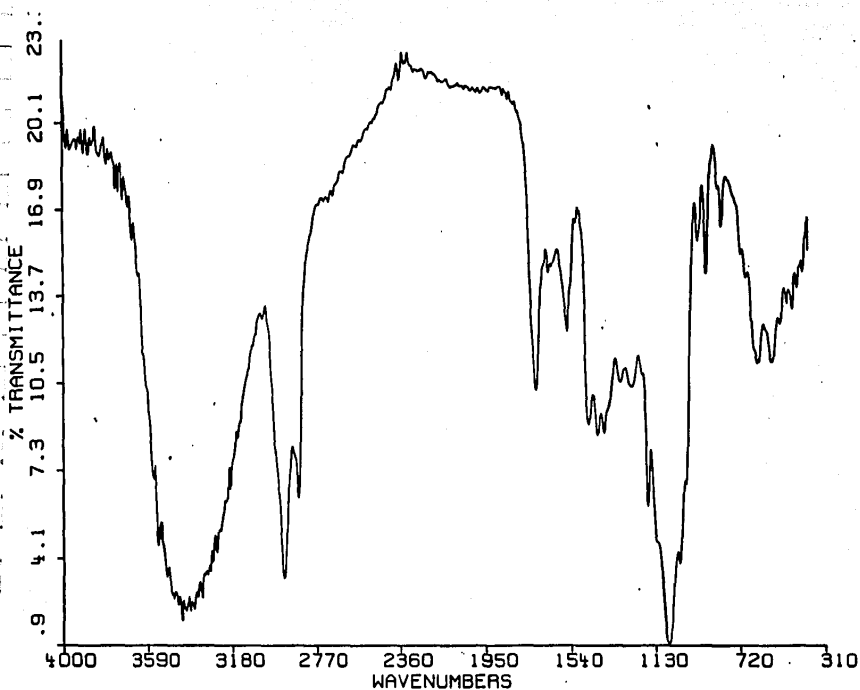


Figura 10.- Espectro IR del glucósido AH.

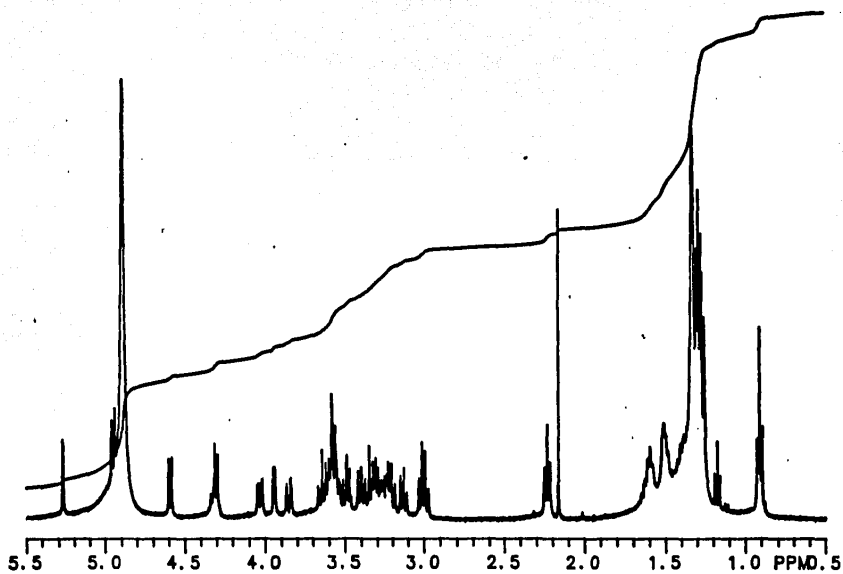


Figura 18.- Espectro RMN de ^1H del glucósido AH.

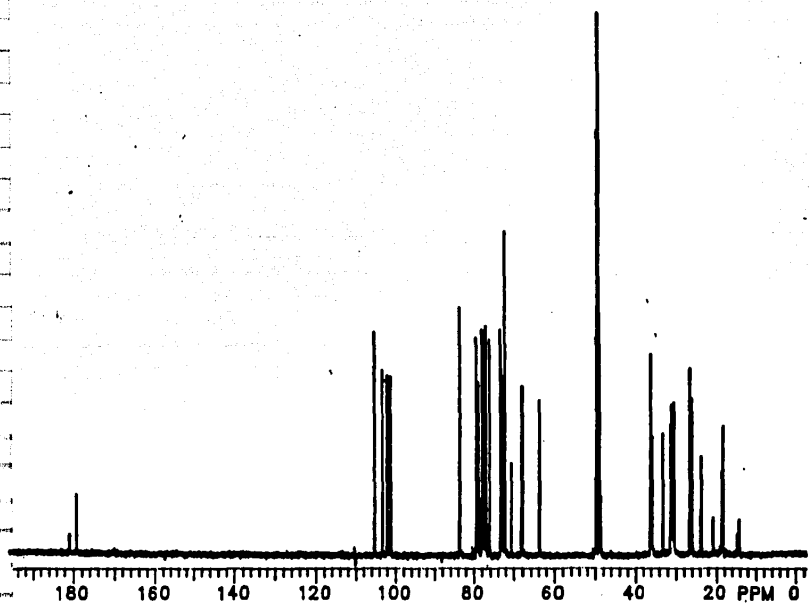


Figura 19.- Espectro RMN de ¹³C del glucósido AH.

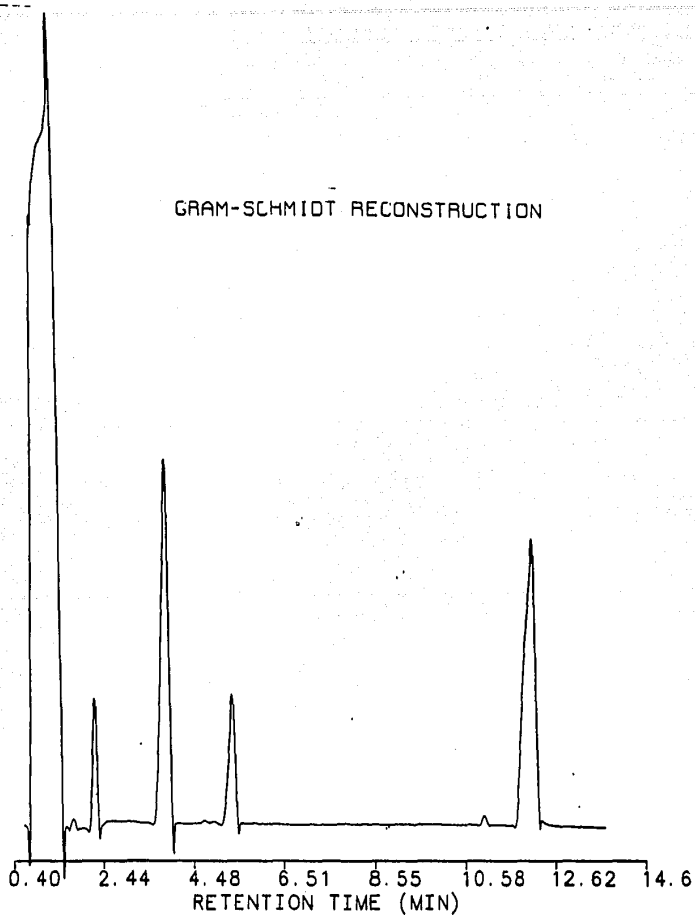


Figura 20.- Quimigrama de los esteres etlicos
provenientes del glucósido A.

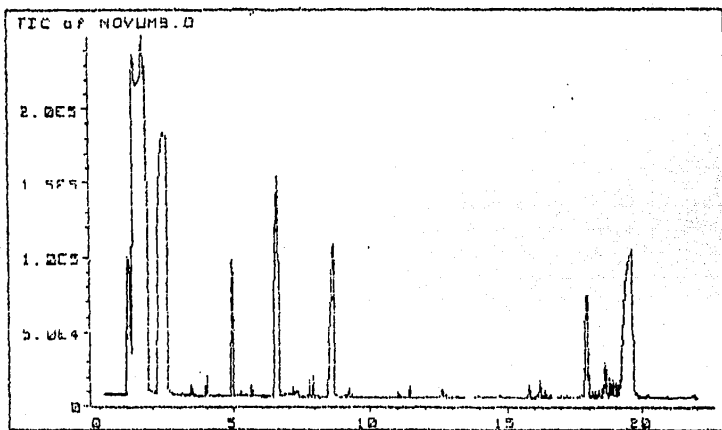


Figura 21.- Cromatograma de iones totales de los esteres etilicos del glucósido A.

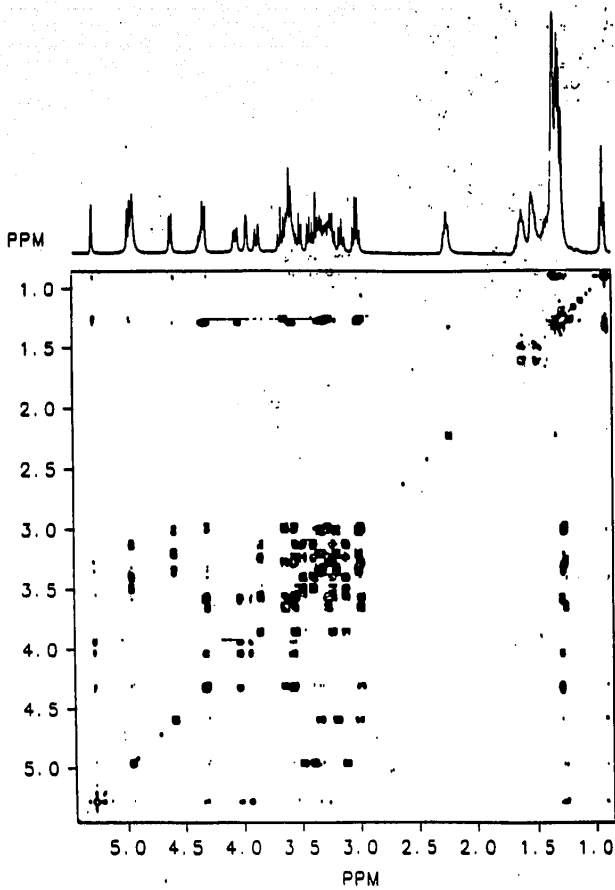


Figura 22.- Espectro Relay Coherence del glucósido-AH.

"EDITED" MONOSACCHARIDE SPECTRA

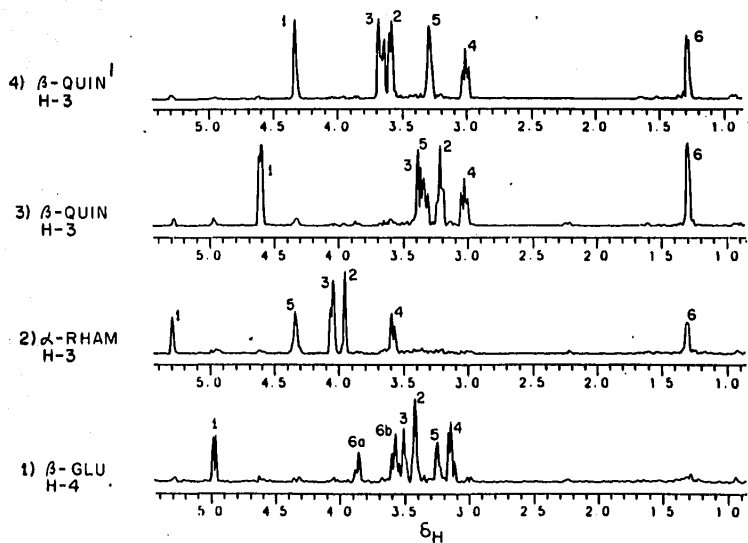


Figura 23.- Edici3n espectral del experimento
Relay Coherence.

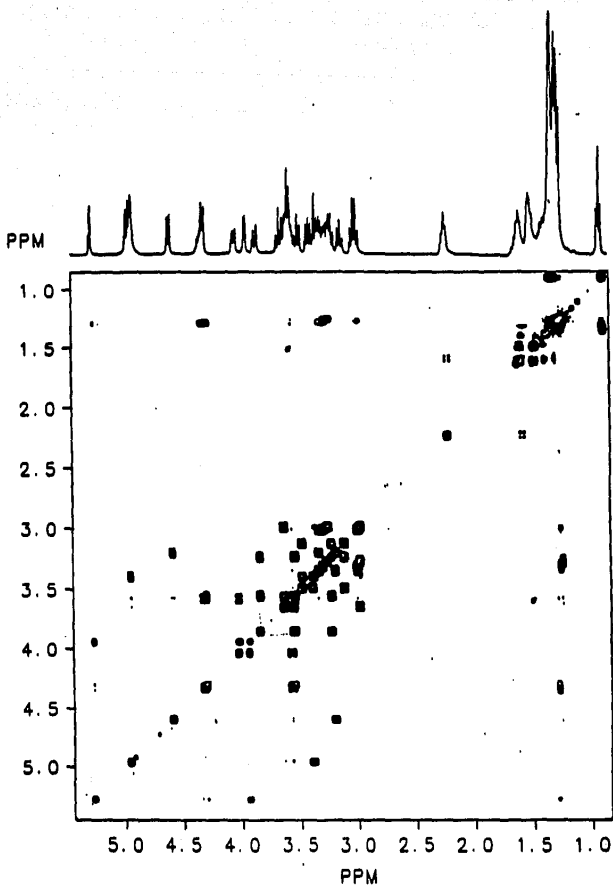


Figura 24.- Espectro COSY del glucósido AH.

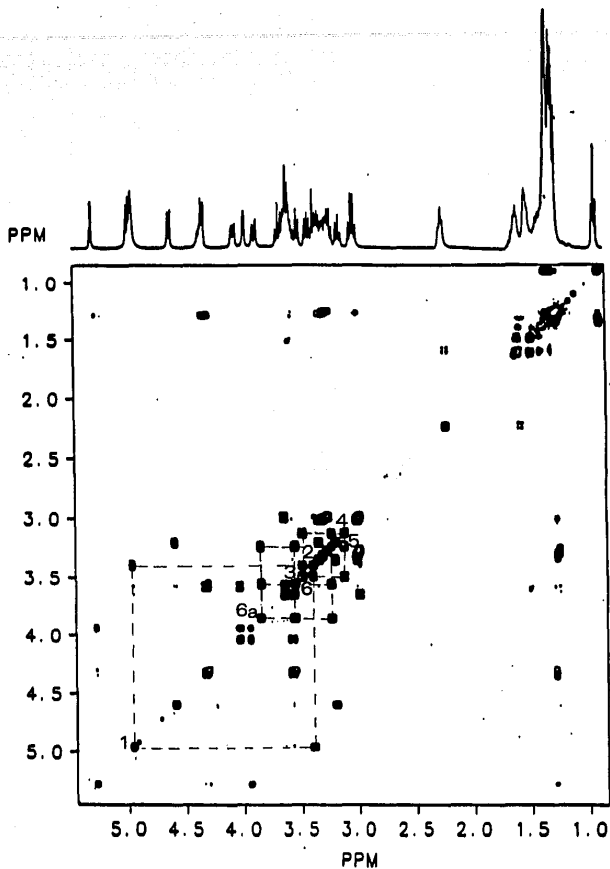


Figura 24a.- Cuadros de conectividad de la glucosa.

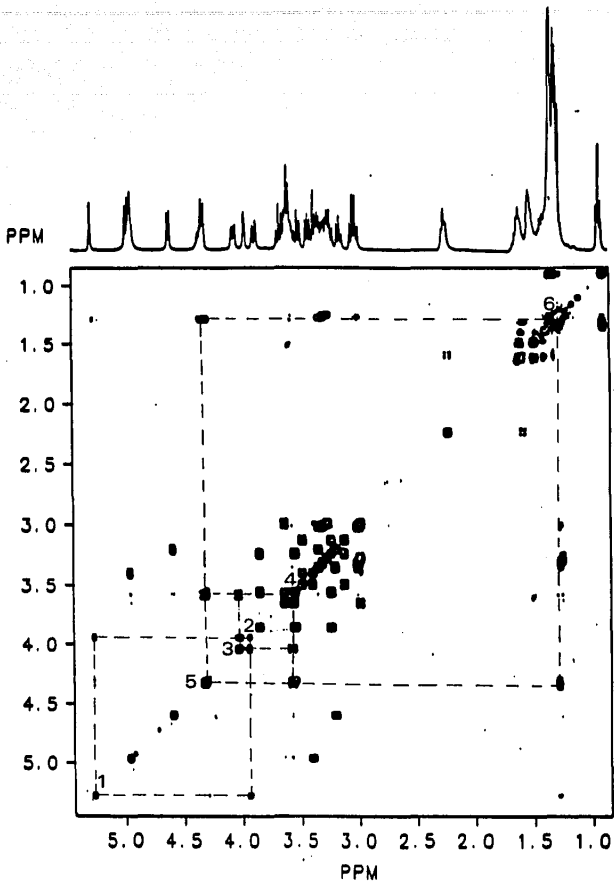


Figura 24b.- Cuadros de conectividad del ramnosa.

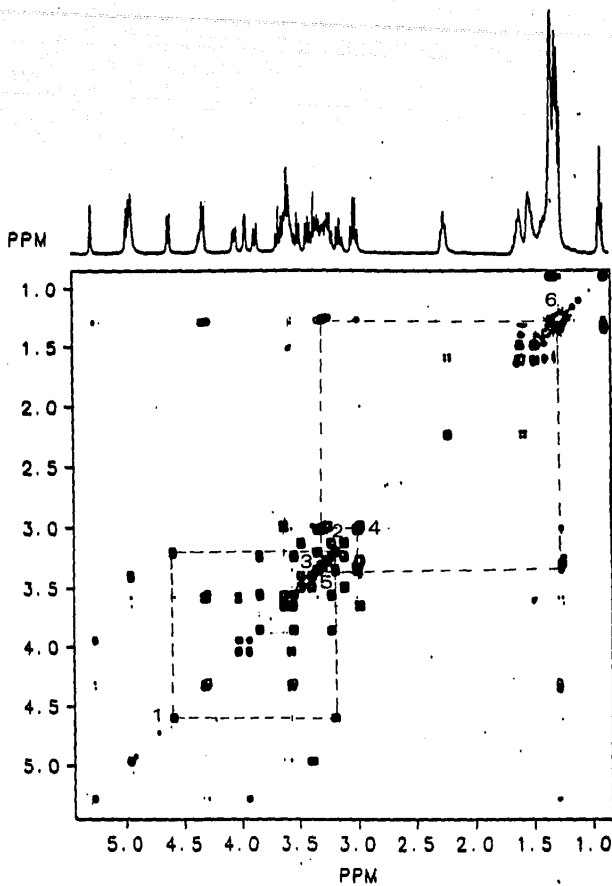


Figura 24c.- Cuadros de coenctividad de la quinovosa.

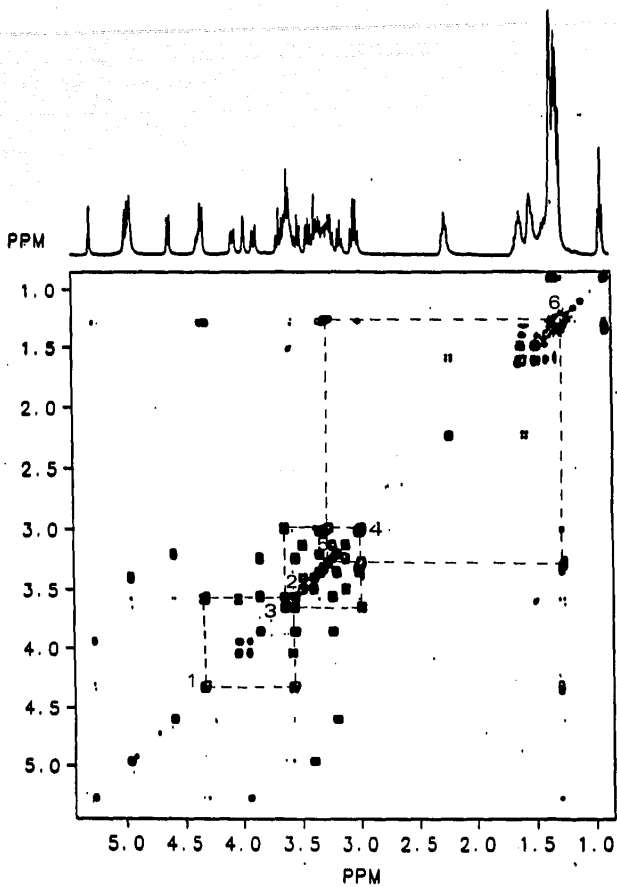


Figura 24d.- Cuadros de conectividad de la quinososa¹.

PM

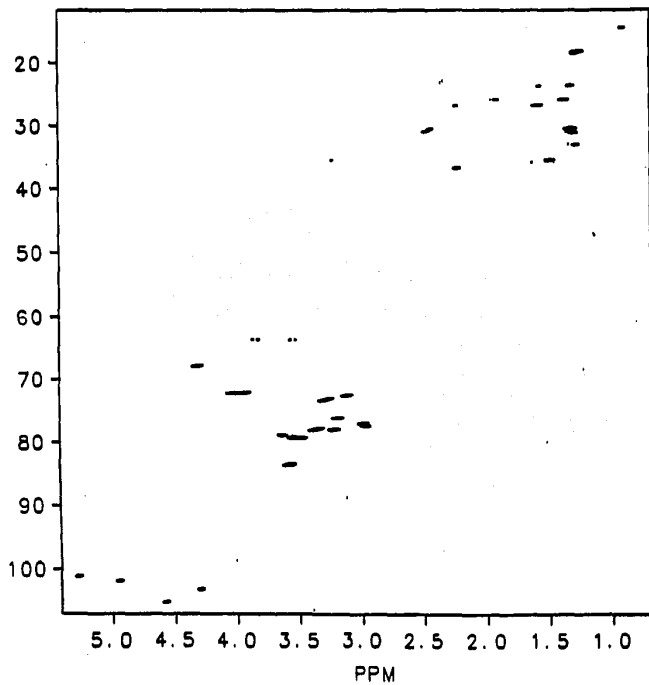


Figura 25.- Espectro HETCOR del glucósido AH.

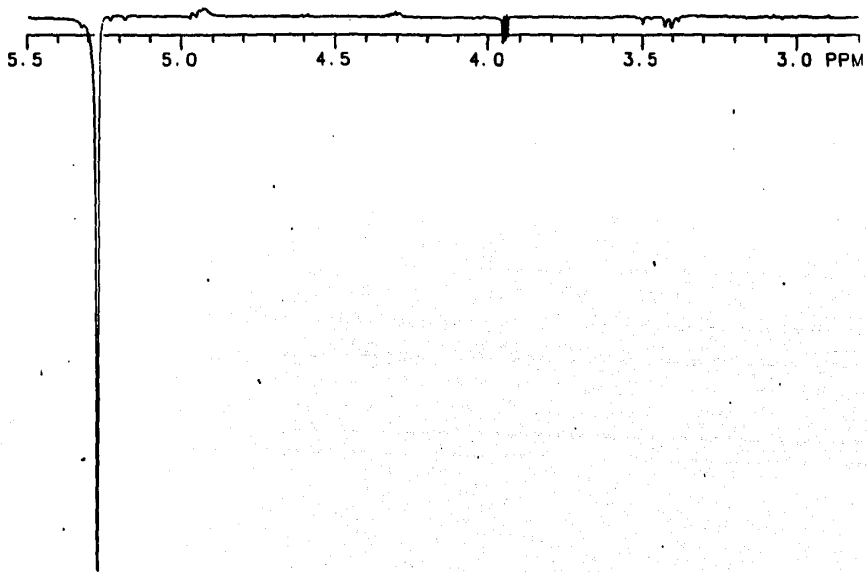


Figura 26.- Espectro ENO de la irradiación de H₁ de ramnosa.

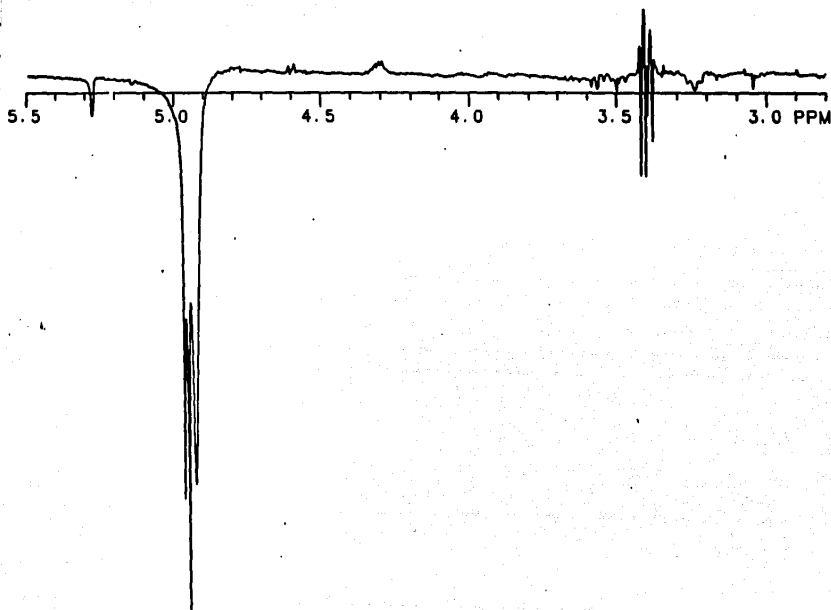


Figura 27.- Espectro ENO de la irradiación de H_1 de glucosa.

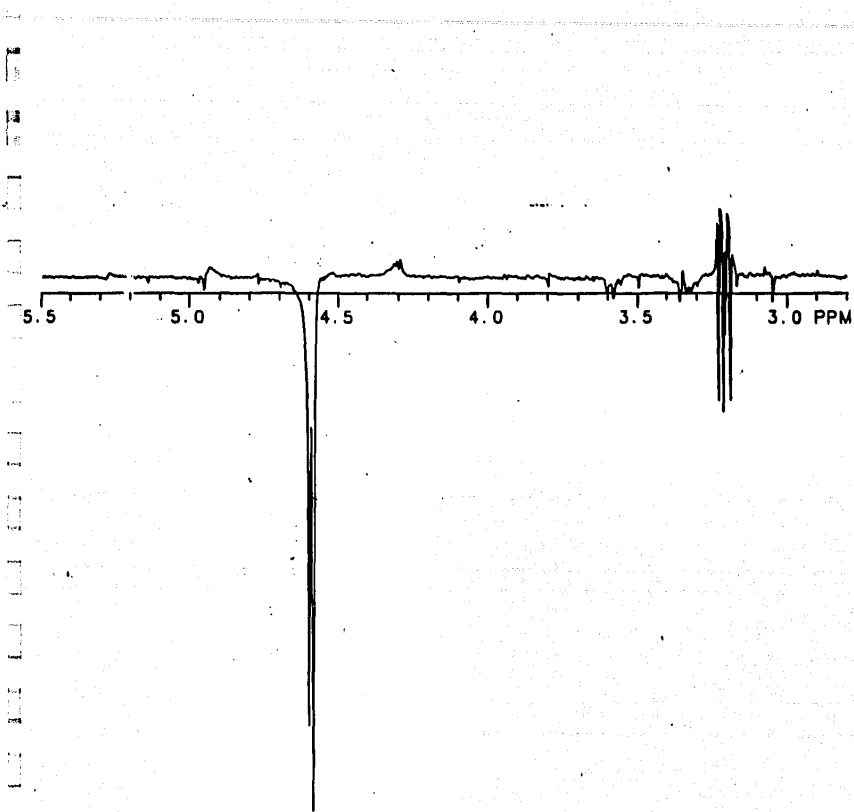


Figura 28.- Espectro ENR de la irradiación de H_1 de quinovosa.

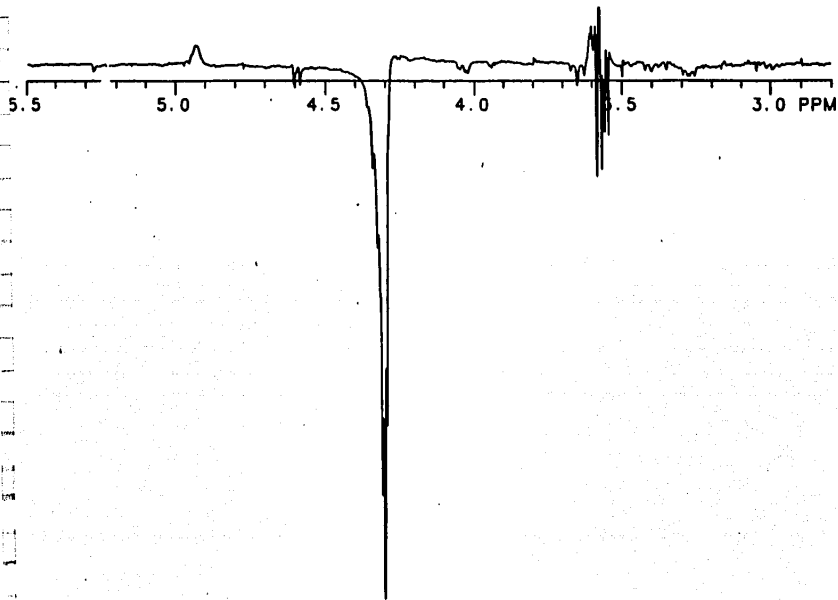


Figura 29.- Espectro ENR de la irradiación de H_1 de la quinovosol¹.

LIBRARY SEARCH RESULT FOR PEAK
1.71 MINUTES INTO RUN
OFN = 2
PROPIONIC ACID, ETHYL ESTER
RTN = 2241
PICO 1 ILR87.GC02P1

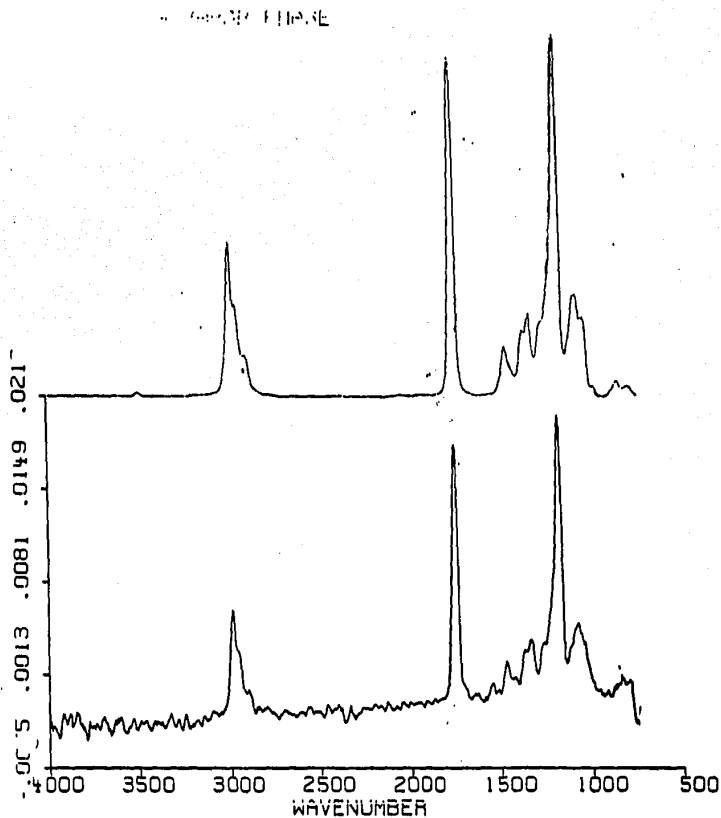


Figura 30.- Espectro IR del propanoato de etilo.

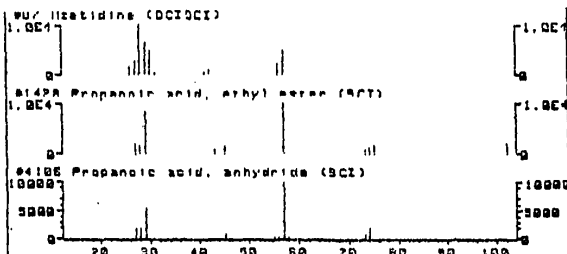
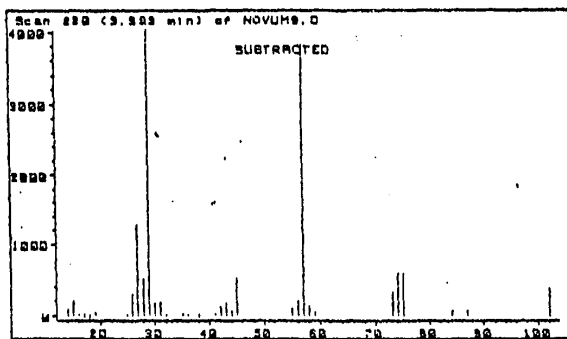


Figura 31.- Espectro de masas del propanoato de etilo.

LIBRARY SEARCH RESULT FOR PEAK
2.25 MINUTES INTO RUN
OFN = 2
ISOBUTYRIC ACID, ETHYL ESTER
RTN = 161
PICO 2 1LA87.GC02P2

EPA VAPOR PHASE

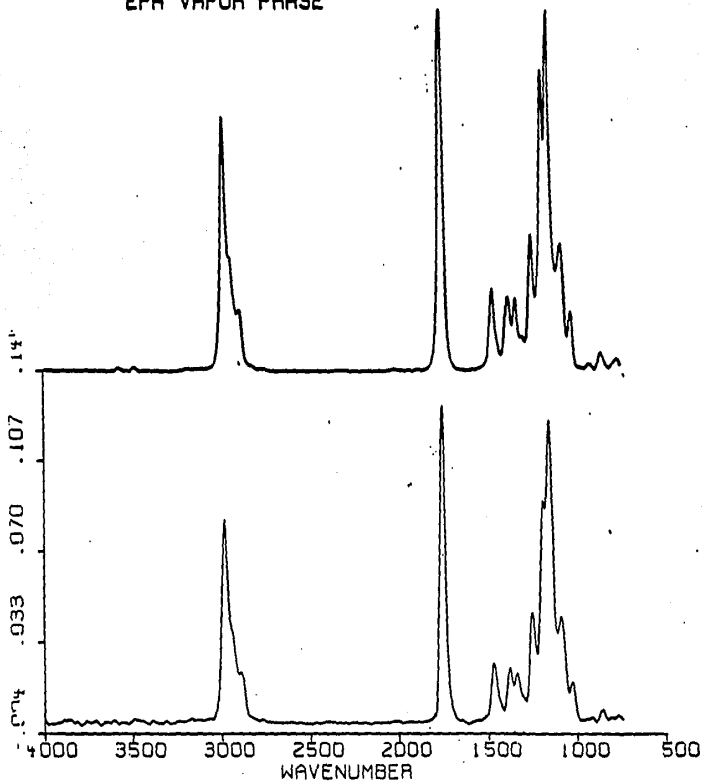
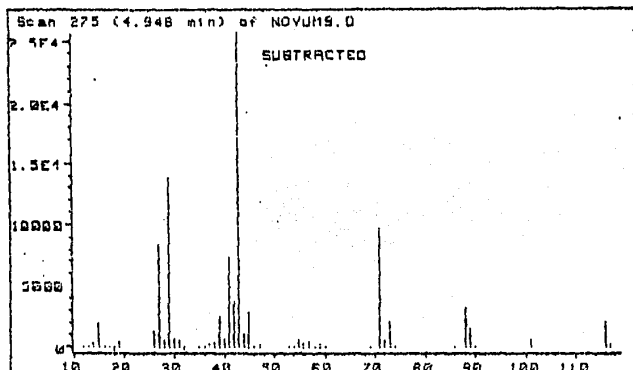


Figura 32.- Espectro IR del 2-metil propanoato de etilo.



Scan 275 (4.948 min) of NOVUMS.D

difference spectrum

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
14.00	1	30.00	2	43.00	100	72.00	1
15.00	6	31.00	1	44.00	3	73.00	7
19.00	1	38.00	1	45.00	10	88.00	12
26.00	5	39.00	9	55.00	1	89.00	9
27.00	32	40.00	2	57.00	1	101.00	1
28.00	1	41.00	29	71.00	37	116.00	7
29.00	54	42.00	14				

Figura 33.- Espectro de masas del 2-metil propanoato de etilo.

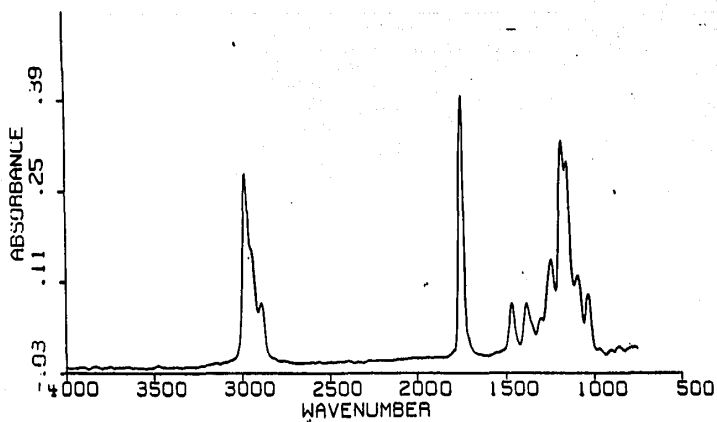


Figura 34.- Espectro IR de 2-metil butanoato de etilo.

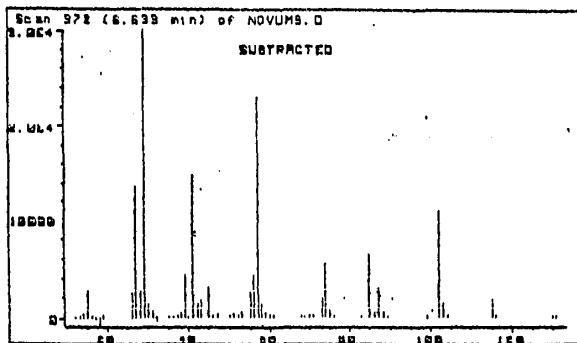


Figura 35.- Espectro de masas de 2-metil butanoato de etilo.

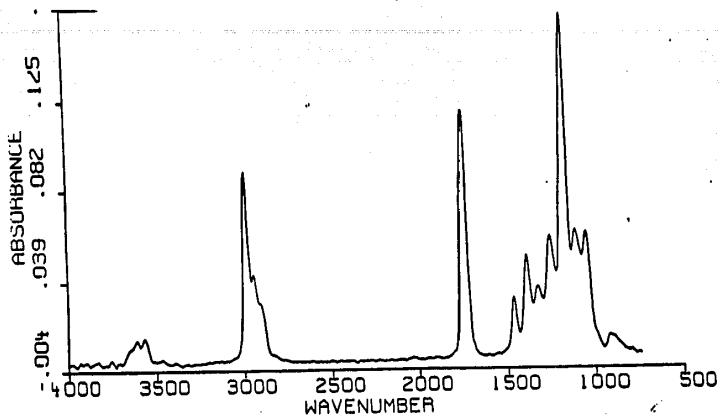


Figura 36.- Espectro IR de 3-hidroxi-2-metil butanoato de etilo.

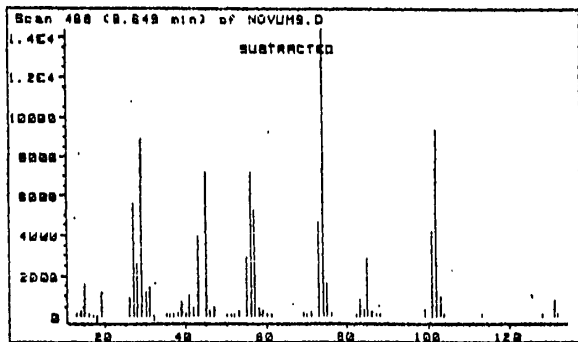


Figura 37.- Espectro de masas de 3-hidroxi-2-metil butanoato de etilo.

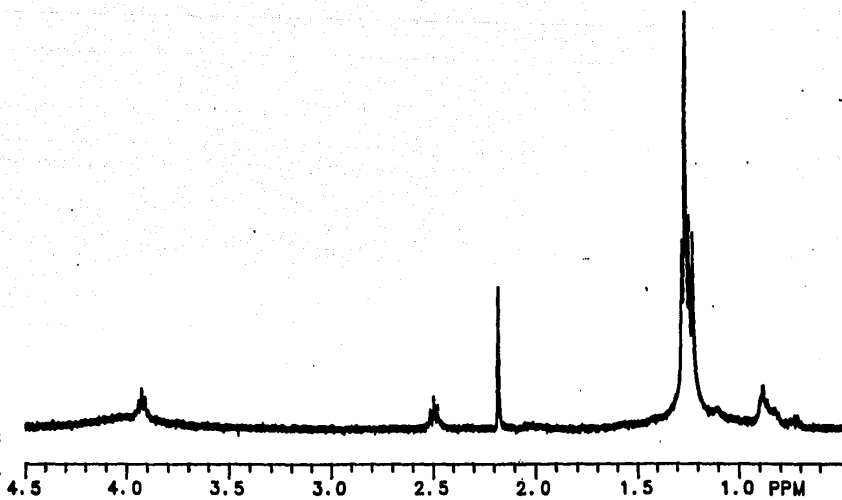


Figura 38.- Espectro RMN de ^1H de 3-hidroxi-2-metil butanoato de etilo.

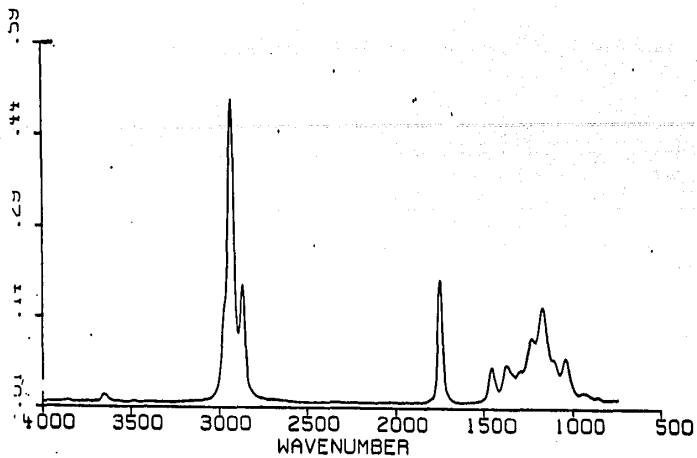


Figura 39.- Espectro IR del 11-hidroxi hexadecanoato de etilo.

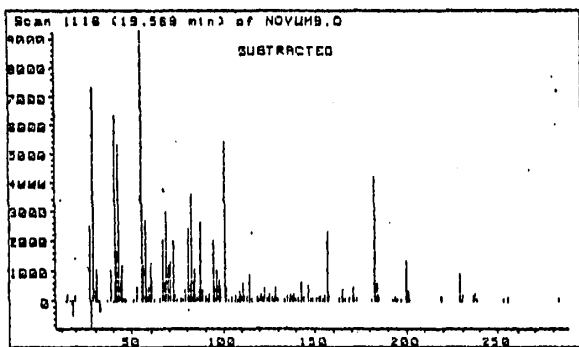


Figura 40.- Espectro de masas del 11-hidroxi hexadecanoato de etilo.

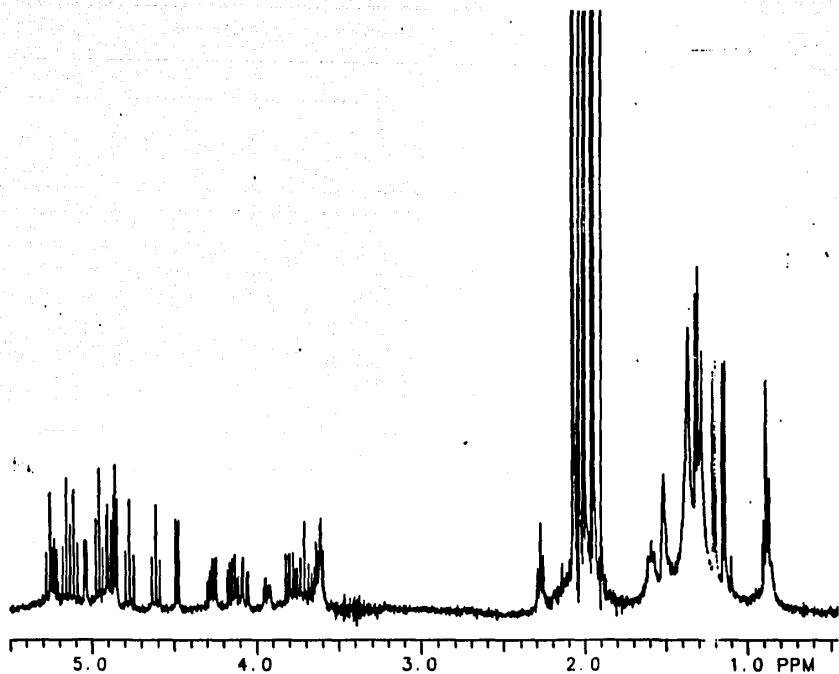


Figura 41.- Espectro RMN de ^1H del glucósido AH peracetilado.

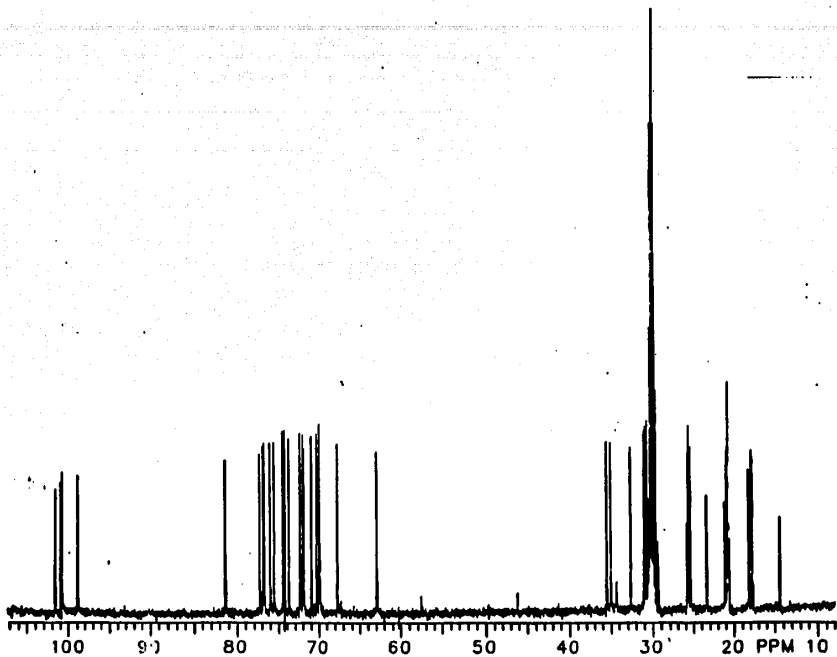


Figura 42.- Espectro RMN de ^{13}C del glucósido AH peracetilado.

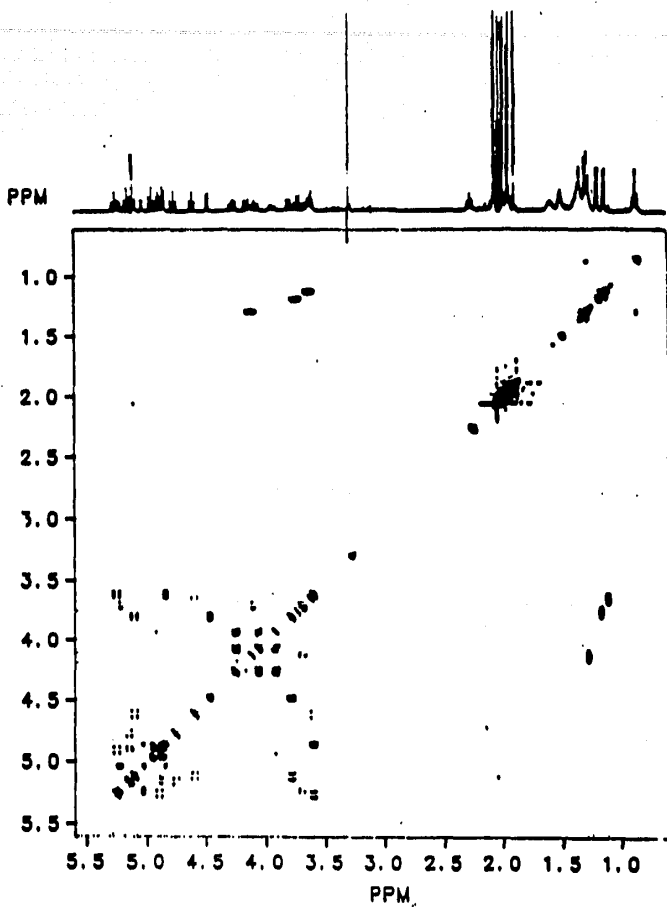


Figura 43.- Espectro COSY del glucósido AH peracetilado.

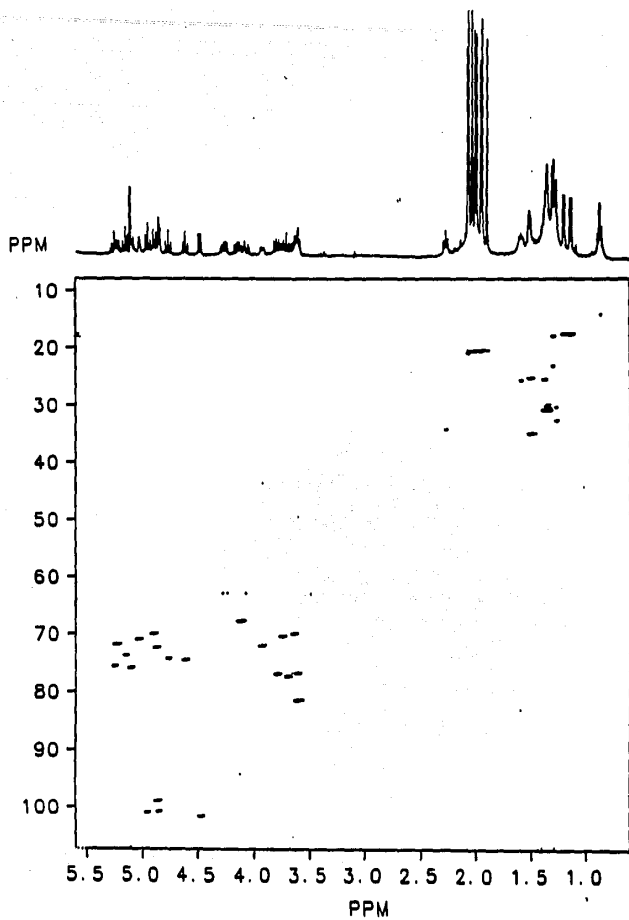


Figura 44.- Espectro HETCOR del glucósido AH peracetilado.

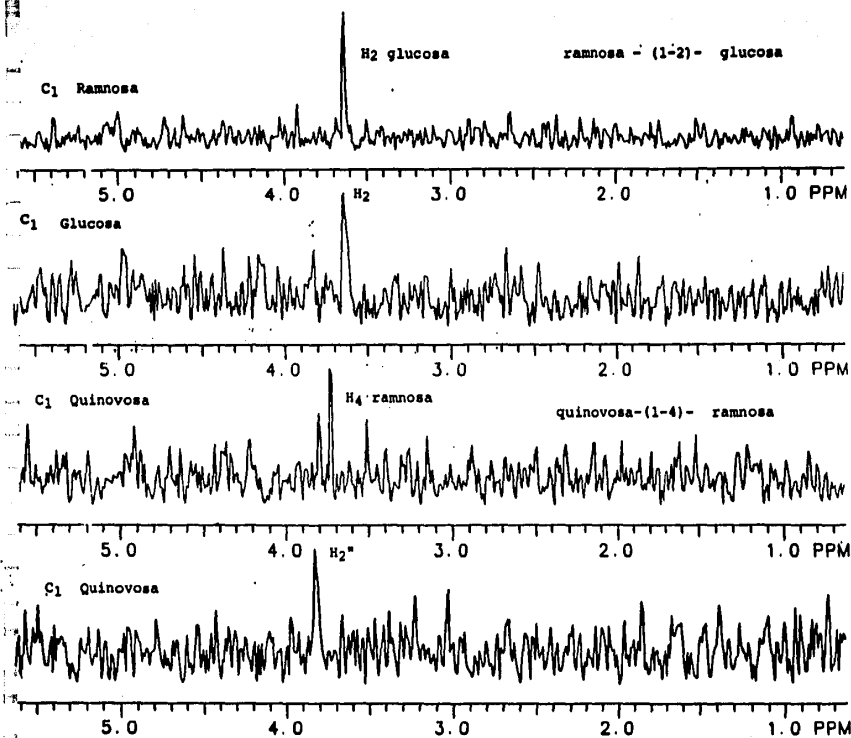


FIGURA 45

Las figuras 45 - 50 muestran la edición espectral del experimento XCORFE aplicado al glucósido AH peracetilado.

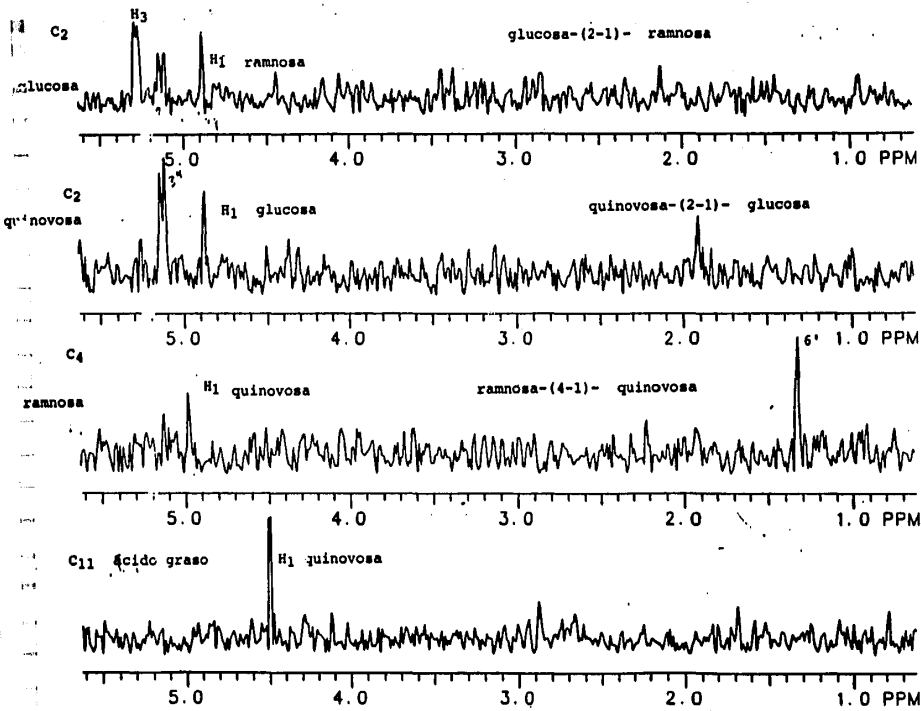


FIGURA 46

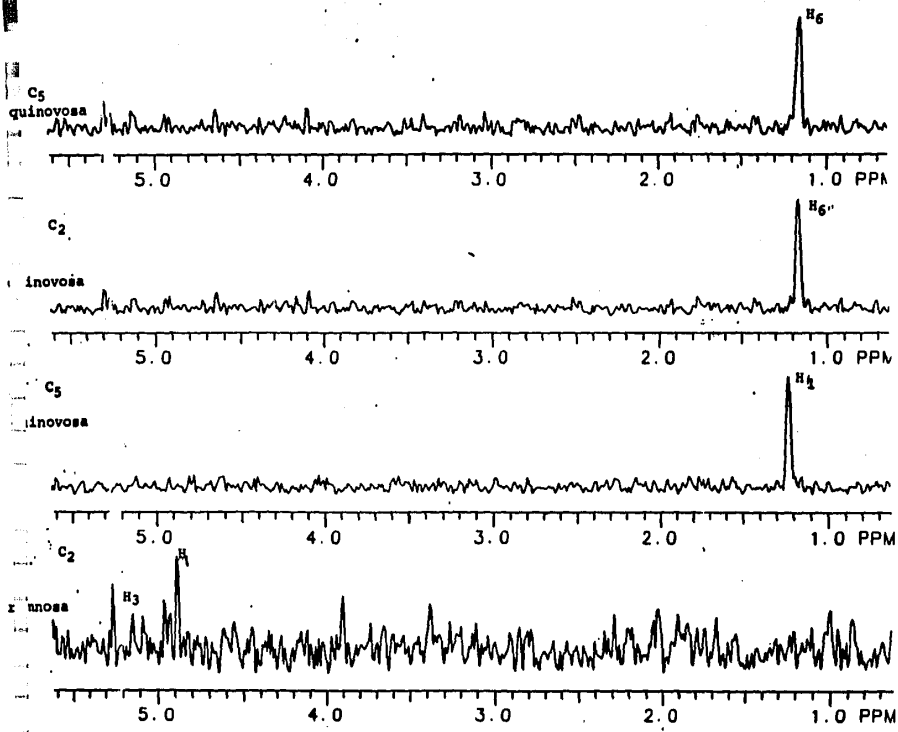


FIGURA 47

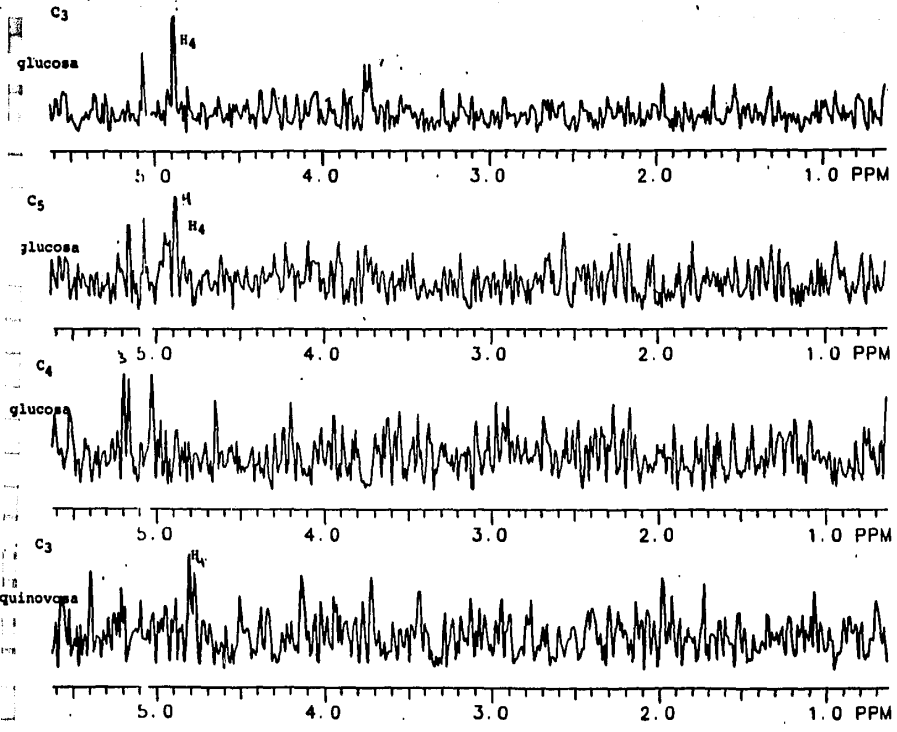


FIGURA 48

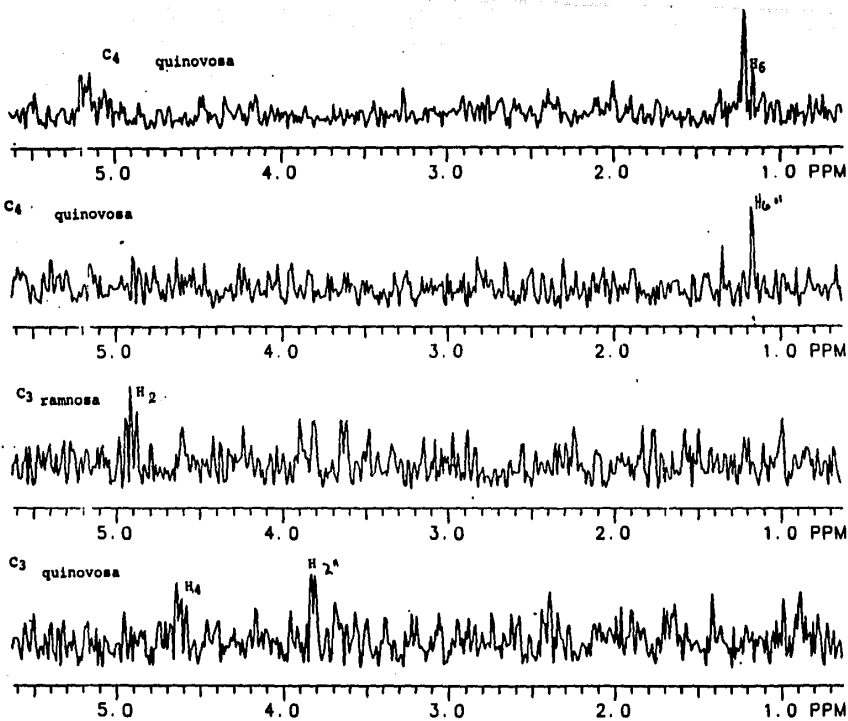


FIGURA 49

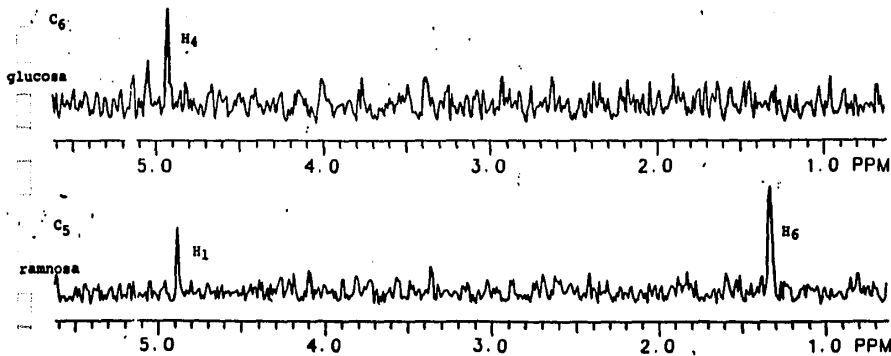


FIGURA 50