

13

00582

29

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO DE ESTRUCTURAS ORGANICAS
COMPLEJAS CON RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR
BIDIMENSIONAL MODERNA.**

**LOS GLUCOSIDOS DE IPOMOEA STANS Y
MICHROSECHIUM HELLERI**

T E S I S

**Que para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias Químicas
(Química Analítica)
presenta el**

M. C. ISMAEL LEON RIVERA

División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química. U N A M

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

264102

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

Dirección de Tesis :

DR. RAUL GUILLERMO ENRIQUEZ HABIB

Instituto de Química. U N A M

PROFR. WILLIAM FRANCIS REYNOLDS

Departamento de Química. Universidad de Toronto

AGRADECIMIENTOS

Las investigaciones realizadas en esta Tesis, fueron posibles gracias al apoyo de las siguientes instituciones:

Instituto de Química. U N A M

Departamento de Química. Universidad de Toronto. Canadá.

Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Laboratorio de RMN . Varian Associates Palo Alto, California



FACULTAD DE QUÍMICA
DIRECCIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
Director General de la Administración Escolar
Presente.

AT'N: Lic. Antonio Díaz García
Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado

Me es grato informarle que el alumno **M EN C ISMAEL LEÓN RIVERA** presentará próximamente su examen para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas (Química Analítica), ante el siguiente jurado:

Presidente:	Dra. Lena Ruiz Azuara
Primer Vocal:	Dr. Hugo Torrens Miquel
Segundo Vocal:	Dr. Dino Gnecco (UAP)
Tercer Vocal:	Dr. Norberto Farfán (CINVESTAV)
Secretario:	Dr. Eduardo Díaz Torres (IQ)
Primer Suplente:	Dr. Benjamín Ortiz Mendoza (IQ)
Segundo Suplente:	Dr. Francisco Yuste López (IQ)

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F. a de 5 de enero de 1998.

El Director

Dr. Enrique R. Bazúa Rueda

C.c.p.- Integrantes del Jurado
C.c.p.- Coordinador de Área
C.c.p.- Departamento de Control Escolar
C.c.p.- Interesado
CAPMDCQ*ggm.

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
INTRODUCCION.....	iii
ANTECEDENTES.....	iv
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	ix
OBJETIVOS.....	xi

CAPITULO 1.- RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR BIDIMENSIONAL MODERNA

1.1.-Formalismo de Producto de Operadores.....	1
1. 2.-Descripción de secuencias de pulsos de RMN bidimensionales.....	5
DEPT, Efecto Nuclear Overhauser, Relay Coherence, HETCOR, XCORFE, FLOCK, COSY, TOCSY, HMQC, HMBC, ROESY.	
1. 3.-Pulsos con gradiente de campo.....	21
COSY, TOCSY, HSQC, HMBC.	
1. 4.- Predicción lineal.....	30

CAPITULO 2.- SEPARACION DE GLUCOSIDOS DE IPOMOEA STANS Y MICHROSECHIUM HELLERI

2. 1.-Separación de glucósidos de la fracción cromatográfica A de Ipomoea stans.....	32
2. 2.-Separación de glucósidos de la fracción cromatográfica B de Ipomoea stans.....	33
2. 3.-Separación de los glucósidos del extracto metanólico de Michrosechium helleri.....	36

CAPITULO 3.- GLUCOSIDOS DE IPOMOEA STANS

3. 1.-Caracterización estructural del ácido glucosídico de Ipomoea stans.....	37
Caracterización inicial del ácido glucosídico	
Caracterización del ácido 11-hidroxihexadecanoico	
Caracterización de los monosacáridos en el ácido glucosídico	
Determinación del sitio de unión de los monosacáridos y con el ácido 11-hidroxihexadecanoico	
Estructura del ácido glucosídico de Ipomoea stans	
3. 2.-Caracterización de los glucósidos de la fracción cromatográfica A.....	48
Glucósido I	
Glucósido III	
Glucósido IV	
Glucósido V	
3. 3.-Caracterización de los glucósidos de la fracción cromatográfica B.....	66
Glucósido IV A	
Glucósido IV B	
Glucósido V	
Glucósido VI	
Glucósido VII	

3. 4.-Actividad citotóxica y antimicrobiana de los glucósidos de la fracción cromatográfica B de Ipomoea stans.....	81
3. 5.-Resultados.....	82

CAPITULO 4.- GLUCOSIDOS DE MICHROSECHIUM HELLERI

4. 1.-Estructura del triterpeno en los glucósidos F y G.....	84
Caracterización inicial de los glucósidos F y G	
Identificación del aglicón	
Estructura del aglicón en los glucósidos F y G de amole	
4. 2.-Estructura del las cadenas de sacaridos en el glucósido F.....	93
Identificación de los monosacáridos	
Determinación de los sitios de unión intersacáridos	
4. 3.-Estructura de los glucósidos F y G de amole.....	103

CAPITULO 5.- LA PREDICCIÓN LINEAL EN EL PROCESAMIENTO DE DATOS EN UN ESPECTRO DE RMN BIDIMENSIONAL

5. 1.- Predicción lineal en el procesamiento de datos de diferentes experimentos de RMN....	105
HSQC	
HMQC	
HMBC	
2QF COSY	
COSY	
Llenado con ceros	
Predicción lineal en f2	
5. 2.-Resultados.....	115

CONCLUSIONES.....	116
-------------------	-----

BIBLIOGRAFIA.....	117
-------------------	-----

PUBLICACIONES

ABSTRACT

The more polar oligosaccharide fraction from the ethyl acetate extract from the root of *Ipomoea stans* Cav. was separated by HPLC in the reverse mode phase. The integration areas suggested that these fractions, listed in order of increasing retention time, were present in relative amounts of IV A 10 %, IV B 10 %, V 20 %, VI 40 %, VII 20 %. After repeated separations, each compound was available with a purity of 90 - 95 %.

Five new tetrasaccharide glycosides, differing from those previously reported in the type of short-chain fatty acids ester linked to the tetrasaccharide core, have been isolated and identified from the more polar fraction of *Ipomoea stans* Cav. (Convolvulacea). Two of the structures of the new glycosides have only two short-chain acids esterified on the sugar units. Preliminary screening tests showed glycoside VII had pronounced cytotoxicity toward two human tumor cell lines.

A combination of ^1H and ^{13}C NMR spectra in conjunction with COSY, TOCSY, HMQC, HMBC and ROESY NMR experiments were used to assign structures and spectra of glycosides IVA, IVB and VII. Glycosides V and VI were assigned using COSY, HSQC, HMBC and ROESY spectra, using pulse field gradient versions of these sequences.

The higher polarity of these fraction of *Ipomoea stans* presumably reflects the fact that each of the isolated compounds in this fraction have one or more free OH groups in the tetrasaccharide unit and attached short chain acids than the compounds from the less polar fraction.

Two new saponins (glycosides F and G) were isolated by HPLC from the methanolic extract of the root of *Michrosecium helleri*. The structure elucidation of the aglycone was achieved by a combined interpretation of COSY, TOCSY, HMQC, HMBC and ROESY spectra. The assignments and connectivities of protons were derived from the TOCSY spectrum and confirmed by the COSY experiment. The carbon connectivities were derived from the HMBC experiment.

Linear prediction was used in several two dimensional NMR experiments showing improvements in resolution, signal / noise ratio and diminishing acquisition time in the spectrometer. Zero filling is not as good as linear prediction in the same experiments at the same conditions.

R E S U M E N

La investigación que se presenta muestra la aplicación de una metodología analítica de separación, elucidación y estudio estructural de los glucósidos contenidos en las plantas *Ipomoea stans* y *Michrosetchium helleri* que poseen estructuras moleculares complejas.

A partir del extracto de acetato de etilo de la raíz de *Ipomoea stans* se separaron dos fracciones A y B (de menor y de mayor polaridad) por cromatografía en columna, la separación y purificación de los glucósidos contenidos en las dos fracciones se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se utilizó una columna analítica con fase inversa (ODS) y como fase móvil una mezcla acetonitrilo / agua, se encontró que la temperatura es un factor muy importante para tener una buena resolución de los picos cromatográficos, la detección se realizó a 220 nm. Se purificaron los cuatro glucósidos mas abundantes de la fracción de menor polaridad y los cinco glucósidos mas abundantes de la fracción de mayor polaridad.

La elucidación estructural de los glucósidos de *Ipomoea stans* se realizó con los siguientes experimentos de RMN: COSY, RELAY COHERENCE, TOCSY, HETCOR, HMQC, HMBC, ROESY, XCORFE y FLOCK, las secuencias de pulsos se realizaron en sus versiones de ciclos de fases o de gradiente de campo. Las estructuras de los nueve glucósidos purificados tienen como el esqueleto principal una macrolactona, cuya fórmula es ácido 11-hidroxipalmitico-11-O-4-O- β -D-quinovopiranosil-(1-4)-O- α -L-ramnopiranosil]-(1-2)-O- β -D-glucopiranosil-O-(1-2)- β -D-quinovopiranosil. Las diferencias entre los nueve glucósidos radican en la naturaleza del ácido carboxílico de cadena corta y su ubicación en la cadena oligosacárida.

Se realizaron pruebas de actividad antimicrobiana y citotóxica de las fracciones cromatográficas A y B de *Ipomoea stans*, encontrandose actividad citotóxica en ambas muestras y muy poca actividad antimicrobiana en ambas fracciones cromatográficas.

Michrosetchium helleri (amole) es una planta utilizada en el estado de Oaxaca por sus propiedades tensoactivas y que no ha sido objeto de estudio fitoquímico ni farmacológico. A partir del extracto metanólico del amole se separaron y purificaron dos glucósidos utilizando una columna semipreparativa de fase inversa (ODS), la fase móvil consistió de una mezcla metanol / agua, la detección se realizó a 210 nm con un detector de longitud de onda variable.

Las estructuras moleculares de los glucósidos F y G se identificaron con los siguientes experimentos de RMN: COSY, TOCSY, HSQC, HMBC y ROESY. Las fórmulas moleculares de los glucósidos F y G corresponden a saponinas y son derivados del ácido bayogenoico, la diferencia estructural entre ambas es una molécula de glucosa ausente en el glucósido G.

Se realizó un estudio del efecto de la predicción lineal en el procesamiento de datos en un espectro de RMN bidimensional. Se utilizaron dos moléculas para el estudio el ácido grandiflorénico obtenido de *Montanoa tomentosa* y el glucósido F obtenido de *Michrosechium helleri*. Los resultados muestran que la inserción de la predicción lineal en muchos experimentos de RMN bidimensional, presenta grandes ventajas tales como mejora de la resolución, disminución del tiempo de uso del espectrómetro y aumento de la relación señal / ruido.

La utilidad de la RMN en el estudio de estructuras orgánicas complejas intactas, como son los glucósidos de *Ipomoea stans* y *Michrosechium helleri* queda demostrada con los resultados obtenidos en esta tesis.

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

La familia de las Convolvuláceas se caracteriza porque estas plantas producen resinas glucosídicas que son generalmente macrolactonas compuestas de oligosacáridos unidos a un ácido graso hidroxilado, otros ácidos de cadena corta se encuentran esterificados a los sacáridos en diferentes posiciones.

La población mexicana ha utilizado diferentes especies de *Ipomoea* tales como : *Ipomoea batatas* (camote), *Ipomoea purga* (raíz de Jalapa), *Ipomoea orizabensis* (jalapa de Orizaba), *Ipomoea stans* (tumbavaqueros), *Ipomoea pes-caprae* e *Ipomoea tricolor* a las cuales se les ha atribuído una amplia gama de propiedades medicinales, sin que hasta el momento muchas de ellas hayan sido confirmadas experimentalmente. La dificultad de realizar estudios farmacológicos con los oligosacáridos de las Convolvuláceas se debe en mucho a la dificultad de aislar, purificar y elucidar estructuralmente cada uno de los componentes individuales de las resinas glucosídicas.

Ipomoea stans es una Convolvulácea originaria de México y que la tradición popular recomienda para: el tratamiento de los "nervios", evitar el embarazo, controlar la histeria, controlar los movimientos epilépticos, así como un agente purgante.

La complejidad estructural de los glucósidos de *Ipomoea stans* y su similitud estructural, representan dos retos importantes para el desarrollo de una metodología analítica que permita identificar sus estructuras químicas y con ello entender su comportamiento farmacológico.

Michrosechium helleri es otra planta con el nombre común de amole y que las poblaciones del estado de Oaxaca y Guatemala utilizan para lavar y como tónico para evitar la caída del cabello. A partir de la información etnobotánica consideramos la hipótesis de que la(s) estructura(s) responsable(s) de las propiedades tensoactivas eran saponinas. En la literatura no hemos encontrado datos reportados sobre estudios fitoquímicos ni farmacológicos de *Michrosechium helleri*.

La separación y purificación de los glucósidos de *Ipomoea stans* y de *Michrosechium helleri* se decidió realizar con la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), utilizando columnas de fase inversa como se ha realizado en la separación de muchos de los glucósidos de las resinas glucosídicas.

La metodología analítica de caracterización estructural de los glucósidos intactos de *Ipomoea stans* y de *Michrosechium helleri*, se basó en los métodos modernos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) Bidimensional de correlación homonuclear y heteronuclear sin recurrir a reacciones de degradación química o de formación de derivados.

La realización de esta investigación doctoral demostró que la RMN bidimensional moderna puede ser aplicada en el análisis estructural de glucósidos intactos con estructuras complejas.

A N T E C E D E N T E S

Resina glucosídica de *Ipomoea stans*

La propiedad mas conocida de las plantas pertenecientes a la familia botánica de las Convolvuláceas es el ser purgantes, también se les atribuyen propiedades citotóxicas, antimicrobianas, anticonvulsivas, etc., pero muchas de estas propiedades no han sido demostradas experimentalmente. Las propiedades antes mencionadas se atribuyen a las resinas glucosídicas, que son mezclas complejas de macrolactonas monoméricas de tetra, penta o hexasacáridos del ácido 11-hidroxihexadecanoico, donde los componentes individuales tienen gran similitud estructural. Como ejemplo de las estructuras de los glucósidos en las resinas glucosídicas considerese la figura 1.

Las primeras elucidaciones estructurales de las resinas glucosídicas de las Convolvuláceas se basaron en reacciones químicas de degradación, como son la hidrólisis básica para liberar el ácido glucosídico y los ácidos carboxílicos de cadena corta. Posteriormente la hidrólisis ácida del ácido glucosídico permite la separación de los monosacáridos y del ácido graso, los cuales son sometidos a derivación química para permitir su caracterización por sistemas acoplados cromatografía de gases - espectrometría de masas (CG - EM) y cromatografía de gases - infrarrojo (CG - IR).

Los ácidos carboxílicos identificados en las resinas glucosídicas son: acético, 2-metilpropanoico, butanoico, 2-metilbutanoico, 3-metilbutanoico, 2-metil-3-hidroxi-butanoico, tíglico, 3,6,6,9-diepoidecanoico, hexanoico, octadecanoico, dodecanoico, 11-hidroxihexadecanoico, 3,11-dihidroxitetradecanoico y eicosanoico. Los monosacáridos identificados en las resinas glucosídicas son: D-glucosa, D-fucosa, D-quinovosa, L-ramnosa y D-xilosa.¹⁻⁵⁶

El ejemplar de *Ipomoea stans* estudiado en esta investigación fue colectado en el km 93 de la carretera Puebla - Orizaba en el estado de Puebla. La clasificación botánica fue realizada por el Dr. M. Martínez del Instituto de Biología de la UNAM.

La raíz seca y molida de *Ipomoea stans* se sometió a extracción con n-hexano, acetato de etilo y metanol. El extracto de acetato de etilo se separó por cromatografía en columna, obteniéndose dos fracciones cromatográficas llamadas A (menos polar) y B (mas polar). La fracción cromatográfica A es diez veces mas abundante que la fracción B.

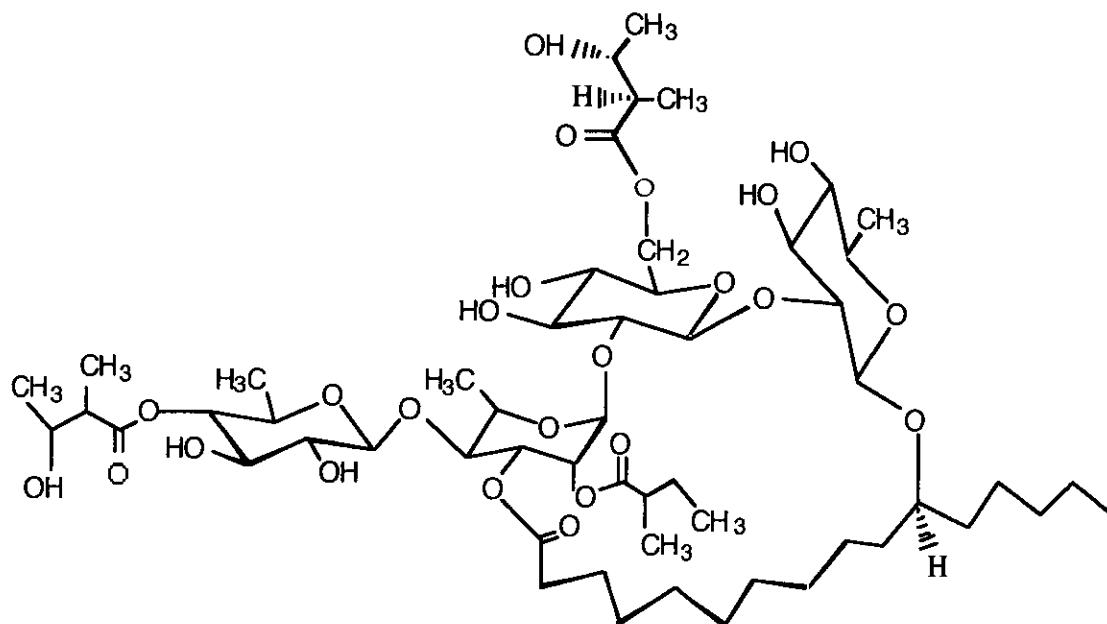


Figura 1.- Estructura del glucósido V de la fracción A de *Ipomoea stans*, en la que se observan la cadena oligosacárida formada por cuatro monosacáridos, el ácido 11-hidroxihexadecanoico y los ácidos de cadena corta esterificados a los monosacáridos.

La caracterización inicial de las dos fracciones A y B por RMN de ^1H indicó que cada muestra consistía de un oligosacárido y un ácido carboxílico de cadena larga, se observan además otras señales de ácidos carboxílicos de cadena corta. Los espectros de RMN de ^{13}C mostraban que cada muestra consistía de una mezcla de varios compuestos con estructuras muy similares entre si ¹.

Las figuras 2 y 3 muestran expansiones del espectro DEPT de la fracción cromatográfica A en la que es fácil observar que esta muestra es una mezcla de componentes. Se pueden observar señales con desplazamientos químicos muy similares pero de intensidad diferente, debido a las diferentes proporciones en que se encuentran presentes cada uno de los componentes.

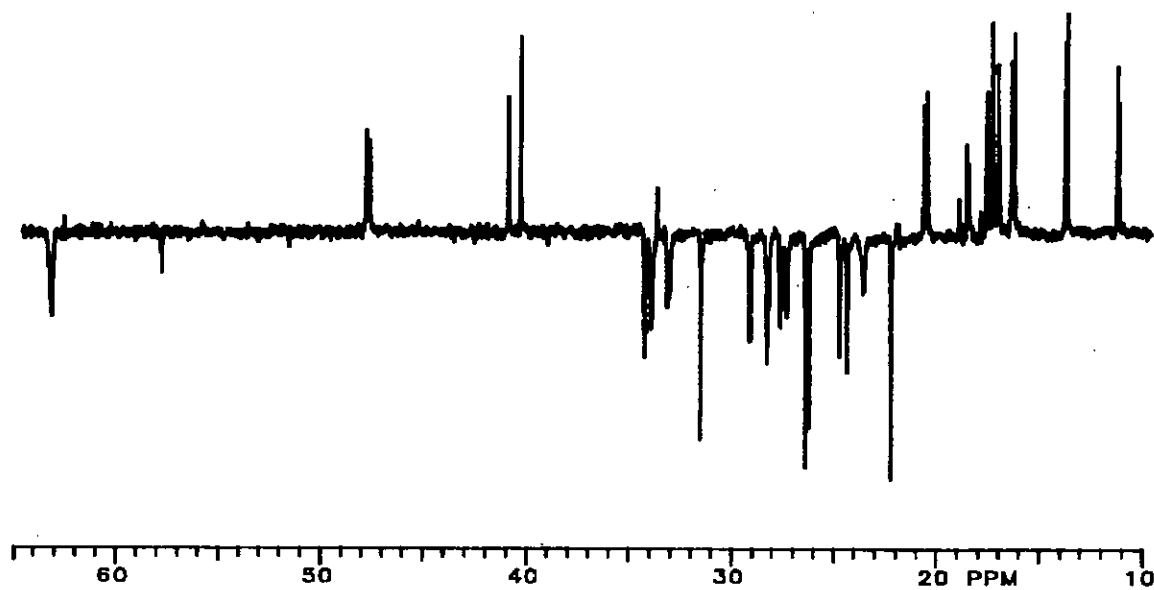


Figura 2. Expansión de una región del espectro DEPT, mostrando las señales de metilos y metinos con fase positiva y los metilenos con fase negativa de la fracción cromatográfica A de *Ipomoea stans*

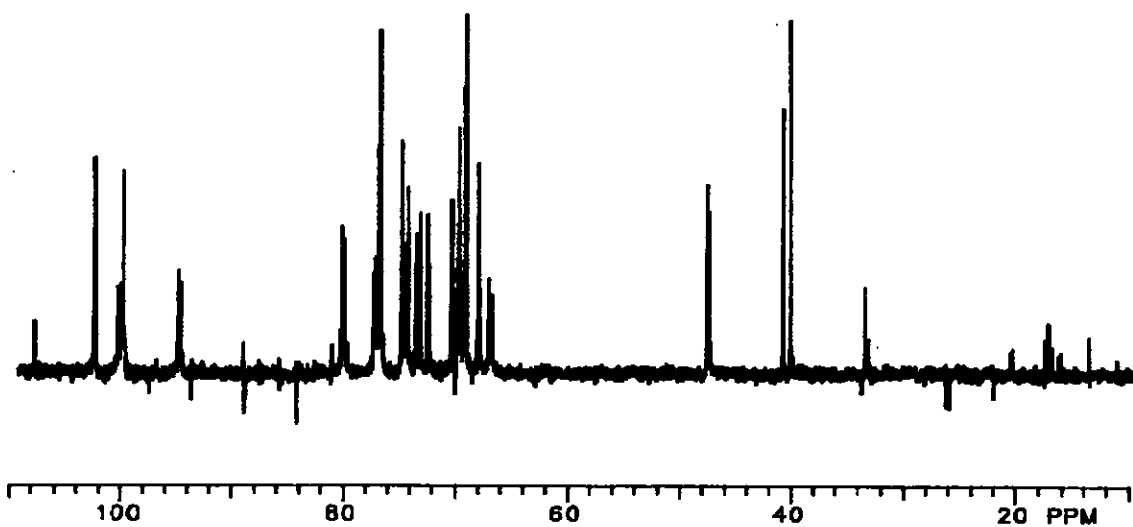


Figura 3. Expansión de una región del espectro DEPT de la fracción cromatográfica A de *Ipomoea stans*, mostrando las señales de los metinos.

La fracción A y la fracción B se sometieron a hidrólisis básica por separado, ambos productos de hidrólisis resultaron idénticos. El ácido glucosídico se sometió a una hidrolisis ácida, los azúcares y el ácido hidroxipalmítico liberados fueron identificados al analizarlos en sistemas acoplados CG - EM y CG - IR. ⁴

En el caso de los glucósidos de *Ipomoea stans*, ácidos orgánicos de bajo peso molecular derivados del ácido butírico se encuentran como sustituyentes de los monosacáridos. La problemática está centrada en conocer con exactitud, cuales sustituyentes se encuentran presentes y qué posiciones ocupan en el oligosacárido, esto es imposible de llevar a cabo cuando se emplea un método destructivo como es la hidrólisis. La RMN bidimensional moderna por otra parte, permite establecer la posición del sustituyente en la cadena de monosacáridos sin recurrir a reacciones químicas de degradación o formación de derivados.

Separación de glucósidos de Convolvuláceas

La separación de los sacáridos por cromatografía en capa fina no ha sido muy utilizada, ya que las interacciones de los hidroxilos de los sacáridos con los silanoles ocasiona el ensanchamiento de las bandas y por consiguiente una gran pérdida en la resolución. El uso de algunas sales inorgánicas permite la formación de complejos con los sacáridos disminuyendo las interacciones polares y favoreciendo las separaciones, sin embargo los complejos formados son bastante estables y ello limita su uso en escala preparativa para purificar sacáridos

Los mono y oligosacáridos generalmente son separados por cromatografía en papel, pero esta técnica requiere de mucho tiempo y a menudo la resolución no es suficiente para separar moléculas muy similares.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) aprovecha las pequeñas diferencias que existen en la configuración de las moléculas para su separación. Se han desarrollado los siguientes modos de separación: intercambio iónico, partición, fase inversa y exclusión de tamaños.

La separación de mono, di y trisacáridos se realiza principalmente empleando columnas de intercambio catiónico, que utilizan fase móvil acuosa. En este modo de separación la eficiencia es afectada por el contraíón en la columna y la temperatura.

La separación de los sacáridos por intercambio aniónico se realiza debido a la acidez de los grupos hidroxilos presentes en la molécula, ligeramente ácidos y que a pH mayores de 12 forman oxianiones. En la cromatografía de intercambio aniónico de alta eficiencia la separación de oligosacáridos se efectúa a pH controlado y con fases móviles salinas.

Otro modo de separación de oligosacáridos se realiza con columnas de sílice que tienen grupos amino ó ciano químicamente unidos, utilizando disolventes orgánicos como fase móvil, el mecanismo de separación es esencialmente de partición a través de las interacciones de puentes de hidrógeno con los grupos químicamente unidos sobre la sílice, un inconveniente de estas columnas es su reactividad con los azúcares reductores, lo cual afecta la resolución y favorece la aparición de picos fantasmas en el cromatograma.

La separación de sacáridos también se puede realizar con el mecanismo de partición en columnas de sílice equilibradas con una fase móvil que contiene aminas polifuncionales, las cuales son adsorbidas y son las responsables de la separación. Estas columnas en general presentan mejores características físicas que las químicamente unidas con amino o ciano, pero son bastantes inestables por la adsorción de la fase estacionaria.

El empleo de columnas de fase inversa (octil y octadecil silano generalmente) en la separación de sacáridos se debe a la facilidad para eluir todos los componentes de la inyección y a la gran resistencia química de la fase estacionaria. El mecanismo de separación de los oligosacáridos considera a las interacciones de van der Waals entre la cadena alifática y los sacáridos como las responsables de la separación.

La cromatografía de exclusión de tamaños es utilizada para determinar la distribución de pesos moleculares de polisacáridos (almidones y gomas), pudiendo separar monosacáridos de polisacáridos con este modo.

La separación de los glucósidos de las Convolvuláceas generalmente se ha realizado por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) con columnas de fase inversa, en las que los soportes tienen tamaños de partícula de 5 mm y ello ha mejorado la eficiencia de las columnas. 1, 2, 3, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 35, 37, 40, 41, 42, 44, 45, 46, 48, 54, 55

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los oligosacáridos son estructuras moleculares que contienen aproximadamente entre 3 y 10 unidades monoméricas. Estas últimas pueden ser del mismo o diferente tipo y es común encontrar tres o cuatro unidades de monosacáridos distintas presentes en la misma estructura molecular. El estudio estructural de oligosacáridos es de interés general, debido a que estas estructuras se encuentran presentes en una amplia gama de organismos vivos y tienen funciones biológicas cruciales al intervenir en procesos de transporte iónico, fenómenos osmóticos en las paredes celulares, etc.

La determinación estructural de oligosacáridos constituye un problema de considerable magnitud debido a la complejidad inherente de asignar una estructura molecular inequívoca a este tipo de sustancias. La asignación normalmente implica conocer la identidad de la unidad de monosacárido, el orden de la secuencia en que éstos se encuentran (ya que existe más de una unidad presente en la estructura molecular), el número total de unidades de monosacáridos y en el caso de glucósidos identificar la estructura de la aglicona.

El procedimiento que clásicamente se sigue para investigar estas sustancias es de naturaleza destructiva, ya que usualmente se requiere de reacciones de hidrólisis combinadas con otras de derivación química tanto previas (metilación, acetilación) como posteriores (silylación principalmente) a la reacción de hidrólisis. En algunos casos, también es utilizada la reacción de hidrólisis parcial, involucrando una laboriosa determinación de condiciones de reacción antes de controlar adecuadamente la ruptura molecular en fragmentos más sencillos.

En todos los casos clásicos, la metodología se basa en descomponer la molécula de oligosacárido en unidades más simples de analizar e identificar. El proceso de asignación cualitativo y cuantitativo se realiza indirectamente, es decir con los datos de una estructura química que ha sido destruída y por tanto ya no es posible repetir con ella nuevos experimentos para corroborar datos u obtener otros adicionales en apoyo de los previamente obtenidos. Esto es particularmente inconveniente cuando se dispone de cantidades limitadas de sustancia.

Entre los métodos modernos no destructivos para atacar el problema de elucidación estructural, está la resonancia magnética nuclear (RMN) como la herramienta más poderosa para abordar este problema. La RMN aporta una metodología no destructiva con gran número de variantes para el estudio estructural desde la plataforma de observación de distintas especies nucleares dentro de la misma molécula, y con una sensibilidad a cambios estructurales difícilmente igualada por ninguna otra espectroscopía.

La asignación de las estructuras de los glucósidos de las resinas glucosídicas obtenidas a partir de las Convolvuláceas, se ha realizado mediante asignaciones espectrales de RMN y de

espectrometría de masas de los productos de la hidrólisis o mediante la formación de derivados químicos de los glucósidos.

Los glucósidos de *Ipomoea stans* son una mezcla de macrociclos del ácido 11-hidroxihexadecanoico con oligosacáridos, en los que ácidos carboxílicos de bajo peso molecular derivados del ácido butanoico se encuentran como sustituyentes de los monosacáridos. La problemática está centrada en conocer con exactitud, qué sustituyentes se encuentran presentes y qué posiciones ocupan en el oligosacárido **sin utilizar reacciones químicas de degradación o de derivación**, usando únicamente experimentos de RMN bidimensional.

En el caso de los glucósidos de *Michrosetchium helleri* se tiene una estructura terpénica con siete monosacáridos, la complicación estructural aumenta respecto a los glucósidos de *Ipomoea stans* debido a la presencia de anillos que implica sustituyentes con posiciones estereoquímicas muy diversas.

La elucidación estructural de los glucósidos de *Ipomoea stans* y de *Michrosetchium helleri* se plantea realizar con una metodología de RMN basada en experimentos de correlación homonuclear y heteronuclear con detección de ^1H .

Cuando se dispone de poca cantidad de muestra o se presentan regiones espectrales con gran congestionamiento de señales, se puede recurrir a la predicción lineal para el procesamiento de datos en algunos experimentos de RMN con los cuales se obtengan mejoras en: la relación señal / ruido, la resolución y la disminución del tiempo de adquisición de señales. En el presente trabajo se realizan estudios del efecto que tiene la predicción lineal sobre varios experimentos de RMN bidimensionales, aplicados sobre las moléculas del ácido grandiflorénico y del glucósido F de amole.

O B J E T I V O S

- 1.- Realizar un estudio estructural por RMN Bidimensional (COSY, TOCSY, HMBC, HMQC, ROESY en su versión de ciclos de fases o gradiente de campo) de los glucósidos aislados de *Ipomoea stans* y *Michrosechium helleri*..
- 2.- Desarrollar una metodología cromatográfica sencilla y eficiente que permita separar y purificar los glucósidos del extracto de acetato de etilo de *Ipomoea stans* y del extracto metanólico de *Michrosechium helleri*..
- 3.- Asignar total e inequívocamente las señales en los espectros de RMN ^1H y de ^{13}C de todos los glucósidos purificados y en particular de los espectros de ^1H donde existe gran sobreposición de señales.
- 4.- Estudiar la importancia de la predicción lineal en el procesamiento de datos en varios experimentos de RMN bidimensional para determinar su efecto sobre : la relación señal / ruido, la resolución y el tiempo de adquisición de señales.
- 5.- Evaluar la utilidad de algunos de los mas importantes experimentos unidimensionales y bidimensionales de RMN, para la determinación estructural de las sustancias aisladas en esta investigación.
- 6.- Contribuir al desarrollo y divulgación de la potencialidad de la RMN en la elucidación de estructuras orgánicas complejas intactas.
- 7.- Evaluar la actividad citotóxica y antimicrobiana de los glucósidos de *Ipomoea stans*.

CAPITULO 1

RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

BIDIMENSIONAL MODERNA

1. 1. Formalismo de producto de operadores

El conjunto de operadores base para un sistema de N espines con espín = 1/2 consiste de 4n productos de operadores, para el caso de un sistema de dos espines I S, los productos de operadores son:

$E/2$ Operador unitario.

I_x, I_y, I_z Componentes x, y, z de la magnetización del espín I.

S_x, S_y, S_z Componentes x, y, z de la magnetización del espín S.

$2 I_x S_z, 2 I_y S_z$ Componentes de la magnetización x, y del espín I separadas en dos componentes en antifase.

$2 S_x I_z, 2 S_y I_z$ Componentes de la magnetización x, y del espín I separadas en dos componentes en antifase.

$2 I_z S_z$ Ordenamiento longitudinal de los espines I y S.

$2 I_x S_x, 2 I_y S_y, 2 I_x S_y, 2 I_y S_x$ Coherencia de dos espines

cualquier operador de densidad puede ser expresado como una combinación lineal del conjunto de operadores base, donde cada producto de operadores puede ser seguido a lo largo de los cálculos y se le asigna un significado físico.

Los experimentos de RMN se realizan a través de tres tipos de interacciones :

1) de los espines con campos magnéticos estáticos u oscilatorios, y el Hamiltoniano toma la siguiente expresión

$$\mathcal{H}_{cm} = - \omega_1 [I_x \cos \omega t - I_y \sen \omega t] \quad \text{ec. 1. 1}$$

donde $\omega_1 = \gamma B_1$ es la intensidad del campo magnético aplicado pero representado en unidades de frecuencia y ω es la frecuencia de precesión del campo. La ec. 1. 1 se puede simplificar al considerar que estamos trabajando en un sistema de coordenadas rotatorio y obtener

$$\mathcal{H}_{\text{cm}} = -\omega_I I_x \quad \text{ec. 1. 2}$$

2) acoplamiento escalares o acoplamiento J es descrito por el Hamiltoniano

$$\mathcal{H}_J = I \cdot J \cdot S \quad \text{ec. 1. 3}$$

donde J consiste de una parte isotrópica, un escalar J y una parte anisotrópica que en solución se promedia a cero, resultando

$$\mathcal{H}_J = J \mathbf{I} \cdot \mathbf{S} = J (I_x S_x + I_y S_y + I_z S_z) \quad \text{ec. 1. 4}$$

acoplamiento dipolares entre los espines y su Hamiltoniano es

$$\mathcal{H}_D = \gamma_I \gamma_S \hbar [\mathbf{I} \cdot \mathbf{S} - 3/r^2 (\mathbf{I} \cdot \mathbf{r}) \cdot (\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})] \quad \text{ec. 1. 5}$$

el vector \mathbf{r} apunta del espín I al espín S y depende del tiempo.

3) espines con el entorno químico.

Considerando el Hamiltoniano para el conjunto de interacciones tenemos

$$\begin{aligned} \mathcal{H} = & -\omega_I I_z - \omega_S S_z + J (I_x S_x + I_y S_y + I_z S_z) \quad \text{ec. 1. 6} \\ & -\omega_1 [I_x \cos \omega_a t - I_y \sin \omega_a t] \\ & -\omega_2 [S_x \cos \omega_b t - I_y \sin \omega_b t] \end{aligned}$$

y para un sistema de coordenadas rotatorio en que las radiofrecuencias de los pulsos son mucho mayores que los valores de J, la ecuación 1. 6 se transforma en

$$\mathcal{H} = -\omega_I I_z - \omega_S S_z + J I_z S_z \quad \text{ec. 1. 7}$$

Los operadores I representan la magnetización macroscópica y los subíndices x, y, z la orientación de la magnetización en alguno de los ejes cartesianos, el estado basal del sistema es descrito por una polarización a lo largo del eje z (I_z)^{58, 59}.

1) La precesión de los operadores I alrededor de un campo magnético estático (por ejemplo en el eje z) en un sistema de coordenadas rotatorio, con una frecuencia ω da las siguientes transformaciones:

$$\begin{aligned} & \omega t I_z \\ I_x & \text{-----} I_x \cos \omega t I_z + I_y \sin \omega t I_z \\ & \omega t I_z \\ I_y & \text{-----} I_y \cos \omega t I_z - I_x \sin \omega t I_z \\ & \omega t I_z \\ I_z & \text{-----} I_z \end{aligned}$$

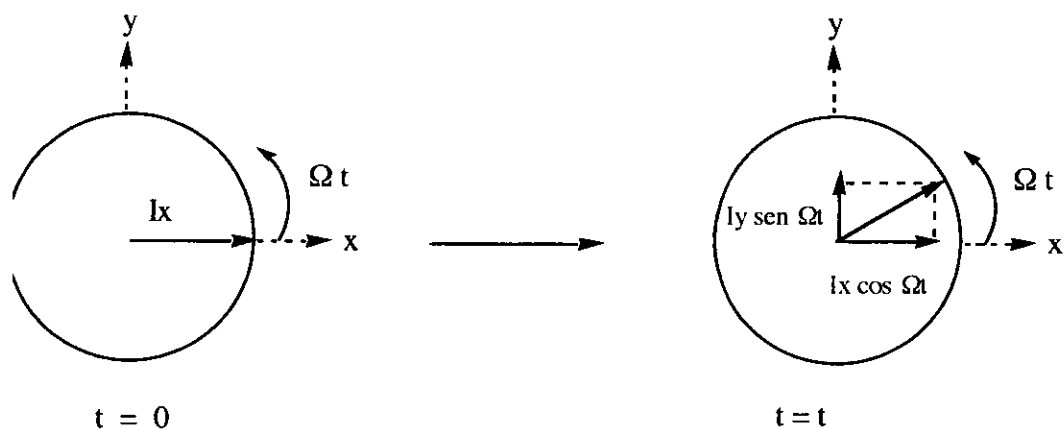


Figura 1. 1.- Representación vectorial de la evolución de operadores por efecto del desplazamiento químico.

2) El efecto de un pulso (αI_y) sobre las polarizaciones es descrito por las siguientes transformaciones :

$$\begin{aligned} & \alpha I_y \\ I_x & \text{-----} I_x \cos \alpha - I_z \sin \alpha \\ & \alpha I_y \\ I_y & \text{-----} I_y \\ & \alpha I_y \\ I_z & \text{-----} I_z \cos \alpha + I_x \sin \alpha \end{aligned}$$

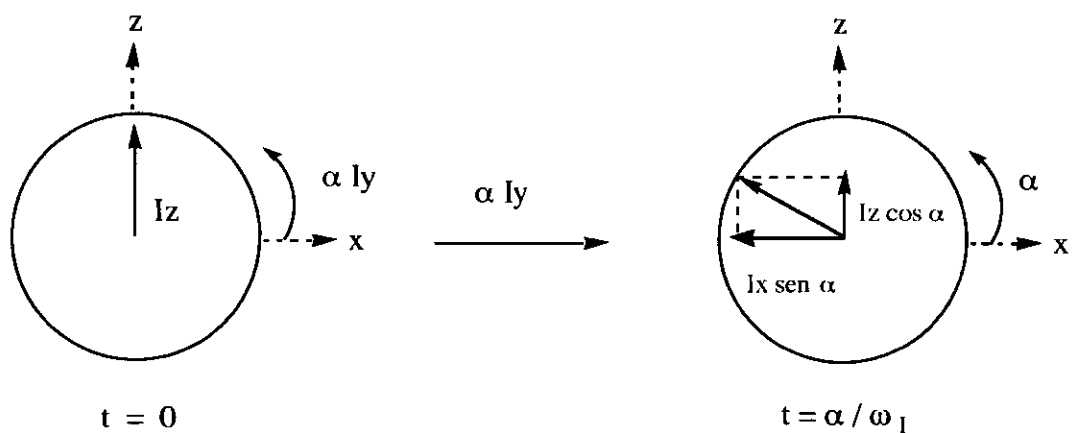


Figura 1. 2.- Representación vectorial de la evolución de operadores por efecto de la aplicación de un pulso de radiofrecuencia.

3) La evolución de las polarizaciones por efecto del acoplamiento escalar

$(2 \pi J_{12} t I_{1z} I_{2z})$ es :

$$I_{1x} \xrightarrow[2 \pi J_{12} t I_{1z} I_{2z}]{} I_{1x} \cos 2 \pi J_{12} t I_{1z} I_{2z} + 2 I_{1y} I_{2z} \sin 2 \pi J_{12} t I_{1z} I_{2z}$$

$$I_{1y} \xrightarrow[2 \pi J_{12} t I_{1z} I_{2z}]{} I_{1y} \cos 2 \pi J_{12} t I_{1z} I_{2z} - 2 I_{1x} I_{2z} \sin 2 \pi J_{12} t I_{1z} I_{2z}$$

$$I_z \xrightarrow[2 \pi J_{12} t I_{1z} I_{2z}]{} I_z$$

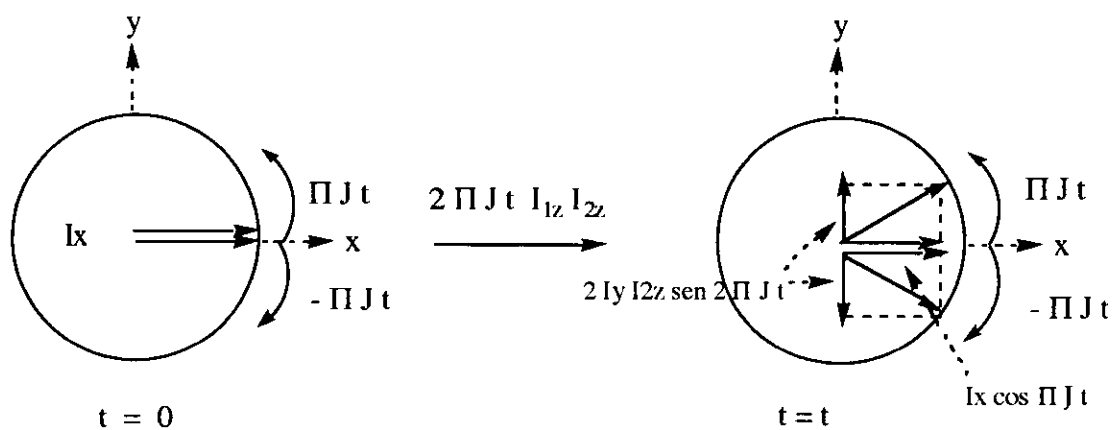


Figura 1. 3.- Representación vectorial de la evolución de operadores por efecto del acoplamiento escalar.

1. 2.- Descripción de secuencias de pulsos de RMN bidimensionales

A continuación se describen los experimentos de RMN Bidimensional Moderna (utilizando el formalismo de producto de operadores), que se usaron para elucidar las estructuras de los glucósidos de *Ipomoea stans* y *Michroseechium helleri*

DEPT

El experimento DEPT ⁵⁷ permite la edición espectral de los diferentes átomos de ¹³C similar a los obtenidos con INEPT pero sin depender de J_{CH} , la secuencia de pulsos DEPT se presenta en la figura 1. 4.

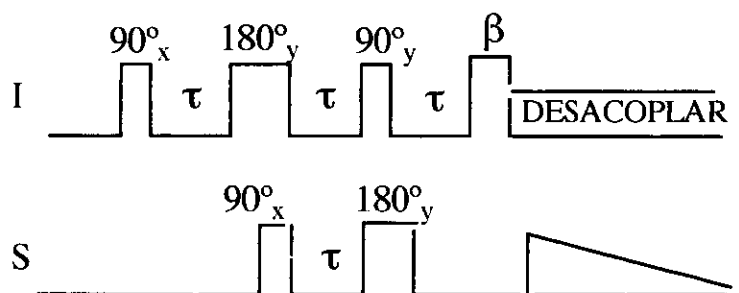


Figura 1. 4.- Secuencia de pulsos del experimento DEPT

En el experimento DEPT aplicado a un sistema de espines $I_n S$ (donde $I = {}^1H$ y $S = {}^{13}C$), el primer pulso de 90° genera la magnetización transversal que evoluciona en t por efecto de acoplamiento escalar generando las componentes I_{1y} y $-2 I_{1x} S_z$ que con $\tau = 1 / (2J)$ colocan las componentes de la magnetización en antifase.

El pulso de 90°_x sobre S , transforma la magnetización en antifase a coherencias cuánticas cero

$$-2 I_{1x} S_z \xrightarrow{90^\circ S} 2 I_{1x} S_y \quad \text{ec. 1. 8}$$

en el segundo intervalo de evolución hay interacciones de $2 I_{1x} S_y$ con otros espines I generando los productos de operadores siguientes

$$2 \gamma I_{1x} S_y \xrightarrow{\tau} 2 \gamma I_{1x} S_y \cos(\pi J_{11 12} \tau) - 4 \gamma I_{1x} I_{2z} S_x \sin(\pi J_{11 12} \tau) \quad \text{ec. 1. 9}$$

$$2 \gamma I_{1x} S_y \xrightarrow{\tau} 2 \gamma I_{1x} S_y \cos(\pi J_{11 13} \tau) - 4 \gamma I_{1x} I_{3z} S_x \sin(\pi J_{11 13} \tau) \quad \text{ec. 1. 10}$$

$$- 4 \gamma I_{1x} I_{2z} S_x \text{ ----- } - 4 \gamma I_{1x} I_{2z} S_x \cos(\pi J_{11} I_3 \tau) - 8 \gamma I_{1x} I_{2z} I_{3z} S_y \sin(\pi J_{11} I_3 \tau)$$

ec. 1. 11

las ecuaciones anteriores pueden simplificarse para valores de $\tau = 1 / (2 J)$, obteniéndose las siguientes magnetizaciones:

$$\begin{aligned} CH &= 2 I_{1x} S_y \\ CH_2 &= - 4 I_{1x} I_{2z} S_x \\ CH_3 &= - 8 I_{1x} I_{2z} I_{3z} S_x \end{aligned}$$

y el pulso β°_y tiene los siguientes efectos:

$$2 \gamma I_{1x} S_y \text{ ----- } 2 \gamma I_{1z} S_y \sin \beta \quad \text{ec.1. 12}$$

$$- 4 \gamma I_{1x} I_{2z} S_x \text{ ----- } - 4 \gamma I_{1z} I_{2z} S_x \sin \beta \cos \beta \quad \text{ec. 1. 13}$$

$$8 \gamma I_{1x} I_{2z} I_{3z} S_x \text{ ----- } - 8 \gamma I_{1z} I_{2z} I_{3z} S_x \sin \beta \cos^2 \beta \quad \text{ec. 1. 14}$$

Los pulsos de 180° tienen como efecto reafocar las evoluciones por desplazamientos químicos y en el tercer período las magnetizaciones en antifase son reenfoadas en el término $- S_x$, siendo las funciones de transferencia finales dependientes de β :

$$\begin{aligned} CH &= (\gamma I / \gamma S) \sin \beta \\ CH_2 &= (\gamma I / \gamma S) 2 \sin \beta \cos \beta \\ CH_3 &= (\gamma I / \gamma S) 3 \sin \beta \cos^2 \beta \end{aligned}$$

y con combinaciones de las funciones anteriores es posible editar las señales de metinos, metilenos y metilos, y por diferencia con el espectro original determinar las señales de carbono cuaternario.

Efecto Nuclear Overhauser

Las interacciones dipolares entre espines cercanos espacialmente constituyen mecanismos de relajación cruzada, lo que significa que dos espines I y S experimentarán procesos de relajación longitudinal acoplados, de acuerdo a la ecuación de Solomon

$$\begin{aligned} d/dt(\langle I_z \rangle - I_0) &= -\rho_I (\langle I_z \rangle - I_0) - \sigma (\langle S_z \rangle - S_0) \\ d/dt(\langle S_z \rangle - S_0) &= -\rho_I (\langle S_z \rangle - S_0) - \sigma (\langle I_z \rangle - I_0) \end{aligned} \quad \text{ec. 1. 15}$$

donde I_0 y S_0 representan los valores de equilibrio de $\langle I_z \rangle$ y de $\langle S_z \rangle$.

Al aplicar un pulso al espín I, $\langle I_z \rangle$ difiere de I_0 permaniendo $\langle S_z \rangle = S_0$ y la ec. 1. 15 resulta

$$\begin{aligned} d/dt(\langle I_z \rangle - I_0) &= -\rho_I (\langle I_z \rangle - I_0) \\ d/dt(\langle S_z \rangle - S_0) &= -\sigma (\langle I_z \rangle - I_0) \end{aligned} \quad \text{ec. 1. 16}$$

lo que significa que la perturbación del espín I es resentida por el espín S y que tiene una rapidez de relajación cruzada S .

La saturación de S ($\langle S_z \rangle = 0$) conduce a

$$d/dt(\langle I_z \rangle - I_0) = -\rho_I (\langle I_z \rangle - I_0) + \sigma S_0 \quad \text{ec. 1. 17}$$

y cuando $\langle I_z \rangle$ permanece constante en un valor I_e no varía con el tiempo y se obtiene la ec. 1. 18

$$I_e = I_0 + \sigma / \rho S_0 \quad \text{ec. 1. 18}$$

donde el segundo término representa el incremento en la intensidad del espín I (NOE) y que en términos generales se escribe como

$$I_e = (1 + \eta) I_0 \quad \text{ec. 1. 19}$$

$$\eta = (\sigma / \rho) (\gamma_S / \gamma_I) \quad \text{ec. 1. 20}$$

el término S / r depende de la frecuencia del espectrómetro y de la rapidez de movilidad molecular.

Relay Coherence

La secuencia de pulsos Relay Coherence⁶⁰ (figura 1. 5) nos permite identificar las señales de un sistema de espines homonucleares, que presentan un patrón común de acoplamientos por ejemplo un sistema I - S - M en el que pueden presentarse las siguientes consideraciones $J_{I-S} = m$, $J_{S-M} = n$ y $J_{I-M} = 0$. RELAY difiere del experimento COSY en que transfiere coherencias por relevo a espines que no están directamente acoplados ($J_{I-M} = 0$), y puede considerarse como una extensión de COSY.

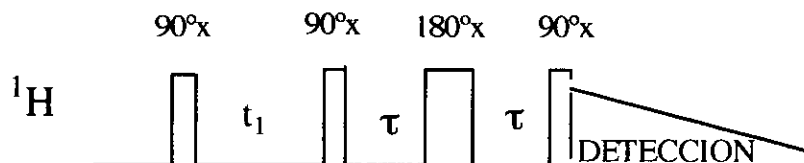


Figura 1. 5.- Secuencia de pulsos del experimento Relay Coherence

Los dos primeros pulsos de 90° de la figura 1. 5 separados por un intervalo variable t_1 , producen en los espines un efecto similar al obtenido en COSY. El primer pulso de 90° genera la magnetización transversal, los espines evolucionan en t_1 por sus diferencias de desplazamientos químicos y por sus acoplamientos escalares. El segundo pulso de 90° transfiere las magnetizaciones de los espines acoplados escalarmente.

Después del segundo pulso de 90° la componente de magnetización transversal de S es:

$$2 I_z S_y \sin \omega_I t_1 \sin \Pi J_{IS} t_1 \quad \text{ec. 1. 21}$$

y es el término que puede transferir coherencia de I a M a pesar de no haber acoplamiento escalar entre ellos. La eficiencia de los relevos de transferencia depende de las constantes de acoplamiento y del intervalo t . En el segundo intervalo t la evolución por efecto de desplazamientos químicos es reafocada por el pulso de 180° , en tanto que la evolución por acoplamiento escalar de la ec. 1. 21 da origen a

$$\begin{aligned} & [2 I_z S_y \cos \Pi J_{IS} 2\tau \cos \Pi J_{SM} 2\tau - \\ & 4 I_z S_x M_z \cos \Pi J_{IS} 2\tau \sin \Pi J_{SM} 2\tau - \\ & 2 S_x \sin \Pi J_{IS} 2\tau \cos \Pi J_{SM} 2\tau - \\ & 2 S_y M_z \sin \Pi J_{IS} 2\tau \sin \Pi J_{SM} 2\tau] \sin \omega_I t_1 \sin \Pi J_{IS} t_1 \quad \text{ec. 1. 22} \end{aligned}$$

Al aplicar el tercer pulso de 90°_x , el último término de la ec. 1. 22 es convertido en magnetización transversal de M

$$2 S_z M_y \sin \Pi J_{I-S} 2 \tau \sin \Pi J_{S-M} 2 \tau \sin \omega_I t_1 \sin \Pi J_{I-S} t_1 \quad \text{ec. 1. 23}$$

la evolución del término de la ec. 1. 23 en el intervalo t_2 , producirá una expresión que corresponde a una señal fuera de la diagonal en las coordenadas ω_I , ω_M .

HETCOR

El experimento de correlación heteronuclear de desplazamientos químicos HETCOR⁶¹ es de los mas utilizados para investigar las estructuras de moléculas orgánicas, ya que permite esparcir el espectro de ^1H en la dimensión de ^{13}C , mejorando la resolución y eliminando las sobreposiciones de señales por efectos de acoplamientos de ^1H . HETCOR proporciona espectros bidimensionales que contienen señales correspondientes a los desplazamientos químicos de protón y carbono para cada unidad $^{13}\text{C}-^1\text{H}_n$, con lo cual es posible rastrear la estructura de la molécula.

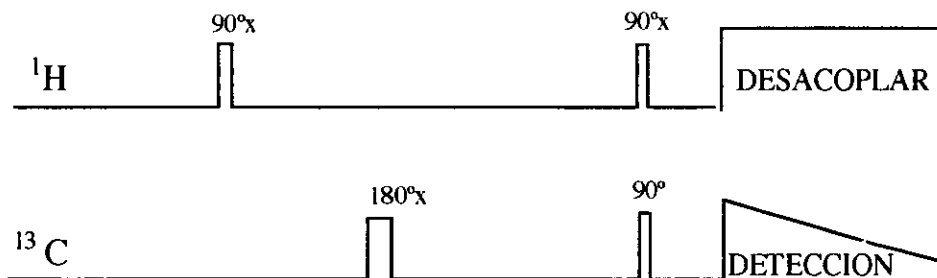


Figura 1. 6. - Secuencia de pulsos del experimento HETCOR

El análisis de la secuencia de pulsos de la figura 1. 6 con el formalismo de producto de operadores nos da lo siguiente:

- el primer pulso de 90°_x sobre I genera la magnetización transversal $-I_y + S_z$

- en el primer intervalo $t_1/2$ se presenta una evolución por acoplamiento escalar y por desplazamientos químicos, en los que el espín I ha precesado con su frecuencia de Larmor ω_I , como se observa en σ (2) se generan las componentes de la magnetización en fase I_x , I_y , y las componentes en antifase $2 I_y S_z$, $2 I_x S_z$.

$$(- I_y \cos \omega_I t_1/2 + I_x \sen \omega_I t_1/2) \cos \Pi J_{IS} t_1/2 + \\ (2 I_x S_z \cos \omega_I t_1/2 + 2 I_y S_z \sen \omega_I t_1/2) \sen \Pi J_{IS} t_1/2 = \sigma (2)$$

- el pulso de 180° ocasionará un reafocamiento de las componentes de la magnetización transversal debidas al acoplamiento escalar heteronuclear, al término del segundo intervalo $t_1/2$

$$- I_y \cos \omega_I t_1 + I_x \sen \omega_I t_1 = \sigma (3)$$

- un primer intervalo t antes del segundo pulso de 90° , permitirá una evolución por efecto de desplazamientos químicos y acoplamientos heteronucleares, resultando :

$$\cos \omega_I t_1 [- I_y \cos \omega_I \tau \cos \Pi J_{IS} \tau + 2 I_x S_z \cos \omega_I \tau \sen \Pi J_{IS} \tau \\ + I_x \sen \omega_I \tau \cos \Pi J_{IS} \tau + 2 I_y S_z \sen \omega_I \tau \sen \Pi J_{IS} \tau] + \\ \sen \omega_I t_1 [I_x \cos \omega_I \tau \cos \Pi J_{IS} \tau - 2 I_y S_z \cos \omega_I \tau \sen \Pi J_{IS} \tau \\ - I_y \sen \omega_I \tau \cos \Pi J_{IS} \tau + 2 I_x S_z \sen \omega_I \tau \sen \Pi J_{IS} \tau] = \sigma (4)$$

si consideramos en σ (4) que $\tau_1 = 1 / (2 J)$ y reorganizando con identidades trigonométricas obtenemos :

$$\sigma (4) = 2 I_x S_z \cos \omega_I (t_1 + \tau_1) + 2 I_y S_z \sen \omega_I (t_1 + \tau_1) - S_z$$

- el segundo pulso de 90° transfiere la magnetización del espín I al espín S, obteniendose las expresiones

$$2 I_x S_y \cos \omega_I (t_1 + \tau_1) + 2 I_z S_y \sen \omega_I (t_1 + \tau_1) = \sigma (5)$$

- en el segundo período τ algunos de los términos en σ (5) se transforman en observables, considerando que $\tau_2 = (1 / 2 J)$ las expresiones se reducen a los términos:

$$S_x \sen \omega_S \tau_2$$

$$S_x \sin \omega_I (t_1 + \tau_1) \cos \omega_S \tau_2$$

que corresponden a la magnetización de S como función de las frecuencias ω_I y ω_S .

XCORFE

XCORFE⁶² es otro experimento de correlación heteronuclear de largo alcance $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ que utiliza un tiempo fijo de evolución para efectuar desacoplamiento homonuclear en la región espectral de ^1H . Utiliza 2 pulsos BIRD que actúan en forma selectiva sobre los ^1H que no están directamente enlazados a ^{13}C , sin afectar a los ^1H directamente enlazados. Se emplea un tiempo de evolución fijo T con un tiempo de evolución t_1 que es incrementado desde cero hasta un valor máximo.

Los pulsos BIRD actúan como pulsos de 180° de reafocamiento de los vectores de ^{13}C con ^1H directamente unidos, colocando a los vectores asociados a los acoplamientos C - H en antifase al final de delta para minimizar su detección (artefactos). La transferencia de polarización indirecta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ está modulada por $J_{\text{H}(i)\text{H}(d)} ({}^3J_{\text{HH}})$

Las ventajas de esta secuencia radican en su habilidad para: detectar y distinguir entre conectividades a dos y tres enlaces de distancia, la accesibilidad para determinar conformación molecular a partir de ${}^3J_{\text{HH}}$, es fácilmente optimizado para la transferencia de polarización de ${}^2J_{\text{HC}}$ entre C protonados por la modulación de ${}^3J_{\text{HH}}$ disminuyendo la pérdida de señal

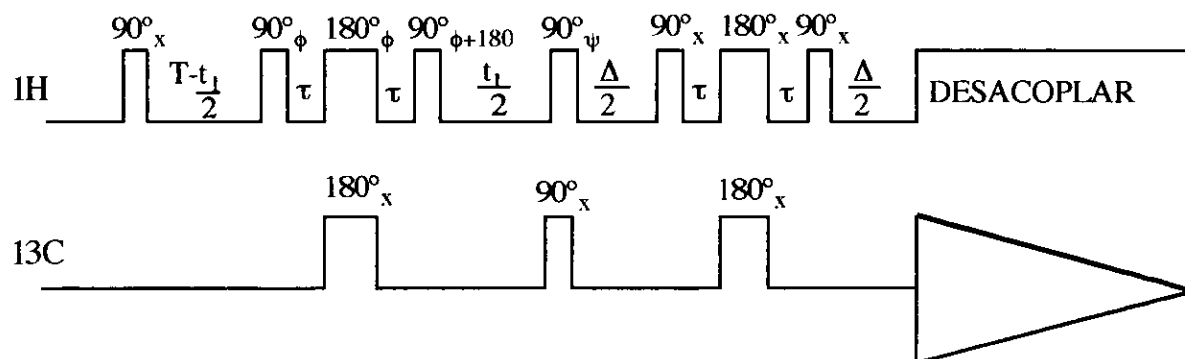


Figura 1. 7.- Secuencia de pulsos del experimento XCORFE

El tiempo entre el primer pulso de 90° y la transferencia de polarización es fijo (T), se introduce un pulso BIRD que se mueve en función de t_1 . El pulso BIRD invierte selectivamente todos los protones acoplados a largo alcance a ^{13}C y dejando a los protones directamente enlazados a ^{13}C sin afectar manteniendo el acoplamiento $^3 J_{\text{Hd-Hi}}$. Los acoplamientos vecinales $\text{H}_d - \text{H}_i$ son reenfocados como función de t_1 , lo cual permitirá diferenciar señales de unidades C - H a dos y tres enlaces de distancia. Las señales de acoplamientos heteronucleares a tres enlaces de distancia aparecen como singuletes y las señales de acoplamientos heteronucleares a dos enlaces de distancia aparecen con multiplicidad debido a los acoplamientos $^1\text{H} - ^1\text{H}$.

El experimento XCORFE permite: distinguir los acoplamientos $^2 J_{\text{CH}}$ (presenta multiplicidad) y $^3 J_{\text{CH}}$ (señal sencilla); determinar conformaciones moleculares a partir de $^3 J_{\text{HH}}$ y disminuir el tiempo total del experimento que se traduce en aumento de la sensibilidad. El principal problema de XCORFE es la aparición de señales $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ directamente unidos, debido a que BIRD no afecta a los protones directamente enlazados y actúa como un pulso de 180° en ^{13}C y los espectros obtenidos presentan el acoplamiento C H en el eje de frecuencias f_1 en las coordenadas $f_1 = 0$.

FLOCK

La secuencia de pulsos FLOCK ^{63,64} emplea tres pulsos BIRD que tienen funciones específicas, el primer pulso BIRD suprime los picos de conectividad $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ (por ciclos de fases), el segundo pulso mejora la sensibilidad (por reafocamiento de inhomogeneidades de campo y acoplamiento H H no resueltos) además de suprimir parcialmente las conectividades $^{13}\text{C} - \text{H}$, en tanto que el tercer pulso BIRD elimina los efectos de modulación de un enlace que ocasionan pérdida de la intensidad de la señal para ^{13}C individuales y supresión parcial de picos de conectividad directa.

La combinación de pulsos BIRD durante t_1 y $\delta 2$ también proporcionan aumento en la sensibilidad por desacoplamiento parcial, debido al reafocamiento de los vectores de acoplamiento durante t_1 y $\delta 1$. En XCORFE y COLOC el desacoplamiento se logra permitiendo que los vectores de acoplamiento evolucionen durante un tiempo fijo con el riesgo de que terminen en antifase y la señal pierda intensidad.

Entre las ventajas de esta técnica se pueden mencionar la supresión de las señales $^{13}\text{C} - \text{H}$, la facilidad de parametrización, la detección de la mayoría de los picos de conectividad con un solo experimento, la optimización de la ciclación de fases para eliminar artefactos y mejorar la relación

señal/ruido, la implementación de un filtro J para suprimir señales de correlación directa y la sensibilidad a la fase para mejorar resolución y distinguir conectividades a 2 enlaces.

COSY

El experimento COSY ⁶⁵ se encuentra entre los más simples y útiles desarrollados hasta ahora en RMN. Utiliza solamente dos pulsos no selectivos con un tiempo de evolución intermedio t_1 y uno de observación t_2 .

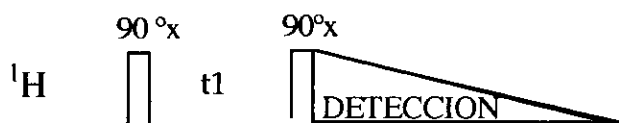


Figura 1. 8.- Secuencia de pulsos del experimento COSY

En el caso de un sistema homonuclear de un sistema de dos espines homonucleares I - S con $s = 1/2$ y con acoplamiento débil entre si, el experimento COSY puede describirse utilizando el formalismo de producto de operadores de la siguiente forma:

- en el equilibrio térmico antes de la aplicación del primer pulso las componentes de la magnetización son $I_z + S_z$, la aplicación de un pulso de 90°_x , la aparición de la magnetización macroscópica $-I_y + -S_y$

- en el período de evolución t_1 se presenta una evolución por acoplamiento escalar y por desplazamientos químicos, en los que el espin I ha precesado con su frecuencia de Larmor ω_I y el espin S ha precesado con su frecuencia de Larmor ω_S , las componentes de la magnetización son

$$(-I_y \cos \omega_I t_1 + I_x \sin \omega_I t_1 - S_y \cos \omega_S t_1 + S_x \sin \omega_S t_1) \cos \Pi J_{IS} t_1 +$$

$$(2 I_x S_z \cos \omega_I t_1 + 2 I_y S_z \sin \omega_I t_1 + 2 S_x I_z \cos \omega_S t_1 + 2 S_y I_z \sin \omega_S t_1) \sin \Pi J_{IS} t_1 = \sigma (1)$$

en $\sigma (1)$ se observan las componentes de la magnetización en fase I_x, I_y, S_x, S_y y las componentes en antifase $2 I_y S_z, 2 I_x S_z, 2 I_z S_x, 2 I_z S_y$

- el segundo pulso de 90° transfiere la magnetización del espín I al espín S,

$$(- I_z \cos \omega_I t_1 + I_x \sin \omega_I t_1 - S_z \cos \omega_S t_1 + S_x \sin \omega_S t_1) \cos \Pi J_{IS} t_1 -$$

$$(2 I_x S_y \cos \omega_I t_1 + 2 I_z S_y \sin \omega_I t_1 + 2 I_y S_z \cos \omega_S t_1 + 2 I_y S_x \sin \omega_S t_1) \sin \Pi J_{IS} t_1$$

- en el período de detección t_2 se presenta la evolución por efecto de desplazamientos químicos y del acoplamiento escalar, a continuación se muestran las componentes de la magnetización que son observables:

$$\begin{aligned} & I_x \sin(\omega_S t_1) \sin(\Pi J_{IS} t_1) \cos(\omega_I t_2) \sin(\Pi J_{IS} t_2) \\ & + I_x \sin(\omega_I t_1) \cos(\Pi J_{IS} t_1) \cos(\omega_I t_2) \cos(\Pi J_{IS} t_2) \\ & + I_y \sin(\omega_S t_1) \sin(\Pi J_{IS} t_1) \sin(\omega_I t_2) \sin(\Pi J_{IS} t_2) \\ & + I_y \sin(\omega_I t_1) \cos(\Pi J_{IS} t_1) \sin(\omega_I t_2) \cos(\Pi J_{IS} t_2) \\ & + S_x \sin(\omega_I t_1) \sin(\Pi J_{IS} t_1) \cos(\omega_S t_2) \sin(\Pi J_{IS} t_2) \\ & + S_x \sin(\omega_I t_1) \cos(\Pi J_{IS} t_1) \cos(\omega_S t_2) \cos(\Pi J_{IS} t_2) \\ & + S_y \sin(\omega_S t_1) \sin(\Pi J_{IS} t_1) \sin(\omega_S t_2) \sin(\Pi J_{IS} t_2) \\ & + S_y \sin(\omega_S t_1) \cos(\Pi J_{IS} t_1) \sin(\omega_S t_2) \cos(\Pi J_{IS} t_2) \end{aligned}$$

El rearrreglo de las relaciones trigonométricas anteriores, nos permite obtener expresiones similares a las siguientes:

$$\begin{aligned} I_y & \quad 1/2 [\cos(\omega_S t_1 - \Pi J_{IS} t_1) - \cos(\omega_S t_1 + \Pi J_{IS} t_1)] \\ & \quad 1/2 [\cos(\omega_I t_2 - \Pi J_{IS} t_2) - \cos(\omega_I t_2 + \Pi J_{IS} t_2)] \end{aligned} \quad \text{ec. 1. 24}$$

$$\begin{aligned} I_y & \quad 1/2 [\sin(\omega_I t_1 + \Pi J_{IS} t_1) + \sin(\omega_I t_1 - \Pi J_{IS} t_1)] \\ & \quad 1/2 [\cos(\omega_I t_2 - \Pi J_{IS} t_2) + \cos(\omega_I t_2 + \Pi J_{IS} t_2)] \end{aligned} \quad \text{ec. 1. 25}$$

- las señales de la ec. 1. 24 tienen señales positivas y negativas alternadas y como en el intervalo t_1 precesaron con la frecuencia ω_S y en el tiempo t_2 precesaron con la frecuencia ω_I son señales que se encuentran **fuera de la diagonal**, y como son funciones coseno todas ellas dan origen a señales de tipo absorción,

- y las señales de la ecuación 1. 25 tienen todas sus señales positivas y como en los dos intervalos t_1 y t_2 precesaron con la misma frecuencia w_I dan origen a señales **en la diagonal** y de tipo dispersivo.

El análisis para el espín S dará resultados similares que las ecuaciones anteriores. En el caso de las señales múltiples fuera de la diagonal debido a que están formados por fases positivas y negativas, es posible que se cancelen cuando las constantes de acoplamiento son pequeñas; en tanto que las señales en la diagonal por su carácter dispersivo son anchas y pueden sobreponerse a algunas señales cerca de la diagonal y dificultar la interpretación espectral.

Un tercer tipo de señales que aparecen en el espectro COSY son las señales axiales y son aquellas componentes de la magnetización transversal que al ser detectadas no están moduladas por las frecuencias de los espines I o S, por ejemplo sería la magnetización en eje Z que se genera por relajación durante t_1 y que el segundo pulso de 90° la convierte en magnetización transversal a una frecuencia $w = 0$.

TOCSY

TOCSY⁶⁶ es una secuencia que realmente debe considerarse como una extensión de COSY. Mientras que en COSY la transferencia de coherencia se efectúa mediante la aplicación del pulso de mezcla, produciéndose coherencia en antifase durante el período de evolución antes del siguiente pulso, la secuencia TOCSY emplea un período extendido de evolución para aplicar una excitación "a la medida" (Hamiltoniano) con la cual se logra una mezcla de coherencias o estados cuánticos.

El tipo de excitación se denomina comúnmente "mezclado isotrópico", durante este período se suprimen los términos de Zeeman que representan la precesión libre con la aplicación de un tren de pulsos con retardo interno muy corto comparado con las diferencias de los desplazamientos químicos. Esto también se logra alternativamente con secuencias de anclado de espines ("spin-lock") cumpliendo la condición de Hartman-Hann. El sistema adquiere así, condiciones de acoplamiento fuerte, que a diferencia de lo que ocurre en condiciones de acoplamiento débil, en que los núcleos no evolucionan cuasi-independientemente sino en lo que se denomina "modos de espín colectivo".

En TOCSY se tiene un mezclado isotrópico que es un período de mezclado en el cual se combinan las diferentes coherencias, al eliminar la contribución por efecto de los desplazamientos químicos, los espines adquieren condición de acoplamiento fuerte y su comportamiento no es de

espines individuales sino de una colectividad de espines. Lo que implica que la transferencia de coherencia es posible entre todos los pares de núcleos aunque no haya acoplamiento escalar entre ellos y TOCSY es independiente de las magnitudes de los acoplamientos escalares existentes en una red local de espines nucleares.

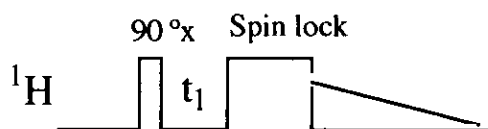


Figura 1. 9.- Secuencia de pulsos del experimento TOCSY

La magnetización de un espin (I) bajo condiciones de mezclado isotrópico es convertido periodicamente en magnetización de otro espin (S) acoplado escalarmente.

$$I_x \xrightarrow{2 \pi J_{IS} \tau_m} I_x [1 + \cos(2 \pi J \tau)] / 2 + S_x [1 - \cos(2 \pi J \tau)] / 2 + (I_y S_z - I_z S_y) \sin(2 \pi J \tau) \quad \text{ec. 1. 26}$$

La ec. 1. 26 muestra que I_x es convertido en S_x en un período $\tau = 1 / (2 J)$, en forma similar las componentes I_y e I_z son interconvertidas en S_y y S_z respectivamente. El espin I también puede transferir magnetización a los términos $I_z S_y$ e $I_y S_z$ y que corresponden a componentes en antifase, la ec. 1. 26 es válida si todos los desplazamientos y los términos de radiofrecuencia del Hamiltoniano tienen valores idénticos para los dos espines considerados.

HMQC

HMQC ⁶⁷ realiza una correlación heteronuclear de núcleos de baja sensibilidad mediante la detección protónica. Las ventajas de la aplicación de esta secuencia son grandes aún cuando la resolución digital alcanzada no sea alta. Este no es un impedimento porque la asignación de desplazamientos químicos del núcleo de baja sensibilidad (usualmente ^{13}C) ocurre en una ventana espectral de mucho mayor dispersión que la del ^1H . Durante el período de mezcla, las propiedades de relajación del sistema son diferentes (se reducen) y consecuentemente la anchura de las señales aumenta.

En experimentos de correlación heteronuclear la detección de ^1H presenta grandes ventajas en cuanto a sensibilidad respecto a los experimentos de correlación heteronuclear con detección de los espines de baja sensibilidad, en los experimentos HMQC y HSQC el incremento en la sensibilidad $(\gamma_{\text{H}} / \gamma_{\text{X}})^{3/2}$ es de 8 respecto a HETCOR, aunque este incremento puede ser alterado por los desacoplamientos ^1H - ^1H . La realización de estos experimentos ha sido posible gracias a la eliminación de las señales de ^1H - ^{12}C (una señal 90% mas grande que la señal deseada) con ciclos de fases en varias etapas que en espectrometros con estabilidad de radiofrecuencias y a la buena realización de desacoplamientos heteronucleares de banda ancha (GARP, WALTZ, etc) mientras se detecta la señal de ^1H .

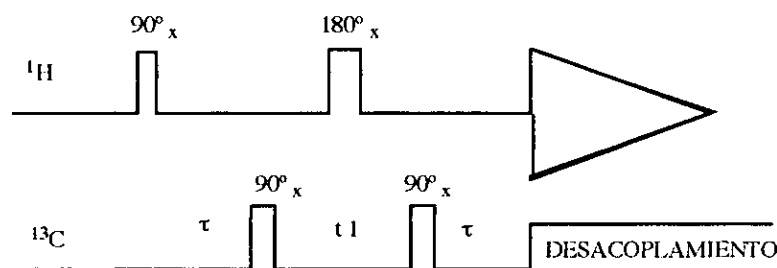


Figura 1. 10.- Secuencia de pulsos del experimento HMQC

En términos del formalismo de producto de operadores, donde I se refiere a ^1H y S a ^{13}C tenemos:

- el primer pulso de 90°_x sobre I genera la magnetización transversal $-I_y + S_z$
- en el primer intervalo τ se presenta una evolución por acoplamiento escalar y por desplazamientos químicos, en los que el spin I ha precesado con su frecuencia de Larmor ω_I ,

$$\begin{aligned} & (-I_y \cos \omega_I \tau + I_x \sin \omega_I \tau) \cos \Pi J_{IS} \tau + \\ & (2 I_x S_z \cos \omega_I \tau + 2 I_y S_z \sin \omega_I \tau) \sin \Pi J_{IS} \tau = \sigma(1) \end{aligned}$$

si consideramos que $\tau = 1 / (2 J_{IS})$, la expresión $\sigma(1)$ se simplifica a:

$$-I_y \cos \omega_I \tau + I_x \sin \omega_I \tau$$

- el pulso de 90° aplicado a S produce su magnetización transversal

$$- I_y \cos \omega_I \tau + I_x \sin \omega_I \tau - S_y = \sigma (2)$$

- la evolución por desplazamientos químicos genera las siguientes expresiones:

$$\begin{aligned} & (- S_y \cos \omega_S t_1 + S_x \sin \omega_S t_1) \cos \Pi J_{IS} t_1 + \\ & (2 I_x S_z \cos \omega_S t_1 + 2 I_y S_z \sin \omega_S t_1) \sin \Pi J_{IS} t_1 = \sigma (3) \end{aligned}$$

- el pulso de 180° ocasionará un reafocamiento de las componentes de la magnetización transversal debidas al acoplamiento escalar heteronuclear, al término del segundo intervalo t_1

$$- I_y \cos \omega_I t_1 + I_x \sin \omega_I t_1 = \sigma (4)$$

- un primer intervalo τ antes del segundo pulso de 90°, permitirá una evolución por efecto de desplazamientos químicos y acoplamientos heteronucleares, resultando :

$$\begin{aligned} & \cos \omega_I t_1 [- I_y \cos \omega_I \tau \cos \Pi J_{IS} \tau + 2 I_x S_z \cos \omega_I \tau \sin \Pi J_{IS} \tau \\ & + I_x \sin \omega_I \tau \cos \Pi J_{IS} \tau + 2 I_y S_z \sin \omega_I \tau \sin \Pi J_{IS} \tau] + \\ & \sin \omega_I t_1 [I_x \cos \omega_I \tau \cos \Pi J_{IS} \tau - 2 I_y S_z \cos \omega_I \tau \sin \Pi J_{IS} \tau \\ & - I_y \sin \omega_I \tau \cos \Pi J_{IS} \tau + 2 I_x S_z \sin \omega_I \tau \sin \Pi J_{IS} \tau] = \sigma (5) \end{aligned}$$

si consideramos en $\sigma (5)$ que $\tau_1 = 1 / (2 J)$ y reorganizando con identidades trigonométricas obtenemos :

$$\sigma (5) = 2 I_x S_z \cos \omega_I (t_1 + \tau_1) + 2 I_y S_z \sin \omega_I (t_1 + \tau_1)$$

- el segundo pulso de 90° transfiere la magnetización del espín I al espín

$$2 I_x S_y \cos \omega_I (t_1 + \tau_1) + 2 I_z S_y \sin \omega_I (t_1 + \tau_1) + S_y = \sigma (6)$$

- en el segundo período t algunos de los términos anteriores se transforman en observables,

$$\begin{aligned}
& - S_z + \\
& 2 I_x S_y \cos \omega_I (t_1 + \tau_1) + \\
& 2 I_z S_y \sin \omega_I (t_1 + \tau_1) \cos \omega_S \tau_2 \cos \Pi J_{IS} \tau_2 - \\
& S_x \sin \omega_I (t_1 + \tau_1) \cos \omega_S \tau_2 \sin \Pi J_{IS} \tau_2 - \\
& 2 I_z S_x \sin \omega_I (t_1 + \tau_1) \sin \omega_S \tau_2 \cos \Pi J_{IS} \tau_2 - \\
& S_y \sin \omega_I (t_1 + \tau_1) \sin \omega_S \tau_2 \sin \Pi J_{IS} \tau_2 - \\
& S_y \cos \omega_S \tau_2 \cos \Pi J_{IS} \tau_2 - \\
& 2 I_z S_x \cos \omega_S \tau_2 \sin \Pi J_{IS} \tau_2 + \\
& S_x \sin \omega_S \tau_2 \cos \Pi J_{IS} \tau_2 + \\
& 2 I_z S_y \sin \omega_S \tau_2 \sin \Pi J_{IS} \tau_2 +
\end{aligned}$$

considerando que $\tau_2 = 1 / (2 J)$ las expresiones se reducen y uno de los términos observables es:

$$I_x \sin \omega_I (t_1 + \tau_1) \cos \omega_S \tau_2$$

el cual contiene la información de la magnetización del espín S.

HMBC

HMBC ^{68, 69} es el acrónimo para heteronuclear multiple bond correlation, siendo una de las secuencias desarrolladas recientemente para la determinación de correlaciones heteronucleares a dos y tres enlaces de distancia. Debido a su gran sensibilidad, sus aplicaciones y desarrollo se encuentran en auge. En HMBC se recurre a la supresión del acoplamiento directo J entre carbonos e hidrógenos mediante el denominado filtro J, que elimina interacciones a un enlace de distancia.

La coherencia cuántica doble se produce entre aquellos núcleos de hidrógeno acoplados entre sí, unidos a un átomo de ¹³C, misma que puede ser eliminada por alternación de las fases del pulso sobre el eje x. Otro pulso genera las coherencias múltiples entre ¹³C e ¹H para las conectividades de dos y tres enlaces de distancia.

En el experimento de correlación heteronuclear a largo alcance HMBC el principal problema es la resolución en ¹³C ya que requiere un gran número de incrementos de tiempo para lograr una buena resolución en este eje, otro factor que afecta la resolución es el acoplamiento ¹H-¹³C ya que se manifiesta en ambos ejes.

En HMBC el primer pulso de 90° elimina la señal ¹H-¹³C al aplicarse un filtro J permitiendo "el paso" de las señales de correlación a largo alcance, al generarse coherencias cuánticas múltiples en

los protones unidos directamente a ^{13}C al aplicar ciclos de fases, permitiendo una simplificación muy grande en el número de señales detectadas.

$$\begin{array}{ccccccc}
 & & 90^\circ \text{X} & \text{I evolución} & & 90^\circ \text{X} & \text{S} & & \text{refocamiento} \\
 I_z & \text{-----} & & - I_y & \text{-----} & 2 I_x S_z & \text{-----} & 2 I_x S_y & \text{-----} \\
 & & & & & & & & \\
 & & & 90^\circ \text{S} & & & \text{evol. en } t_2 & & \\
 2 I_x S_y & \text{-----} & & 2 I_x S_z & \text{-----} & & & & I_y
 \end{array}$$

El segundo pulso de 90° genera coherencias cuánticas múltiples para las correlaciones heteronucleares a largo alcance, en tanto que el pulso de 180° elimina el efecto de los desplazamientos químicos de ^1H en el intervalo t_1 . El tercer pulso de 90° permite que las componentes de ^1H de coherencia cuántica múltiple moduladas por los desplazamientos químicos de ^{13}C y los acoplamientos homonucleares de ^1H sean detectadas.

ROESY

La relajación cruzada (NOE) se ha convertido en el método mas popular para determinar distancias interatómicas y con ello obtener información sobre las configuraciones y conformaciones moleculares. NOESY permite detectar simultaneamente todos los pares de hidrógenos cercanos entre si y la eficiencia de la relajación dipolar es función de la intensidad del campo y del movimiento de la molécula (t_c). NOESY ⁷⁰ es utilizada para moléculas pequeñas con NOEs positivos o moléculas grandes con NOEs grandes, en tanto que para moléculas de tamaño intermedio (P. M. 1000) efectos NOEs pequeños o cero son observados.

La secuencia de pulsos ROESY ⁷¹ se realiza en un sistema de referencia rotante con anclado de espines y la relajación cruzada se realiza perpendicular al campo magnético estático, resultando dependiente de la relajación espin-espin. Al final del período de evolución una radiofrecuencia de gran potencia es aplicada a los espines en dirección perpendicular al campo magnético estático con lo que los espines son anclados en la dirección de la radiofrecuencia.

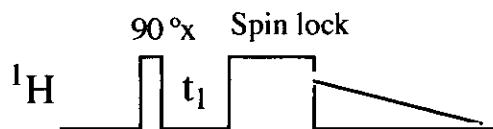


Figura 1. 11.- Secuencia de pulsos del experimento ROESY

La rapidez de relajación s en ROESY es positiva y por lo tanto moléculas de tamaño intermedio darán señales intensas en tanto que en NOESY la movilidad molecular de este tipo de moléculas produce valores de NOE pequeños o cero.

El espectro ROESY es generalmente usado para determinar en forma cualitativa la cercanía de espines, ya que el estudio cuantitativo es válido para una molécula rígida de movimiento isotrópico.

ROESY es similar a la secuencia de pulsos TOCSY, diferenciándose en que la potencia de la radiofrecuencia para lograr el anclado de espines en ROESY es menor que en TOCSY, con lo cual se evita que aparezcan picos TOCSY que son mas intensos y de signo positivo que las señales ROESY.

1. 3.- Pulsos con gradiente de campo

Durante la aplicación de un pulso con gradiente de campo, la homogeneidad espacial de la magnetización macroscópica se pierde en forma deliberada al aplicar un pulso con gradiente de campo durante un tiempo pequeño, con lo cual la magnetización transversal y otras coherencias se defasan en toda la muestra. El proceso de defasamiento ocurre a diferente rapidez para las diferentes coherencias (coherencia cuántica doble se defasa al doble de rapidez que las coherencias cuánticas sencillas), aplicando otros gradientes de diferentes duraciones o intensidades es posible reafocar selectivamente algunas coherencias ⁷².

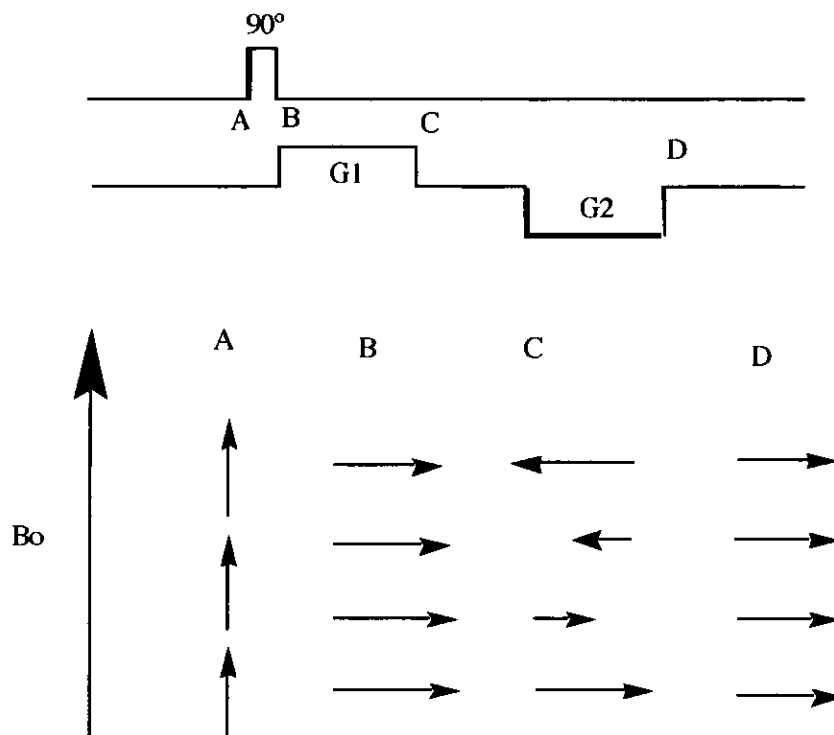


Figura 1. 12.- Efecto de los pulsos con gradiente de campo sobre la magnetización en una secuencia de pulsos, produciendo espacialmente una hélice de magnetización. La proyección de la fase de la magnetización helicoidal sobre el eje z produce una onda sinusoidal.

La dependencia espacial de la fase $\Phi_d (z, t)$ al aplicar un gradiente de campo se puede representar de la siguiente forma ,

$$\Phi_d (z, t) = s B_g(z) t \sum \gamma_i p_i \quad \text{ec. 1. 27}$$

donde s es el factor de forma del pulso, $B_g(z)$ es el campo magnético dependiente del espacio, p es el orden de coherencia y γ la constante magnetogónica del espin considerado. En el caso de un campo magnético producido por el gradiente de campo varíe linealmente a lo largo del eje z $B_g(z) = G z$, los pulsos con gradiente de campo lineales, tienen una duración de 10 a 20 ms y una amplitud de 1 a 35 G / cm.

El uso de los gradientes de campo para seleccionar el orden de las coherencias, se realiza cuando la suma de los efectos de todos los gradientes son cero al final de la secuencia de pulsos

$$\sum s_i p_i \gamma_i G_i t_i = 0 \quad \text{ec. 1. 28}$$

y que para pulsos de la misma forma y duración se puede escribir $\sum p_i \gamma_i G_i = 0$

Considerando el caso de la figura 1. 12 el primer gradiente produce una dependencia espacial de la fase ϕ_1 y el segundo una dependencia de fase ϕ_2

$$\phi_1 = p_1 \gamma_1 G_1 \quad \phi_2 = p_2 \gamma_2 G_2$$

al final del segundo gradiente la fase total es $\phi_1 + \phi_2$. Para seleccionar la trayectoria que involucre la transferencia p_1 a p_2 se debe cumplir que $f_1 + f_2 = 0$ lo que conduce a

$$\frac{-p_2}{p_1} = \frac{\gamma_2 G_2}{\gamma_1 G_1} \quad \text{ec. 1. 29}$$

para la transferencia de coherencia $p_1 = +1$ a $p_2 = -1$ el reafocamiento ocurre cuando los dos gradientes tienen la misma intensidad y la misma duración, en el caso de la transferencia de coherencia $p_1 = +2$ a $p_2 = -1$ el reafocamiento no se presenta cuando $G_2 = G_1$ ya que la fase total es $\phi_1 + \phi_2 = p_1 \gamma_1 G_1 + p_2 \gamma_2 G_2 = \gamma_1 G_1$ y este defasamiento ocasiona que ésta y otras transferencias no sean detectadas.

Al aplicar el formalismo de producto de operadores a la evolución de la magnetización después de ser afectada por un pulso con gradiente de campo se observa que se comporta en forma similar a la evolución por desplazamientos químicos

$$I_x \xrightarrow{G} I_x \cos(\gamma G t) + I_y \sin(\gamma G t)$$

siendo t el tiempo de duración del gradiente y G es el campo producido por el gradiente en la posición z .

COSY

En el caso de un sistema homonuclear de un sistema de dos espines $I S$ con $s = 1/2$ y con acoplamiento débil entre sí, el experimento COSY⁷⁴ puede describirse utilizando el formalismo de producto de operadores de la siguiente forma:

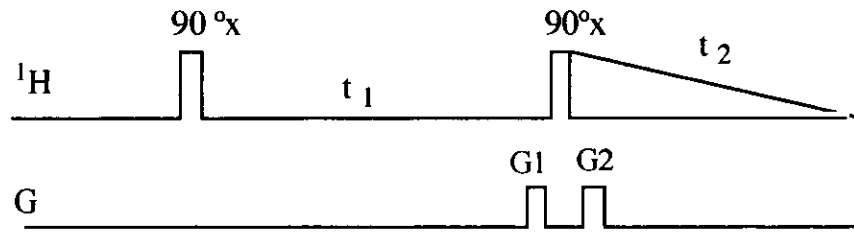


Figura 1. 13.- Secuencia de pulsos del experimento COSY en su versión de gradiente de campo.

- la magnetización antes del primer gradiente es

$$(I_y \cos \omega_I t_1 + I_x \sin \omega_I t_1 - S_y \cos \omega_S t_1 + S_x \sin \omega_S t_1) \cos \Pi J_{IS} t_1 +$$

$$(2 I_x S_z \cos \omega_I t_1 + 2 I_y S_z \sin \omega_I t_1 + 2 S_x I_z \cos \omega_S t_1 + 2 S_y I_z \sin \omega_S t_1) \sin \Pi J_{IS} t_1$$

- el primer pulso con gradiente de campo produce un defasamiento de la magnetización transversal,

$$(I_y \cos \omega_I t_1 + I_x \sin \omega_I t_1 - S_y \cos \omega_S t_1 + S_x \sin \omega_S t_1) \cos \Pi J_{IS} t_1 \cos (\gamma G_1 \tau) +$$

$$(- I_x \cos \omega_I t_1 + I_y \sin \omega_I t_1 + S_x \cos \omega_S t_1 + S_y \sin \omega_S t_1) \cos \Pi J_{IS} t_1 \sin \gamma G_1 \tau +$$

$$(2 I_x S_z \cos \omega_I t_1 + 2 I_y S_z \sin \omega_I t_1 + 2 S_x I_z \cos \omega_S t_1 + 2 S_y I_z \sin \omega_S t_1) \sin \Pi J_{IS} t_1 \cos (\gamma G_1 \tau) +$$

$$(2 I_y S_z \cos \omega_I t_1 - 2 I_x S_z \sin \omega_I t_1 + 2 S_y I_z \cos \omega_S t_1 - 2 S_x I_z \sin \omega_S t_1) \sin \Pi J_{IS} t_1 \sin (\gamma G_1 \tau)$$

- el segundo pulso de 90° transfiere la magnetización del espín I al espín

$$(I_z \cos \omega_I t_1 + I_x \sin \omega_I t_1 + S_z \cos \omega_S t_1 + S_x \sin \omega_S t_1) \cos \Pi J_{IS} t_1 \cos (\gamma G_1 \tau) +$$

$$(- I_x \cos \omega_I t_1 - I_z \sin \omega_I t_1 + S_x \cos \omega_S t_1 - S_z \sin \omega_S t_1) \cos \Pi J_{IS} t_1 \sin (\gamma G_1 \tau) +$$

$$(- 2 I_x S_y \cos \omega_I t_1 + 2 I_z S_y \sin \omega_I t_1 - 2 S_x I_y \cos \omega_S t_1 + 2 S_z I_y \sin \omega_S t_1) \sin \Pi J_{IS} t_1 \cos (\gamma G_1 \tau) +$$

$$(2 I_z S_y \cos \omega_I t_1 + 2 I_x S_y \sin \omega_I t_1 + 2 S_x I_y \cos \omega_S t_1 + 2 S_x I_y \sin \omega_S t_1) \sin \Pi J t_1 \sin (\gamma G_1 \tau) = \sigma(1)$$

Efectuando un rearrreglo de $\sigma(1)$ y considerando las expresiones para el espín I, se tienen los términos observables:

$$[I_x \sin (\omega_I t_1 + \gamma G \tau) + S_x \sin (\omega_S t_1 + \gamma G \tau)] \cos (\Pi J t_1) - [2 I_y S_z \sin (\omega_S t_1 + \gamma G \tau) + 2 I_z S_y \sin (\omega_I t_1 + \gamma G \tau)] \cos (\Pi J t_1)$$

y después de aplicar el segundo gradiente tenemos

$$- 2 I_y S_z \sin (\omega_S t_1 + \gamma G \tau) \sin (\Pi J t_1) e^{i \gamma G_2 \tau'}$$

rearrgando en función de igualdades trigonométricas

$$- 2 I_y S_z \sin (\Pi J t_1) [e^{i \omega_S t_1} e^{i \gamma (G_1 \tau + G_2 \tau')} - e^{-i \omega_S t_1} e^{i \gamma (G_1 \tau - G_2 \tau')}]$$

considerando que los dos gradientes son de la misma intensidad y duración, la cuarta exponencial es uno, y como la señal producida por los dos gradientes aplicados tiende a cero, la expresión resultante es

$$2 I_y S_z \sin (\Pi J t_1) e^{-i \omega_S t_1}$$

Considerando la evolución por acoplamiento y desplazamientos químicos en el período de detección, la señal detectada tiene fases alternadas, como se muestra a continuación:

$$\begin{aligned} & - 1 / 8i [e^{-i (\omega_I - \Pi J) t_1} + e^{-i (\omega_I + \Pi J) t_1}] [e^{i (\omega_I + \Pi J) t_2} + e^{i (\omega_I - \Pi J) t_2}] \\ & - 1 / 8i [e^{-i (\omega_S - \Pi J) t_1} + e^{-i (\omega_S + \Pi J) t_1}] [e^{i (\omega_S + \Pi J) t_2} + e^{i (\omega_S - \Pi J) t_2}] \\ & - 1 / 8i [e^{-i (\omega_S - \Pi J) t_1} + e^{-i (\omega_S + \Pi J) t_1}] [e^{i (\omega_S + \Pi J) t_2} + e^{i (\omega_S - \Pi J) t_2}] \\ & - 1 / 8i [e^{-i (\omega_I - \Pi J) t_1} - e^{-i (\omega_I + \Pi J) t_1}] [e^{i (\omega_I + \Pi J) t_2} - e^{i (\omega_I - \Pi J) t_2}] \end{aligned}$$

La transformada de Fourier de las señales de una de las coherencias, da la siguiente forma de los espectros:

$$S_P(\omega_1, \omega_2) = 1/2 [A_+(\omega_1) A_+(\omega_2) - D_+(\omega_1) D_+(\omega_2)] \\ + i/2 [A_+(\omega_1) D_+(\omega_2) + D_+(\omega_1) A_+(\omega_2)] \quad \text{ec. 1. 28}$$

la parte real tiene una componente

$$A_+(\omega_1) A_+(\omega_2) - D_+(\omega_1) D_+(\omega_2)$$

que es una mezcla de absorción y dispersión, la cual ensancha la señal y las correcciones que puedan realizarse provocarán una disminución de la relación señal / ruido.

TOCSY

En el experimento TOCSY⁷⁵ el mezclado isotrópico transfiere la magnetización de los espines acoplados, dando origen a las señales fuera de la diagonal que tienen forma de absorción y que están en fase en ambas dimensiones. El mezclado isotrópico también transfiere y genera componentes en antifase que dan señales dispersivas. Para eliminar estas contribuciones en antifase se aplica un pulso con gradiente de campo.

La magnetización longitudinal y la coherencia cuántica cero tienen un orden de coherencia cero y no son defasadas al aplicar un gradiente de campo, además la coherencia cuántica cero evoluciona con el tiempo en tanto que la magnetización longitudinal no evoluciona. Si se aplica un gradiente de campo combinado con un anclado de espines, las coherencias que originan las coherencias cuánticas cero pueden ser defasadas.

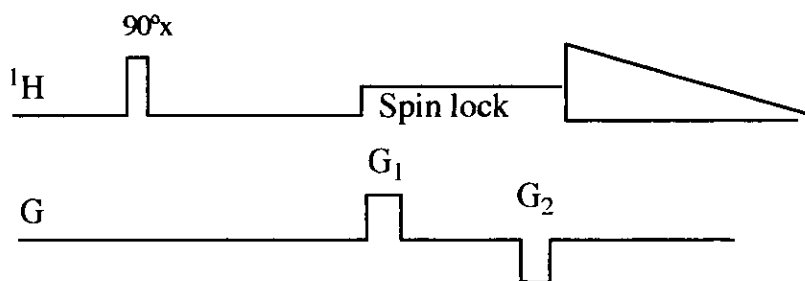


Figura 1. 14 .- Secuencia de pulsos del experimento TOCSY en su versión de gradiente de campo.

La radiofrecuencia que produce el anclado de espines tiene dirección del eje x y las magnetizaciones que no se encuentren alineadas en este eje precesarán en torno del campo de anclado de espines y se defasarán debido a las inhomogeneidades del campo. Para dos espines que se encuentren acoplados las componentes que se conservan son I_x , S_x , $2 I_y$ S_z y $2 I_z$ S_y .

HSQC

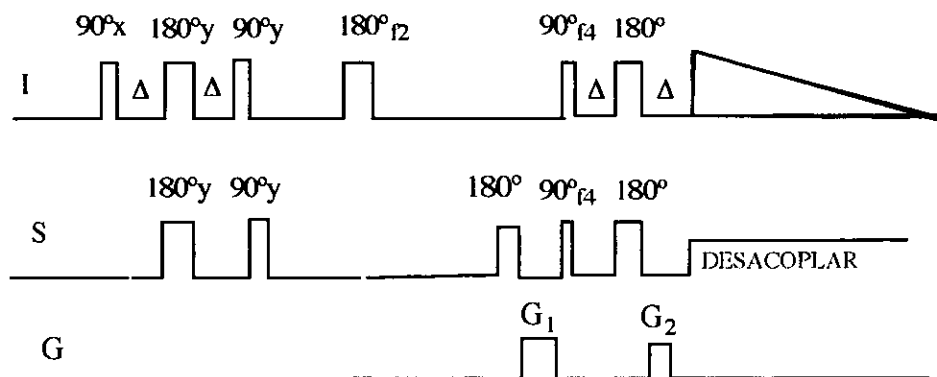


Figura 1. 15.- Secuencia de pulsos del experimento HSQC en su versión de gradiente de campo

La descripción del experimento HSQC ⁷⁶ de la figura 1. 15 se muestra a continuación:

- el gradiente G_1 defasa la magnetización del espín S al final de t_1 , el segundo pulso de 180° aplicado a S permite reafocar las evoluciones por desplazamientos químicos de S que ocurren durante el primer gradiente G_1 . El reafocamiento se realiza después de la transferencia al espín I con el pulso con gradiente G_2 cuando

$$+_{-} \gamma_S G_1 \tau_1 = \gamma_I G_2 \tau_2 \quad \text{ec. 1. 29}$$

o

$$\frac{+_{-} G_1 \tau_1}{G_2 \tau_2} = \frac{\gamma_I}{\gamma_S}$$

si se mantienen las intensidades de los gradientes iguales, variando las duraciones de los gradientes se puede igualar la relación de las constantes giromagnéticas y con ello conseguir el reafocamiento

$$- I_y S_z \left[\cos \omega_S t_1 \cos (\gamma G_1 t) + \sin \omega_S t_1 \sin (\gamma G_1 t) \right] \frac{t \ 180^\circ \ t \ I}{180^\circ \ S} \\ G_2$$

$$\left[I_x \cos (\gamma_S G_2 t_1) + I_y \sin (\gamma_S G_2 t_1) \right] \left[\cos (\omega_S t_1 - g B g_1 t_1) \right] \\ = I_x / 2 \left[\cos (\gamma_S G_2 t_1 + \omega_S t_1 - \gamma_S G_1 t_1) + \cos (\gamma_S G_2 t_1 - \omega_S t_1 + g B g_1 t_1) \right] \\ + I_y / 2 \left[\sin (\gamma_S G_2 t_1 + \omega_S t_1 - g B g_1 t_1) + \sin (\gamma_S G_2 t_1 - \omega_S t_1 + g B g_1 t_1) \right]$$

si se ajustan los dos gradientes para que

$$\gamma_S G_1 t = \pm \gamma_I G_2 t_1$$

de esta forma se ha seleccionado la trayectoria de coherencia $I \rightarrow S \rightarrow I$

La componente I_y podría ser eliminada si se aplicará un pulso con gradiente lo cual ocasionaría su defasamiento, sin embargo debido a la imperfección de los pulsos las componentes I_z presentes no serían defasadas y posteriormente generarían artefactos de mucha mayor intensidad que las componentes deseadas.

Las señales P o N que se detectan tienen una intensidad de la señal igual a la mitad de una señal obtenida con el experimento en su versión de ciclos de fases, debido a que solo una de las trayectorias de transferencia de coherencia es detectada.

$$S_P(t_1, t_2) = 1/2 \exp(i\omega_S t_1) \exp(-t_1/T_2) \exp(i\omega_I t_2) \exp(-t_2/T_2)$$

$$S_N(t_1, t_2) = 1/2 \exp(-i\omega_S t_1) \exp(-t_1/T_2) \exp(i\omega_I t_2) \exp(-t_2/T_2)$$

conduciendo a los términos observables

$$1/2 I_x \cos \omega_S t_1 + 1/2 I_y \sin \omega_S t_1$$

HMBC

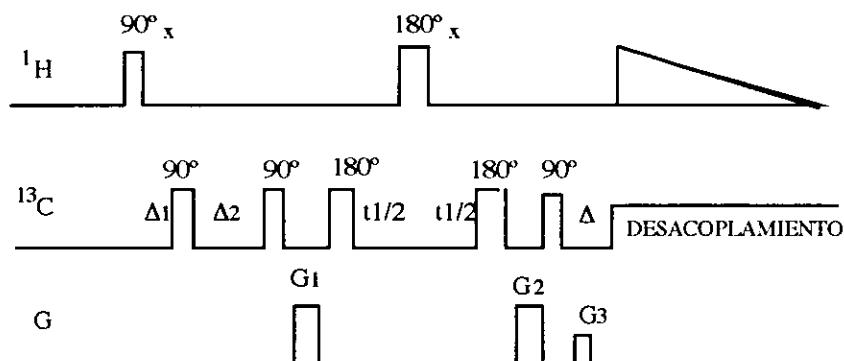


Figura 1. 16 .- Secuencia de pulsos del experimento HMBC en versión gradiente de campo

Los espectros HMBC⁷⁷ en su versión de ciclos de fases presentan por lo general cancelación de señales y artefactos provenientes del ruido generado en t_1 , debido a que se requieren varios barridos por cada incremento de t_1 . En cambio HMBC en su versión de gradiente de campo proporciona espectros más limpios ya que solo requiere de un barrido por cada incremento de t_1 , los artefactos que se producen son causados por imperfecciones en el pulso de 180° que mezcla las trayectorias de coherencia P y N.

La descripción del experimento HMBC en versión gradiente de campo con el formalismo de producto de operadores se describe a continuación, donde se considera $I = {}^1\text{H}$ y $S = {}^{13}\text{C}$

- el primer pulso de 90° en I genera la magnetización transversal $-I_y$
- la aplicación de los pulsos de 90° en S ocasiona la evolución de las componentes de la magnetización transversal y su evolución por acoplamiento escalares y por desplazamientos químicos,
- el primer gradiente defasa las componentes transversales de los espines I y S ,

$$I_y \cos(\gamma G_1 t) - I_x \sin(\gamma G_1 t) -$$

$$- S_y \cos(\gamma G_1 t) + S_x \sin(\gamma G_1 t)$$

generando las componentes de antifase

$$- I_y S_z [\cos \omega_s t_1 \cos(\gamma G_1 t) + \sin \omega_s t_1 \sin(\gamma G_1 t)]$$

- los dos pulsos de 180° en I , 180° en S y el segundo gradiente G_2 desarrollan las siguientes componentes:

$$[I_x \cos(\gamma_s G_2 t_1) + I_y \sin(\gamma_s G_2 t_1)] [\cos(\omega_s t_1 - g B g_1 t_1)] =$$

$$I_x/2 [\cos(\gamma_s G_2 t_1 + \omega_s t_1 - \gamma_s G_1 t_1) + \cos(\gamma_s G_2 t_1 - \omega_s t_1 + g B g_1 t_1)] +$$

$$I_y/2 [\sin(\gamma_s G_2 t_1 + \omega_s t_1 - g B g_1 t_1) + \sin(\gamma_s G_2 t_1 - \omega_s t_1 + g B g_1 t_1)]$$

si se ajustan los dos gradientes para que

$$\gamma_s G_1 t = \pm \gamma_I G_2 t_1$$

se obtienen las componentes de la magnetización I que son detectables

$$1/2 I_x \cos \omega t_1 + 1/2 I_y \sin \omega t_1$$

Los gradientes aplicados generalmente ocupados guardan la relación $(G_1 + G_2) / G_3 = \gamma \text{ } ^1\text{H} / \gamma \text{ } ^{13}\text{C} = 4$

1.4. Predicción lineal

La RMN es una técnica analítica muy poderosa en la investigación de las estructuras moleculares, sin embargo presenta el gran problema de tener baja sensibilidad y si a esto le agregamos el problema de que en la mayoría de los casos la cantidad total de la muestra con que trabajamos es del orden de las decenas de mg, nos obliga a que los experimentos que se programen requieren de una gran cantidad de tiempo (mas de 2 horas). Una de las formas de disminuir el tiempo de los experimentos de RMN mejorando la resolución, la sensibilidad o eliminando las regiones de ruido es la manipulación del interferograma (FID), que consiste en multiplicar el FID por otras funciones matemáticas ² y la función resultante al ser sometida a la transformada de Fourier (F T), presenta un espectro con mejoras espectrales respecto al espectro original considerense las siguientes operaciones como ejemplo:

a) Cuando el decaimiento libre de la inducción es multiplicado por una función matemática exponencial decayente ($\exp(-t T_c)$), se obtiene una nueva función matemática, de la cual el espectro resultante de la transformada de Fourier presentara menor ruido pero las senales seran mas anchas, la mejora en la relación señal / ruido es a expensas de la resolución espectral.

b) Otra posibilidad de manipulación del FID es multiplicarlo por una función matemática exponencial creciente ($\exp(t T_c)$), el espectro resultante de la nueva transformada de Fourier tendrá una mejora en la resolución espectral, pero la relación señal ruido se vera disminuída drásticamente.

En forma deseable se pretende que al multiplicar el FID por otra función se obtenga una mejora tanto en la resolución de las senales como en la relación / señal ruido, para ello se han utilizado varias funciones como las siguientes:

c) multiplicación del FID por la transformada de Fourier de una función gaussiana (que también es gaussiana), con lo que las señales de resonancia son convertidas a líneas de forma gaussiana y con decaimiento mas rápido a la línea base,

d) multiplicación del FID por una función sinusoidal que empieza a cero y tiene un valor de máximo a la mitad del FID, aunque mejora bastante la resolución también afecta la relación señal / ruido en forma significativa y la forma de las señales.

e) multiplicación del FID por una función exponencial doble, permite obtener un espectro con mejora en la resolución de las señales sin incrementar notoriamente la relación señal / ruido.

Una de las formas mas utilizadas de aumentar la resolución digital, sin afectar la relación señal / ruido es extender artificialmente el número datos adquiridos con el llenado de ceros (N_1 señales de amplitud cero), de forma que la transformación del FID se realizará con $N + N_1$ datos. La extrapolación de las series de datos al agregar ceros es un proceso simple, pero poco conveniente cuando el interferograma no ha decaído completamente, ya que la transformada de Fourier produce un señales distorsionadas.

Otro método de extrapolación es la predicción lineal en la cual M puntos ausentes de la muestra pueden ser extrapolados iterativamente al número deseado de puntos y de esta forma obtener mejoras en la resolución de las señales. La extrapolación es debida a que el FID esta compuesto por señales sinusoidales decayentes en forma exponencial, el n -ésimo punto (S_n) puede ser expresado como una combinación lineal de los k -ésimos puntos anteriores⁸⁸:

$$S_n = \sum_{j=1}^k a_j S_{n-k}$$

Cuando N puntos han sido muestreados, se pueden generar $N - k$ ecuaciones y los valores de a_j pueden ser determinados. Al conocerse los valores de a_j se pueden calcular los valores de S_n , S_{n+1} , etc. y de esta forma realizarse la transformada de Fourier con un mayor número de datos y mejorar la calidad de las señales en el espectro.

CAPITULO 2

SEPARACION Y PURIFICACION DE LOS GLUCOSIDOS DE
IPOMOEAE STANS Y MICHROSECHIUM HELLERI2. 1. Separación de los glucósidos de la fracción cromatográfica A de *Ipomoea stans*

El primer glucósido de la fracción A de *Ipomoea stans* (glucósido V) fué separado en una columna con grupos ciano químicamente unidos, usando como eluyente un gradiente de acetonitrilo-agua desde 80 : 20 hasta 50 : 50 respectivamente, con flujo de 1 mL/min y detector de índice de refracción. ¹

La separación de los demás componentes de la fracción cromatográfica A se realizó con una columna de fase inversa MCH-10 de acero inoxidable, 30 cm de longitud, 4.0 mm de diámetro interno, fase estacionaria octadecilsilano químicamente unida a partículas de sílice de 10 μm de diámetro, fase móvil 70 % CH_3CN - 30 % H_2O , temperatura de 35 $^\circ\text{C}$ y flujo de 1.5 mL / min. ² El cromatógrafo de líquidos utilizado es un VARIAN 9010 con sistema ternario de bombas, conectado a un detector de UV de longitud de onda variable VARIAN 9050 a una longitud de onda de 220 nm. Las columnas se mantuvieron a una temperatura constante con un controlador de temperatura Eppendorf modelo TC-50. El cromatograma de los glucósidos de la fracción A de *Ipomoea stans* (figura 2. 1) muestra cuatro componentes principales.

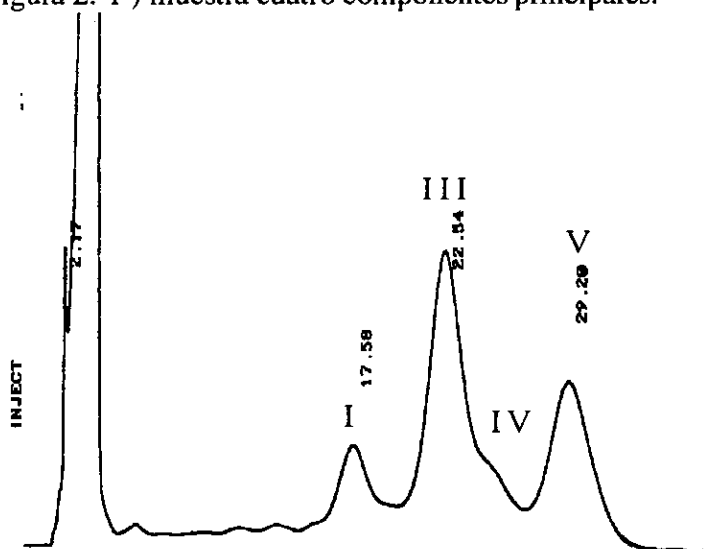


Figura 2. 1. Cromatograma de la fracción cromatográfica A de *Ipomoea stans* en el que se observan los cuatro glucósidos mas abundantes.

2. 2.- Separación de glucósidos de fracción cromatográfica B de *Ipomoea stans*

La separación de los glucósidos de la fracción B se realizó en las siguientes condiciones: columna de acero inoxidable de 30 cm longitud, 4.0 mm diámetro interno, fase estacionaria octadecilsilano unida químicamente a partículas de sílice de 10 μm de diámetro (MCH 10), fase móvil 60 % CH_3CN - 40 % H_2O , temperatura de 35 $^\circ\text{C}$ y flujo de 1.5 mL/ min. En la figura 2. 2 se presenta el cromatograma de la fracción B de *Ipomoea stans* se observan ocho picos principales, sin embargo los glucósidos I, II y III se encontraban en cantidades muy pequeñas y la cantidad colectada no fué suficiente para su identificación.³

Para obtener 10 mg de cada uno de los glucósidos se inyectaron cantidades de sustancia que sobresaturaron la columna analítica, llegando a inyectar hasta 1.0 mg de fracción cromatográfica sin afectar seriamente la resolución. El proceso de purificación de los glucósidos es lento debido a que las fracciones colectadas del cromatógrafo de líquidos deben ser liofilizadas, reinyectadas para eliminar los contaminantes aún presentes y recheckar la pureza (figuras 2. 3 a 2. 6).

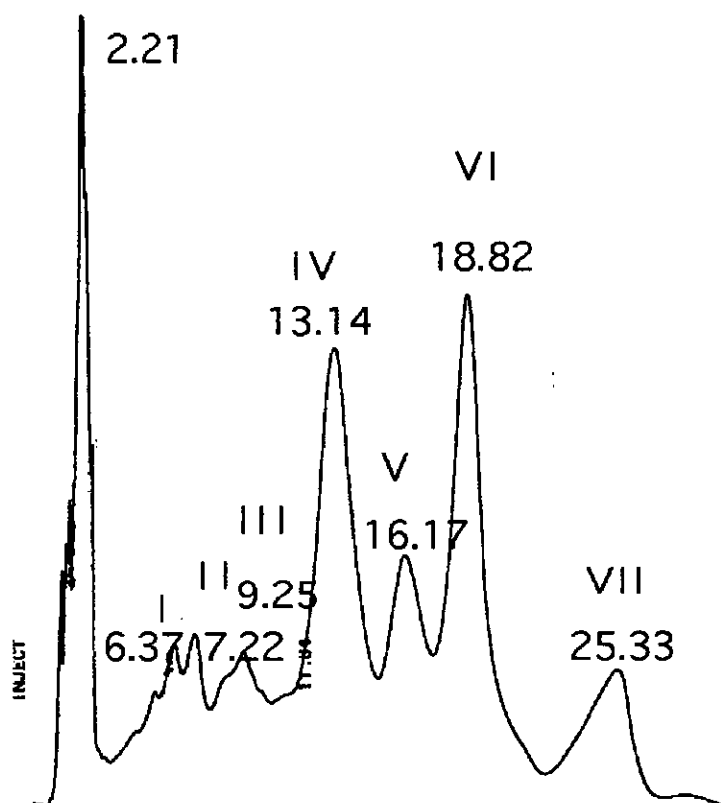


Figura 2. 2. Cromatograma de la fracción cromatografica B del extracto de acetato de etilo de la raiz de *Ipomoea stans* , en que se indican los ocho glucósidos principales.

El glucósido IV parecía un componente puro, pero al observar el pico cromatográfico con atención, se observó una ligera asimetría en el máximo por lo que se decidió coleccionar este glucósido en dos partes y por RMN se identificaron a dos glucósidos muy semejantes estructuralmente (IVA y IVB).

Las proporciones de los glucósidos de la fracción B de *Ipomoea stans* de acuerdo a su % en área, fueron: IV A 10 % , IV B 10 % , V 40 % , VI 20 % y VII 20 %.

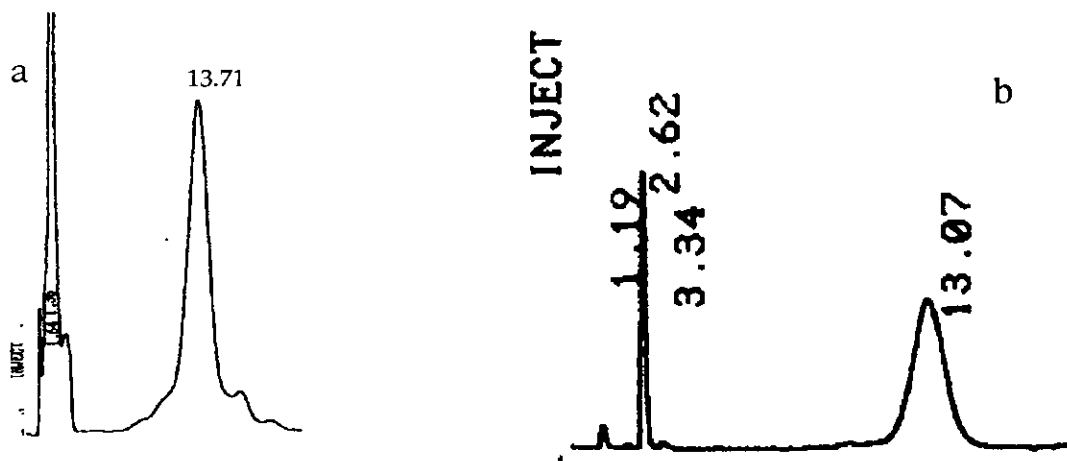


Figura 2. 3. Cromatogramas del glucósido IV A a) en la primera fase de purificación y b) en la segunda fase de purificación, de la fracción cromatográfica B de *Ipomoea stans*.



Figura 2. 4. Cromatogramas del glucósido V a) en la primera fase de purificación y b) en la segunda fase de purificación , de la fracción cromatográfica B de *Ipomoea stans*.

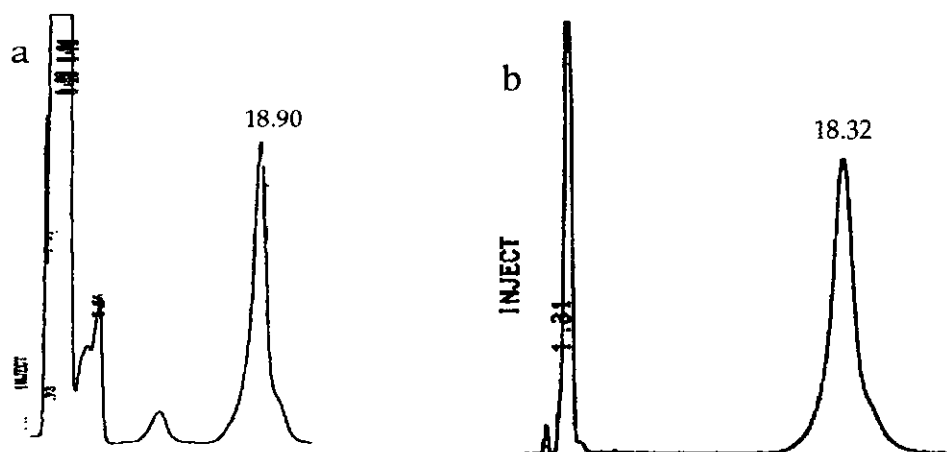


Figura 2. 5. Cromatogramas del glucósido VI a) en la primera fase de purificación y b) en la segunda fase de purificación, de la fracción cromatográfica B de *Ipomoea stans*.

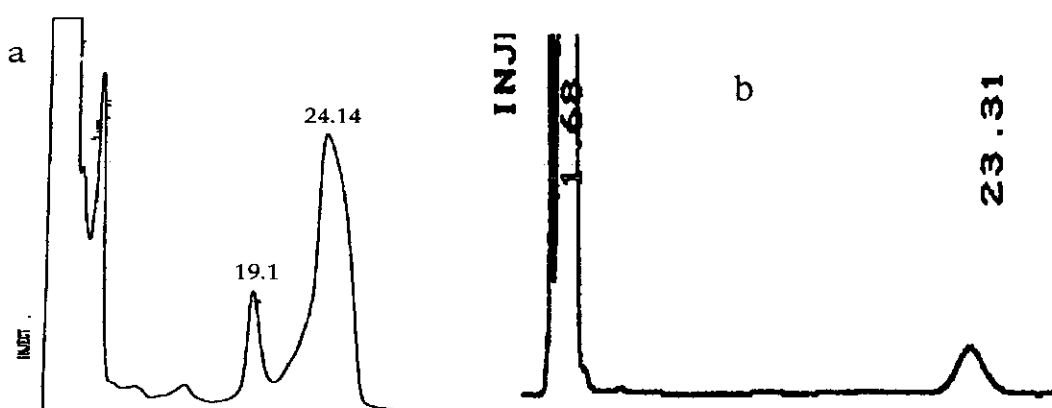


Figura 2. 6. Cromatogramas del glucósido VII a) en la primera fase de purificación y b) en la segunda fase de purificación, de la fracción cromatográfica B de *Ipomoea stans*.

2. 3. Separación de glucósidos del extracto metanólico de *Michrosechium helleri*

Amole es un nombre muy común utilizado por la población mexicana para describir a una gran variedad de plantas de diferentes especies con la característica común de que los rizomas de estas plantas se utilizan para lavar la ropa. El material vegetal utilizado en esta investigación fué colectado en el poblado de Tlazoyoaltepec, Municipio de ETLA, estado de Oaxaca e identificado en el Herbario de la UNAM. El rizoma seco y molido fué sometido a extracción con los siguientes disolventes : éter de petróleo, acetato de etilo, metanol.

La separación de los glucósidos F y G del extracto metanólico de *Michrosechium helleri* se realizó con una columna de acero inoxidable de 250 mm longitud, 10 mm diámetro (Phenomenex Maxsil), fase estacionaria octadecilsilano sobre partículas de sílice de 5 µm de diámetro, fase móvil CH₃OH / H₂O (75 : 25), con un flujo de 1 mL / min, detectando a una longitud de onda 210 nm y manteniendo la columna a una temperatura de 30 °C., obteniéndose con pureza del 95 % (figura 2. 7). El cromatógrafo de líquidos utilizado es un VARIAN 9010, conectado a un detector de U V de longitud de onda variable VARIAN 9050 y un controlador de temperatura de la columna modelo Eppendorf TC-50.

El procedimiento de purificación de los glucósidos F y G consistió en inyectar hasta 8 mg del extracto metanólico de *Michrosechium helleri*, coleccionar los componentes, liofilizarlos y reinyectar para eliminar las impurezas aún presentes hasta obtener 10 mg de cada uno de los componentes.⁷⁹

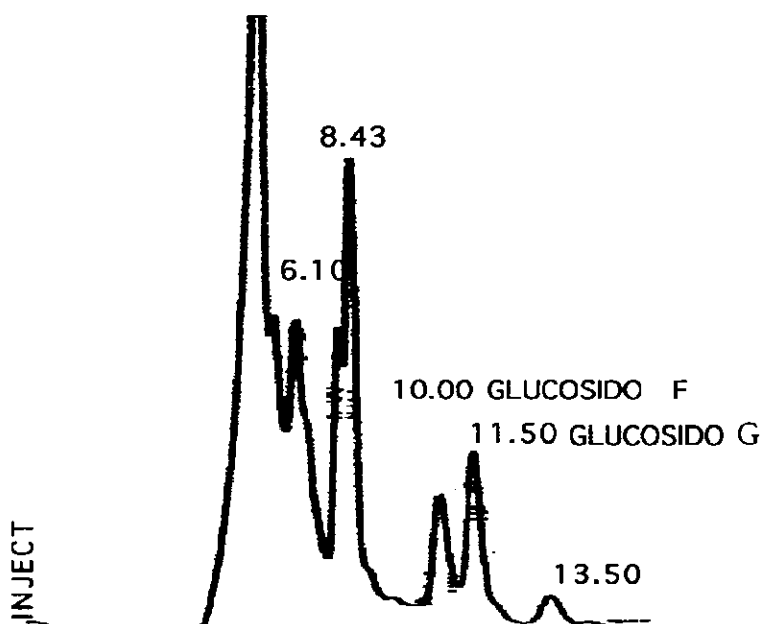


Figura 2. 7.- Cromatograma del extracto metanólico de *Michrosechium helleri* , donde se indican los picos correspondientes a los glucósidos F y G.

CAPITULO 3

GLUCOSIDOS DE IPOMOEA STANS

3. 1. Caracterización estructural del ácido glucosídico de *Ipomoea stans*

Caracterización inicial del ácido glucosídico

Los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C del ácido glucosídico de *Ipomoea stans* (figura 3.1) se obtuvieron en un espectrómetro VARIAN de 400 MHz. En la región anomérica de los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C del ácido glucosídico (figuras 3. 2 y 3. 3) se observaron cuatro señales sugiriendo que la molécula es un tetrasacárido, lo que se corrobora en el espectro de ^{13}C al detectarse en la región de 67 - 84 ppm 17 señales de metinos. En el espectro RMN de ^1H tres de los metilos se presentan como señales dobles indicativo de acoplamiento con un metino, pertenecientes a tres sacáridos con metilo en la posición 6.

En el espectro RMN de ^{13}C se observan 13 señales en la región de 21 - 37 ppm que se asignan a un ácido de cadena larga, también se observa una señal de carboxilo, asignación que se corrobora en el espectro de RMN de ^1H con la señal triple en 2.22 ppm característico de un CH_2 adyacente a carboxilo, que esta acoplada a otro metileno. Una señal de metilo en el espectro de RMN de ^1H es un triple ensanchado debido al acoplamiento con mas de un metileno, el resto de las señales de metilenos se presentan como una señal ancha.

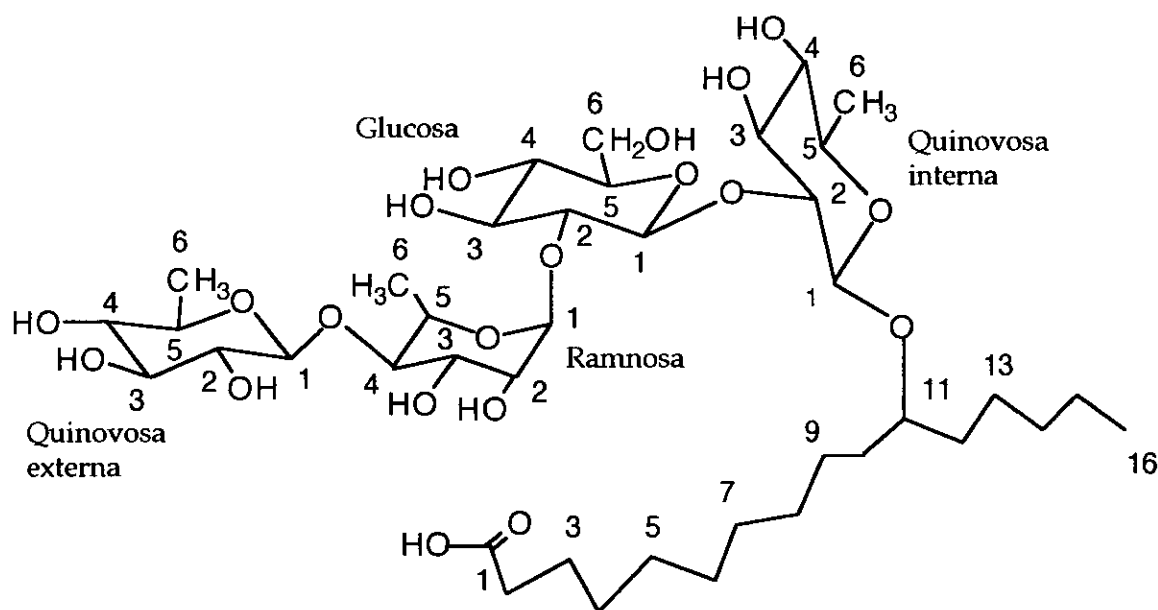


Figura 3. 1. Estructura del ácido glucosídico de *Ipomoea stans*

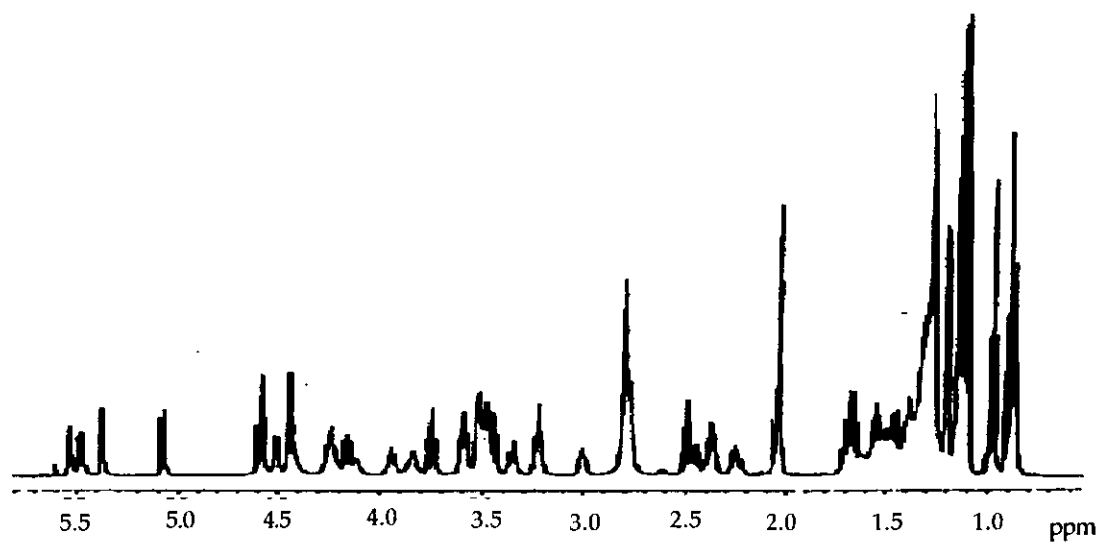


Figura 3. 2. Espectro RMN de ^1H de 400 MHz del ácido glucosídico de *Ipomoea stans*.

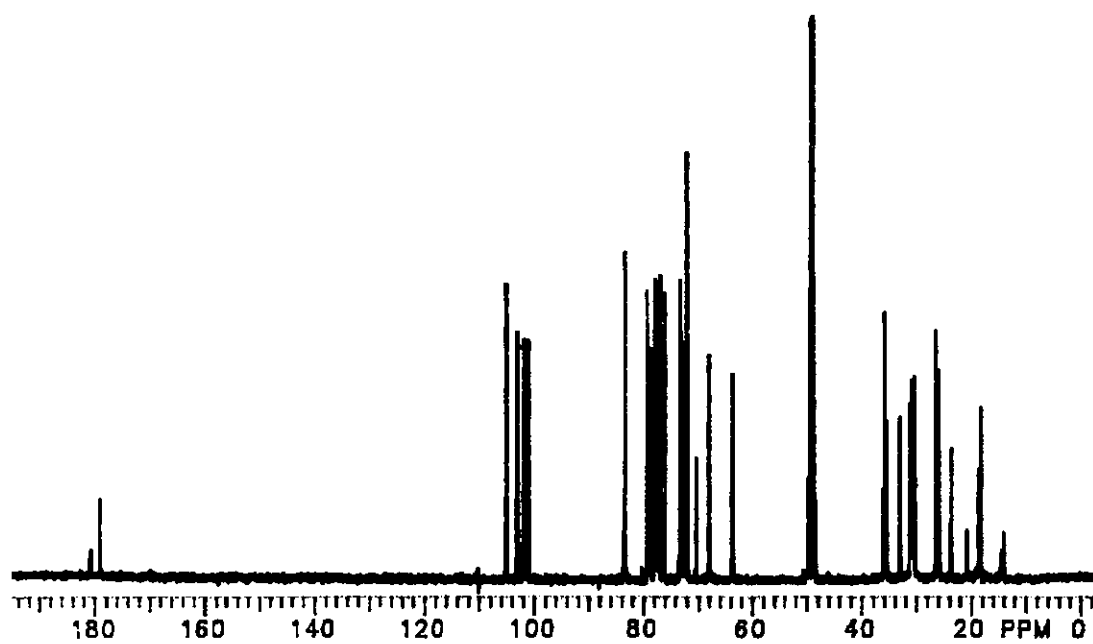


Figura 3. 3. Espectro RMN de ^{13}C de 100 MHz del ácido glucosídico de *Ipomoea stans*.

Caracterización del ácido 11-hidroxihexadecanoico

A partir de los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C no es posible identificar la estructura del ácido hidroxipalmítico, por lo que 200 mg del ácido glucosídico se hidrolizaron con HCl 3 N durante 2 horas a reflujo, posteriormente la solución fría se neutralizó con NaOH 1 N. La fase acuosa se extrajo con éter etílico, al residuo del extracto étereo se le adicionó $\text{BF}_3 / \text{CH}_3\text{OH}$ para formar el éster metílico del ácido hidroxipalmítico. Posteriormente con hexametildisilazano y trimetilclorosilano en piridina se forma el éter trimetilsililado, que se inyectó en el sistema CG - EM y la interpretación del espectro estableció su estructura como ácido 11-hidroxihexadecanoico.

La rotación óptica del 11-hidroxihexadecanoato de metilo preparado es $[\alpha]^{25}_{\text{D}} = + 0.42$, valor muy similar al reportado ($[\alpha]^{25}_{\text{D}} = + 0.45$) para el enantiómero S del éster metílico del ácido 11-hidroxihexadecanoico.

La tabla 3. 1 muestra los tiempos de relajación longitudinal (T_1) de los átomos de ^{13}C del ácido 11-hidroxihexadecanoico en el ácido glucosídico de *Ipomoea stans* (figura 3. 1). Se puede observar que el mecanismo de relajación predominante en el ácido glucosídico es el efecto de movilidad molecular, como se puede observar en la señal de metilo que tiene el mayor tiempo de relajación a pesar de tener 3 protones para efectuar su relajación.

T A B L A 3. 1

Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C y tiempos de relajación longitudinal (T_1) para los átomos de ^{13}C del ácido 11-hidroxi hexadecanoico en el ácido glucosídico de *Ipomoea stans*

Carbono	$\delta_{^{13}\text{C}}$	$\delta_{^1\text{H}}$	T_1 (seg)
1	179.1	---	---
2	36.8	2.22	0.42
3	26.8	1.60	0.52
4	30.5	1.33	0.54
5	30.4	1.33	0.52
6	30.7	1.32	0.48
7	30.9	1.30	0.43
8	31.1	1.29	0.34
9	25.8	1.39	0.34
10	35.5	1.51	0.19
11	83.5	3.60	0.31
12	35.8	1.48, 1.66	0.23
13	25.9	1.39	0.34
14	33.0	1.27	0.84
15	23.6	1.33	1.72
16	14.4	0.91	2.91

Caracterización de los monosacáridos en el ácido glucosídico

El espectro COSY del ácido glucosídico de *Ipomoea stans* permitió realizar algunas asignaciones de los protones en los cuatro monosacáridos, aunque algunas asignaciones no fueron realizadas debido a la sobreposición de señales cerca de la diagonal. Las constantes de acoplamiento J^{1H-1H} en los monosacáridos (tabla 3.2) se determinaron en el espectro de RMN de 1H . A partir de los valores de las constantes de acoplamiento entre H-1 y H-2 de los monosacáridos se asignaron las siguientes configuraciones: β -glucosa, dos β -quinovosas y α -ramnosa.

T A B L A 3. 2

Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de los monosacáridos en el ácido glucosídico

Monosacárido	Carbono	δ_C	δ_H	J_{HH}
Glucosa	1	101.8	4.96	$J_{1,2} = 7.6$
	2	77.9	3.39	$J_{2,3} = 9.1$
	3	79.3	3.49	$J_{3,4} = 9.2$
	4	72.5	3.13	$J_{4,5} = 9.2$
	5	77.9	3.22	$J_{5,6'} = 2.4$
	6	63.6	3.55	$J_{5,6} = 4.8$
				3.85
Ramnosa	1	101.1	5.28	$J_{1,2} = 1.2$
	2	72.0	3.93	$J_{2,3} = 3.2$
	3	72.0	4.03	$J_{3,4} = 9.2$
	4	83.4	3.59	$J_{4,5} = 9.4$
	5	67.9	4.33	$J_{5,6} = 6.2$
	6	18.4	1.30	
Quinovosa interna	1	103.1	4.31	$J_{1,2} = 8.0$
	2	79.2	3.58	$J_{2,3} = 9.1$
	3	78.8	3.65	$J_{3,4} = 9.0$
	4	72.3	2.99	$J_{4,5} = 8.8$
	5	73.0	3.29	$J_{5,6} = 6.2$
	6	18.2	1.26	
Quinovosa externa	1	105.1	4.59	$J_{1,2} = 8.0$
	2	76.1	3.21	$J_{2,3} = 9.2$
	3	77.7	3.26	$J_{3,4} = 9.3$
	4	76.9	3.02	$J_{4,5} = 8.8$
	5	73.3	3.34	$J_{5,6} = 6.2$
	6	18.2	1.28	

El experimento Relay Coherence permitió editar las señales de ^1H de los cuatro monosacáridos, con las que se asignaron sus desplazamientos químicos (figura 3. 4). Con la secuencia de pulsos aplicada se esperaba que la transferencia de magnetización ocurriera a lo largo de tres protones, sin embargo en los resultados experimentales se observa que la transferencia de magnetización se realizó con la participación de cuatro protones a lo largo del monosacárido (lo cual no es común).

El espectro HETCOR del ácido glucosídico de *Ipomoea stans* permitió asignar los desplazamientos químicos de ^{13}C de los sacáridos, que se muestran en la tabla 3.2.

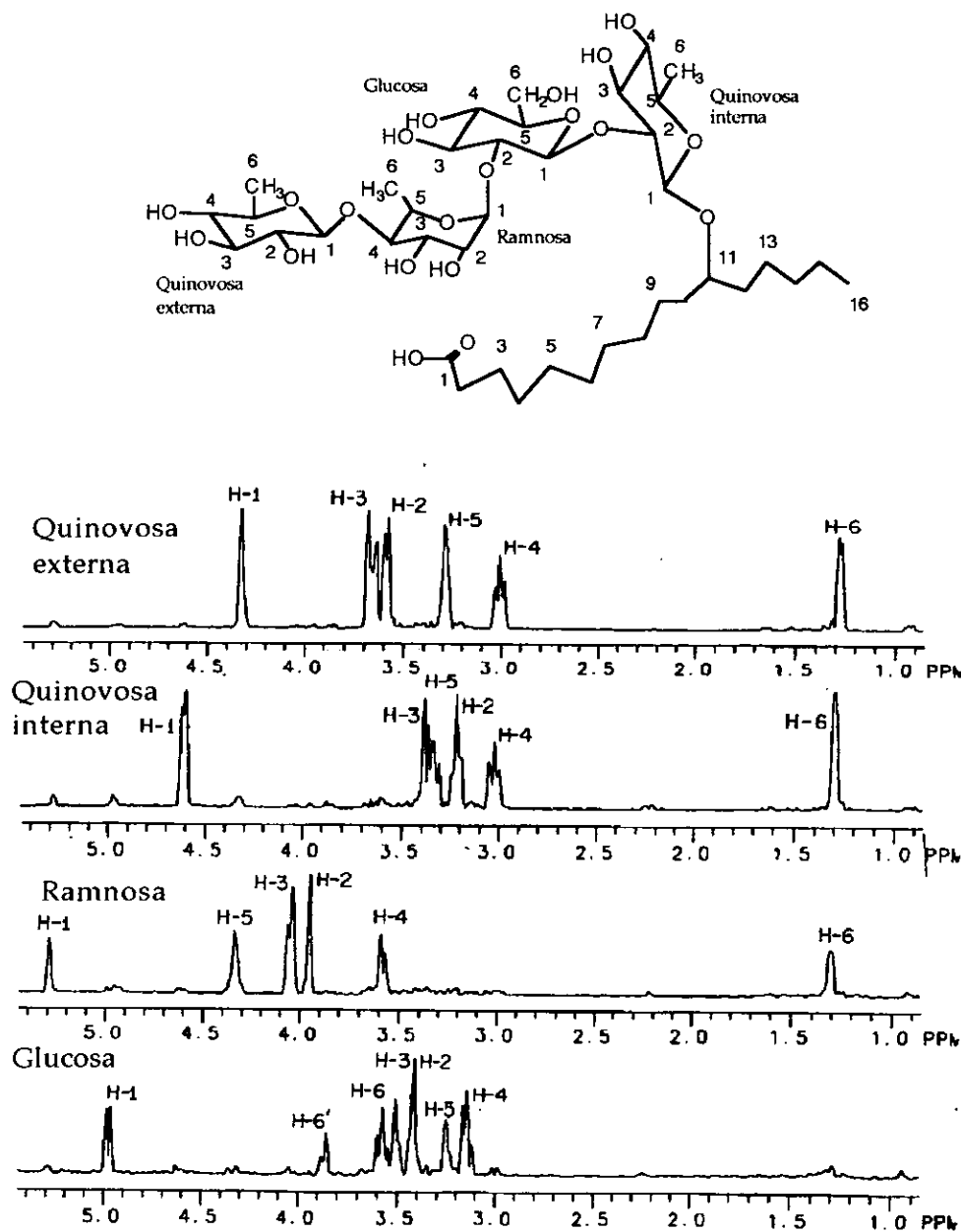


Fig. 3. 4. Edición espectral de las señales de los cuatro monosacáridos del ácido glucosídico de *Ipomoea stans*, obtenidas en el experimento Relay Coherence.

Determinación del sitio de unión entre los monosacáridos y con el ácido 11-hidroxihexadecanoico

La asignación de los sitios de unión entre los monosacáridos y con el ácido graso se determinó con los espectros del efecto nuclear Overhauser por diferencia, obtenidos del ácido glucosídico con irradiación y sin irradiación de los protones anoméricos (figuras 3.5 a 3.8). Las intensidades de las señales son pequeñas debido a que el peso molecular del ácido glucosídico es cercano a 1 000 g/mol, por lo que la molécula presenta una movilidad molecular que corresponde a la zona de transición de NOE de positiva a negativa. La sobreposición de algunas señales y el congestionamiento de señales con desplazamientos químicos muy similares dificultó la interpretación de los espectros.

A partir de estos experimentos se lograron asignar los sitios de unión de los azúcares C-1 de quinovosa externa con C-4 de ramnosa, C-1 de ramnosa con C-2 de glucosa, C-1 de glucosa con C-2 de quinovosa interna y entre C-1 de quinovosa interna con C-11 del ácido graso.

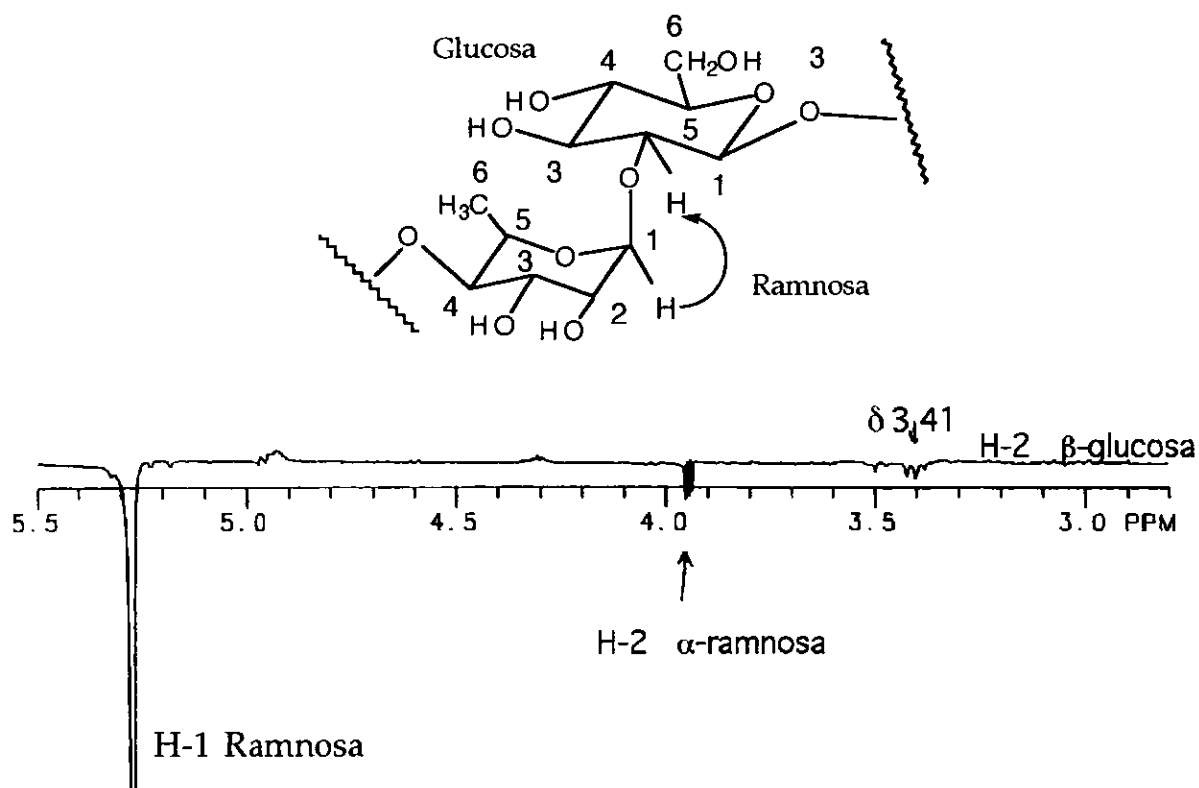


Figura 3. 5. Espectro NOE diferencial del ácido glucosídico de *Ipomoea stans*. Al irradiar H-1 de ramnosa, se observa alteración en la intensidad de la señal de H-2 de glucosa, indicativo de la cercanía espacial de estos dos protones. A partir de este resultado se puede afirmar que la ramnosa se encuentra unida a la glucosa con una unión 1 - 2. Otra señal que se observa corresponde a H-2 de ramnosa y la ausencia de interacciones con otros Hs de la ramnosa indican que H-1 de ramnosa tiene orientación ecuatorial.

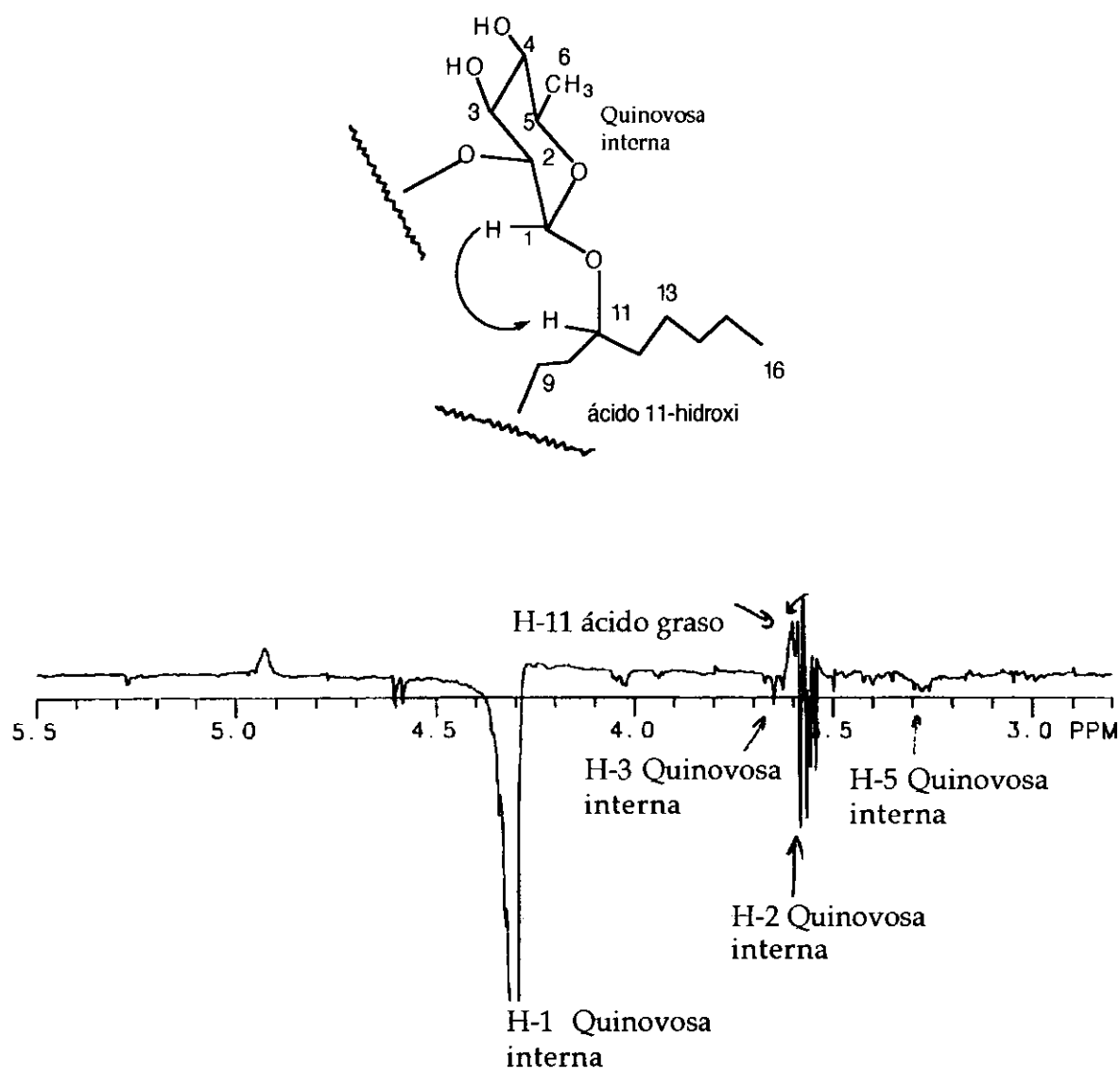


Figura 3. 6. Espectro NOE diferencial del ácido glucosídico de *Ipomoea stans*. Al irradiar H-1 de quinovosa interna, se observa un cambio en la intensidad de la señal de H-11 del ácido 11-hidroxihexadecanoico, indicativo de la cercanía de H-1 de quinovosa interna con H-11 del ácido graso. Otras señales que se observan corresponden a H-2, H-3 y H-5 de quinovosa interna indican que H-1 tiene orientación axial.

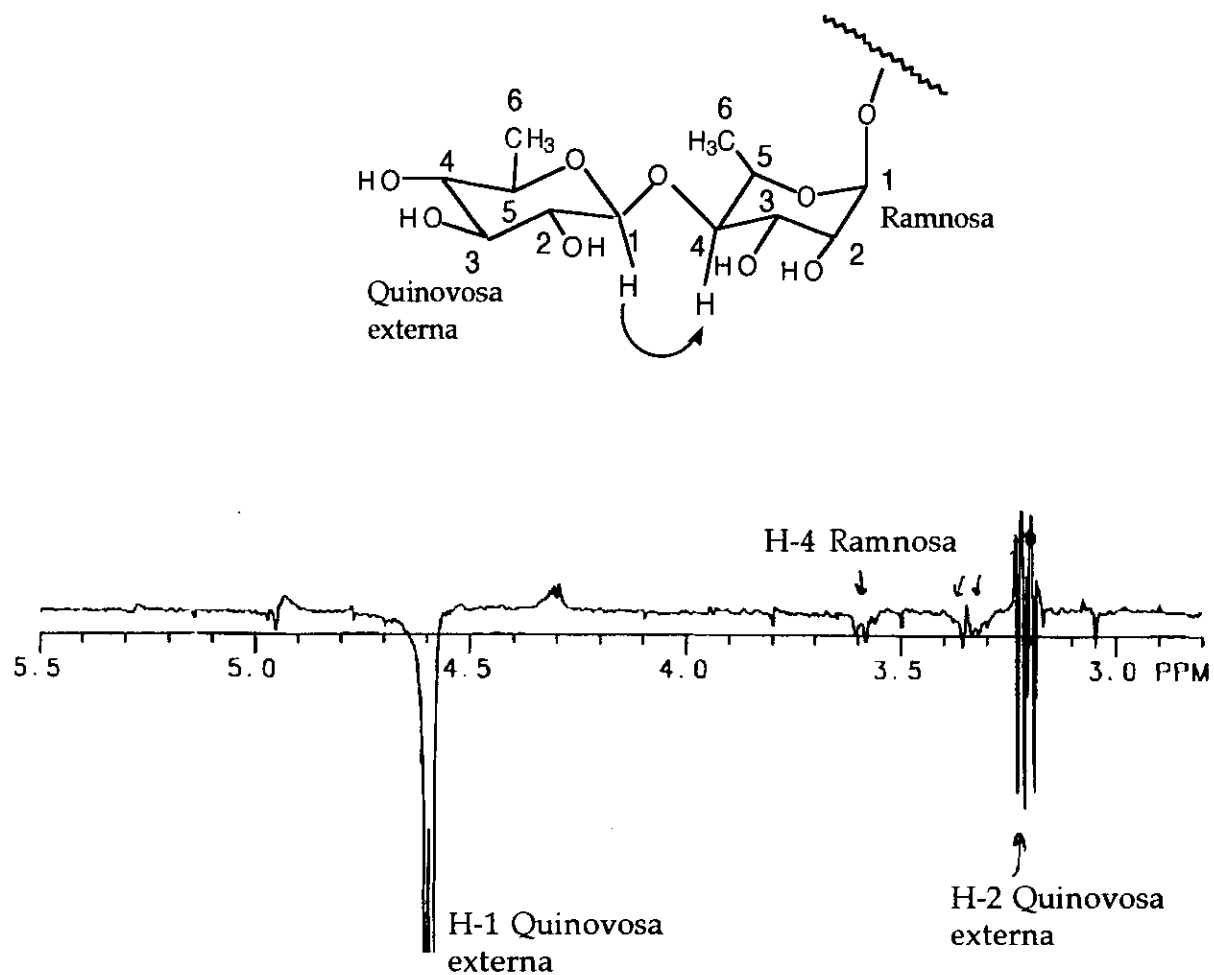


Figura 3. 7. Espectro NOE diferencial del ácido glucosídico de *Ipomoea stans*. Al irradiar H-1 de quinovosa externa, se observa un cambio en la intensidad de la señal de H-4 de ramnosa, indicativo de la cercanía espacial de H-1 de quinovosa externa y H-4 de ramnosa. Otra señal que se observa corresponde a H-2 de quinovosa externa.

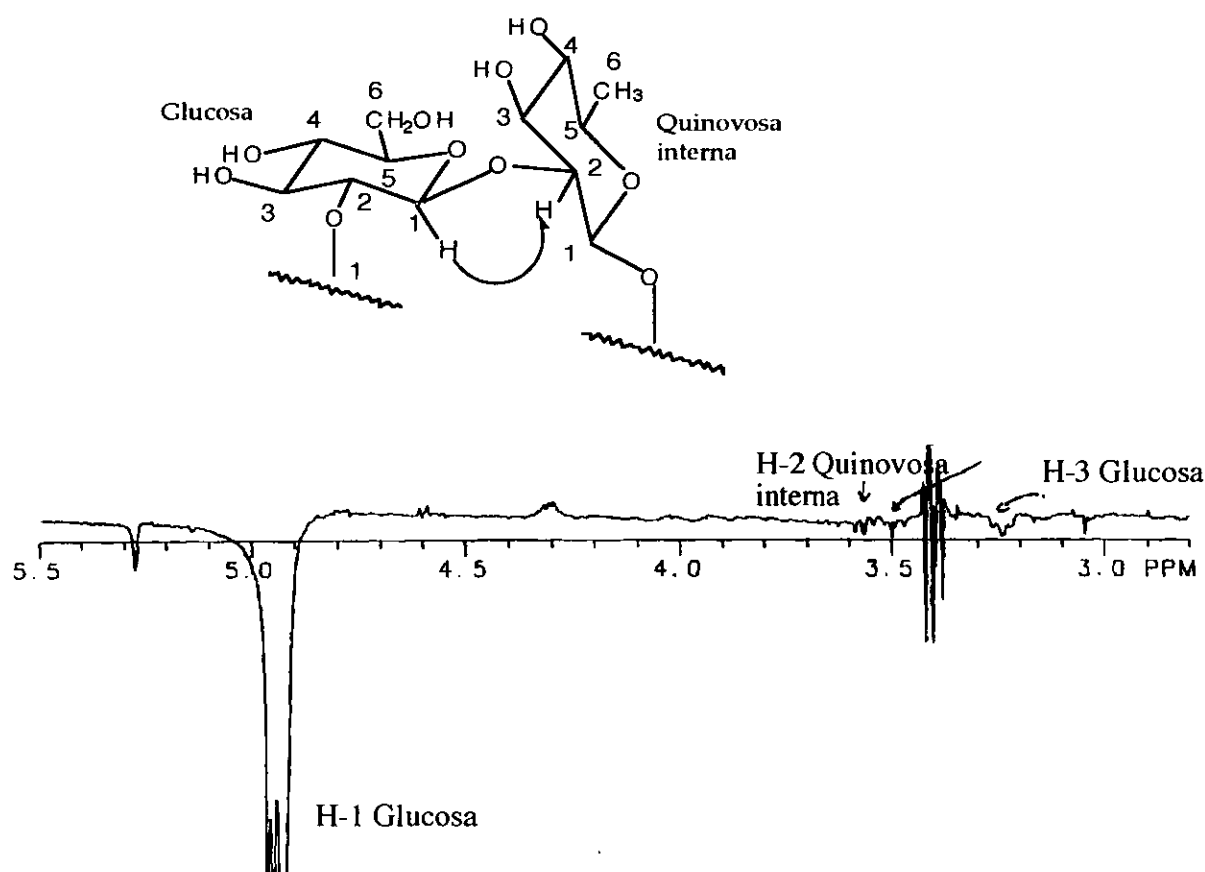


Figura 3. 8. Espectro NOE diferencial del ácido glucosídico de *Ipomoea stans*. Al irradiar H-1 de glucosa, se observa que la intensidad de la señal de H-2 de quinovosa externa cambia, debido a la cercanía de H-2 de quinovosa externa con H-1 de glucosa. Otras señales que se observan corresponden a H-3 y H-5 de glucosa indicando que H-1 tiene orientación axial.

El experimento XCORFE se realizó con el ácido glucosídico peracetilado (figura 3.9), debido a que sus tiempos de relajación son mayores que los de la molécula sin peracetilar, lo cual minimizó la pérdida de señal por efectos de relajación durante los intervalos t del experimento XCORFE.

La figura 3. 10 muestra las correlaciones a dos y tres enlaces de distancia de los átomos de ^{13}C anoméricos. Las señales $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ se distinguen de las correlaciones a tres enlaces por mostrar el acoplamiento vecino $^1\text{H}-^1\text{H}$ (multiplicidad). La señal producida por H-2 y C-4 de ramnosa muestra una conectividad a tres enlaces de distancia, debido a una constante de acoplamiento grande ($^3J_{\text{CH}}$ anti). Las conectividades entre C-3 y C-5 con H-1 son posibles y detectadas cuando H-1 se encuentra en posición ecuatorial, lo que confirma la configuración α de ramnosa. Los resultados del experimento XCORFE permitieron corroborar los sitios de unión de los azúcares C-1 de quinovosa externa con C-4 de ramnosa, C-1 de ramnosa con C-2 de glucosa, C-1 de glucosa con C-2 de quinovosa interna y entre C-1 de quinovosa interna con C-11 del ácido graso.

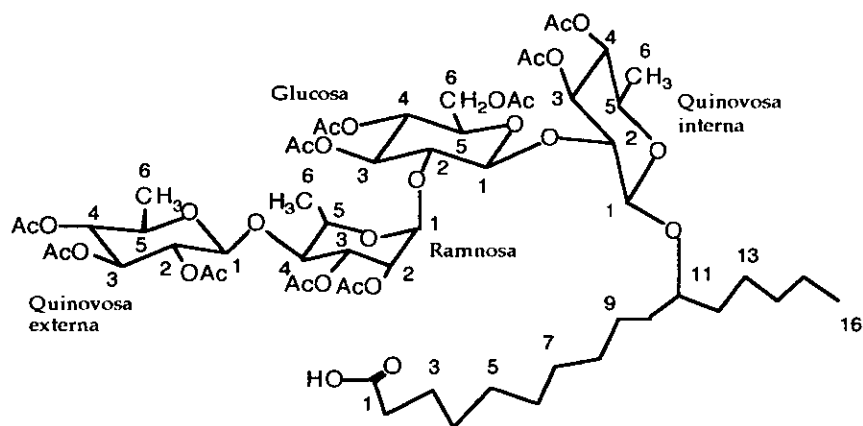


Figura 3. 9. Estructura del ácido glucosídico peracetilado de *Ipomoea stans*

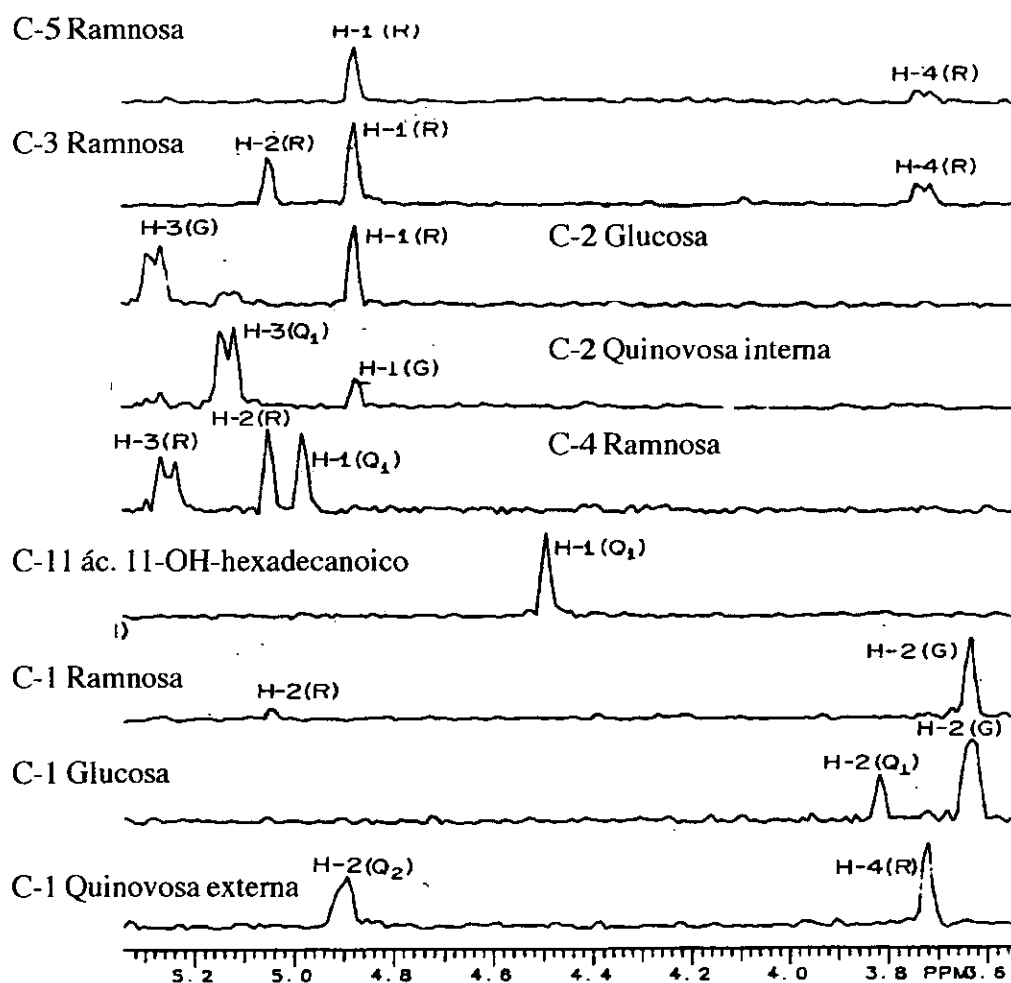
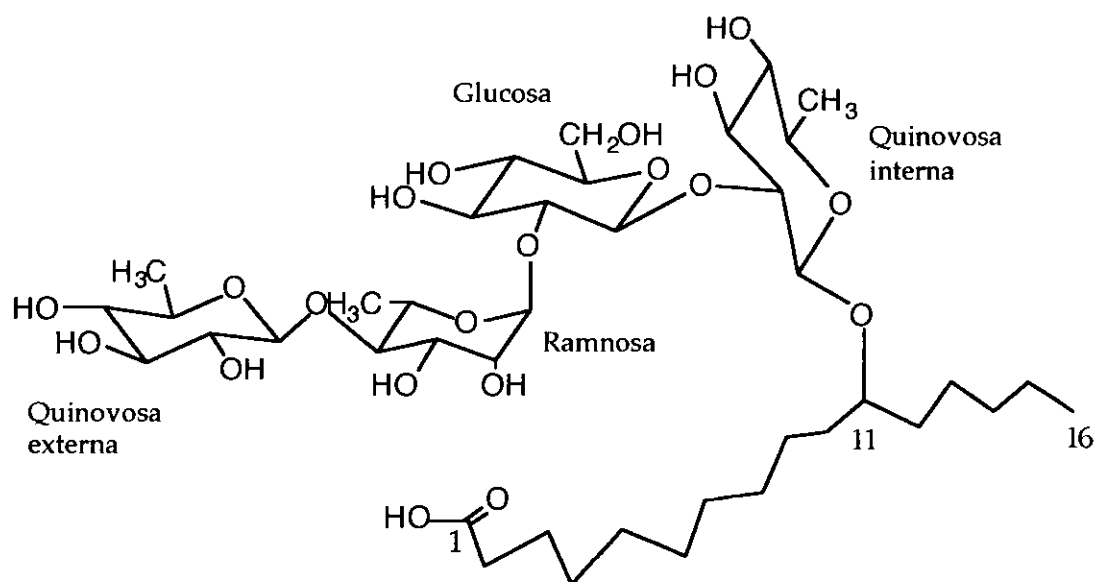


Figura 3.10- Edición espectral de algunas secciones transversales del espectro XCORFE del ácido glucosídico, en el que se muestran las conectividades a largo alcance de los átomos de carbono con los ^1H inter e intrasacáridos, que confirman los sitios de unión entre los azúcares y con el ácido graso. R = ramnosa, G = glucosa, Q1 = quinovosa interna, Q2 = quinovosa externa

Estructura del ácido glucosídico de *Ipomoea stans*

Con la información obtenida el nombre del ácido glucosídico de *Ipomoea stans* es el ácido 11-O-[β -quinovopiranosil-(1-4)- α -ramnopiranosil-(1-2)- β -glucopiranosil-(1-2)- β -quinovopiranosido]-(S)-11-hidroxihexadecanoico y su estructura molecular es la siguiente



La estructura del ácido glucosídico de *Ipomoea stans* ha sido reportada anteriormente por Miyahara en dos glucósidos obtenidos de *Convolvulus scammonia* ²⁷ basandose en cambios en desplazamientos químicos del producto de la hidrólisis básica de dichos glucósidos.

3. 2. Glucósidos fracción cromatográfica A

Caracterización de los glucósidos de la fracción cromatográfica A

Los cuatro glucósidos mas abundantes en la fracción cromatográfica A presentaron espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C muy similares entre si. Generalizando, podemos decir que las cuatro señales anoméricas se ubicaron aproximadamente en 4.4, 5.1, 5.4 y 4.5 ppm. Las señales de metilo en el rango 1.22 - 1.00 ppm. En el espectro RMN de ^{13}C se tienen las señales anoméricas en 100.4, 100.3, 96.9 and 104.4 ppm y las señales de carboxilos de éster entre 176 y 172 ppm.

Glucósido I

Las correlaciones a largo alcance del carbono anomérico de ramnosa, se presentan con H-2 de ramnosa (5.52 ppm) y con H-2 de glucosa como indicación del sitio de unión intersacárida. Las conectividades del carbono anomérico de la quinovosa externa son con H-4 de ramnosa (sitio de unión intersacárida) y con H-2 de quinovosa externa. En la figura 3.12 se observan las correlaciones a largo alcance del átomo de carbono anomérico de la glucosa con H-2 de glucosa y con H-2 de quinovosa interna, indicativo del sitio de unión entre ambos monosacáridos. En la tabla 3.3 se presentan los desplazamientos químicos del glucósido I.

La estructura intacta del glucósido I (figura 3.11) es la del éster intramolecular del ácido 11-hidroxipalmitico-11-O-4-O-[ác.2-metilbutanoico- β -D-quinovopiranosil]-(1-4)-O-2-O-[ác.3-metilbutanoico- α -L-ramnopiranosil]-(1-2)-O-6-O-[ác.2-metil-3-hidroxibutanoico- β -D-glucopiranosil]-O-(1-2)- β -D-quinovopiranosil.

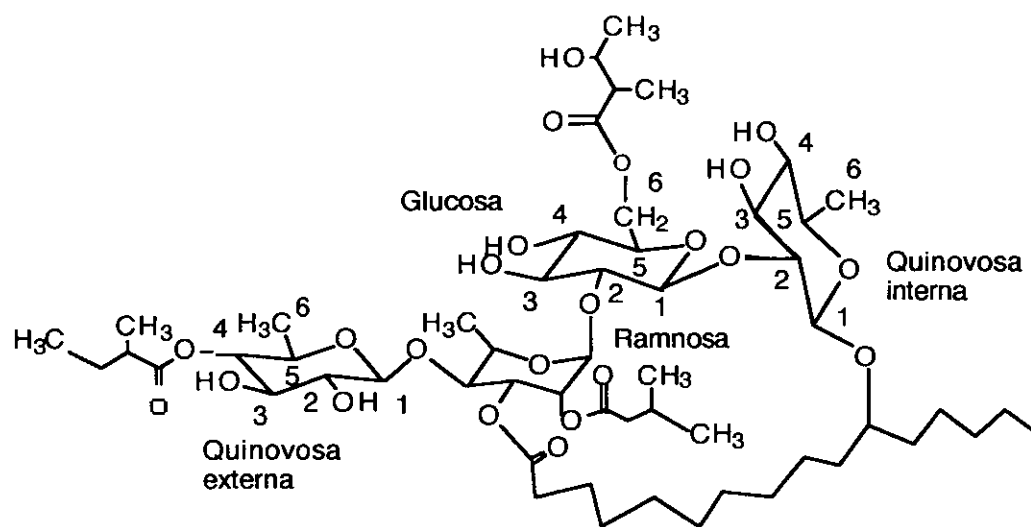


Figura 3. 11. Estructura del glucósido I de la fracción cromatográfica A.

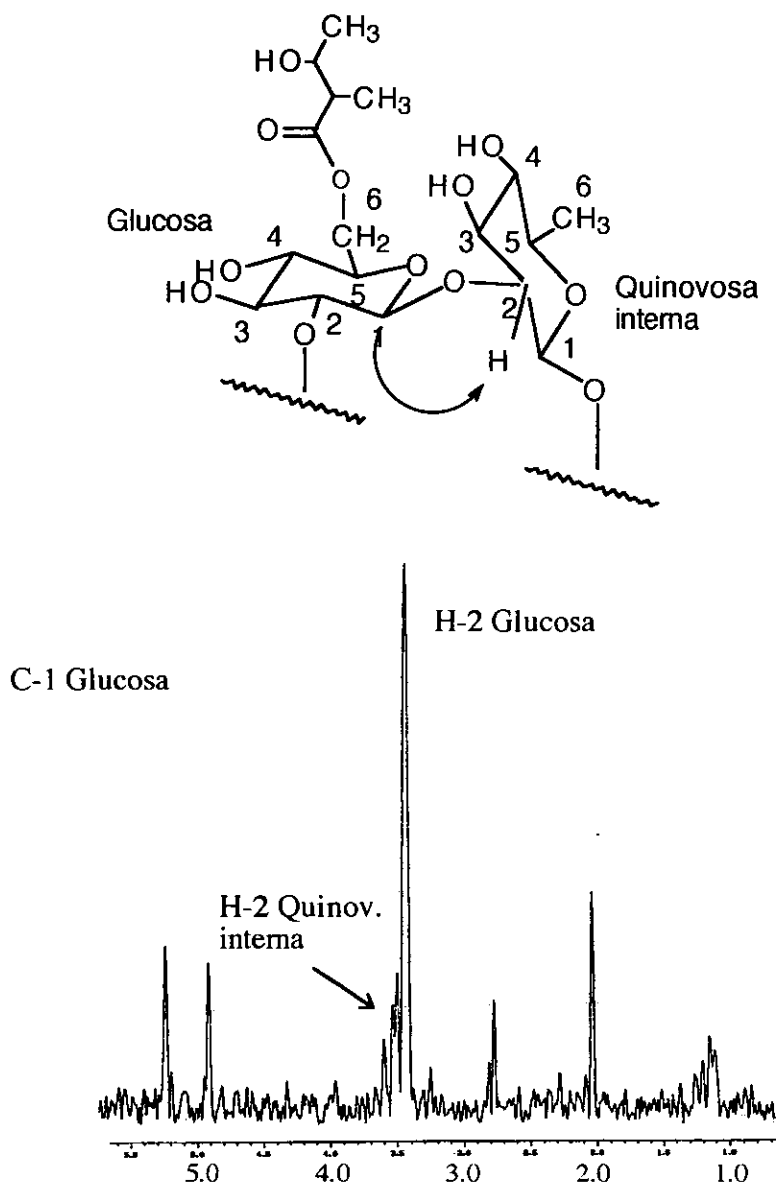


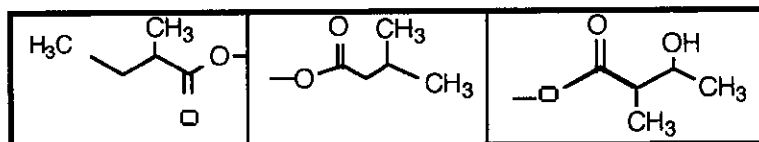
Figura 3. 12. Sección transversal del espectro HMBC del glucósido I. Se presenta la edición del carbono anomérico de la glucosa ($\delta = 100.3$) mostrando correlaciones con H-2 de glucosa y con H- 2 de quinovosa interna.

T A B L A 3. 3

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DEL GLUCOSIDO I

Quinovosa interna	Glucosa	Ramnosa	Quinovosa externa
----------------------	---------	---------	----------------------

Hidrógeno	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	4.52	100.4	5.07	100.3	5.34	96.7	4.44	104.4
2	3.54	79.3	3.44	79.2	5.52	69.8	3.22	75.3
3	3.53	78.0	3.58	77.3	5.47	71.7	3.50	75.1
4	2.99	77.0	3.34	72.0	3.74	78.5	4.58	76.1
5	3.23	72.1	3.47	74.4	4.24	68.5	3.48	70.6
6	1.20	18.1	4.17	64.5	1.27	18.2	1.12	17.9
6'			4.45					



Hidrógeno	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1		176.0		174.9		175.4
2	2.37	41.9	2.25	43.8	2.49	48.4
3	1.42	27.3	2.09	26.4	3.93	69.5
3'	1.65					
4	0.90	11.9	0.99	22.6	1.14	20.6
5	1.11	16.8	0.99	22.6	1.09	13.4

Glucósido III

Las asignaciones de desplazamientos químicos de ^1H en el glucósido III (figura 3.13) se realizaron con los espectros COSY y TOCSY. En la figura 3.14 se muestra el espectro COSY del glucósido III en el que se presentan las correlaciones $^1\text{H} - ^1\text{H}$ para los monosacáridos glucosa y ramnosa. En el espectro TOCSY del glucósido III se detectaron las señales del ácido 2-metil-3-hidroxi butanoico, la señal en 3.92 ppm corresponde al metino en posición gemela al -OH, la señal en 2.47 ppm es del metino adyacente a carbonilo y en 1.09 y 1.14 ppm los metilos. Otro sistema de espines en el espectro TOCSY tiene señales en 2.44 ppm de un metino adyacente a carbonilo, un metileno con desplazamientos químicos en 1.70 y 1.53 ppm y dos metilos en 1.15 y 0.97 ppm del ácido 2-metil butanoico.

A partir del espectro HMQC del glucósido III, se asignaron los desplazamientos químicos de ^{13}C de los monosacáridos. En la tabla 3.4 se presentan los desplazamientos químicos del glucósido III.

Las figuras 3.15 a 3.18 muestran las correlaciones a largo alcance de tres átomos de carbono anoméricos con los que se determinó el sitio de unión de los monosacáridos en el glucósido III y del átomo de carbono del carbonilo en 175.44 ppm del ácido 2-metil-3-hidroxi butanoico unido a la glucosa en la posición 6.

Las correlaciones a largo alcance (HMBC) del carboxilo (δ 176.5) con un metino en 2.55 ppm y dos metilos en 1.12 ppm indican que es un ácido 2-metilpropanoico; también se observa una correlación con el H-4 de la quinovosa externa en 4.56 ppm como indicación del sitio de esterificación. Se observaron las conectividades del carboxilo en 175.9 ppm con el metilo de desplazamiento químico 1.15 ppm, así como con el metino en 2.44 ppm del ácido 2-metilbutanoico. También se detectaron las correlaciones del carboxilo en 175.5 ppm con el metilo en 1.09 ppm y el metino en 2.47 ppm del ácido 3-hidroxi-2-metil butanoico.

El experimento ROESY permitió corroborar algunas asignaciones en los sistemas cíclicos de los monosacáridos así como de los sitios de unión entre los azúcares y los ácidos carboxílicos. Los sitios de unión son: H-1 de quinovosa terminal con H-4 de ramnosa, H-1 de ramnosa con H-2 de glucosa, H-1 de glucosa con H-2 de quinovosa interna y H-1 de quinovosa interna con H del grupo -H-COH- del ácido graso.

La estructura intacta del glucósido III (figura 3.13) es la del éster intramolecular del ácido 11-hidroxipalmitico-11-O-4-O-[ác.2-metilpropanoico- β -D-quinovopiranosil]-(1-4)-O-2-O-[ác.2-metilbutanoico- α -L-ramnopiranosil]-(1-2)-O-6-O-[ác.2-metil-3-hidroxi butanoico - β -D-glucopiranosil]-O-(1-2)- β -D-quinovopiranosil.

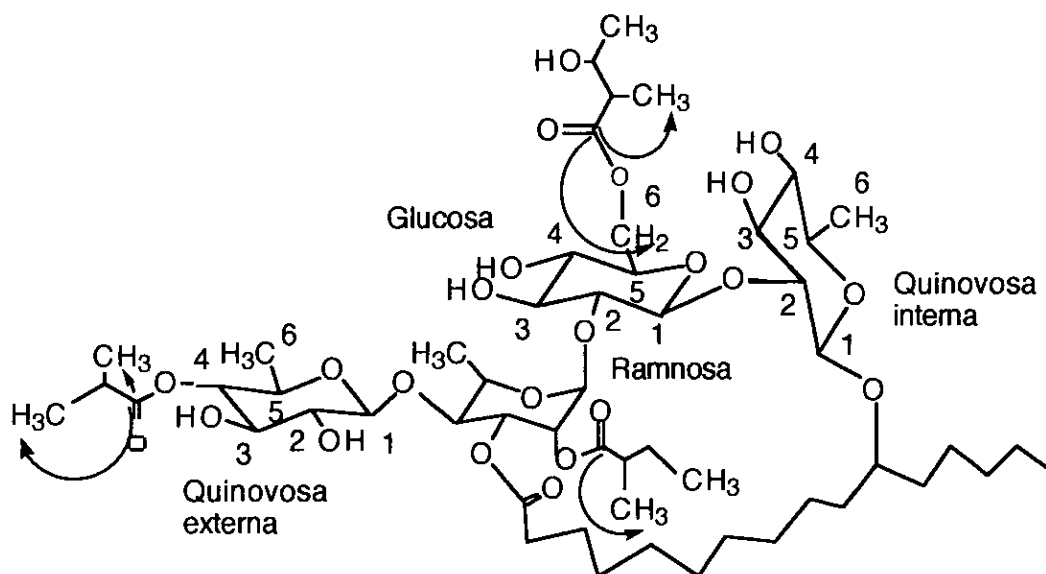


Figura 3. 13. Estructura del glucósido III mostrando las correlaciones a largo alcance (HMBC) de los carboxilos de los ácidos de cadena corta.

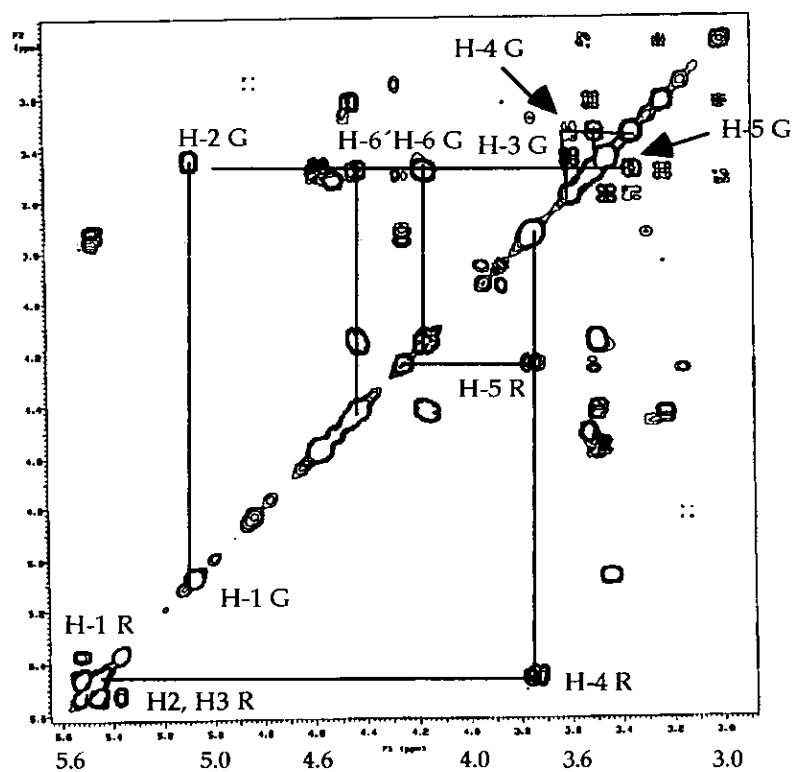


Figura 3. 14. Expansión del espectro COSY del glucósido III mostrando las correlaciones homonucleares de los monosacáridos glucosa (G) y ramnosa (R).

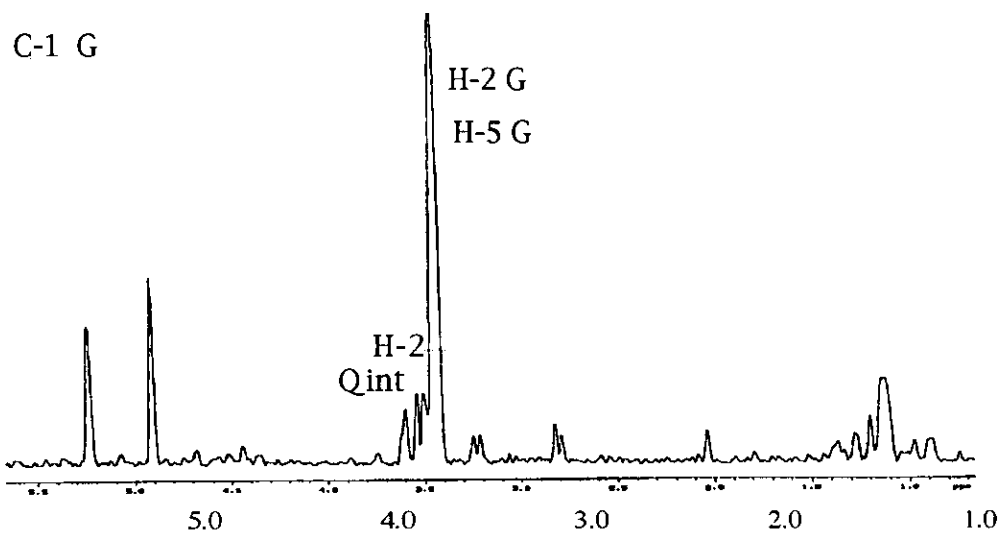
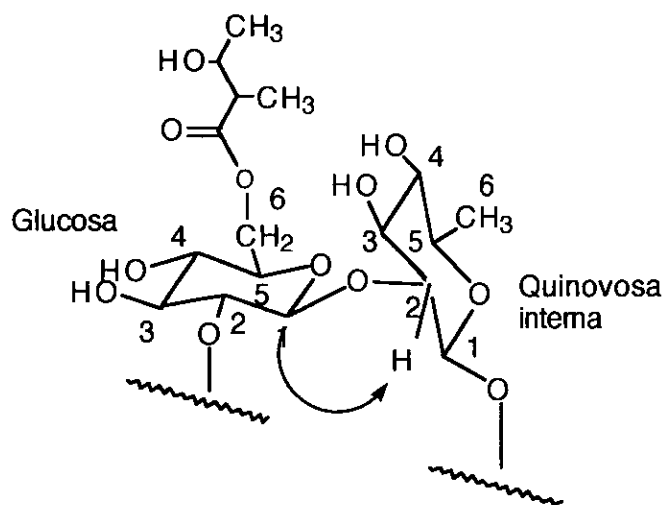


Figura 3. 15. Edición de las conectividades a largo alcance (HMBC) del átomo de carbono anomérico (100.15 ppm) de la glucosa (G) en el glucósido III, con H-2 de quinovosa interna (Qint), a partir del cual se deduce la unión glucosa. 1 - 2 quinovosa interna.

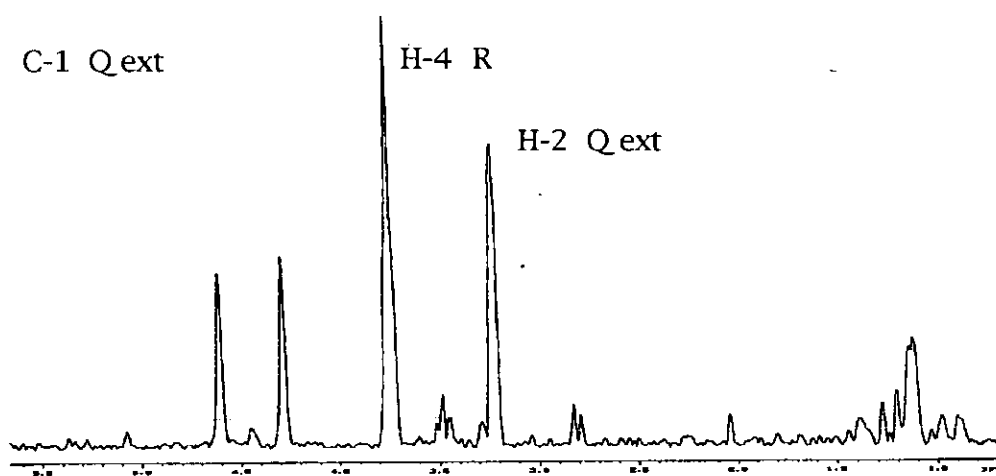
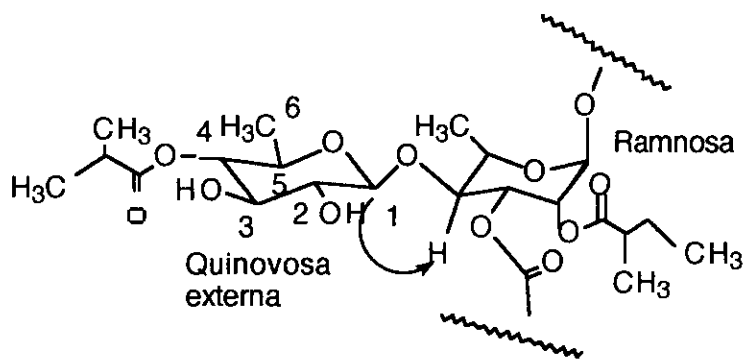


Figura 3. 16. Edición de las conectividades a largo alcance (HMBC) en el glucósido III . El átomo de carbono anomérico (104.3 ppm) de quinovosa externa (Qext) presenta correlación con H-4 de ramnosa (R), para deducir el enlace quinovosa externa 1- 4 ramnosa.

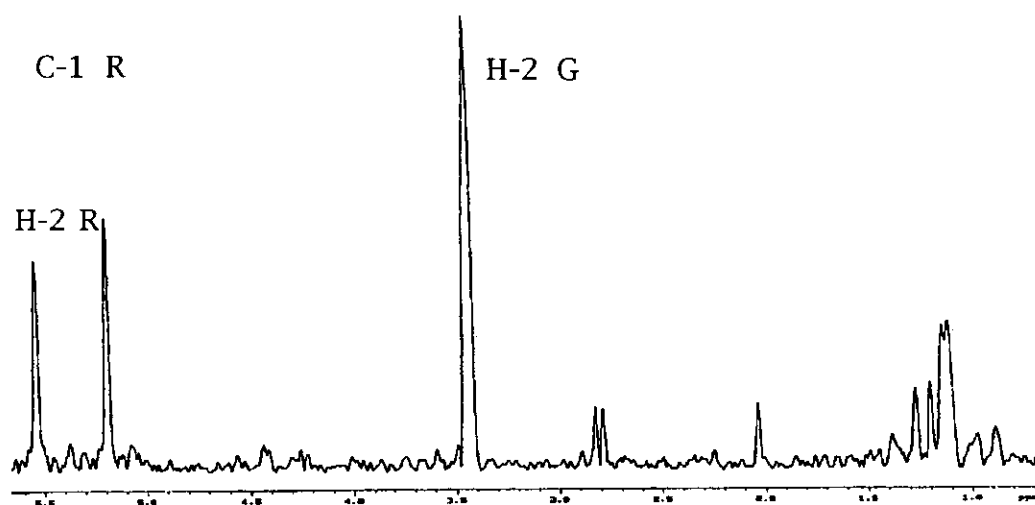
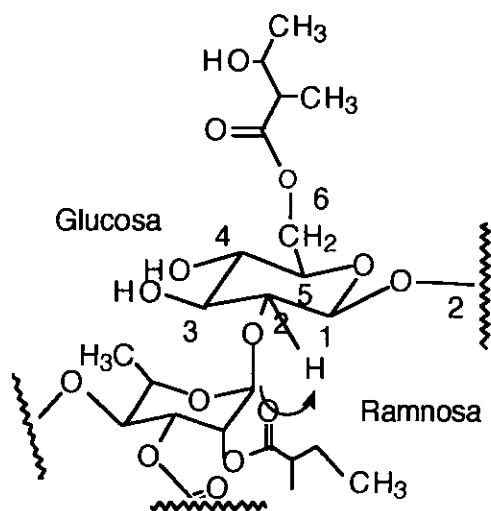
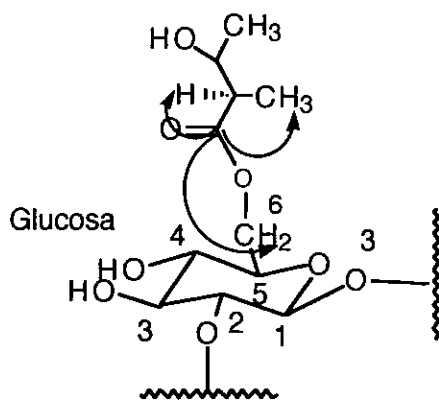


Figura 3. 17. Edición de las conectividades a largo alcance (HMBC) en el glucósido III. El átomo de carbono anomérico (96.86 ppm) de ramnosa R presenta una correlación intersacárida con H-2 de glucosa (G), que permitió asignar el enlace ramnosa 1 - 2 glucosa.



C de carbonilo

ác. 2-metil-3-hidroxi butanoico

(C5)

CH3

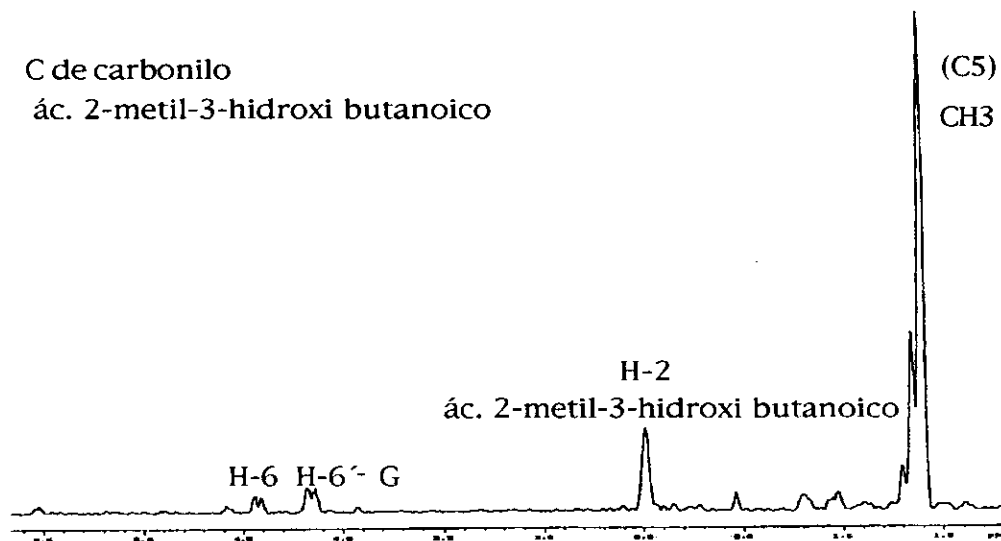


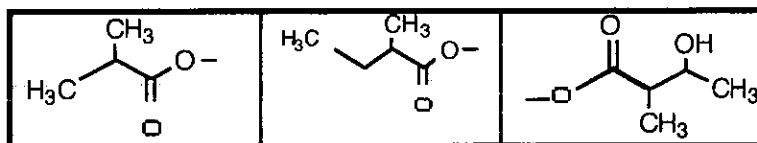
Figura 3. 18. Edición de las conectividades a largo alcance (HMBC) en el glucósido III. El átomo de carbono de carboxilo (175.0 ppm) del ácido 2-metil-3-hidroxi butanoico, presenta una correlación con H-6 de glucosa (G), que permitió asignar el sitio de unión de este ácido de cadena corta con C-6 de glucosa.

TABLA 3.4

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DEL GLUCOSIDO I I I

Quinovosa interna	Glucosa	Ramposa	Quinovosa externa
----------------------	---------	---------	----------------------

Hidrógeno	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	4.51	100.4	5.07	100.3	5.37	96.9	4.44	104.4
2	3.53	79.3	3.44	79.1	5.53	69.9	3.20	775.3
3	3.52	78.1	3.58	77.3	5.46	71.8	3.49	75.0
4	2.99	77.0	3.34	72.1	3.74	78.3	4.56	76.2
5	3.22	72.2	3.47	74.5	4.24	68.6	3.46	70.6
6	1.20	18.1	4.16	64.5	1.27	18.3	1.11	17.9
6'			4.44					



Hidrógeno	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1		176.5		175.9		175.5
2	2.55	34.6	2.44	41.6	2.47	48.5
3	1.12	19.2	1.53	27.6	3.92	69.5
3'			1.70			
4	1.12	19.2	0.97	11.8	1.14	20.7
5			1.15	17.2	1.09	13.4

Glucósido IV

El espectro COSY del glucósido IV permitió realizar las asignaciones de correlación homonuclear $^1\text{H} - ^1\text{H}$ para los monosacáridos y los ácidos carboxílicos de cadena corta. En el espectro TOCSY del glucósido IV se agruparon, la señal en 3.96 ppm corresponde al metino unido al mismo átomo de carbono que el -OH, la señal en 2.49 ppm es del metino adyacente a carbonilo y en 1.10 y 1.15 ppm los metilos del ácido 2-metil-3-hidroxi butanoico. Otro sistema de espines en el espectro TOCSY tiene señales en 2.56 ppm de un metino adyacente a carboxilo y dos metilos en 1.13 y 1.15 ppm del ácido 2-metil propanoico. El sistema de espines en el espectro TOCSY del segundo ácido 2-metil propanoico tiene señales en 2.61 ppm de un metino adyacente a carbonilo y dos metilos en 1.19 ppm.

Las conectividades del carbono anomérico de la quinovosa externa con H-4 de ramnosa (sitio de unión intersacárida) y con H-2 de quinovosa externa se presentan en la figura 3.20. En la figura 3.21 se observan las correlaciones a largo alcance del átomo de carbono anomérico de la glucosa con H-2 de glucosa y con H-2 de quinovosa interna indicativo del sitio de unión entre ambos monosacáridos. Las correlaciones a largo alcance del carbono anomérico de ramnosa se presentan con H-2 de ramnosa (5.52 ppm) y con H-2 de glucosa como indicación del sitio de unión intersacárida (figura 3.22).

El experimento ROESY permitió corroborar los sitios de unión entre los azúcares y los ácidos carboxílicos. Los sitios de unión son: H-1 de Quinovosa terminal con H-4 de ramnosa, H-1 de ramnosa con H-2 de glucosa, H-1 de glucosa con H-2 de quinovosa interna y H-1 de quinovosa interna con H-11 del grupo -H-COH- del ácido graso.

A partir del espectro HMQC del glucósido III, se asignaron los desplazamientos químicos de ^{13}C de los monosacáridos y de los ácidos de cadena corta. En la tabla 3.5 se presentan los desplazamientos químicos del glucósido IV.

La estructura intacta del glucósido IV (figura 3.12) es el ester intramolecular del ácido 11-hidroxipalmitico-11-O-4-O-[ác.2-metilpropanoico- β -D-quinovopiranosil]-(1-4)-O-2-O-[ác.2-metilpropanoico- α -L-ramnopiranosil]-(1-2)-O-6-O-[ác.2-metil-3-hidroxi butanoico- β -D-glucopiranosil]-O-(1-2)- β -D-quinovopiranosil.

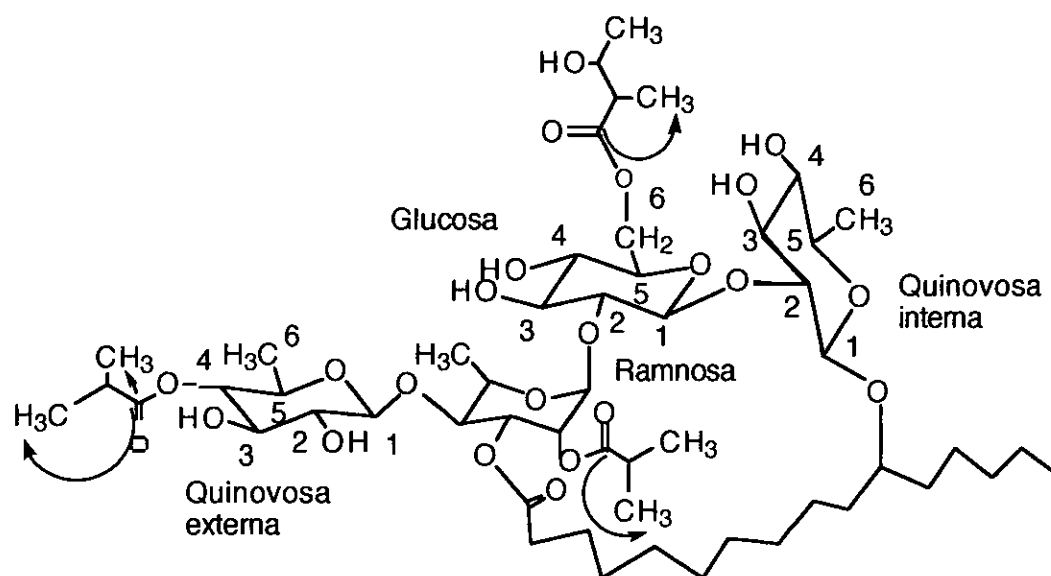
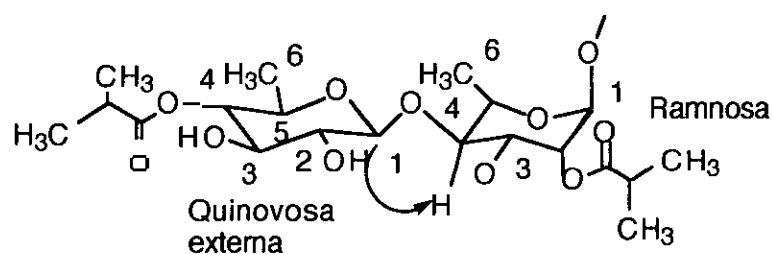


Figura 3. 19. Estructura del glucósido IV de la fracción cromatográfica A



C-1 Quinovosa ext.

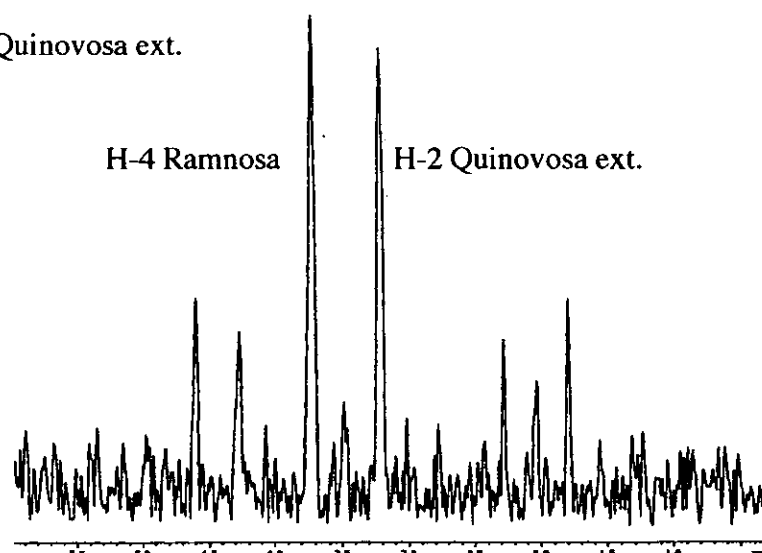
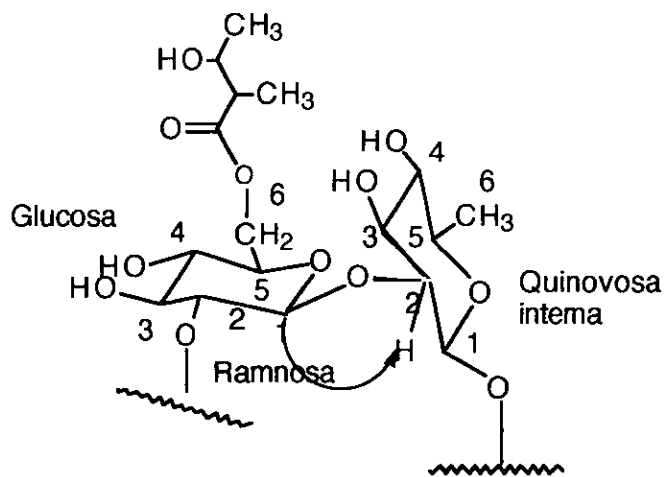


Figura 3. 20. Edición de las conectividades a largo alcance (HMBC) en el glucósido IV . El átomo de carbono anomérico (104.4 ppm) de quinovosa externa (Qext) presenta correlación con H-4 de ramnosa (R), y con esto se deduce el enlace quinovosa externa 1- 4 ramnosa.



C-1 Glucosa

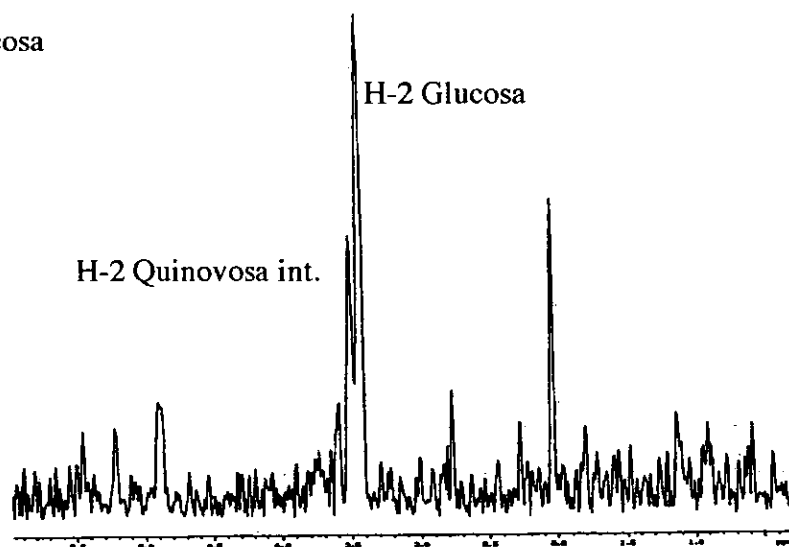


Figura 3.21. Edición HMBC de la sección transversal del carbono anomérico de la glucosa en el glucósido IV, mostrando correlaciones con H-2 de glucosa y con H- 2 de quinovosa interna.

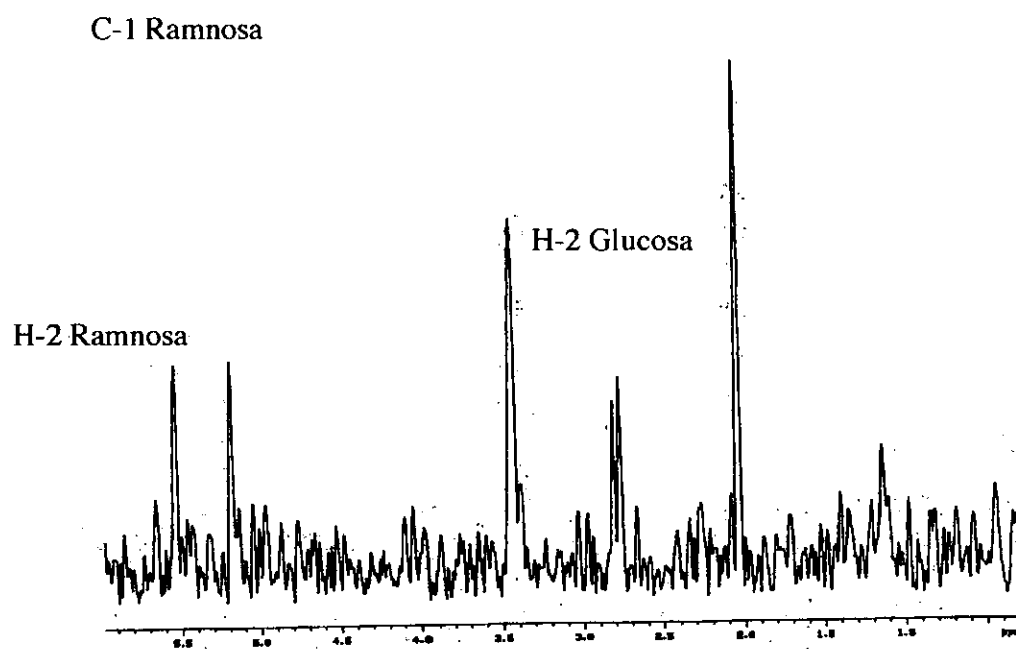
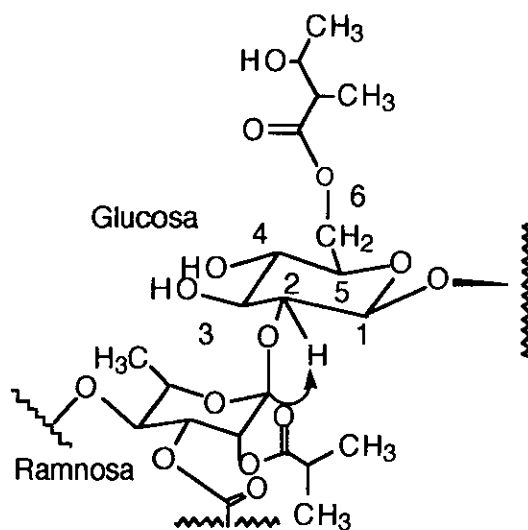


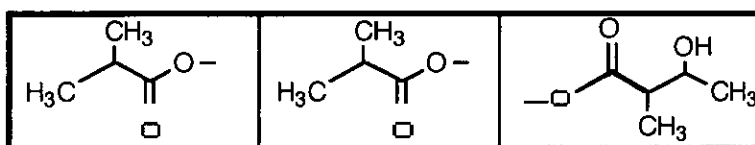
Figura 3. 22. Edición HMBC de la sección transversal de C-1 de ramnosa en el glucósido IV, mostrando correlaciones con H-2 de ramnosa y H-2 de glucosa.

TABLA 3. 5

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DEL GLUCOSIDO I V

Quinovosa interna	Glucosa	Ramnosa	Quinovosa externa
----------------------	---------	---------	----------------------

Hidrógeno	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	4.52	100.28	5.08	100.16	5.37	96.69	4.46	104.42
2	3.53	79.18	3.45	79.08	5.52	69.83	3.24	75.18
3	3.52	77.96	3.58	77.18	5.47	71.73	3.50	74.88
4	3.00	76.95	3.34	72.08	3.74	78.50	4.57	76.15
5	3.24	72.10	3.47	74.50	4.26	68.45	3.49	70.48
6	1.20	18.02	4.16	64.45	1.28	18.20	1.12	17.72
6'			4.44					



Hidrógeno	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1		176.53		176.31		175.46
2	2.56	34.56	2.61	34.73	2.49	48.40
3	1.13	19.03	1.19	19.52	3.96	69.63
4	1.15	19.03	1.19	19.52	1.15	20.52
5					1.10	13.25

Glucósido V

Los valores de T_1 permitieron obtener información sobre la movilidad interna en el glucósido V, los tiempos de relajación menores corresponden a los movimientos moleculares mas lentos, que corresponden a la quinovosa interna y a la ramnosa (valor promedio de $T_1=0.25$ seg) que son los monosacáridos unidos directamente al ácido 11-hidroxihexadecanoico y a la glucosa. Los tiempos de relajación mayores corresponden a la quinovosa terminal (valor promedio de $T_1=0.34$ seg), que tiene enlaces químicos en las posiciones 1 y 4 lo que le permite libertad de rotación en torno al eje C-1 / C-4. Asimismo en los 6 -desoxi azúcares la señal de los metilos presenta el mayor valor de T_1 respecto al resto de los átomos de ^{13}C del anillo.

En la tabla 3. 6 se presentan los tiempos de relajación longitudinal (T_1) de los átomos de ^{13}C del ácido 11-hidroxihexadecanoico del glucósido V, en la que se observa que los tiempos de relajación tampoco estan dominados por el mecanismo de interacciones dipolares, y que la movilidad molecular predomina en los mecanismos de relajación. En el glucósido cíclico los tiempos de relajación son menores que en el ácido glucosídico (Tabla 3. 1) lo cual es congruente con la mayor flexibilidad de la molécula lineal.

En la tabla 3.7 se presentan los desplazamientos químicos de ^1H y de ^{13}C para el glucósido V de la fracción cromatográfica A.

La estructura intacta del glucósido V (figura 3.23) es la del éster intramolecular del ácido 11-hidroxipalmitico-11-O-4-O-[ác.2-metilbutanoico- β -D-quinovopiranosil]-(1-4)-O-2-O-[ác.2-metilbutanoico- α -L-ramnopiranosil]-(1-2)-O-6-O-[ác.2-metil-3-hidroxi-butanoico - β -D-glucopiranosil]-O-(1-2)- β -D-quinovopiranosil.

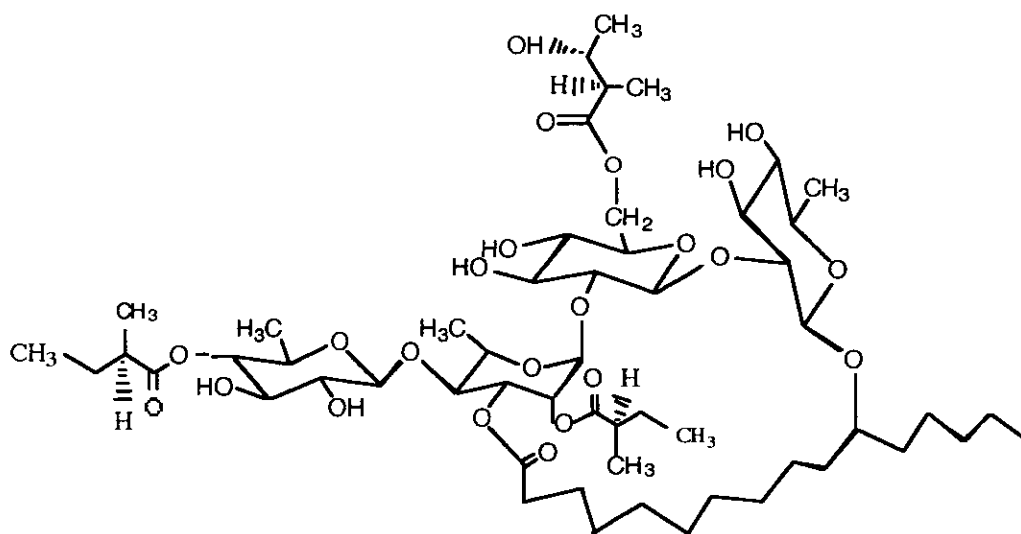


Figura 3. 23. Estructura del glucósido V de la fracción cromatográfica A de *Ipomoea stans*

T A B L A 3. 6

Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C , y tiempos de relajación longitudinal T_1 para los átomos de ^{13}C del ácido 11-hidroxi hexadecanoico en el glucósido V.

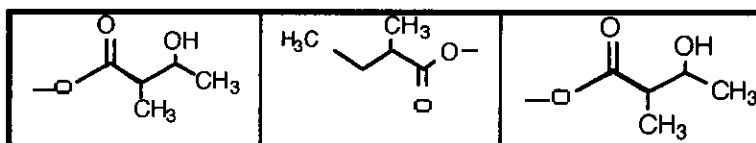
Carbono	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	T_1 (seg)
1	173.811		
2	34.36	2.24, 2.38	0.25
3	25.89	1.29, 1.48	0.30
4	29.91	1.26, 1.34	0.38
5	29.07	1.32	0.36
6	28.77	1.25, 1.40	0.32
7	28.50	1.33	0.30
8	27.98	1.28	0.32
9	23.82	1.52, 1.70	0.21
10	34.27	1.44, 1.62	0.27
11	79.51	3.59	0.44
12	35.22	1.50	0.34
13	25.39	1.39	0.57
14	32.64	1.26	1.03
15	23.34	1.30	2.10
16	14.11	0.87	3.65

T A B L A 3. 7

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DEL GLUCOSIDO V

Quinovosa interna	Glucosa	Ramnosa	Quinovosa externa
----------------------	---------	---------	----------------------

Hidrógeno	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	4.51	100.40	5.07	100.28	5.37	96.82	4.44	104.42
2	3.52	79.24	3.44	79.15	5.53	69.82	3.22	75.30
3	3.53	78.05	3.59	77.22	5.48	71.78	3.50	75.08
4	2.99	77.01	3.35	72.10	3.74	78.31	4.58	76.08
5	3.23	72.10	3.49	74.50	4.24	68.59	3.48	70.55
6	1.20	18.09	4.16	64.47	1.27	18.27	1.13	17.90
6'			4.43					



Hidrógeno	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1		176.01		175.63		175.29
2	2.36	41.98	2.44	41.60	2.49	48.43
2'	1.43		1.53			
3	1.68	27.21	1.69	27.60	3.93	69.50
4	0.89	11.80	0.97	11.80	1.14	20.58
5	1.11	16.97	1.15	17.08	1.10	13.28

3. 3. Glucósidos fracción cromatográfica B

En los antecedentes se mencionó que el ácido glucosídico de la fracción cromatográfica A es el mismo que el de la fracción cromatográfica B. En la fracción B sus componentes se diferencian en el tipo y posición de los ácidos carboxílicos de cadena corta en el oligosacárido. El glucósido V resultó ser el más abundante de todos los glucósidos de la fracción B.

La caracterización de los glucósidos se realizó utilizando una combinación de técnicas de RMN Bidimensional (COSY, TOCSY, HMQC, HMBC y ROESY), en sus versiones de ciclos de fases y gradientes de campo. Los espectros de RMN unidimensionales fueron obtenidos inicialmente en CDCl_3 pero la resolución no era satisfactoria, mejor resolución se obtuvo al utilizar $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

Las señales de ^1H y de ^{13}C fueron asignadas con ayuda de COSY, TOCSY y HMQC iniciando el estudio de los sistemas de espines con las señales anoméricas. Los experimentos COSY y TOCSY también permitieron identificar y asignar los ácidos de cadena corta unidos a los monosacáridos.

Los experimentos HMBC y ROESY permitieron establecer los sitios de unión de los monosacáridos en el oligosacárido a partir de correlaciones a tres enlaces $^1\text{H}-\text{C}-\text{O}-^{13}\text{C}$ y también determinar los sitios de enlace de los ácidos de cadena corta con los monosacáridos a través de correlaciones $^1\text{H}-\text{C}-\text{O}-^{13}\text{C}=\text{O}$.

La caracterización inicial de los cinco glucósidos mostró en el espectro de RMN de ^1H : cuatro señales en la región anomérica, varias señales de metilos pertenecientes a ácidos de cadena corta y a metilpentosas. El espectro de RMN de ^{13}C corroboró las asignaciones del espectro de ^1H y la presencia de señales de carboxilos de los ácidos de cadena corta y del ácido 11-hidroxihexadecanoico.

Glucósido IVA

En el espectro RMN de ^{13}C del glucósido IV A se observa que la muestra está impura (por el glucósido IVB en porcentaje del 10 %). El espectro RMN de ^{13}C presenta cuatro señales de carboxilos correspondientes a tres ácidos de cadena corta y al ácido 11-hidroxipalmitico.

Las señales de ^1H y de ^{13}C en los azúcares fueron asignados con los experimentos COSY, TOCSY y HMQC. Los espectros COSY y TOCSY permitieron asignar los desplazamientos químicos de cada azúcar. A partir de los desplazamientos químicos de ^1H y utilizando el espectro HMQC se asignaron los desplazamientos químicos de ^{13}C . En el espectro TOCSY se pueden observar los agrupamientos de un ácido con un grupo hidroxilo en su estructura por la señal en 3.89 ppm, así como las señales en 2.48 de un metino adyacente a carboxilo y dos metilos en 1.19 y 1.12 ppm indicativos de la presencia del ácido 2-metil-3-hidroxibutanoico. En la Tabla 3. 8 se presentan los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C para el glucósido IVA.

La edición del espectro HMBC del ácido 2-metil-3-hidroxi-butanoico muestra del carboxilo con H-4 (4.61 ppm) de la quinovosa externa, indicativo del sitio de unión. Otro ácido 2-metil-3-hidroxi-butanoico está presente en el glucósido IVA y se encuentra unido en la posición 6 de la glucosa como lo muestran las señales del carboxilo (δ 175.65) presenta correlación indirecta con el metileno de la glucosa (4.19, 4.46 ppm). La presencia del ácido 2-metil propanoico se determinó con las correlaciones a largo alcance del carboxilo en 176.14 ppm con el metino en 2.62 ppm, con los dos metilos en 1.18 y 1.22 ppm, y con H-2 de la ramnosa (5.55 ppm) que corresponde al sitio de unión con el azúcar.

En el espectro HMBC se observan las correlaciones entre C-1 (100.6 ppm) de la quinovosa interna y H-11 (3.63 ppm) del ácido 11-hidroxi-palmitico. La correlación inversa entre C-11 del aglicona y H-1 de la quinovosa confirma la asignación del sitio de esterificación.

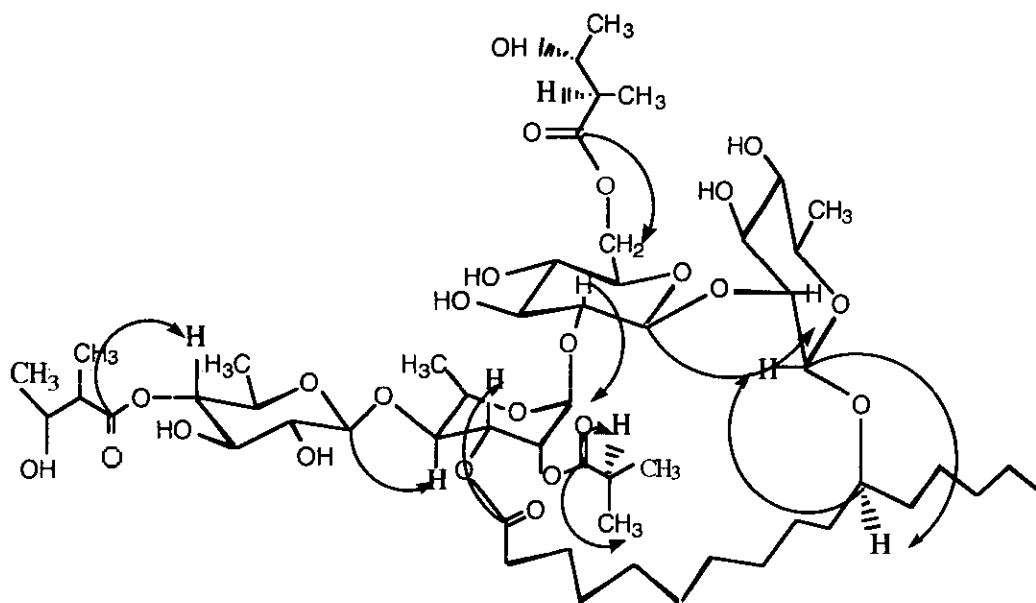
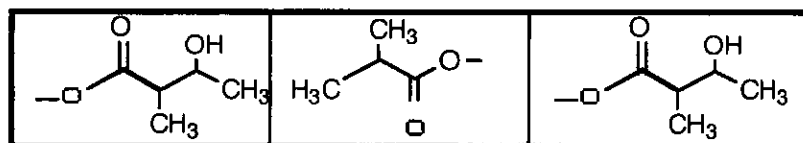


Figura 3. 24. Estructura del glucósido IV A mostrando algunas de las correlaciones de largo alcance.

TABLA 3. 8
DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DEL GLUCOSIDO IV A

Quinovosa interna	Glucosa	Ramnosa	Quinovosa externa
----------------------	---------	---------	----------------------

	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	4.53	100.60	5.10	100.48	5.40	96.93	4.46	104.59
2	3.56	79.49	3.47	79.29	5.55	69.99	3.26	75.20
3	3.57	78.28	3.62	77.40	5.48	71.87	3.53	75.37
4	3.02	77.24	3.39	72.38	3.77	78.68	4.61	76.79
5	3.25	72.24	3.51	74.63	4.27	68.68	3.54	70.59
6	1.23	18.23	4.19	64.58	1.30	18.46	1.18	17.92
6			4.46					



	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1		175.14		176.17		175.65
2	2.48	48.28	2.47	34.60	2.52	48.67
3	3.89	70.30	1.55	19.28	3.96	69.68
4	1.19	20.97	1.00	19.72	1.16	20.73
5	1.12	13.38	1.18		1.12	13.38

Glucósido IV B

El glucósido IV B (figura 3.37) fué separado con una pureza del 80 % estando contaminado con el glucósido IV A. En el espectro de RMN de ^{13}C se observan las señales de cuatro carboxilos en 174.9, 175.6, 175.4 y 173.5 ppm.

En el espectro HMBC se observa la correlación de H-4 (4.57 ppm) de la quinovosa externa con el carboxilo en 175.30 ppm de un éster, asimismo la correlación de este carboxilo con el ^1H del metino (2.43 ppm) en posición alfa, así como con el metilo en 1.14 ppm, permitió identificar a este ácido como 2-metilbutanoico con ayuda de los espectros COSY y TOCSY. La señal en 175.8 ppm del ácido 2-metil-3-hidroxi-butanoico muestra conectividad con los protones del metileno de la glucosa (4.16 y 4.41 ppm), indican su sitio de unión en la posición 6 de la glucosa.

El tercer ácido presente en el glucósido IVB es el ácido 3-metil butanoico, el carboxilo del ácido 3-metilbutanoico con δ 172.2 presenta correlación con H-2 de ramnosa. Con esta información se identificó la estructura del glucósido IV B. En la Tabla 3. 9 se presentan los desplazamientos químicos de ^1H y de ^{13}C del glucósido IVB.

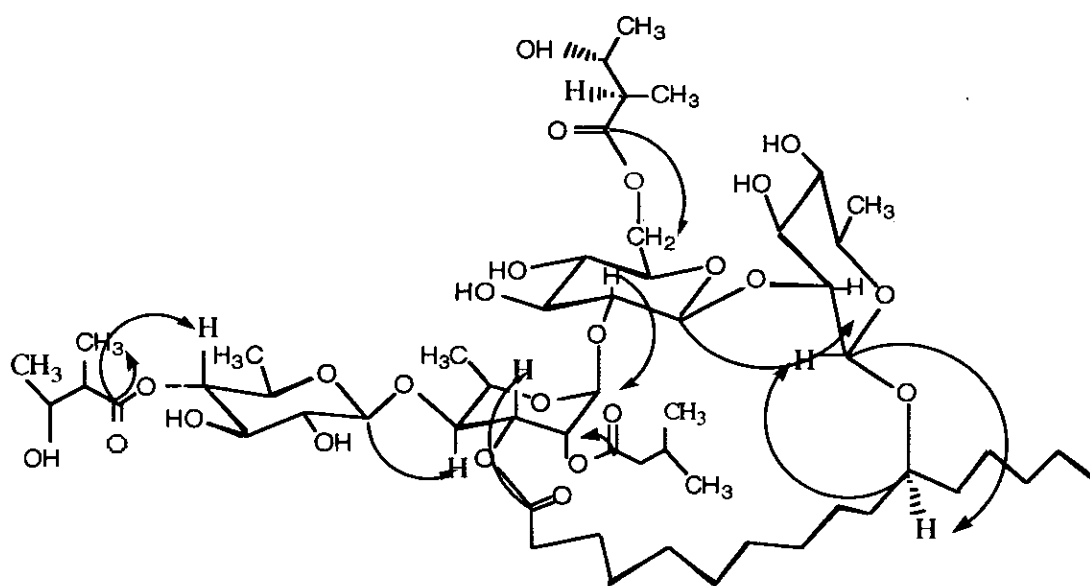


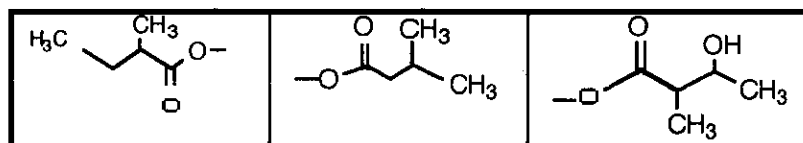
Figura 3. 25. Estructura del glucósido IV B mostrando correlaciones a largo alcance.

TABLA 3. 9

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DEL GLUCOSIDO IV B

Quinovosa interna	Glucosa	Ramnosa	Quinovosa externa
----------------------	---------	---------	----------------------

	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	4.42	100.69	5.07	100.27	5.36	96.38	4.43	104.41
2	3.52	79.26	3.43	79.16	5.50	69.78	3.22	74.97
3	3.52	78.13	3.58	77.13	5.44	71.42	3.50	75.23
4	2.98	77.04	3.35	72.16	3.72	78.46	4.57	76.59
5	3.20	72.12	3.47	74.46	4.20	68.58	3.48	70.46
6	1.19	18.12	4.16	64.43	1.28	18.42	1.12	17.79
6			4.41					



	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1		175.33		172.24		175.80
2	2.43	41.58	2.25	43.58	2.48	48.50
3	1.53	27.50	2.09	26.44	3.93	69.57
3'	1.66					
4	0.97	11.80	0.99	22.58	1.17	20.89
5	1.14	17.17	0.99	22.58	1.09	13.25

Glucósido V

Con los espectros COSY (figura 3.27) y TOCSY (figura 3.28) se lograron asignar la mayoría de los desplazamientos químicos de los monosacáridos, así como también identificar los dos ácidos 2-metil-3-hidroxi butanoico, unidos en la posición 6 de la glucosa y 4 de la quinovosa externa.

Los desplazamientos químicos de ^{13}C del glucósido V fueron determinados por el experimento de coherencia cuántica sencilla (HSQC) en su versión de gradiente de campo (figura 3.29).

El tercer ácido se encuentra unido al C-2 de ramosa por la correlación del carboxilo en 175.56 ppm con el ^1H en 5.54 ppm. También se observa una fuerte correlación con un metilo en 1.17 ppm. Con ayuda del espectro TOCSY se identificó este ácido como 2-metil butanoico. En la Tabla 3.10 se presentan los desplazamientos químicos de ^1H y de ^{13}C del glucósido V (figura 3.26).

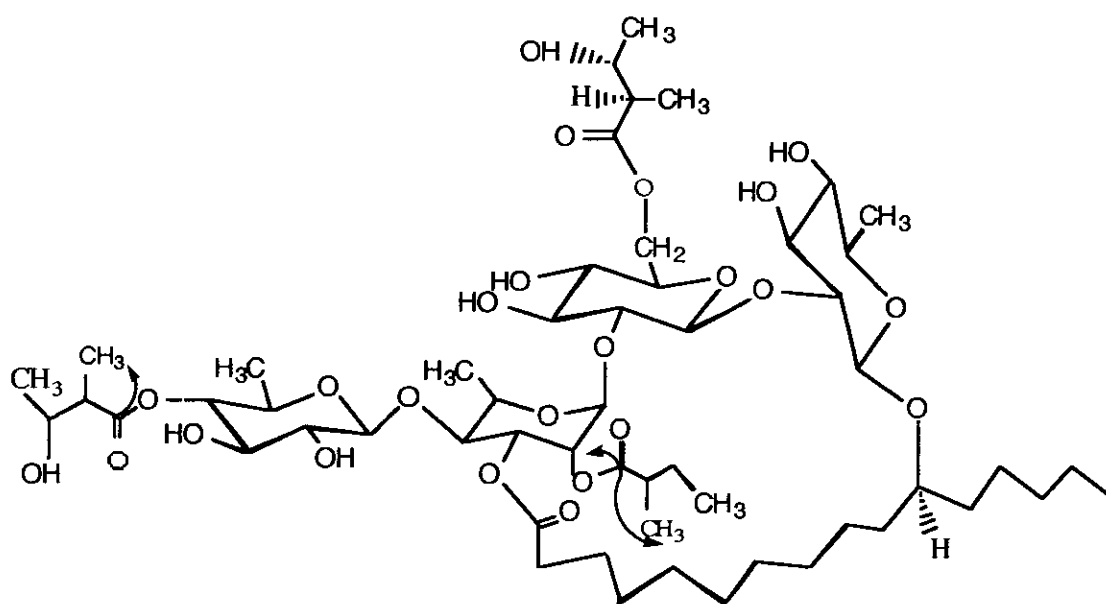


Figura 3. 26. Estructura del glucósido V de la fracción B mostrando algunas correlaciones a largo alcance

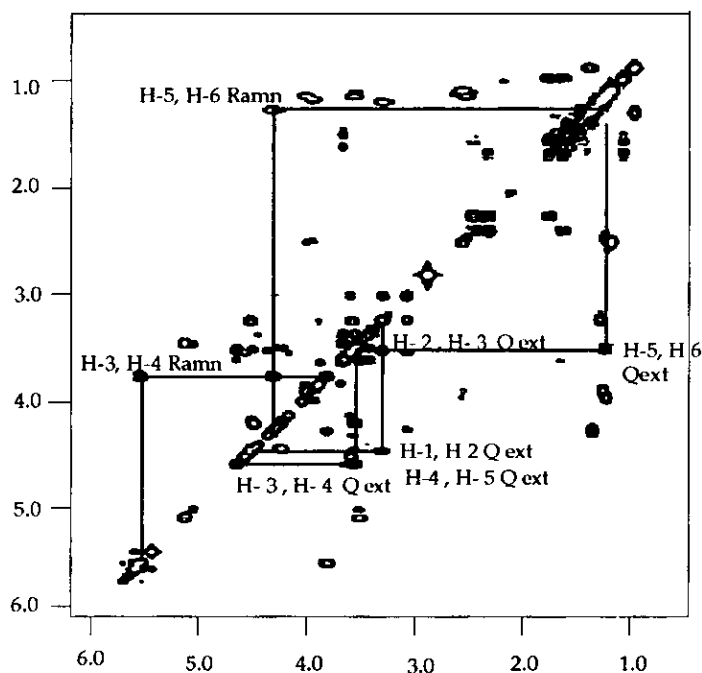


Figura 3. 27. Espectro COSY del glucósido V de la fracción B, obtenido en 12 minutos utilizando 15 mg de muestra. Se muestra el patrón de conectividades de la quinovosa externa y algunas conectividades de la ramnosa.

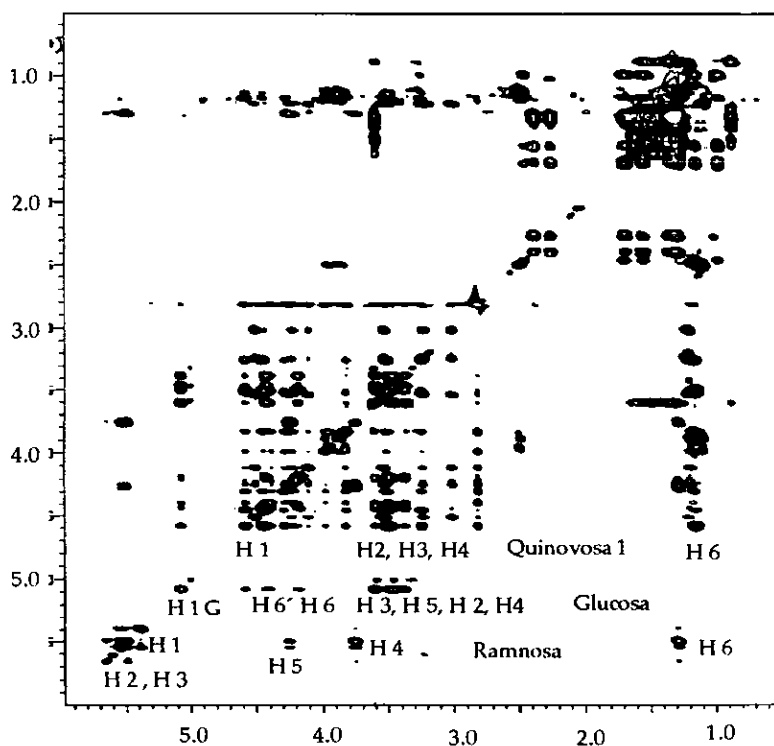


Figura 3. 28. Espectro TOCSY del glucósido V de la fracción B, mostrando las asignaciones de las señales de glucosa, quinovosa interna y ramnosa.

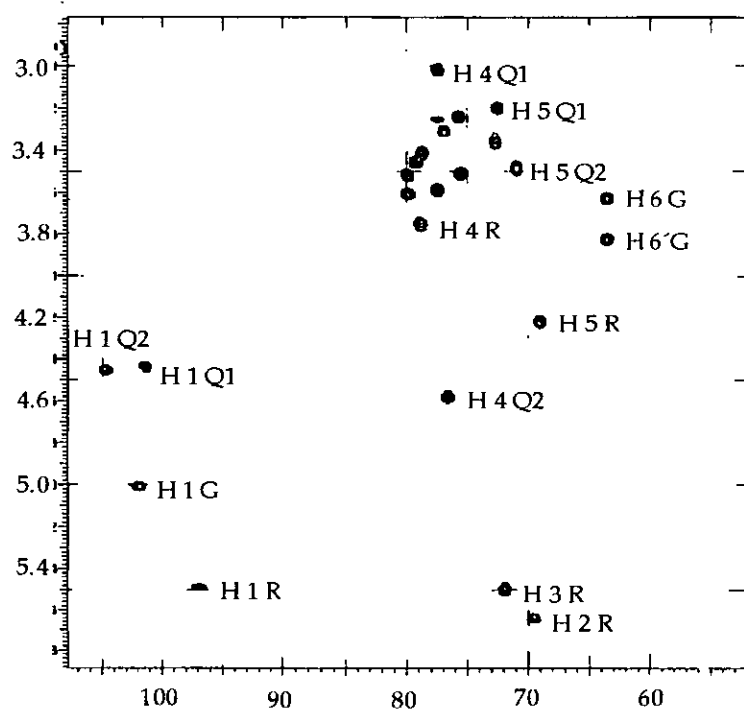


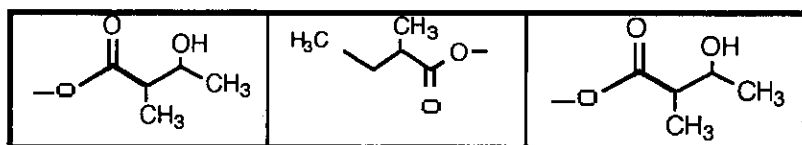
Figura 3. 29. Expansión de una región del espectro HSQC en versión gradiente de campo del glucósido V de la fracción B, mostrando algunas asignaciones de las correlaciones directas ^{13}C - ^1H .

TABLA 3. 11

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DEL GLUCOSIDO V

Quinovosa interna	Glucosa	Ramnosa	Quinovosa externa
----------------------	---------	---------	----------------------

	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	4.51	100.37	5.08	101.27	5.39	96.86	4.45	104.441
2	3.53	79.19	3.46	79.13	5.54	70.24	3.25	75.00
3	3.53	78.15	3.58	77.32	5.50	71.75	3.52	75.28
4	3.01	77.064	3.37	72.16	3.76	78.33	4.58	76.62
5	3.23	72.16	3.50	74.49	4.25	68.59	3.50	70.39
6	1.22	18.18	4.18	64.45	1.30	18.351	1.17	17.16
6'			4.43					



	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1		174.94		175.56		175.36
2	2.49	48.52	2.46	41.61	2.47	48.30
3	3.96	69.58	1.55	27.68	3.89	69.81
3			1.71			
4	1.16	20.68	1.00	11.90	1.19	20.92
5	1.09	13.26	1.17	17.86	1.11	13.40

Glucósido V I

Los glucósidos V y VI de la fracción cromatográfica B de *Ipomoea stans* fueron analizados con un probe para pulsos con gradiente de campo. Los experimentos que se utilizaron fueron: ^1H , COSY, TOCSY, HSQC, ROESY y HMBC en sus versiones de gradiente de campo. El espectro de ^{13}C fué obtenido con un probe de detección inversa. El glucósido VI (figura 3.30) tiene como característica mas importante que la glucosa no tiene aglicona. En la tabla 3.12 se presentan los desplazamientos químicos del glucósido VI de la fracción B.

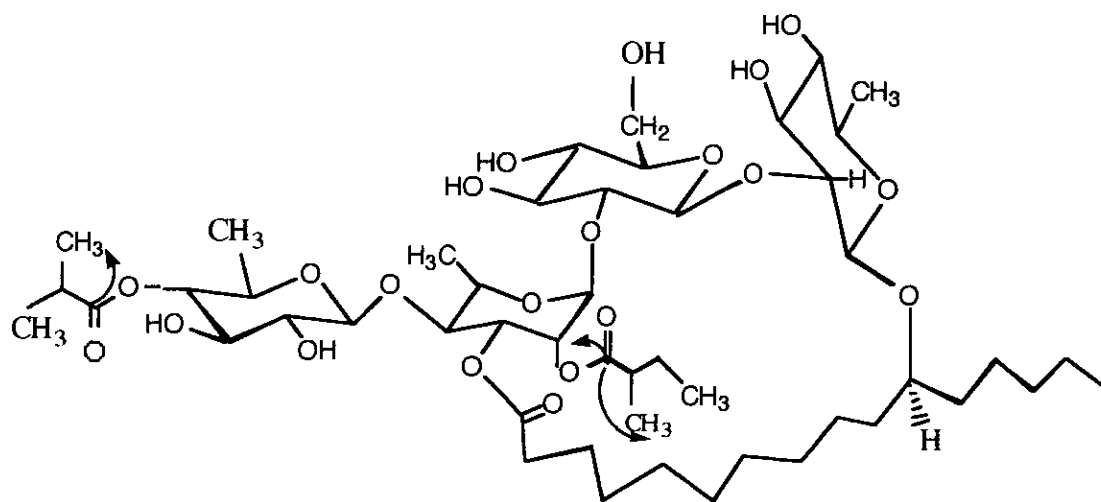


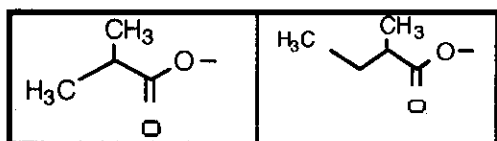
Figura 3. 30. Estructura del glucósido VI de la fracción B mostrando algunas correlaciones a largo alcance.

TABLA 3. 12

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DEL GLUCOSIDO V I

Quinovosa interna	Glucosa	Ramnosa	Quinovosa externa
----------------------	---------	---------	----------------------

	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	4.43	100.784	5.02	101.37	5.49	96.40	4.45	104.371
2	3.53	79.59	3.46	78.77	5.64	69.00	3.23	75.27
3	3.42	78.25	3.58	77.04	5.50	71.45	3.52	75.28
4	3.02	77.04	3.35	72.30	3.77	78.38	4.58	76.14
5	3.20	72.10	3.31	76.47	4.21	68.59	3.49	70.53
6	1.21	18.15	3.62	63.17	1.29	18.45	1.12	17.91
6			3.82					



	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1		176.24		175.33
2	2.56	34.65	2.46	41.63
3	1.14	19.32	1.57	27.71
3			1.71	
4	1.14	19.32	0.99	11.98
5			1.17	17.26

Glucósido VII

En los espectros de RMN ^{13}C (figuras 3.32 y 3.33) del glucósido VII de la fracción B (figura 3.31) se pueden observar las señales de los cuatro átomos de C anoméricos y las tres señales carboxilos, una de las cuales pertenece al ácido graso.

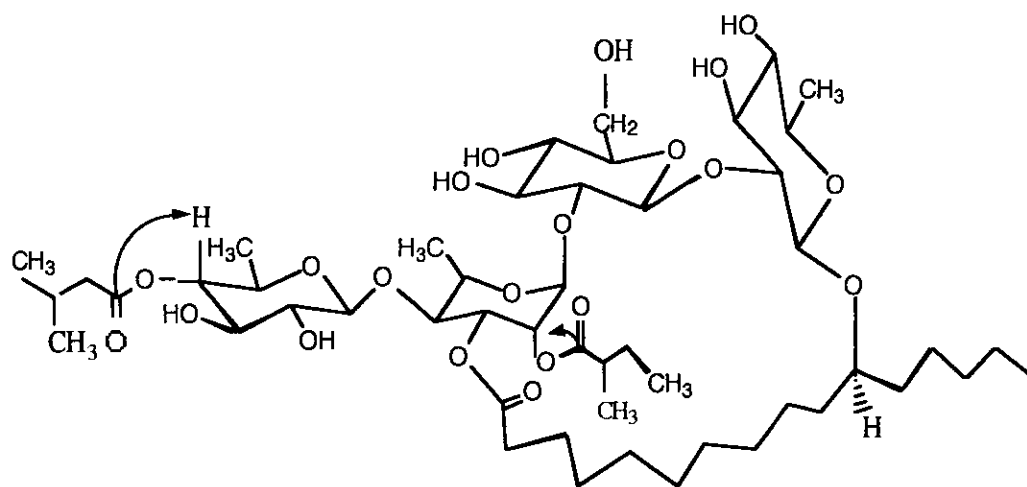


Figura 3. 31 - Estructura del glucósido VII mostrando correlaciones a largo alcance.

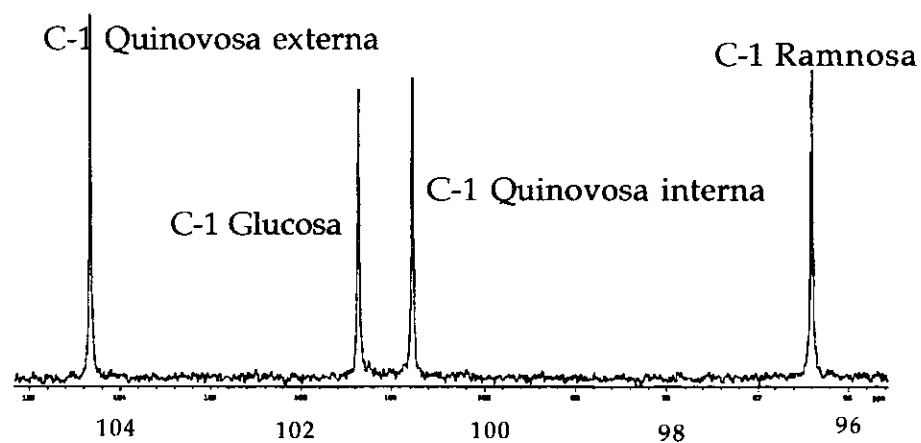


Figura 3. 32. Expansión de la región anomérica del espectro de ^{13}C del glucósido VII, mostrando la presencia de cuatro monosacáridos.

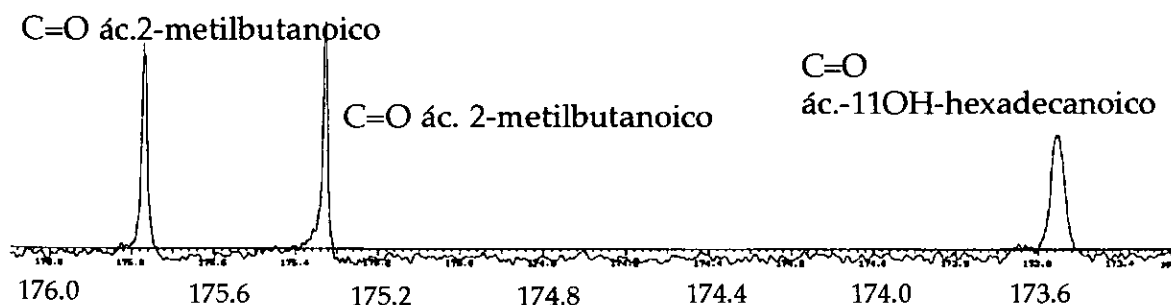


Figura 3.33. Expansión de la región de carboxilos del espectro RMN de ^{13}C del glucósido VII, indicando la presencia de tres ácidos.

En la expansión del espectro HMBC (figura 3.34) se observa que el carboxilo en 176.23 ppm presenta correlación con H-4 (4.60 ppm) de la quinovosa externa, en tanto que el carboxilo con desplazamiento químico de 175.83 ppm se encuentra unido al C-2 de la ramnosa (H-2 5.67 ppm). Con el espectro TOCSY se lograron agrupar los sistemas de espines de las dos agliconas para identificar a los dos ácidos 2-metil butanoicos.

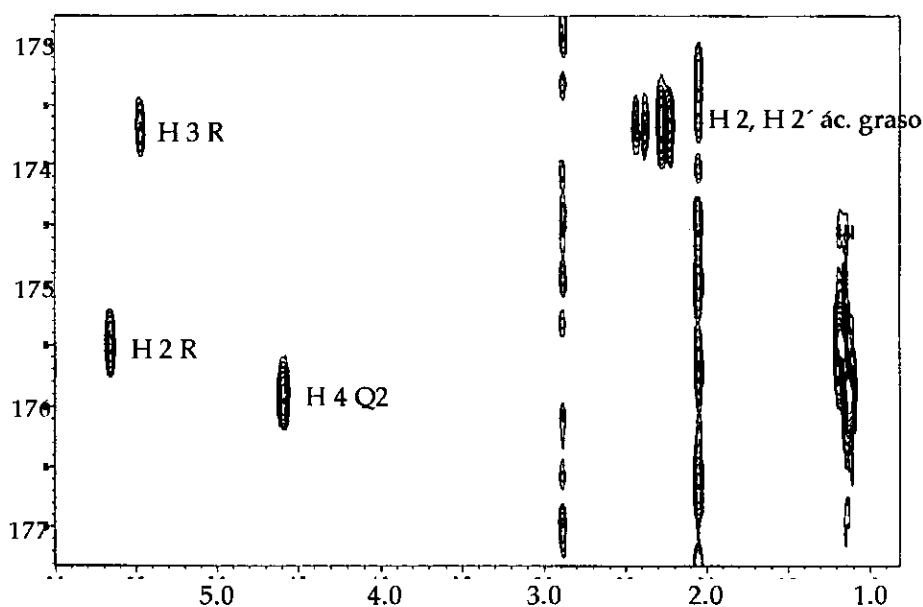


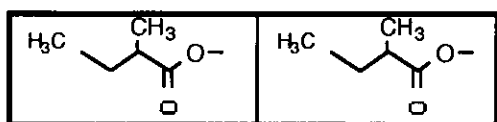
Figura 3. 34. Expansión de la región de carboxilos del espectro HMBC del glucósido VII mostrando las conectividades con los protones de la ramnosa (R) y de la quinovosa externa (Q2).

En la Tabla 3.13 se presentan los desplazamientos químicos del glucósido VII, en los que al comparar el desplazamiento químico de ^1H del metileno de la glucosa con los de los demás glucósidos, se observa que esta señal se encuentra a campo alto con respecto a los glucósidos que sí tienen esterificación en esa posición.

TABLA 3. 13

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DEL GLUCOSIDO V I I

	Quinovosa interna		Glucosa		Ramnosa		Quinovosa externa	
	$\delta ^1\text{H}$	$\delta ^{13}\text{C}$	$\delta ^1\text{H}$	$\delta ^{13}\text{C}$	$\delta ^1\text{H}$	$\delta ^{13}\text{C}$	$\delta ^1\text{H}$	$\delta ^{13}\text{C}$
1	4.44	100.94	5.02	101.60	5.50	96.63	4.46	104.61
2	3.52	79.73	3.46	79.98	5.67	69.17	3.25	75.47
3	3.42	78.42	3.60	77.18	5.49	71.62	3.52	75.31
4	3.02	77.24	3.36	7257	3.75	78.58	4.60	76.25
5	3.21	72.38	3.32	76.73	4.21	68.77	3.49	70.72
6	1.22	18.23	3.63	63.31	1.29	18.51	1.15	18.08
6			3.84					



	$\delta ^1\text{H}$	$\delta ^{13}\text{C}$	$\delta ^1\text{H}$	$\delta ^{13}\text{C}$
1		176.23		175.83
2	2.39	42.09	2.47	41.74
3	1.45	27.31	1.55	27.79
3	1.69		1.71	
4	0.91	11.98	1.00	12.05
5	1.13	17.17	1.18	17.33

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

Los desplazamientos químicos de ^1H y de ^{13}C del ácido 11-hidroxihexadecanoico en los nueve glucósidos de *Ipomoea stans* aislados e identificados, no sufrieron variación alguna. En la tabla 3.8 se presentan los desplazamientos químicos del ácido 11-hidroxihexadecanoico.

T A B L A 3. 14

**DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DEL
ACIDO 11-HIDROXIHEXADECANOICO**

	$\delta ^1\text{H}$	$\delta ^{13}\text{C}$
1	-----	174.08
2	2.24, 2.38	34.33
3	1.56, 1.68	23.78
4	1.33	28.49
5-7	1.32, 1.32,	29.95, 29.06,
	1.28	28.50
8	1.27	27.98
9	1.32, 1.46	25.89
10	1.47, 1.63	34.32
11	3.60	79.53
12	1.51	35.22
13	1.38	25.42
14	1.23, 1.29	32.60
15	1.31	23.31
16	0.88	14.33

3. 4. Actividad citotóxica y antimicrobiana de los glucósidos de *Ipomoea stans*.

Los glucósidos de las fracciones cromatográficas A y B se sometieron a ensayos citotóxicos aplicándose a los siguientes cultivos de células cancerígenas: carcinoma nasofaríngeo (KB), carcinoma de colon (HCT-15) y carcinoma cervico escamoso (SQC-1 UIISO). Utilizando los lineamientos del NCI en que valores de $ED_{50} < 4 \mu\text{g/ mL}$ son considerados activos, se encontraron los siguientes resultados de ED_{50} : 1.5 , 1.5 y 3.2 $\mu\text{g/ mL}$ para los cultivos KB, HCT-15 y SQC-1 UIISO respectivamente, lo cual demuestra un gran actividad citotóxica de estos glucósidos. Los resultados obtenidos indican que la fracción A es mas activa contra las células humanas, en tanto que la fracción B es activa contra las células KB. ²

Los estudios farmacológicos realizados con extractos o infusiones de *Ipomoea stans* para determinar su actividad biológica y poder compararla con la información etnobotánica, son pocos. Considerese los siguientes resultados: el extracto acuoso de la raíz probado en ratones con carcinoma 755, leucemia 1210 y sarcoma 180 y en células aisladas de carcinoma 9 KB indicaron ausencia de actividad citotóxica, en este estudio no se menciona si los glucósidos macrocíclicos estaban presentes en la infusión.

En otro estudio de actividad citotóxica con extractos metanólico y clorofórmico de la raíz de *Ipomoea stans* se reportaron valores de ED_{50} : 12.0 y 4.2 respectivamente al aplicarse a cultivos de células cancerígenas KB. Cabe mencionar que en el estudio con células KB la única actividad encontrada fue con el extracto metanólico de *Ipomoea purga* $ED_{50} = 3.7$. El extracto cloroformico de *Ipomoea purga* y el extracto cloroformico de *Ipomoea stans* mostraron actividad $ED_{50} = 2.4$ y 3.7 contra los cultivos de células MCF - 7. En el caso de *Ipomoea tricolor* se reporta la actividad citotóxica contra células P-338 y células de cáncer mamario humano ($ED_{50} = 2.2 \mu\text{g/ mL}$). ⁴⁷

En otra línea de investigación se determinó la concentración mínima de supresión de crecimiento de microorganismo (MIC) de los glucósidos de la fracción cromatográfica A de *Ipomoea stans* en *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, obteniendose los resultados de MIC = 25 y 12.5 $\mu\text{g/ mL}$, contra 8 y 16 $\mu\text{g/ mL}$ al utilizar nystatin; la actividad antimicosis determinada no representó un efecto de consideración. ²

En un estudio efectuado con ratones para determinar la actividad de glucósidos de *Ipomoea stans* sobre las convulsiones inducidas en los animales con pentilentetrazol y con choques eléctricos, los resultados indican que la fracción cromatográfica B tienen mayores propiedades anticonvulsivas que la fracción cromatográfica A y que el glucósido hidrolizado. ⁸¹

Se probó la actividad citotóxica de los glucósidos IV, V, VI y VII puros en diversos cultivos y se obtuvieron los siguientes resultados: ³

TABLA 3. 15

RESULTADOS DE CITOTOXICIDAD ($\mu\text{g} / \text{mL}$)

Glucósido	HCT-15	OVCAR-5	UIISO
IVA	26.3	34.7	24
V	100	25.1	26.3
VI	26.3	5.5	25.1
VII	24	1.5	4.01

Los cuatro glucósidos no presentan una actividad significativa contra las células HCT-15. La actividad del glucósido VII contra las células de ovario es muy poderosa y el glucósido VI también presenta actividad contra este tipo de células. El glucósido VII presenta la mayor actividad contra las células UIISO.

Los glucósidos VI y VII de la fracción cromatográfica B sin la aglicona en la glucosa, representan la diferencia más importante respecto al resto de los glucósidos y podemos considerar que esta diferencia estructural es la responsable de su gran actividad citotóxica.

3. 5. Resultados

Se lograron identificar las estructuras de los nueve glucósidos intactos más abundantes en el extracto de acetato de etilo de la raíz de *Ipomoea stans* utilizando una metodología de RMN Bidimensional Moderna (COSY, TOCSY, HMQC, HMBC, ROESY). Las diferencias en las estructuras moleculares de los glucósidos de *Ipomoea stans* radican en los ácidos de cadena corta y en la posición en la que se encuentran. El uso combinado de técnicas unidimensionales y bidimensionales de RMN moderna, permitió asignar los desplazamientos químicos de los espines en los espectros de RMN ^1H y de ^{13}C para los cuatro glucósidos de la fracción A.

La determinación de los valores de T_1 fue muy útil para asignar los desplazamientos químicos de los protones del ácido 11-hidroxihexadecanoico. También permitió conocer cuál es el monosacárido (quinovosa externa) de mayor movilidad en los glucósidos de *Ipomoea stans*.

De entre las muchas resinas glucosídicas estudiadas hasta ahora las escamoninas extraídas de *Convolvulus scammonia*²⁶ tienen el mismo esqueleto estructural que el de los glucósidos de *Ipomoea*

stans , siendo la principal diferencia entre ambos grupos de glucósidos los ácidos carboxílicos esterificados a los azúcares.

El glucósido VII es el que presenta la actividad citotóxica mayor y específica de los cinco glucósidos de la fracción cromatográfica B. La mayor actividad anticonvulsiva de la fracción cromatográfica B es posible que sea debida a los glucósidos VI y VII, que son las moléculas que se diferencian del resto de los glucósidos por tener menos ácidos de cadena corta esterificados al macrociclo, faltando su corroboración experimental.

El empleo de un probe con gradiente de campo redujó a una cuarta parte de tiempo la obtención de los espectros de RMN, con respecto a los mismos experimentos en versión de ciclos de fases para la misma cantidad de muestra y para obtener la misma relación señal / ruido.

CAPITULO 4

GLUCOSIDOS DE MICHROSECHIUM HELLERI

4. 1. - Estructura del triterpeno en los glucósidos F y G

Caracterización inicial de los glucósidos F y G

La caracterización inicial del glucósido F de *Michrosechium helleri* (figura 4.1) mostró en el espectro de RMN de ^1H (figura 4. 2) señales de seis metilos con δ 0.78, 0.89, 0.92, 0.94, 1.16 y 1.28 , un protón olefínico en d 5.30 y siete protones anoméricos. En el espectro de RMN de ^{13}C destacan las señales de un carboxilo con δ 177.7, dos átomos de carbono olefínicos en 123.9 y 144.9 ppm y siete señales anoméricas (figura 4. 3).

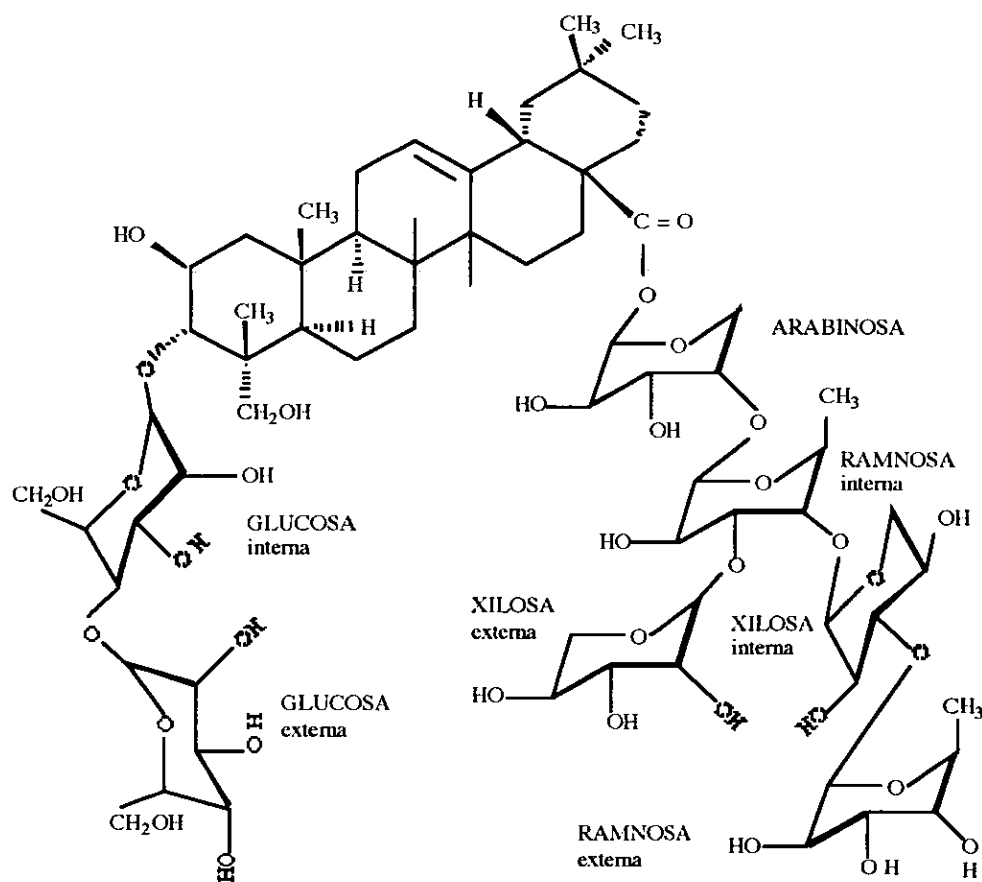


Figura 4.1. Estructura del glucósido F del extracto metanólico de *Michrosechium helleri*.

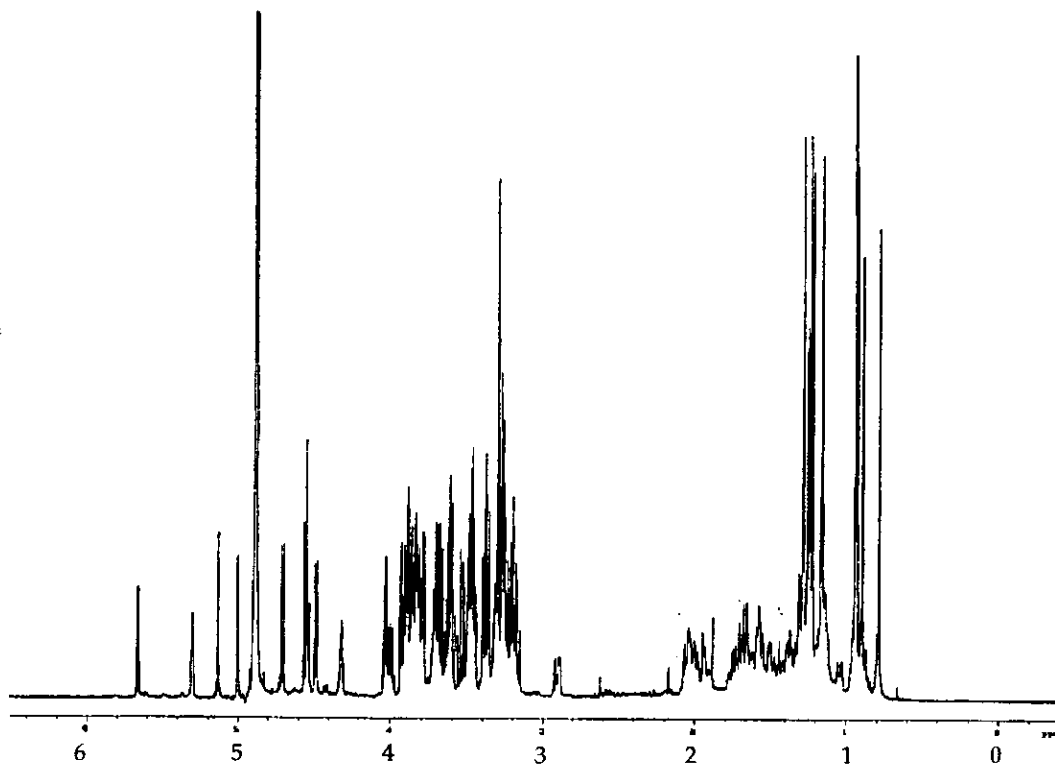


Figura 4. 2.- Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz del glucósido F de *Michrosechium helleri*.

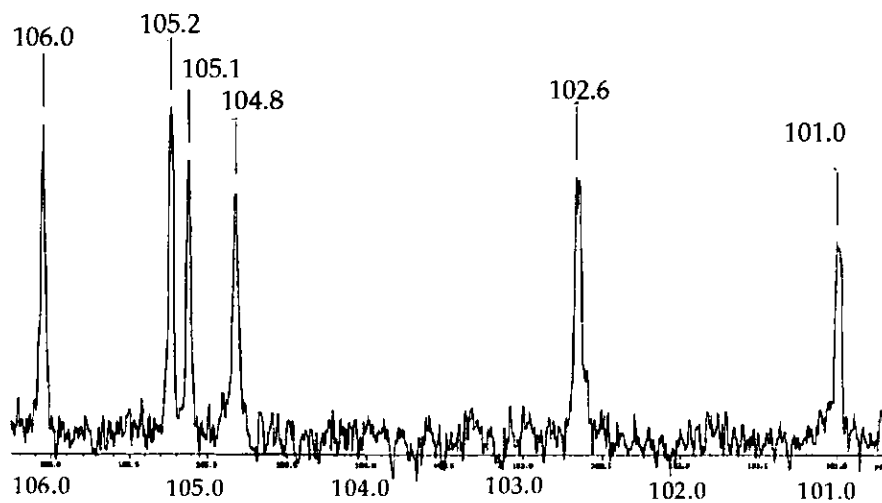


Figura 4. 3.- Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz mostrando seis de las siete señales anoméricas del glucosido F de *Michrosechium helleri*.

La comparación de desplazamientos químicos de ^{13}C en los glucósidos F y G mostraron que los valores eran idénticos (con diferencias de 0.02 ppm) indicando gran similitud estructural entre ambos. La diferencia entre el glucósido F y el G, es que el primero tiene siete monosacáridos y el segundo solo seis monosacáridos.

Las estructuras de los glucósidos F y G de *Michrosechium helleri* (amole) se estudiaron utilizando los experimentos de RMN bidimensional COSY, TOCSY, HSQC, HMBC y ROESY, iniciando la elucidación estructural con el glucósido F. ROESY se utilizó en lugar de NOESY debido a que los glucósidos en solución tienen tiempos de correlación tales que los valores NOE estaban cerca de cero. HSQC se utilizó en lugar de HMQC porque el primero proporciona mejor resolución y sensibilidad en ^{13}C que el último.

Identificación del aglicón

La metodología de elucidación se basó en la descrita por Reynolds y colaboradores^{82, 83, 84} para el estudio de derivados triterpénicos, con el empleo de conectividades a dos y tres enlaces de distancia, a partir de las señales de los protones de los metilos. Las primeras señales asignadas fueron dos metilos en posición gemela (C-29 y C-30) y otro par de metilos también en posición gemela $\text{CH}_3 / \text{CH}_2\text{OH}$ (C-24 , C-23), que mostraron conectividad vía $^3\text{J}_{\text{CH}}$ de una señal de protón de metilo a un segundo átomo de carbono de metilo en el experimento HMBC. En las figura 4. 5 y 4. 6 se muestran las correlaciones de largo alcance para otros protones de metilos. En la tabla 4.1 se presentan los desplazamientos químicos del aglicón

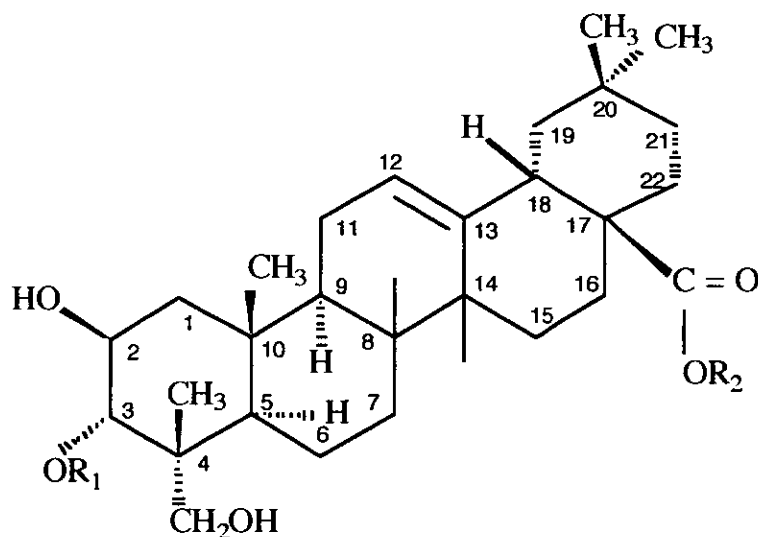


Fig. 4. 4. Estructura del triterpeno de los glucósidos F y G indicando la numeración en los átomos de carbono, R₁ y R₂ se refieren a las cadenas de oligosacáridos.

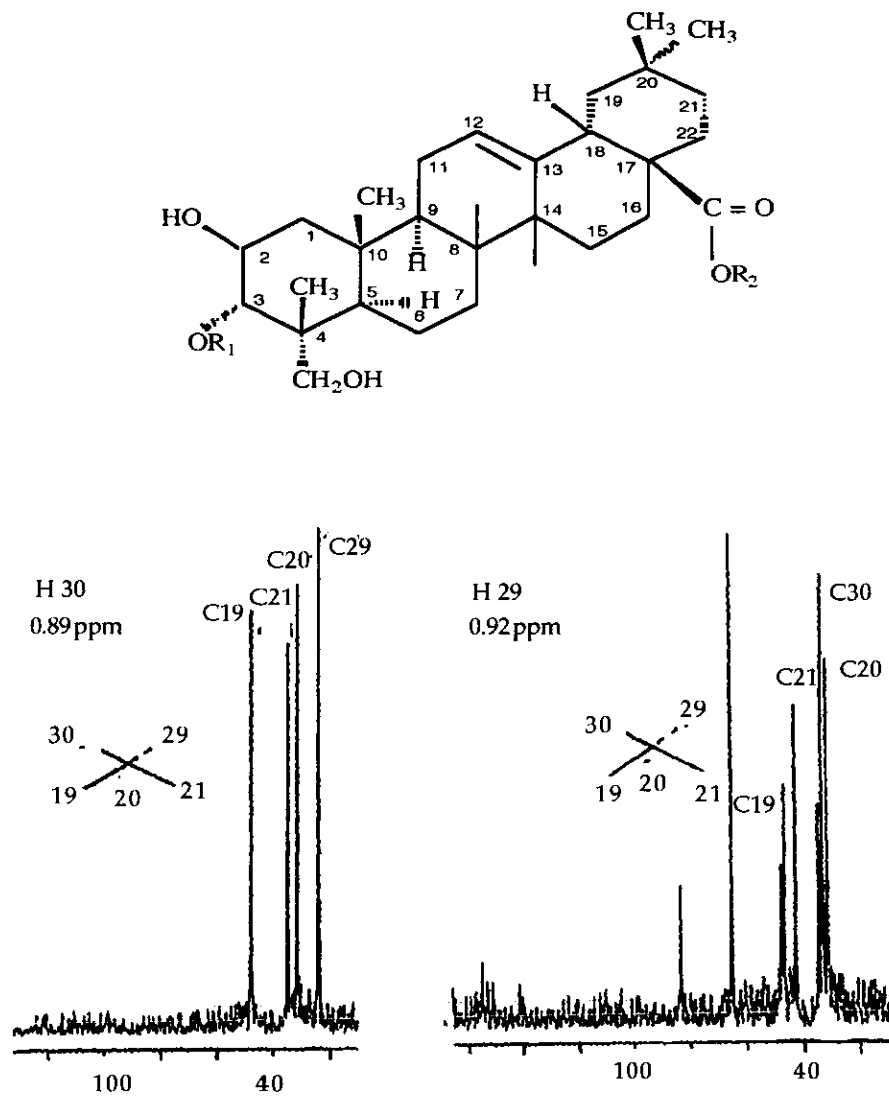


Figura 4. 5 Edición espectral de las conectividades a largo alcance de los metilos en las posiciones 29 y 30.

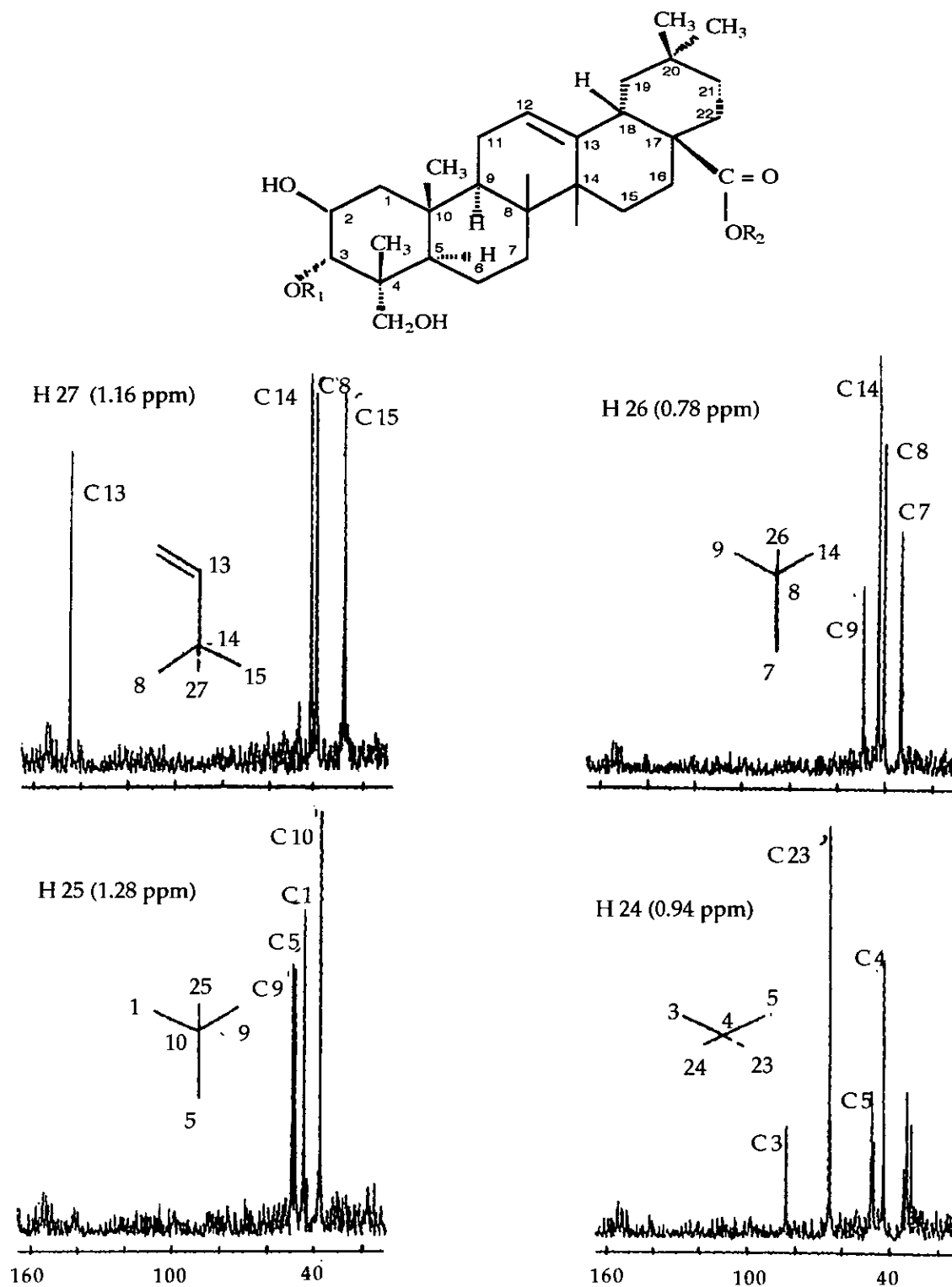


Figura 4. 6.- Edición espectral de las conectividades a largo alcance (HMBC) de los ¹H de los metilos en las posiciones 24, 25, 26, 27.

TABLA 4. 1

DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DEL AGLICON GLUCOSIDO F

	$\delta^1\text{H}$		$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^1\text{H}$		$\delta^{13}\text{C}$
	ax.	ec.			ax.	ec.	
1	1.15	2.05	44.36	16	2.02	1.66	23.76
2	4.3		71.16	17	-----		48.20
3	3.61		83.84	18	2.90		42.67
4	-----		42.96	19	1.71	1.12	47.13
5	1.30		48.14	20	-----		31.60
6	1.45	1.50	18.76	21	1.40	1.20	34.89
7	1.28	1.32	33.52	22	1.74	1.57	33.34
8	-----		40.74	23	3.23, 3.60		65.67
9	1.56		49.26	24	0.94		14.83
10	-----		37.52	25	1.28		17.60
11	1.99	1.89	24.70	26	0.78		18.04
12	5.30		123.91	27	1.16		26.39
13	-----		144.99	28	-----		177.74
14	-----		43.15	29	0.93		24.03
15	1.65	1.14	28.88	30	0.89		33.53

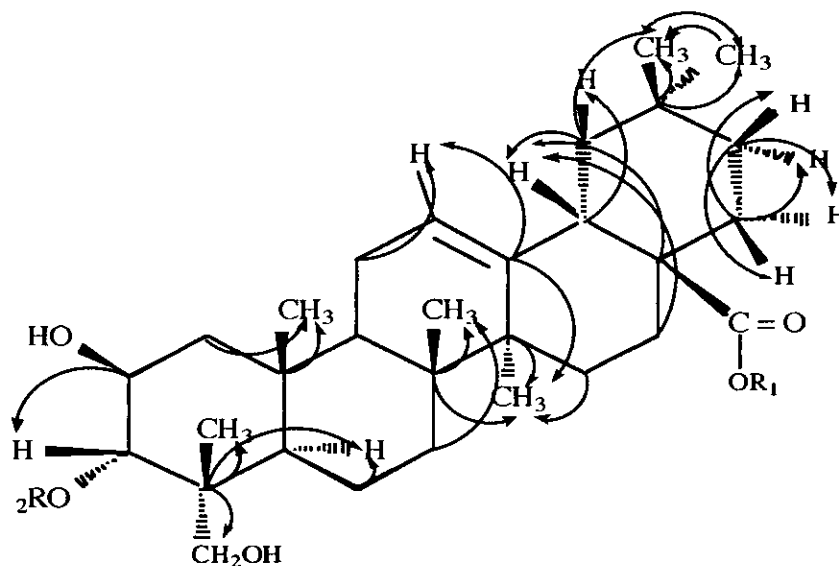


Figura 4. 7.- Conectividades a largo alcance (HMBC) en el ácido bayogenoico donde R1 y R2 se refieren a las cadenas de oligosacáridos.

Las asignaciones y conectividades de los demás protones del aglicón se realizaron con los experimentos COSY y TOCSY. El espectro TOCSY permitió agrupar los protones del triterpeno en los siguientes subsistemas: [CH₂(1) / H-C(2) / H-C(3); H-C(5) / CH₂(6) / CH₂(7); H-C(9) / CH₂(11) / H-C(12); CH₂(15) / CH₂(16); H-C(18) / CH₂(19); CH₂(21) / CH₂(22); CH₂(23).

La figuras 4. 8 y 4. 8a muestran expansiones del espectro COSY del glucósido F indicando algunas acoplamientos en la región de desplazamientos químicos del triterpeno.

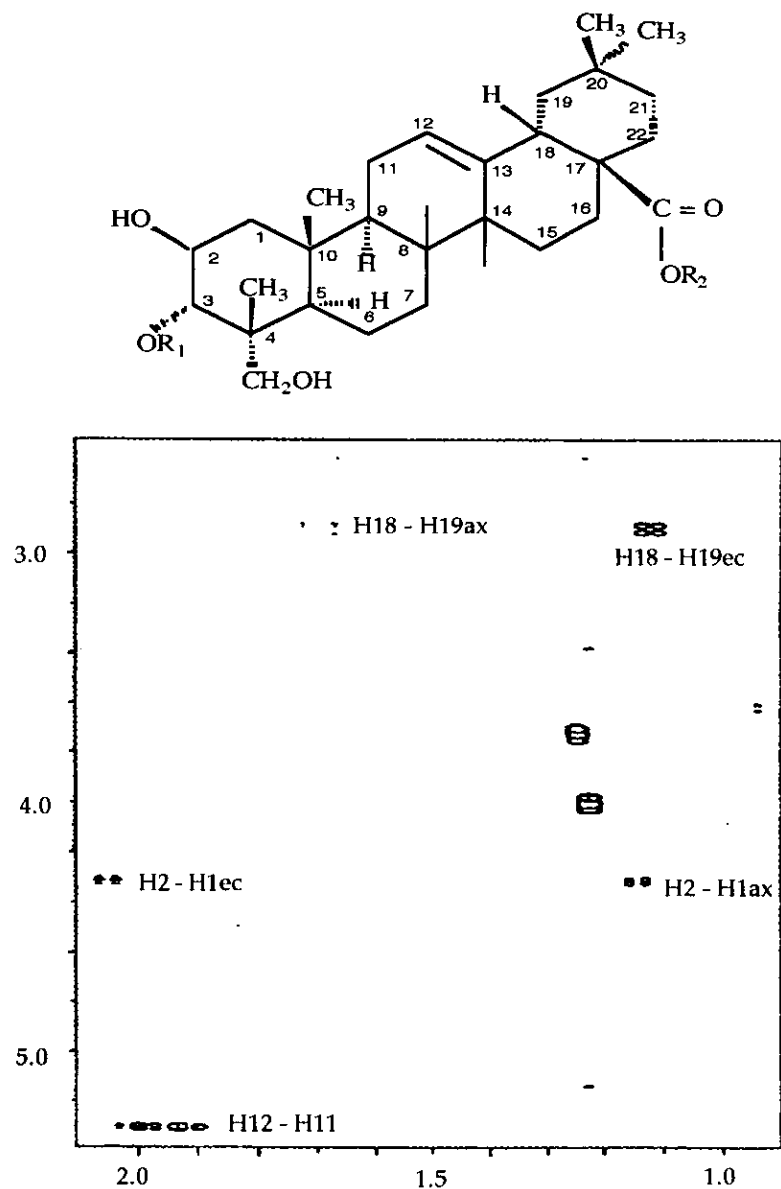


Figura 4. 8.- Expansiones del espectro COSY de la región alifática del glucósido F mostrando algunas correlaciones.

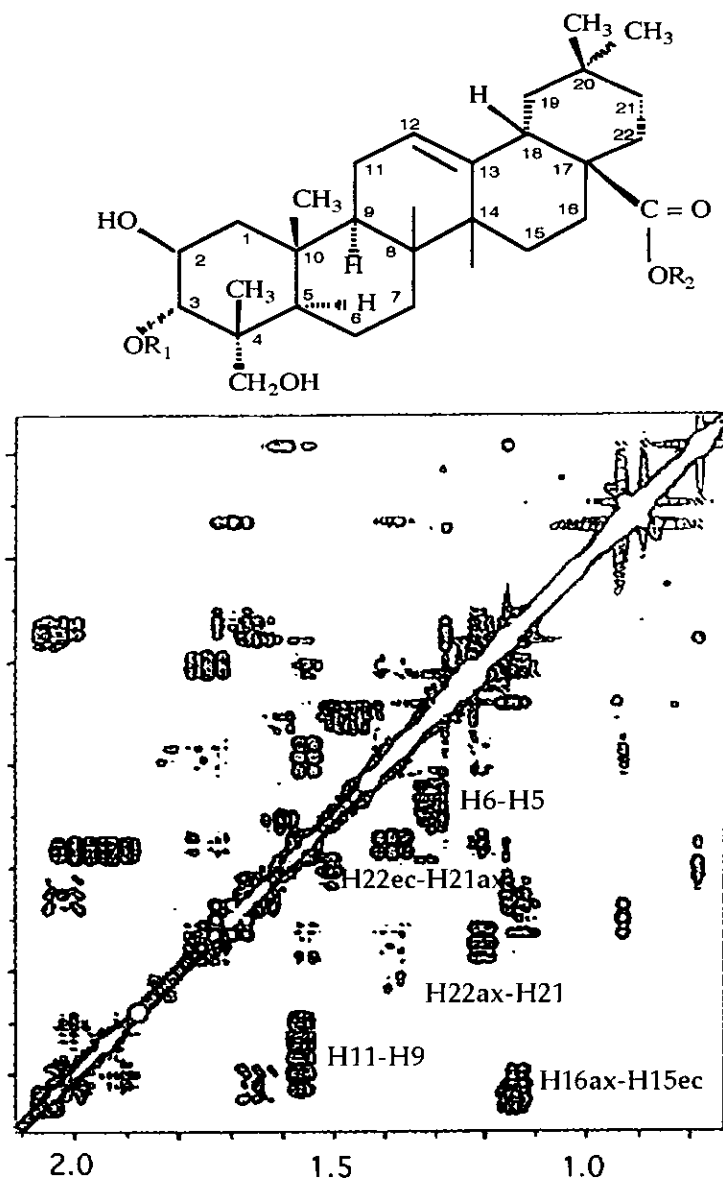


Figura 4. 8a.- Expansiones del espectro COSY de la región alifática del glucósido F mostrando algunas correlaciones.

La estereoquímica del derivado del ácido oleanoico se determinó con el espectro ROESY. Iniciando el estudio con los metilos en posición 1,3 diaxial, se observa una señal entre los protones de los metilos en posiciones C-24 (0.94 ppm) y C-25 (1.28 ppm); otra señal para los protones de los metilos C-25 (1.28 ppm) y C-26 (0.78 ppm), los protones en la posición C-26 mostraron otra interacción con el protón H-15 (1.65 ppm) que también se encuentra en posición axial.

El protón en posición H-18 (2.89 ppm) muestra otra señal en el espectro ROESY con : los protones en posición H-29, un protón ecuatorial en posición 19 y con el protón alílico en posición H-12. En el

espectro HMBC se observa una interacción entre el carbonilo C-28 con un proton axial en 2.02 ppm en C16, sugiriendo que el carbonilo esta en posición anti respecto a H-16axial. Con la información de los espectros ROESY y HMBC de los anillos D y E del triterpeno se considera que la fusión de los anillos es *cis*. Otras señales importantes en la asignación de la estereoquímica fueron entre H-3 y H-1ax, también entre H-5 y H-23 y entre los protones de los metilos en H-24 y H-25.

La estereoquímica de los protones en posición C-2 se determinó con el espectro HSQC sin desacoplar en el que se observan acoplamiento vecinales sin resolver entre H-2, H-3 y con los protones en H-1, sugiriendo que la posición de H-2 es α -ecuatorial.

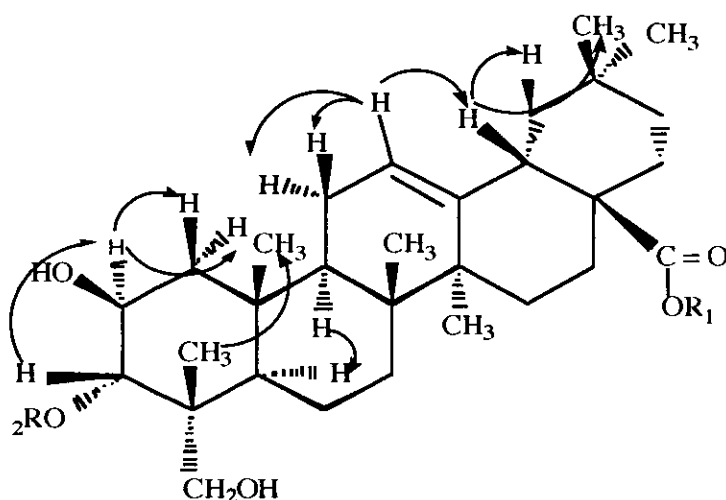
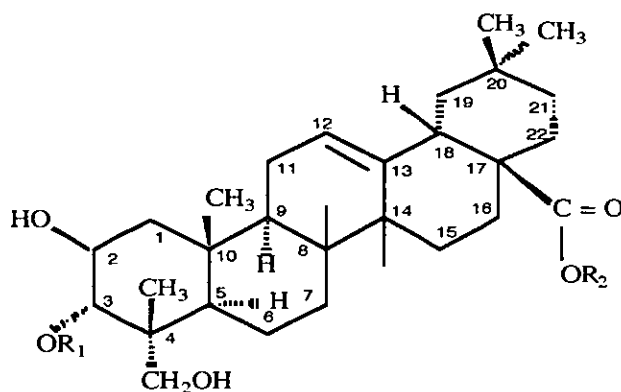


Figura 4. 9.- Interacciones dipolares detectadas en el espectro ROESY en el ácido bayogenoico.

Estructura del aglicón en los glucósidos F y G de amole

A partir de la información anterior se asigna al aglicón la estructura del ácido 2 β ,3 β ,23-trihidroxi-olean-12-en-28-oico, comúnmente llamado bayogenina. Los desplazamientos químicos de ^1H y de ^{13}C para los dos aglicones en los glucósidos F y G son iguales, indicando la misma estructura química



4. 2.- Estructura de las cadenas de sacáridos en el glucósido F

Identificación de los monosacáridos

En la figura 4. 2 se observan siete protones anoméricos en δ 4.42 (d, $J= 7.8$ Hz), 4.54 (dd, $J= 7.8$ Hz), 4.55 (d, $J= 8.9$ Hz), 4.71 (d, $J= 8.5$ Hz), 5.0 (d, $J= 1.8$ Hz), 5.14 (d, $J= 2.14$ Hz) y 5.66 (d, $J= 3.57$ Hz), y en la figura 4.3 se observan las señales de seis de los siete señales anoméricas con δ 93.8, 101.0, 102.6, 104.8, 105.1, 105.2 y 106.5. El espectro HSQC muestra que estas señales se correlacionan con las señales anoméricas de ^1H , confirmando la presencia de siete sacáridos.

Las siete señales de los protones anoméricos son buenos puntos de partida para identificar los protones de los sacáridos. Los espectros COSY (figura 4. 10) y TOCSY (figura 4.11) permitieron asignar todos los protones a los átomos de carbono correspondientes y la comparación de desplazamientos químicos de ^1H y de ^{13}C . Con los datos de los experimentos HSQC y HMBC se pudieron identificar los siete monosacáridos presentes en el glucósido F y las constantes de acoplamiento permitieron asignar las configuraciones siguientes: 2 b- glucosas, 2 b-xilosas, 2 a-ramnosas y 1 a-arabinosa.

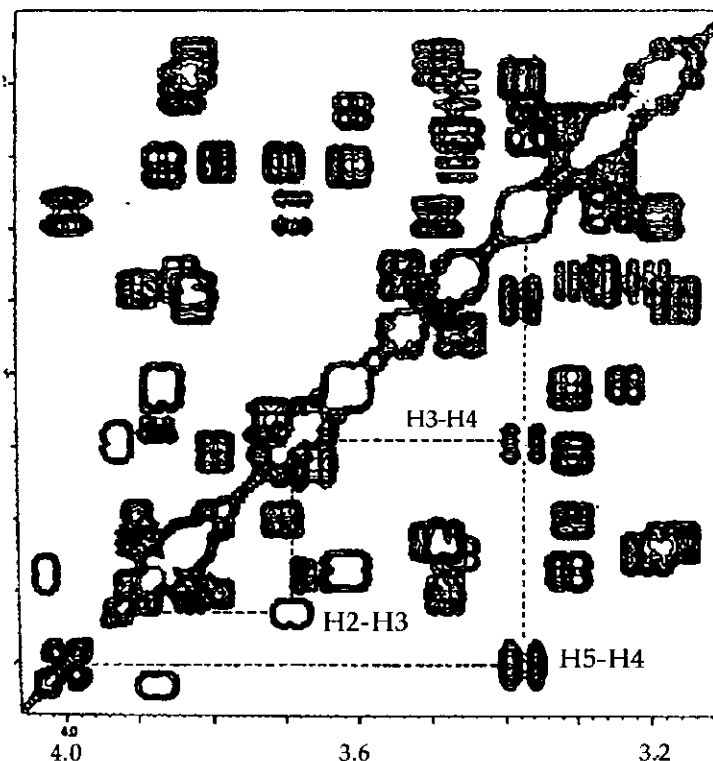


Figura 4. 10.- Espectro COSY de la región de sacáridos del glucósido F de amole mostrando el patrón de conectividades de la ramnosa interna.

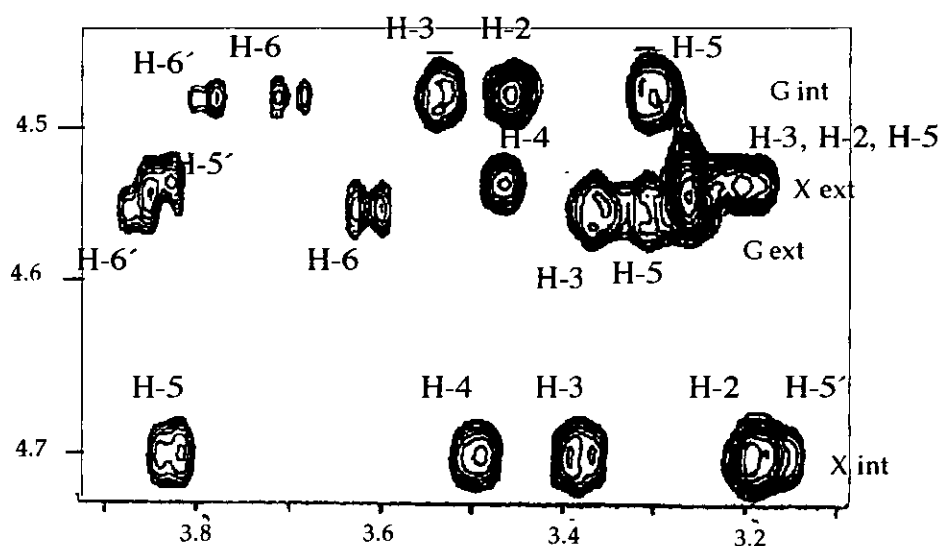


Figura 4. 11.- Expansión de una sección transversal del espectro TOCSY a partir de las señales anoméricas.

La determinación de las configuraciones de los monosacáridos se realizó a partir de los valores de $^1J_{CH}$ y $^3J_{CH}$ calculados con las ediciones espectrales del experimento HSQC sin desacoplamiento. Las constantes de acoplamiento $^1J_{CH} = 160$ Hz para los monosacáridos xilosa interna, xilosa externa, glucosa interna y glucosa externa (figura 4.12) mostraron que la configuración es β y además se observa una separación en dobles de las señales anoméricas por efecto de acoplamiento diaxial $^3J_{HH}$. En tanto que las constantes de acoplamiento para ramnosa interna, ramnosa externa y arabinosa tienen un valor $^1J_{CH} = 170$ Hz indicativo de configuración α . En la Tabla 4.2 se presentan los desplazamientos químicos de los monosacáridos en el glucósido F.

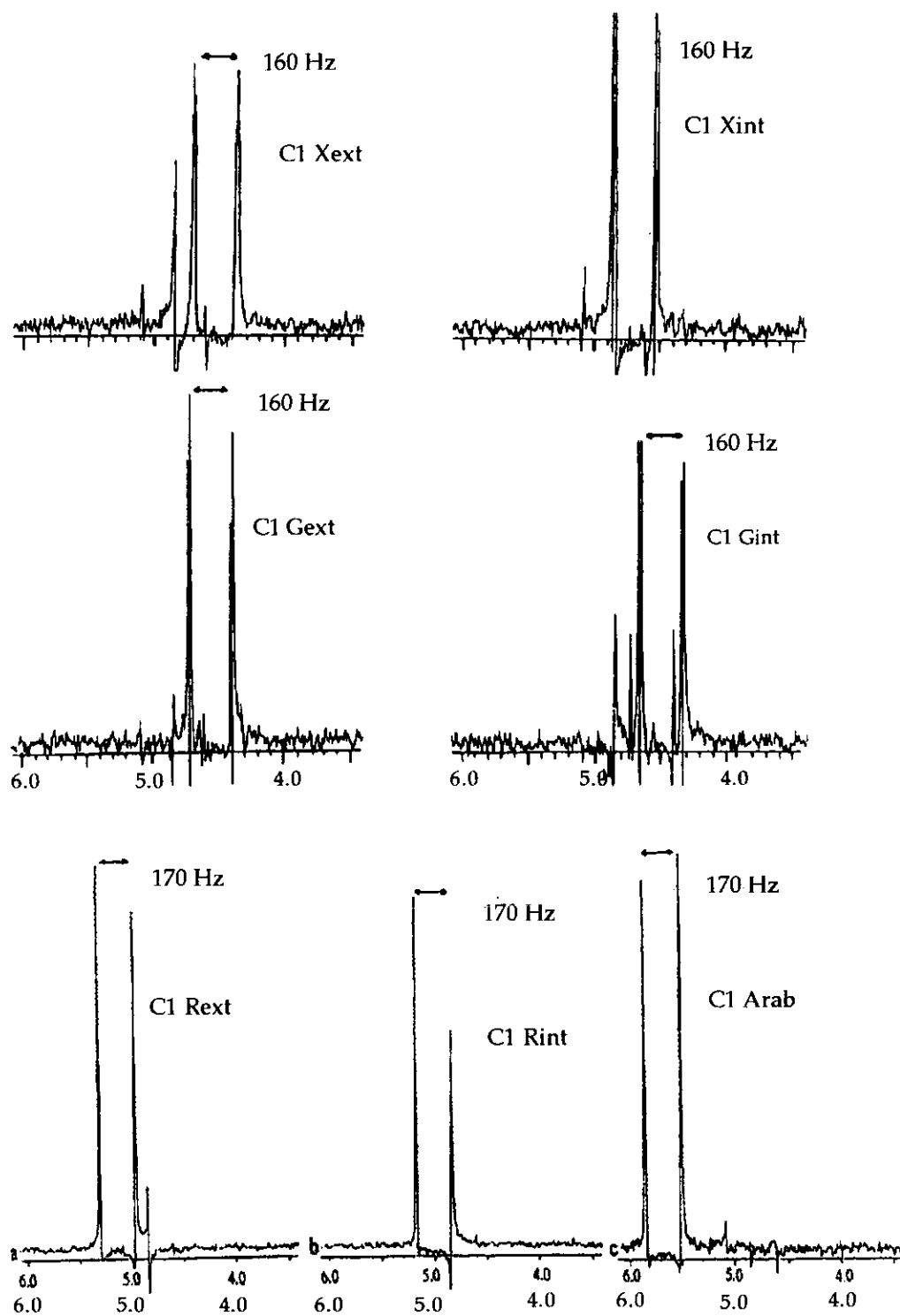


Figura 4. 12.- Secciones transversales de los átomos de C anoméricos, del espectro HSQC sin desacoplamiento.

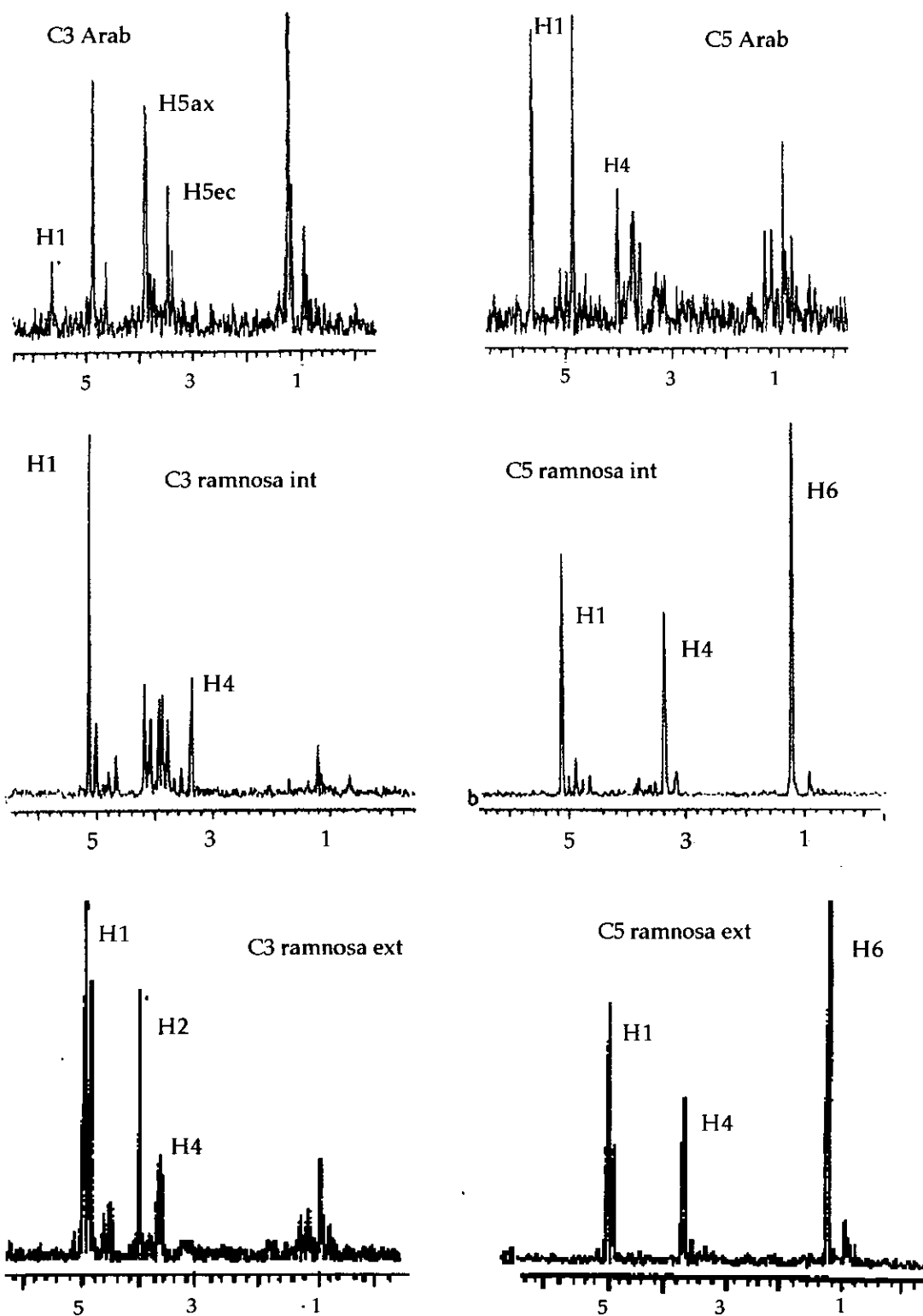


Figura 4. 13.- Conectividades a largo alcance HMBC de los átomos de carbono C -3 y C-5 de ramnosa interna y ramnosa externa.

TABLA 4. 2

**DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DE MONOSACARIDOS
DEL GLUCOSIDO F**

	α -ARABINOSA interna		α -RAMNOSA interna		β -XILOSA		α -RAMNOSA externa	
	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C
1	5.66	93.80	5.00	101.00	4.70	104.82	5.14	102.65
2	3.79	75.61	4.03	72.22	3.19	76.28	3.93	72.27
3	3.90	70.50	3.87	82.16	3.38	84.39	3.69	72.16
4	3.82	66.77	3.67	78.83	3.49	70.21	3.38	73.97
5	3.49	63.31	3.71	69.05	3.16	66.95	4.00	69.96
5'	3.89				3.82			
6			1.25	18.35			1.23	17.90

	β -XILOSA externa		β -GLUCOSA interna		β -GLUCOSA externa	
	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C
1	4.54	106.03	4.48	105.12	4.55	105.24
2	3.26	75.32	3.46	74.72	3.26	71.54
3	3.28	75.49	3.53	87.95	3.36	77.79
4	3.47	71.04	3.26	78.22	3.48	69.50
5	3.22	67.04	3.30	77.33	3.31	78.11
5'	3.85		3.71	62.14	3.62	62.62
6'			3.80		3.87	

A partir de las correlaciones a dos y tres enlaces de distancia se determinó que los anillos son del tipo piranosa para las dos xilosas y la arabinosa. Otro dato que confirma la aseveración anterior es el valor del desplazamiento químico de H-5 ecuatorial que esta mas desprotegido que H-5 axial, algo que

es común en anillos de 6 miembros. Se considera que la configuraciónes absolutas de glucosa y xilosa es D y de ramnosa y arabinosa es L, basandonos en reportes previos de moléculas similares.

Los espectros HSQC (figura 4.14) permitieron la asignación de la mayoría de los pares ^{13}C - ^1H , sin embargo varias señales no pudieron asignarse inambiguamente por la cercanía de sus desplazamientos químicos.

Los desplazamientos químicos del glucósido G son iguales a los del glucósido F excepto por la ausencia del azúcar VII.

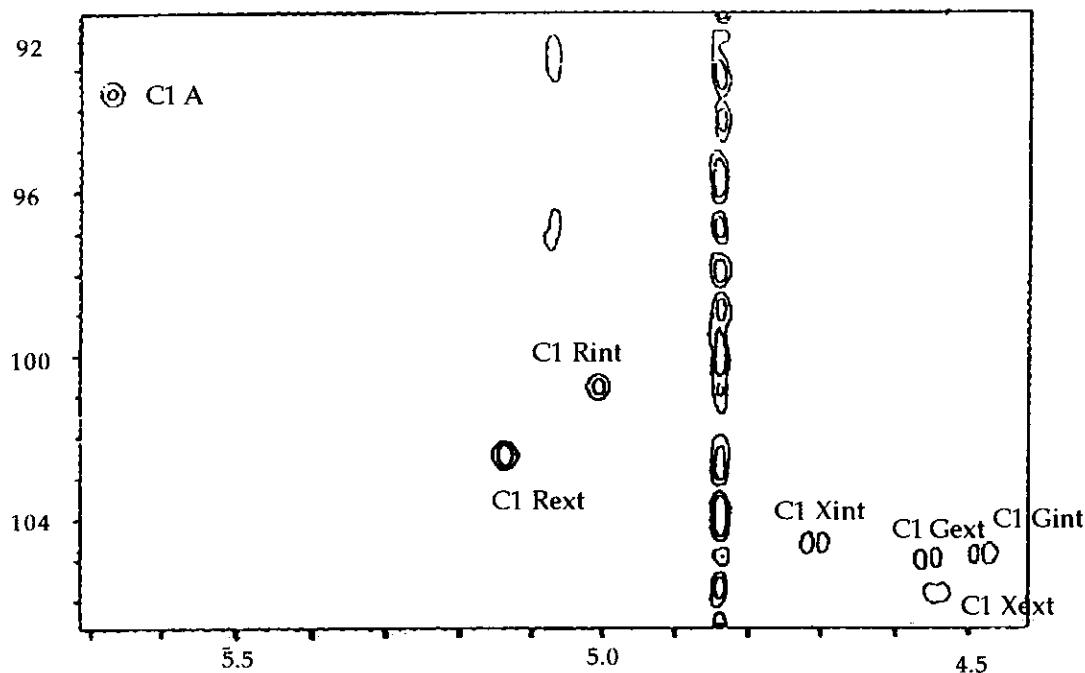


Figura 4. 14.- Expansion del espectro HMQC de la región anomérica del glucósido F.

ARABINOSA.- El enlace O-glucosídico de la arabinosa y del carboxilo en posición 28 del triterpeno se determinó con el experimento HMBC. La edición del espectro TOCSY para el átomo de C anomérico de la ribosa muestra señales en 3.90, 3.81, 3.49 ppm. El espectro COSY muestra conectividad entre H-1 (5.66 ppm) y H-2 (3.79 ppm); entre H-2 y H-3 (3.82 ppm); entre H-3 y H-4 (3.84 ppm) y H-4 con los hidrógenos del metileno en la posición 5 (3.46 y 3.91 ppm). El espectro HMBC permitió corroborar las asignaciones de desplazamientos químicos para α -arabinosa como se describe a continuación: C 1 (93.80 ppm) muestra correlaciones con H 2 en 3.79 ppm y para el metileno de la posición 5 en 3.46 y 3.91 ppm (C-5 63.2 ppm). El átomo de C-2 (75.61 ppm) muestra conectividades con H-1 (5.66 ppm) del azúcar 1, con H-3 en 3.90 ppm y con H-1 (5.00 ppm) del azúcar 2. C-3 (70.47 ppm) muestra conectividad con los H del metileno en C-5 (3.46 y

3.91 ppm), un señal débil para H-2 y H 4 (3.7 ppm). El C-5 (63.2 ppm) muestra conectividad con H-1 (5.66 ppm) y con H-4 (3.72 ppm, 66.9 ppm). La unión del carbono 5 con el carbono 1 indica un anillo de seis miembros.

RAMNOSA interna.- El espectro HMBC mostró que la unión interglucosídica es entre C 1 (101 ppm) de ramnosa y H 2 (3.79 ppm) de la arabinosa. Otra conectividad de C-1 es con H- 2 (3.94 ppm) y con 3.67 ppm de H 3 . El C 3 se une al C 1 de la xilosa interna por la conectividad con H 1 (4.70 ppm), asimismo se observa la conectividad con H 2 (3.94) ppm y con H 4 en 3.90 ppm. C 4 presenta otro enlace interglucosídico con H 1 (4.54 ppm) de xilosa externa, con un metilo en 1.25 ppm y con H 3 (3.66 ppm). C 5 (69.09 ppm) muestra conectividad con el protón anomérico en 5.00 ppm y con un metilo en 1.25 ppm, así como con H 4 en 3.67 ppm y C 6 presenta otra conectividad con H 5 (3.7 ppm). La presencia de un metilo en la posición 6 indica que se trata de un 6-desoxi monosacárido, con la comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C se identifica al azúcar como ramnosa, la unión del oxhidrilo en posición 5 confirma que es un ciclo piranosido.

XILOSA interna.- El C anomérico en 104.8 ppm muestra conectividad con H 2 (3.19 ppm), con H 5 (3.16 ppm) y H5' (3.82). En tanto que C 3 (84.4 ppm) muestra conectividad con H 1 (5.14 ppm) de la ramnosa exterior, con H 2 (3.19 ppm), con H 4 (3.91 ppm). C 4 (70.45 ppm) establece correlación con H 3 (3.38 ppm). C5 (66.95 ppm) muestra correlación con H 1 (4.7 ppm). La conectividad del átomo de C-1 anomérico con el metileno de la posición 5 muestra que se trata de un ciclo de 6 miembros (piranosa), la ausencia de otro átomo de C demuestra que se trata de una aldopentosa.

XILOSA externa.- El átomo de C anomérico (106.0 ppm) presenta correlación con H 3 (3.67 ppm) de la ramnosa interna, con H 5 (3.22 ppm) y H 5' (3.85 ppm). En tanto que C 3 (75.4 ppm) con H 2 (3.26 ppm), con H 4 (3.88 ppm). C 4 (82.16 ppm) establece correlación con H 3 (3.28 ppm). C5 (67.04 ppm) muestra correlación con H 1 (4.5 ppm). La conectividad del átomo de C 1 anomérico con el metileno de la posición 5 muestra que se trata de un ciclo de 6 miembros (piranosa).

GLUCOSA interna.- La glucosa interna se encuentra unida al triterpeno en la posición 3 como se muestra por la conectividad de H 1 (4.42 ppm) y C 3 (83.8 ppm). El espectro TOCSY muestra que el sistema de espines de la glucosa interna tiene los siguientes desplazamientos químicos: 4.42, 3.80, 3.67, 3.5, 3.33 y 3.27 ppm. La secuencia de señales por correlación homonuclear es 4.42 --- 3.5 --- 3.33. Los ^1H con δ 3.67 y 3.80 corresponden al metileno de la glucosa.

Determinación de los sitios de unión intersacáridos

Los sitios de unión entre los monosacáridos se determinaron a partir de los datos de los espectros ROESY y HMBC, indicando que hay dos cadenas de monosacáridos una formada por dos glucosas unidas a la posición C-3 del derivado oleanoico; y el carboxilo en C-28 se encuentra enlazado con un enlace éster a la cadena arabinosa C-2- ramnosa interna C-3-(xilosa externa), ramnosa interna C-4- (xilosa interna) C-3-ramnosa externa.

El espectro HMBC (figuras 4. 15 y 4. 16) permitió realizar las siguientes correlaciones: el C anomérico (105.5 ppm) presenta correlación con H-2 en 3.5 ppm, con H-5 en 3.34 ppm y con H-3 del triterpeno en 3.6 ppm. La unión interglucosídica se encuentra en C-3 de la glucosa interna y H-1' de la glucosa externa a partir de la conectividad en HMBC.

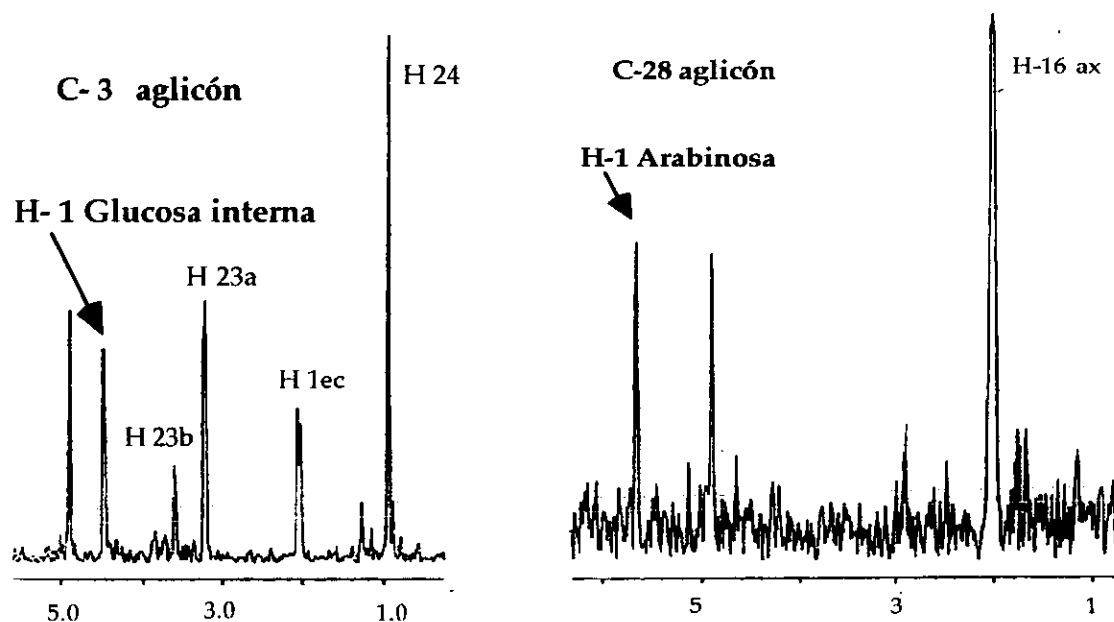


Figura 4. 15.- Edición de las conectividades a largo alcance en el espectro HMBC de los átomos C-3 y C-18 del aglicón en los que se observan las correlaciones con los protones anoméricos de glucosa interna y arabinosa.

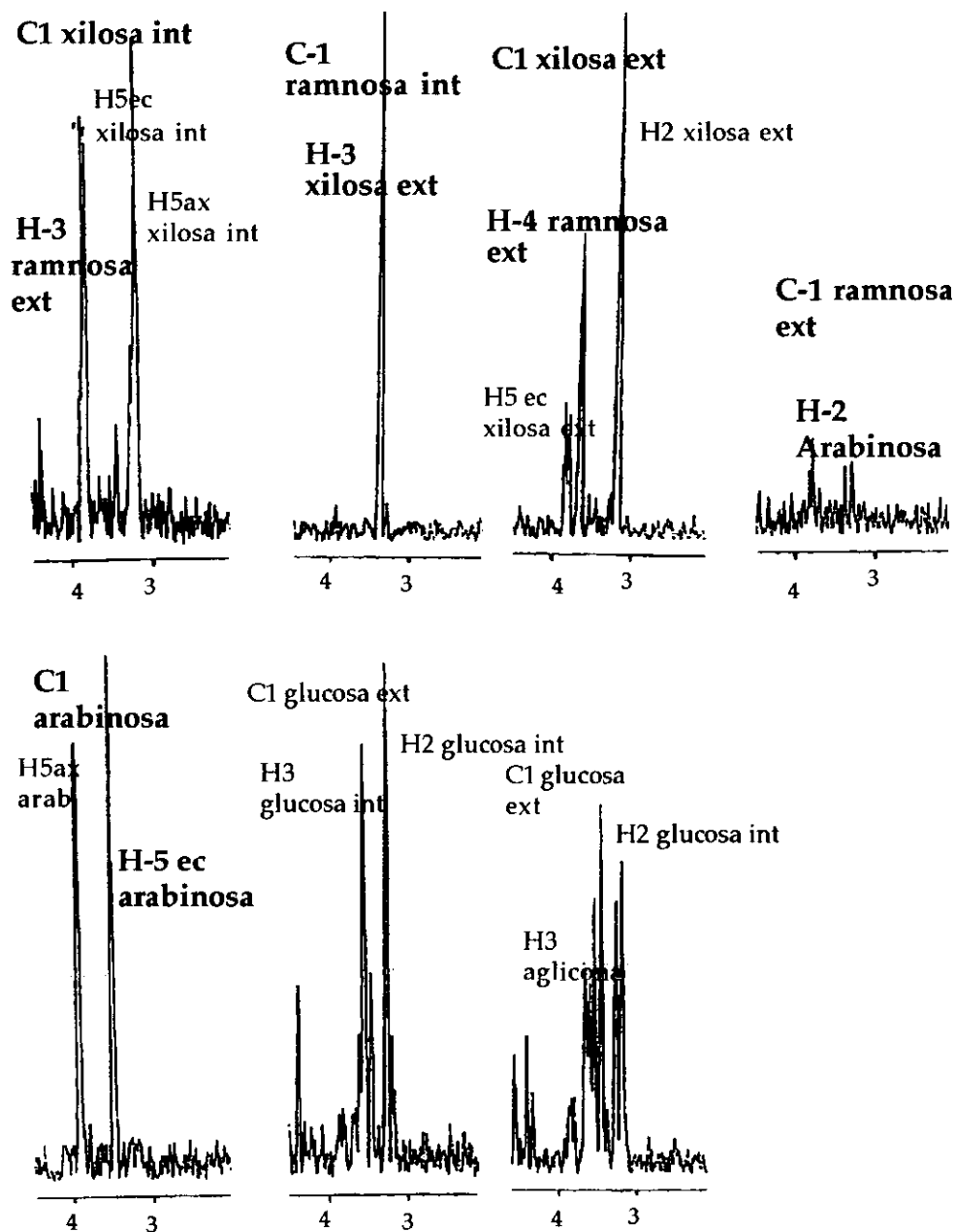


Figura 4. 16.- Edición de las conectividades a largo alcance HMBC de los protones anómicos de los siete átomos de carbono anómicos en el glucósido F, pudiendo detectarse los sitios de unión interglucosídica.

El espectro ROESY (figura 4. 17) muestra las interacciones inter-glucosídicas: H-1 de arabinosa y H-5 de ramnosa interna delimitando las conformaciones de estos dos monosacáridos; e intra aglicon en que se detecta la presencia de un puente de hidrógeno entre el metileno de C-23 y un oxhidrilo de la glucosa interna limita la movilidad de C-23 permitiendo interacciones entre H-23 α con H-6 ecuatorial y H-23 β con H-5 axial.

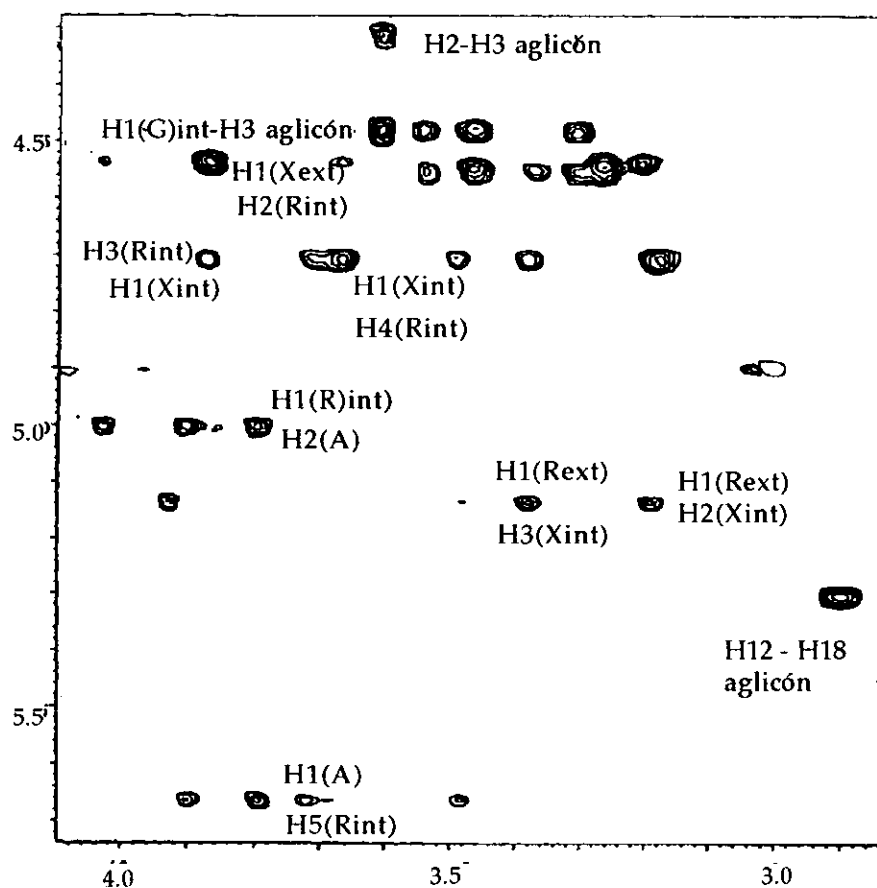


Figura 4. 17.- Expansión de la región de monosacáridos del espectro ROESY mostrando las interacciones interglucosídicas.

4. 3.- Estructura de los glucósidos F y G de amole

La estructura del glucósido F (figura 4.18) de amole es 3-O-[β -D-glucopiranosil-(1-3)- β -D-glucopiranosil]-28-O-{ α -L-ramnopiranosil-(1-3)- β -D-xilopiranosil-(1-4)-[β -D-xilopiranosil-(1-3)]- α -L-ramnopiranosil-(1-2)- α -L-arabinopiranosil-1-bayogenina.

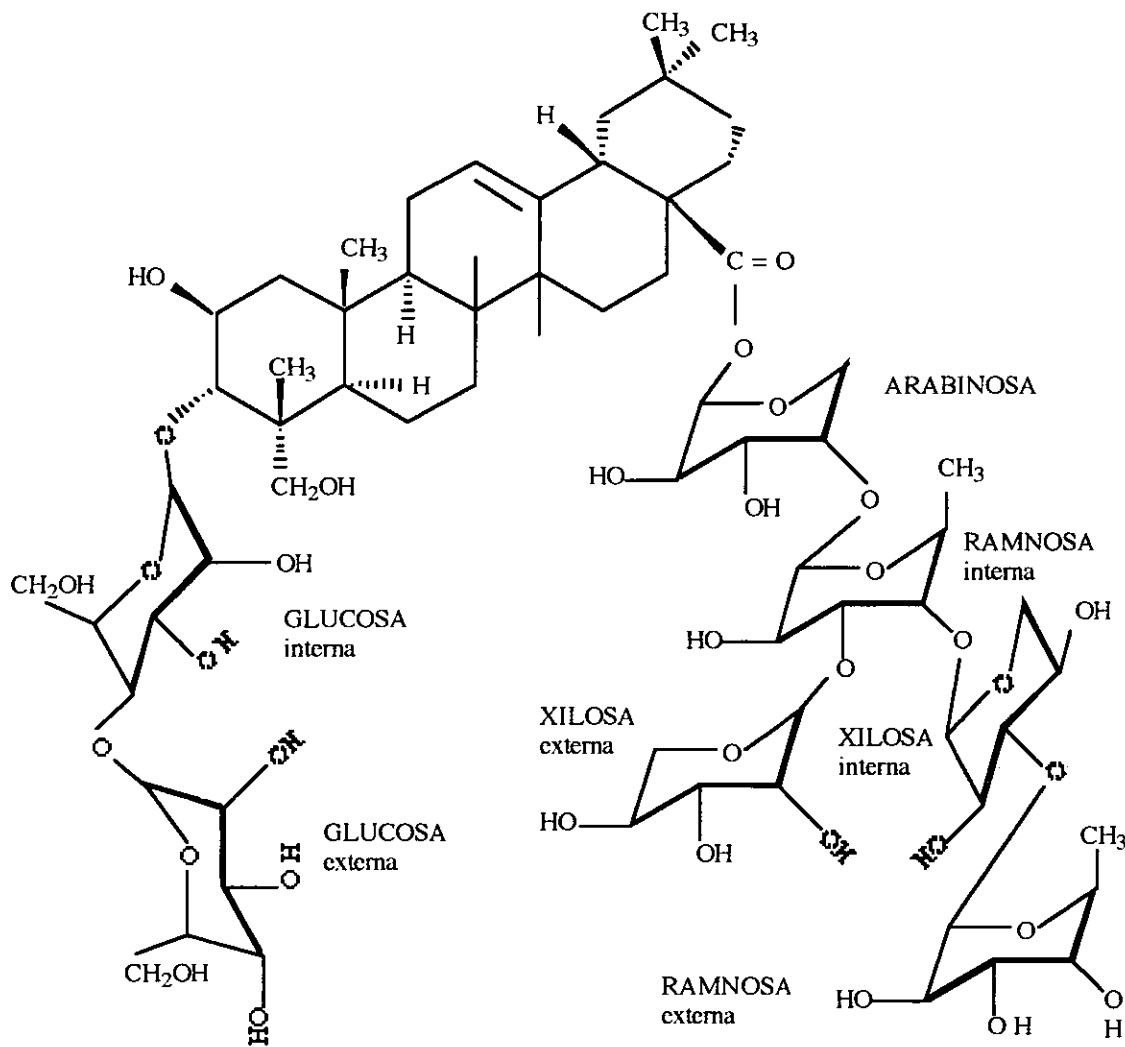


Figura 4.18.- Estructura del glucósido F del extracto metanólico de amole

El glucósido G (figura 4.19) de amole difiere en el glucósido F en que posee una unidad de glucosa menos.79

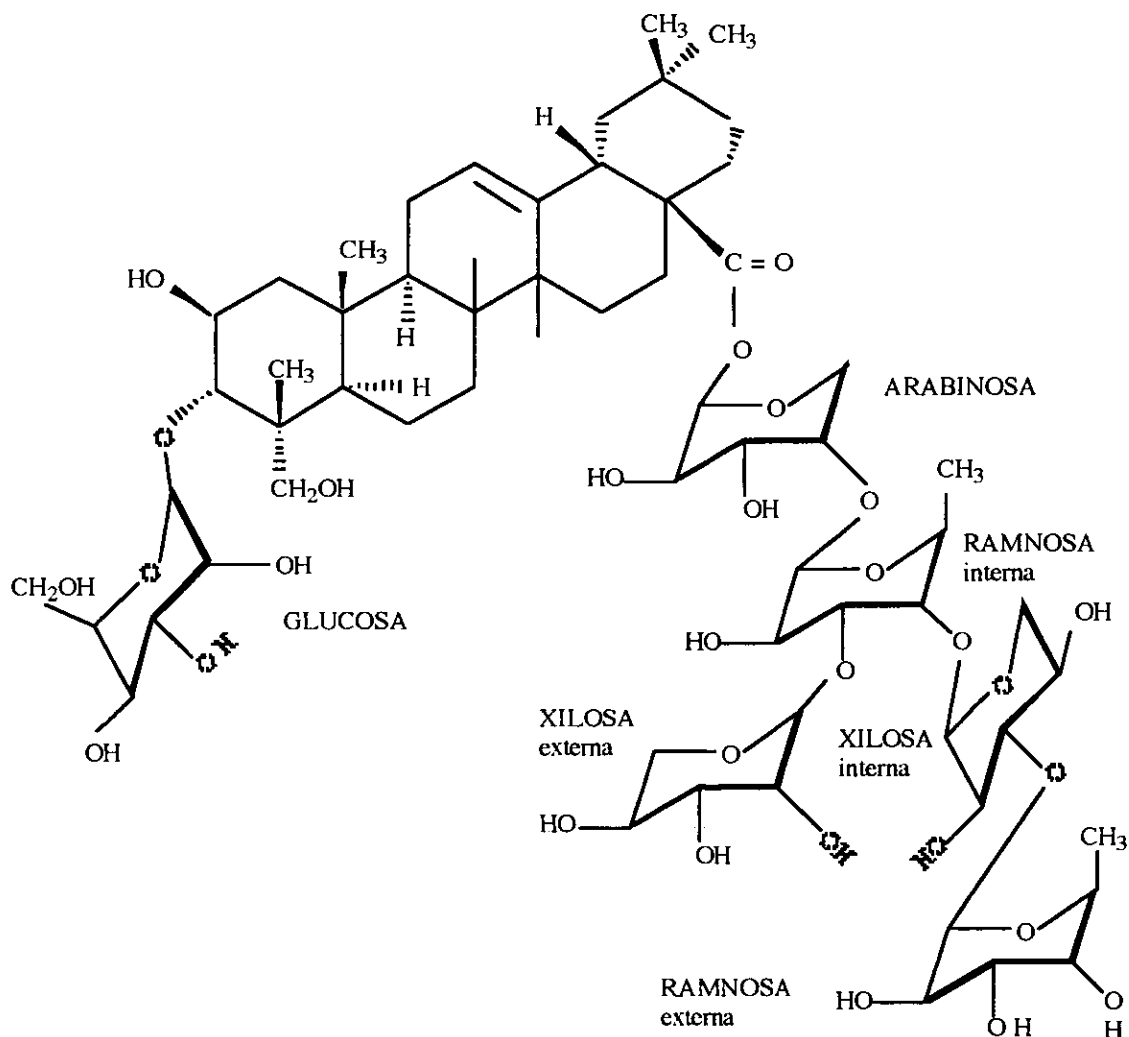


Figura 4. 19.- Estructura del glucósido G del extracto metanólico de amole.

En la literatura hay reportadas pocas moléculas con bayogenina^{85, 86, 87} como aglicona, en el caso de *Solidago canadensis* la diferencia de los glucósidos con los de amole es la presencia de una α -ramnosa, o una β -D-apiosa enlazada a C-3 de la arabinosa, o poseer una α -ramnosa y una β -D-galactosa unida a C-2 de la ramnosa terminal, la elucidación estructural se realizó con degradación química y formación de derivados, contrariamente a lo presentado en la elucidación de los glucósidos de amole.

CAPITULO 5

LA PREDICCIÓN LINEAL EN EL PROCESAMIENTO
DE DATOS DE UN ESPECTRO DE RMN
BIDIMENSIONAL

5. 1. Predicción lineal en el procesamiento de datos de diferentes experimentos de RMN

A continuación se presenta un estudio de la aplicación de la predicción lineal a diferentes experimentos de RMN Bidimensional (HSQC, HMQC, COSY, 2QF COSY) en el cual se varían parámetros espectrales del procesamiento de datos (número de incrementos, llenado con ceros, etc.) y el impacto que tienen estas variaciones en la relación señal / ruido y en la resolución de los espectros.⁸⁹ La mayoría de los experimentos de predicción lineal se realizaron con la molécula del ácido kauradienoico⁹⁰ (figura 5. 1).

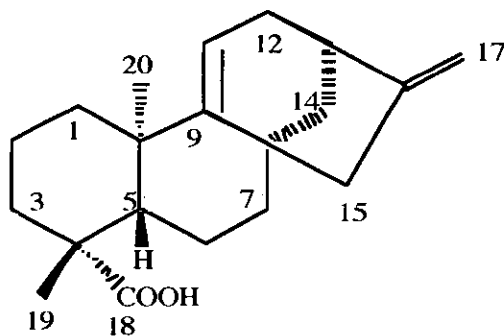


Figura 5. 1.- Estructura del ácido kauradienoico aislado de *Montanoa tomentosa* .

HSQC

En los tres experimentos la concentración de la muestra fué de 6 mg / mL de CDCl_3 , con una ventana espectral en f_2 de 1770 Hz, una ventana espectral en f_1 de 6300 Hz y 256 datos de puntos en f_2 con llenado de ceros a 512.

- en el **experimento 1** se colectaron 16 transientes por cada incremento de tiempo, 256 incrementos de tiempo, con predicción lineal en f_1 a 1024 y un llenado de ceros a 2048,

- en el **experimento 2** se realizaron cuatro transientes por incremento de tiempo, 1024 incrementos de tiempo y un llenado de ceros a 2048 sin predicción lineal,

- en el **experimento 3** se realizaron cuatro transientes por incremento de tiempo, 256 incrementos de tiempo, con predicción lineal a 1024 y un llenado de ceros a 2048. Los datos fueron adquiridos en el modo hipercomplejo para generar espectros sensibles a la fase.

Los resultados que se esperaban eran: que el primer experimento mostrara una relación señal/ruido del doble respecto al segundo experimento en el mismo tiempo. En tanto que la relación señal / ruido del segundo experimento fuera igual a la del tercer experimento en un cuarto de tiempo. La relación señal/ruido fue medida en las secciones transversales de ^1H de los metilenos, los cuales fueron escogidos debido a que tenían la relación señal/ruido mas baja de los grupos CH_n . Los resultados obtenidos mostraron que la relación señal/ruido promedio para los metilenos fue de 237 : 1 en el primer experimento, 117 : 1 en el segundo experimento y de 116 : 1 en el tercer experimento (figura 5.3), casi exactamente los valores predichos, además en la figura 5. 2 se puede observar que los experimentos que utilizaron predicción lineal muestran menor ruido.

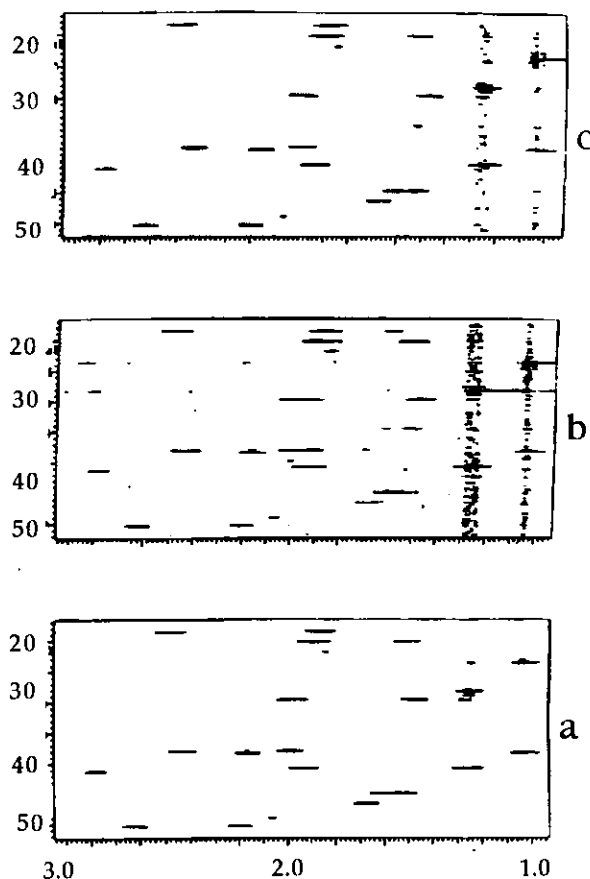


Figura 5. 2.- Espectros HSQC del ácido kauradienoico obtenidos en los tres primeros experimentos a) primer experimento, b) segundo experimento y c) tercer experimento. En los experimentos 2 y 3 se observan las regiones de ruido (t1 ridges).

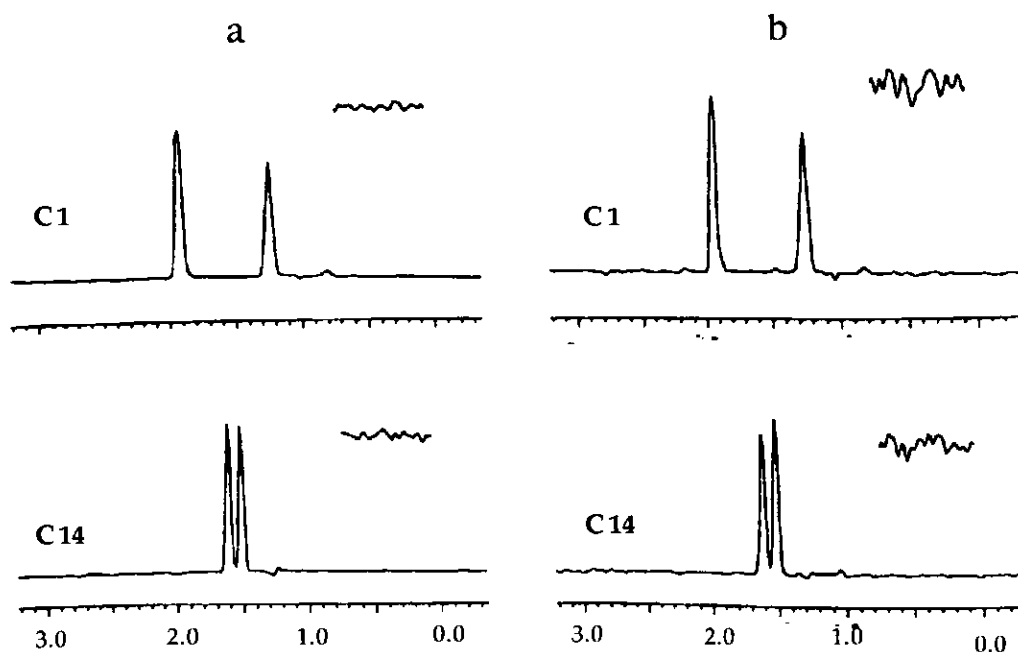


Figura 5. 3.- Secciones transversales de CH_2 obtenidas en a) primer experimento y b) segundo experimento, en que se observa la mayor sensibilidad del experimento con predicción lineal. El ruido mostrado esta multiplicado por 10.

Los **experimentos 4, 5 y 6** son similares a los descritos anteriormente pero con ventanas espectrales de 3 500 Hz en ^1H y de 16 000 Hz en ^{13}C para incluir todas señales de ^1H y de $^{13}\text{CH}_n$. El número de datos de puntos fue duplicado a 512 con llenado de ceros a 1024, y el resto de los parámetros mantenidos constantes. Las relaciones señal/ruido obtenidas en los experimentos 4, 5 y 6 fueron de 200 : 1, 108 : 1 y de 122 : 1 que son similares a los obtenidos en los experimentos iniciales confirmando las ventajas de la predicción lineal aún con ventanas espectrales mas anchas.

El **experimento 6 a**, consistió en el reprocesamiento del experimento 6 con una predicción lineal de 256 a 4096 con llenado de ceros a 8192, observándose que las señales de CH_2 duplicaron su relación señal/ruido respecto a una predicción lineal de 1024 (239 : 1 comparada con 122 : 1), debido a un incremento en la altura del pico (figura 5.4) por reducción en la anchura de las señales en f_1 , ya que una predicción lineal extendida permite tener acceso a una mayor parte del interferograma, produciendo una mejor resolución y requiriendo de apodización menos extrema. La comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C en el experimento 6a y los determinados por un espectro de RMN unidimensional de ^{13}C , mostraron que la máxima diferencia en los δ fue de 0.03 ppm, demostrando que la predicción lineal extensiva no introduce errores en la posición de los picos.

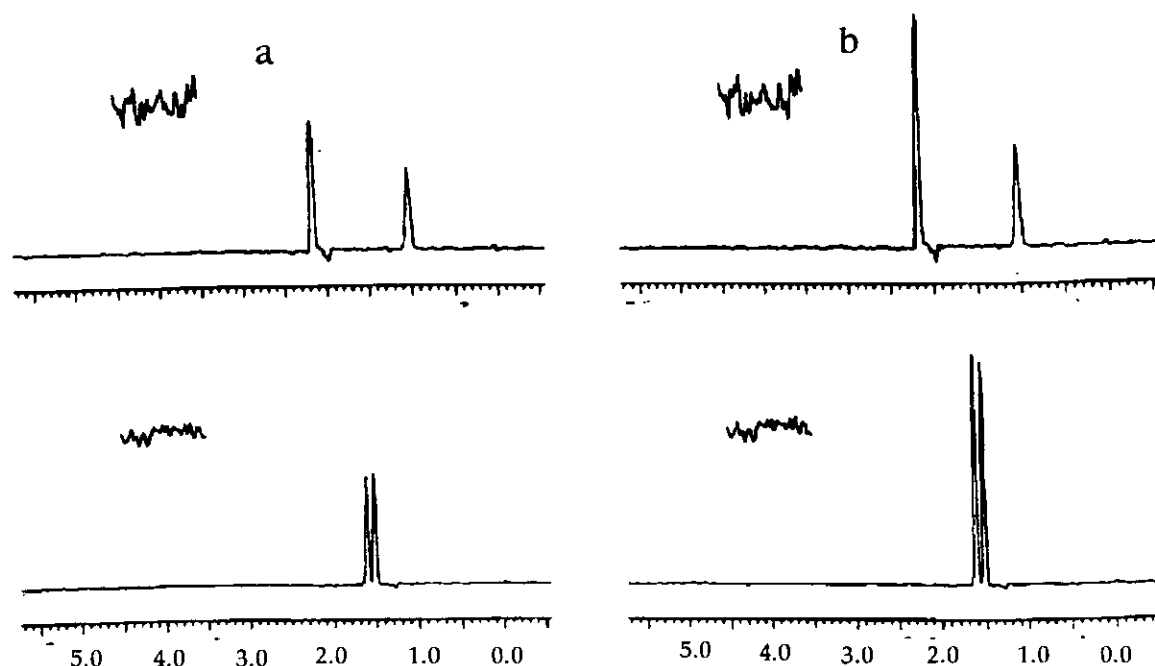


Fig. 5. 4.- Secciones transversales de CH_2 obtenidas en a) experimento 6 con predicción lineal a 1024 y b) experimento 6 a con predicción lineal a 4906, los espectros para el mismo átomo de carbono están graficados a la misma escala vertical. El ruido mostrado está multiplicado por 20.

El experimento 6 utilizando 256 incrementos y efectuando la predicción lineal a 1024, se comparó con el experimento 6 b que utilizó los primeros 128 incrementos de tiempo y usando la predicción lineal a 1024, y con el experimento 6 c utilizando los primeros 64 incrementos de tiempo y también realizando la predicción lineal a 1024, para evaluar el número mínimo de incrementos necesarios para realizar una predicción lineal confiable. Suponiendo que la predicción lineal es satisfactoria aún utilizando un número pequeño de datos, los espectros que se obtengan tendrán calidad espectral semejante. Los espectros de los experimentos 6 b y 6 c muestran un deterioro en la calidad, por lo que la predicción lineal en estos experimentos requiere de al menos 256 incrementos de tiempo y predicción lineal a 1024 para producir mejoras en la resolución, sensibilidad y calidad en los espectros (figura 5.5).

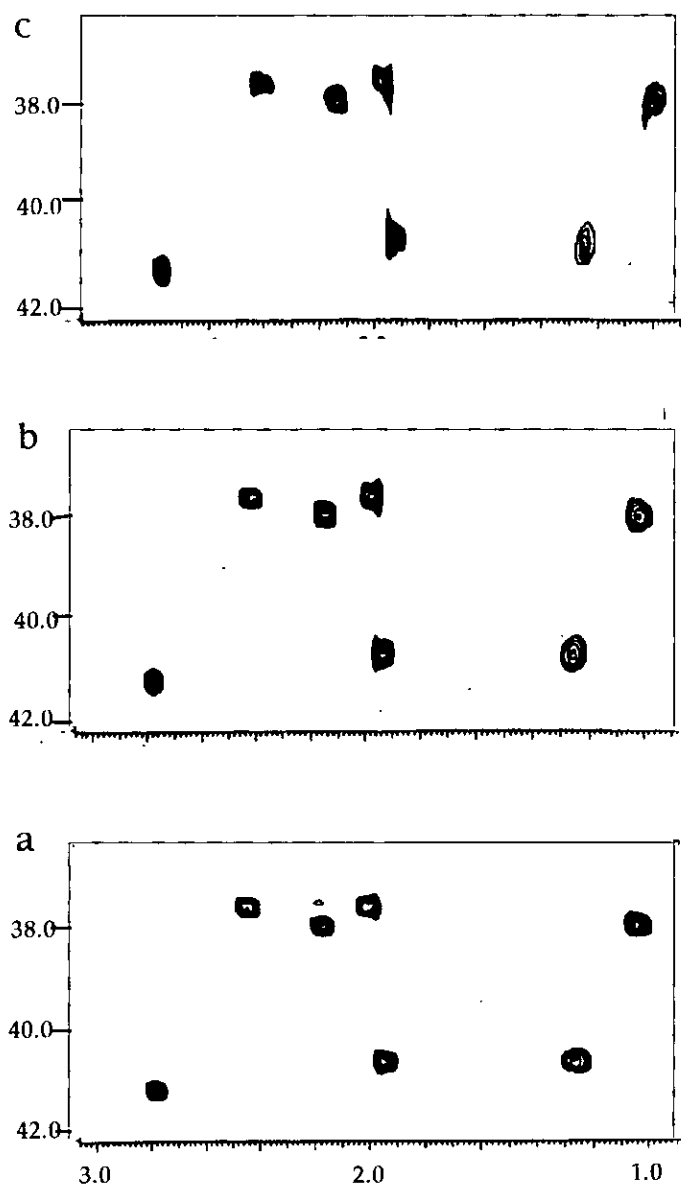


Figura 5. 5.- Gráficas de contorno para a) experimento 6, b) experimento 6 b, c) experimento 6 c. Los tres espectros están graficados a la misma escala vertical y al mismo umbral.

En la figura 5. 7 se muestra el espectro HSQC del glucósido F de *Microsechium helleri* ⁷⁹ obtenido con 1024 datos en f_2 y 256 incrementos de tiempo, con predicción lineal a 2048, la ventana espectral en $f_1 = 6300$ Hz y en $f_2 = 1770$ Hz para abarcar la zona de los sacáridos. A pesar del peso molecular tan alto del glucósido 1 600 g / mol (comparado con 300 g / mol del ácido kauradiénoico), los desplazamientos químicos individuales pueden ser estimados a pesar de lo congestionado de la región espectral con la ayuda de la predicción lineal, lo cual demuestra que la predicción lineal es

valiosa tanto para moléculas de bajo peso molecular (figura 5. 1), como para moléculas de alto peso molecular (figura 5.6).

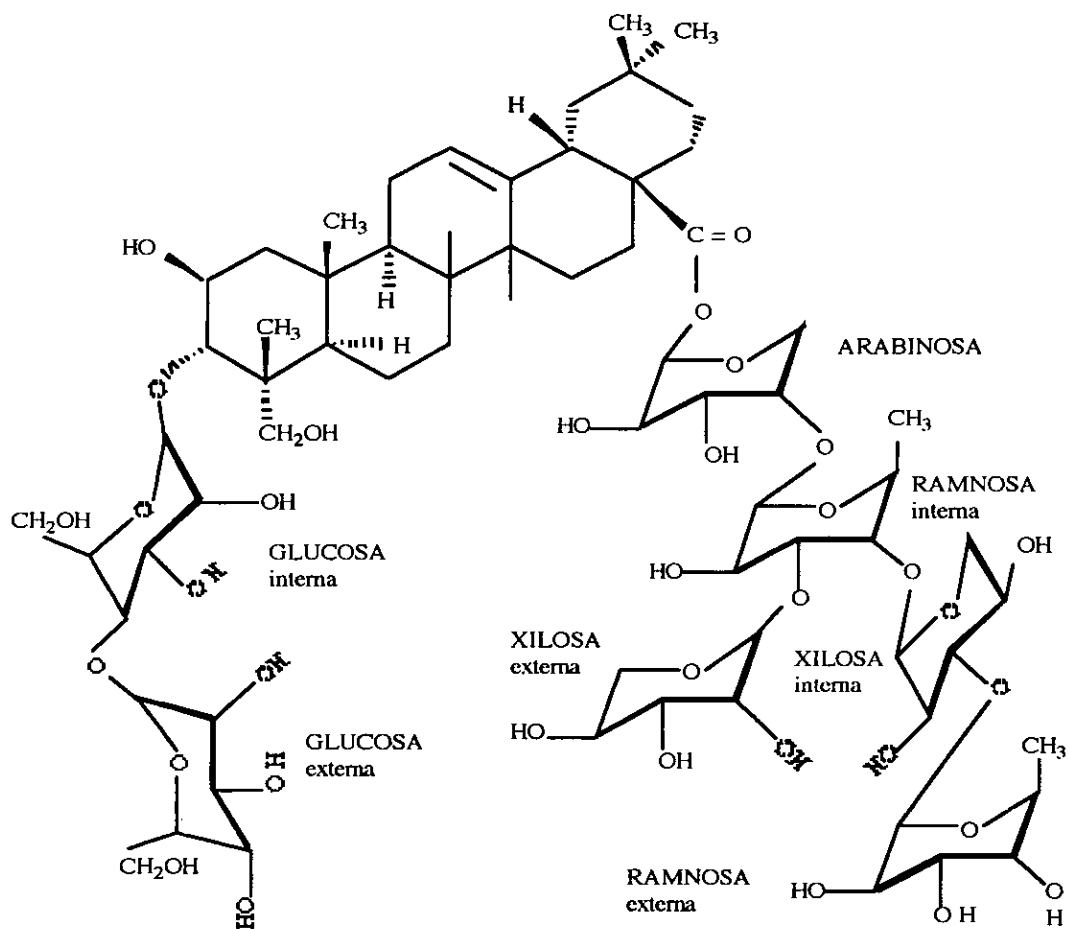


Figura 5. 6 .- Estructura del glucósido F de *Michrosecium helleri* .

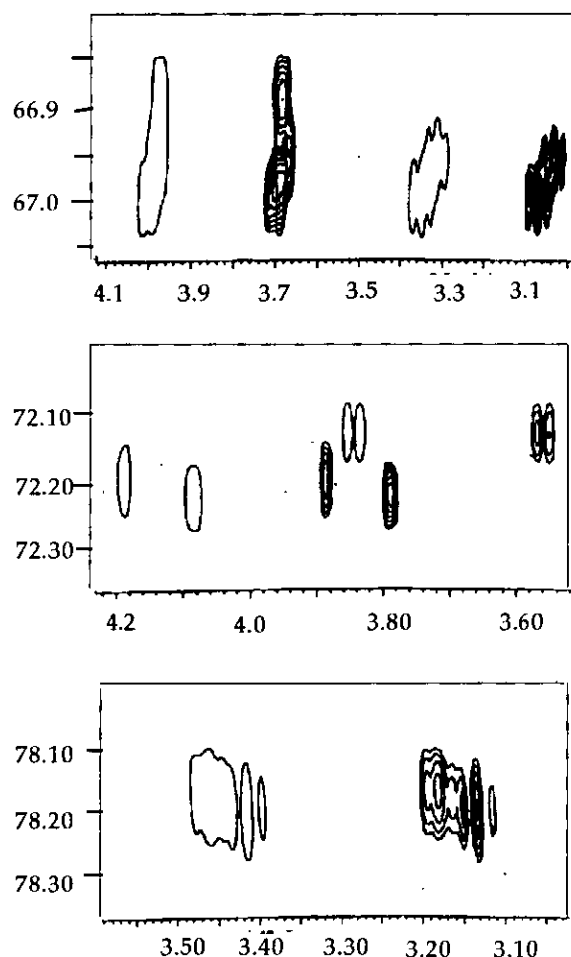


Figura 5. 7.- Expansiones de regiones de señales de metinos de oligosacáridos en el espectro HSQC del glucósido F de amole descritas en el texto. Cada señal de metino aparece como un doblete en antifase, la separación de las señales es el acoplamiento $^1J_{CH}$. Las señales oscuras son positivas y las claras son negativas.

Los **experimentos 7, 8 y 9** se realizaron para determinar el efecto de la concentración del ácido kauradienoico en la disolución. Se preparó una dilución conteniendo 1.5 mg del kaureno y se corrieron los tres experimentos manteniendo los parámetros de adquisición iguales a los de los primeros experimentos (adquiriendo 256 incrementos y con predicción lineal a 1024). Obteniéndose relaciones señal / ruido de 59 : 1 en el experimento 7; de 27 : 1 en el experimento 8 y de 28 : 1 en el experimento 9, que son valores esperados, por lo que la predicción lineal de cuarto orden es confiable aun a diluciones bajas.

HMQC

El **experimento 10** se realizó con las ventanas espectrales completas, 16 transientes por incremento, 256 incrementos y predicción a 1024 y el **experimento 11** con cuatro transientes por incremento, 1024 incrementos y sin predicción lineal con la secuencia de pulsos HMQC, los demás parámetros fueron iguales a los utilizados en los experimentos 4 a 9. Las secciones transversales mostraron que las relaciones señal / ruido de los metilenos en promedio mostraron los valores 160 : 1 en el experimento 10 y 77 : 1 para el experimento 11 sin predicción lineal, resultados coherentes con lo esperado de una diferencia de sensibilidad del doble. Los resultados de los experimentos 10 y 11 corresponden a un 70 - 80 % de los resultados obtenidos en el experimento HSQC, lo cual refleja el efecto negativo de la anchura de la multiplicidad de las señales en f_1 del experimento HMQC en la relación señal / ruido.

En el experimento HMQC se produce un efecto opuesto al observado en el experimento HSQC, en que las señales de CH₂ muestran una disminución en la resolución al aumentar el número de datos en la predicción lineal, debido al incremento en el nivel de ruido y a que permanecieron anchas las líneas en f_1 . Sin embargo para las señales de CH₃ sí se observa un incremento en la relación señal / ruido al aumentar la predicción lineal, asimismo es posible aplicar la predicción lineal para disminuir el tiempo del experimento.

HMBC

El experimento HMBC con su amplia ventana espectral en ¹³C, así como con su estructura de señales múltiples en ¹H a lo largo de f_1 representa un caso especial, las señales que involucran metilos como señales sencillas en f_1 incrementan su resolución y sensibilidad al aumentar la predicción lineal de hasta por lo menos un orden de magnitud de 16. Por lo que conviene procesar los espectros HMBC dos veces, una con predicción lineal de cuatro ordenes de magnitud para la mayoría de los metinos y metilenos y el segundo reprocesamiento con una predicción lineal de mayor magnitud para los metilos y otras señales sencillas.

2QF COSY

Las señales fuera de la diagonal que se obtienen con el espectro 2QF COSY ⁶ consisten de picos con arreglos complejos bidimensionales muy cercanos entre si, la mitad con fase positiva y la otra mitad con fase negativa. Al aplicar la predicción lineal a 2QF COSY a la region alifática del ácido

kauradienoico con una concentración de 1.5 mg / mL, anchura espectral en ambos ejes de 1 770 Hz, colecta de 2048 puntos y llenado con ceros de 4096. El **experimento 12** utilizó ocho transientes por incremento de tiempo, con 256 incrementos de tiempo y predicción lineal a 2048. En tanto que el **experimento 13** utilizó ocho transientes por cada incremento de tiempo, con 2048 incrementos de tiempo sin predicción lineal. Los espectros obtenidos son similares en calidad, aunque el espectro con predicción lineal se realizó en un octavo de tiempo respecto al experimento sin predicción lineal.

COSY

El **experimento 14** se realizó con ventanas espectrales en $f_1 = 3\ 500$ Hz y en $f_2 = 3\ 500$ Hz, 1 024 puntos y 1024 incrementos de tiempo, con llenado de ceros de 2 048 de la secuencia de pulsos COSY. Los espectros fueron procesados con una función pseudo-eco que produce un interferograma con intensidad cero al principio y al final del tiempo de evolución, con un máximo casi a la mitad y por un folding triangular.⁷ El **experimento 14a** fue similar al 14 excepto que los primeros 256 incrementos fueron utilizados y se aplicó la predicción lineal a 1 024. En tanto que el primer cuarto de incrementos de tiempo son experimentales, los incrementos de tiempo predichos contribuyen mas al interferograma que los puntos experimentales. Al utilizar los primeros 512 incrementos de tiempo con predicción lineal a 1024, se obtiene un espectro similar al del otro experimento. La predicción lineal de cuatro ordenes de magnitud funciona mejor cuando se utiliza otra función de apodización, como la multiplicación por una gaussiana a expensas de disminuir la resolución. En el caso de espectros COSY con valor absoluto una predicción lineal de dos ordenes de magnitud es adecuada.

LLENADO CON CEROS

El **experimento 6 e** es un reprocesamiento del experimento 6 con llenado de ceros pero sin predicción lineal, con 256 incrementos de tiempo, llenado de ceros a 2048 y procesamiento del interferograma con una función Gaussiana (tiempo 0.036 seg). El espectro con llenado de ceros mostró señales mas anchas, menos intensas y con anileo que el espectro con predicción lineal. La relación señal / ruido con llenado de ceros es de 79 : 1, comparada con 122 : 1 para el experimento con predicción lineal. El reprocesamiento de datos del experimento 6 e con otra función Gaussiana (tiempo 0.009 seg) eliminó el anileo pero aumentó mas la anchura de las señales y disminuyó aun mas la intensidad de las señales. El **experimento 6 f** se realizó considerando los primeros 128 incrementos de tiempo con llenado de ceros a 2 048, y el **experimento 6 g** se realizó considerando los primeros 64 incrementos de tiempo con llenado de ceros a 2 048, obteniendose espectros con mayor deterioro y la presencia del anileo mas notoria. Resultados similares se obtuvieron al realizar los **experimentos 9 a - c** con 256, 128 y 64 incrementos de tiempo y llenado de ceros a 2 048.

El **experimento 6 h** consistió en reprocesar el experimento 6 con llenado de ceros a 8192 y predicción lineal a 1024, la pérdida de sensibilidad fue menor a 20 % (relación señal / ruido 202 : 1) relativa a la predicción lineal a 4096 con llenado de ceros a 8192 (relación señal / ruido 239 : 1). Los dos espectros obtenidos con reprocesamiento del experimento 9 con predicción lineal a 4096 (**experimento 9 d**) y llenado con ceros a 8192 (**experimento 9 e**) y con predicción lineal a 1024 y llenado con ceros a 8192 tienen aproximadamente la misma relación señal / ruido. Pudiendo considerarse que para espectros con relaciones señal / ruido marginales, la predicción lineal con orden de magnitud mayor a cuatro proporciona poca ventaja sobre el llenado con ceros.

En el espectro COSY del experimento 14 se reprocesó la información utilizando los primeros 256 incrementos de tiempo con llenado de ceros a 2048, se obtuvo un espectro con muchos picos distorsionados. La función Gaussiana utilizada condujo a truncar el interferograma, lo cual se manifiesta en el espectro de valor absoluto como las zonas de ruido t1 ridges. Por lo que el llenado con ceros con orden de magnitud del doble para el espectro COSY en valor absoluto no es recomendable. El reprocesamiento del experimento 12 de 2QF COSY con llenado de cero de 256 a 4096 (**espectro 12 a**), sin predicción lineal produjo un espectro que fue ligeramente menor al del experimento 12 con predicción lineal.

A partir de los resultados anteriores se puede decir que las ventajas de la predicción lineal sobre el llenado con ceros son grandes cuando los interferogramas son truncados y que disminuyen cuando el nivel de la señal se aproxima al nivel del ruido. Este límite que depende del tiempo de evolución máximo f_1 , el tiempo de relajación T_2 y la relación señal / ruido inherente al experimento, es usualmente alcanzada cuando la resolución de los datos se asemeja a la anchura de la línea natural en f_1 .

PREDICCIÓN LINEAL EN f_2

En la predicción lineal en f_1 al duplicar el número de incrementos adquiridos aumenta al doble el tiempo total de adquisición, pero en el caso de f_2 no ocurre lo mismo. El tiempo real de adquisición es una parte del tiempo total del experimento y el número de puntos en f_2 puede aumentar significativamente con mínimo efecto sobre el tiempo total del experimento.

Los datos del experimento 5 fueron reprocesados con los siguientes parámetros: cuatro transientes por cada incremento y 1024 incrementos, utilizando predicción lineal en f_2 a 1024 puntos (**experimento 5 a**). Las señales de los metilenos mostraron una mejora en la resolución en f_2 , pero una disminución en la sensibilidad.

En el **experimento 6 i** se reprocesaron los datos del experimento 6 con predicción lineal en f_1 y f_2 a 1024 puntos, obteniéndose un espectro con pérdida de sensibilidad, resolución y precisión de los picos a comparación de los resultados con predicción lineal en f_1 . En f_2 se pueden detectar dos

problemas importantes, la ventana espectral en f_2 es angosta ocasiona un tiempo de adquisición largo con lo que la mayoría de las señales han decaído antes del inicio de la predicción lineal y que cada FID contiene componentes sinusoidales y cosinusoidales correspondientes a todas las frecuencias en f_2 . En los interferogramas correspondientes a f_1 hay menores frecuencias (solo las asociadas a una frecuencia en f_2), por lo que la predicción lineal en f_2 es mas difícil que en f_1 , lo que sugiere que el llenado con ceros puede ser una alternativa. El experimento 6 fue reprocesado con 512 datos, llenado con ceros a 1024 y con 256 incrementos de tiempo, predicción lineal a 1024 y llenado con ceros a 2048 y al uso de una función de apodización (**experimento 6 j**). El espectro resultante muestra una mejoría en resolución respecto al experimento 6 debido a la mejoría en la resolución de las señales múltiples, la relación señal / ruido mejoró de 122 : 1 a 152 : 1.

5. 2.- Resultados

La predicción lineal en f_1 es una técnica poderosa para mejorar la resolución y sensibilidad de espectros bidimensionales rutinarios y para minimizar el tiempo de adquisición de espectros de la calidad deseada. Para secuencias de correlación heteronuclear $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ con detección inversa el número óptimo de incrementos parece ser de 256 en la mayoría de los casos, con este número de incrementos la predicción lineal en f_1 es muy valiosa al aplicarse a espectros HSQC en los que observa mejoría en la resolución y sensibilidad, así como precisión y exactitud en los desplazamientos químicos de ^{13}C con predicción lineal de hasta un orden de magnitud de 16 veces mayor.

Los experimentos bidimensionales de HMBC y 2QF COSY muestran mejoras con predicción lineal de hasta cuatro veces el orden de magnitud excepto para COSY en la versión de valor absoluto.

La predicción lineal en f_1 de hasta cuatro ordenes de magnitud da mejores resultados que los experimentos con el correspondiente llenado de ceros. En cambio la predicción lineal en f_2 no es ventajosa, pero combinada con un llenado con ceros puede mejorar los resultados.

CONCLUSIONES

- 1.- El uso combinado de técnicas unidimensionales y bidimensionales de RMN moderna, permitió asignar las estructuras moleculares de los nueve glucósidos de la raíz de *Ipomoea stans*, sin realizar ninguna reacción química degradativa o de formación de derivados. Estas estructuras son novedosas y las diferencias entre ellas radican en los ácidos de cadena corta y en la posición que ocupan en el oligosacárido.
- 2.- Se logró elucidar la estructura de dos glucósidos de *Michrosetchium helleri* que además de ser estructuras novedosas, son las primeras moléculas identificadas y reportadas en la literatura de esta planta, usando únicamente métodos de RMN bidimensional moderna.
- 3.- La predicción lineal en f_1 es una técnica poderosa para mejorar la resolución y/o sensibilidad de espectros bidimensionales rutinarios y para minimizar el tiempo de adquisición de espectros de la calidad deseada. Para secuencias de correlación heteronuclear $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ con detección inversa, se determinó que el número óptimo de incrementos es de 256 en la mayoría de los casos. La aplicación de la predicción lineal no afecta precisión y exactitud en la medición de los desplazamientos químicos de ^{13}C .
- 5.- Los glucósidos VI y VII de la fracción B mostraron actividad citotóxica contra las células de OVCAR-5. Los glucósidos de las fracciones A y B no mostraron actividad antimicrobiana contra los cultivos antes mencionados.

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

- 1.- R. Enríquez, I. León, F. Pérez, F. Walls, K. Carpenter, F. Puzzuoli and W. F. Reynolds, *Can. J. Chem.* **70**, 1000 (1992).
- 2.- W. F. Reynolds, M. Yu, R. G. Enríquez, H. González, I. León, G. Magos and M. L. Villarreal, *J. Nat. Prod.* **58** [11], 1730 (1995).
- 3.- I. León, R. G. Enríquez, W. F. Reynolds, M. Yu and M. L. Villarreal, *J. Nat. Prod.* enviado (1998).
- 4.- Ismael León Rivera " Aplicación analítica de la RMN en la elucidación de estructuras orgánicas complejas. Estudio de un oligosacárido de *Ipomoea stans*". Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. 1988.
- 5.- M. Ono, M. Nishi, T. Kawasaki and K. Miyahara, *Chem. Pharm. Bull.* **38** (11), 2986 (1990).
- 6.- R. Pereda, R. Mata, A. L. Anaya, D. B. M. Wickramaratne, J. M. Pezzuto and D. Kinghorn, *J. Nat. Prod.* **56** [4], 571 (1993).
- 7.- C. R. Smith Jr., L. H. Niece, U. F. Zobel and I. A. Wolf, *Phytochemistry* **3**, 289 (1964)
- 8.- L. Gunther, *Phytochemistry* **4**, 29 (1965)
- 9.- P. S. Jagat, S. G. Hari, M. K. Nandu and M. D. Manojit, *Phytochemistry* **12**, 2461 (1973)
- 10.- S. Singh and B. E. Stacey, *Phytochemistry* **12**, 1701 (1973)
- 11.- A. Nikolin, B. Nikolin and M. Jankovic, *Phytochemistry* **17**, 451 (1978)
- 12.- S. N. Khana and P. C. Gupta, *Phytochemistry* **6**, 735 (1967)
- 13.- A. L. Misra and J. D. Tewari, *J. Ind. Chem. Soc.* **30**, 391 (1953)
- 14.- H. Okabe and T. Kawasaki, *Tetrahedron Lett.* 3123 (1970)
- 15.- H. Okabe, N. Koshito, K. Tanaka and T. Kawasaki, *Chem. Pharm. Bull.* **19**, 2394 (1971).
- 16.- H. Wagner und P. Kazmaier, *Tetrahedron Lett.* 2333 (1971)
- 17.- H. Wagner und P. Kazmaier, *Phytochemistry* **16**, 711 (1977).
- 18.- H. Wagner und G. Schwarting, *Phytochemistry* **16**, 715 (1977).

- 19.- H. Wagner, G. Schwarting, J. Varljen, R. Bauer, M. E. Hamdard, M. Z. El-Faer and J. Beal, *Planta Medica* **49**, 154 (1983)
- 20.- L. W. Bieber et al, *Phytochemistry* **25**, 1077 (1985).
- 21.- N. Noda, M. Ono, K. Miyahara and T. Kawasaki, *Tetrahedron* **43**, 17, 3889 (1987).
- 22.- N. Noda, H. Kobayashi, K. Miyahara and T. Kawasaki, *Chem. Pharm. Bull.* **36** [2], 627 (1988).
- 23.- I. Kitagawa, H. Shibuya, Y. Yokokawa, Nam In Baek, K. Ohashi, M. Yoshikawa, A. Nitta and H. Wiriadinata, *Chem. Pharm. Bull.* **36** [4], 1618 (1988).
- 24.- M. Ono, K. Kubo, K. Miyahara and T. Kawasaki, *Chem. Pharm. Bull.* **37**[1], 241 (1989).
- 25.- I. Kitigawa, N. Baek, K. Ohashi, M. Sakagami, M. Yoshikawa and H. Shibuya, *Chem. Pharm. Bull.* **37** (4), 1131 (1989).
- 26.- N. Noda, M. Nishi, K. Miyahara and T. Kawasaki, *Chem. Pharm. Bull.* **36**(5), 1707 (1988).
- 27.- N. Noda, H. Kogetsu, T. Kawasaki, and K. Miyahara, *Phytochemistry* **29**(11), 3565 (1990).
- 28.- M. Ono, T. Fukuunaga, T. Kawasaki and K. Miyahara, *Chem. Pharm. Bull.* **38**(10), 2650 (1990).
- 29.- H. Kogetsu, N. Noda, T. Kawasaki and K. Miyahara, *Phytochemistry* **30**(3), 957 (1991).
- 30.- M. Ono, T. Kawasaki and K. Miyahara, *Chem. Pharm. Bull.* **39**(10), 2534 (1991).
- 31.- N. Noda, H. Kogetsu, T. Kawasaki and K. Miyahara, *Phytochemistry* **31**(8), 2761 (1992).
- 32.- M. Ono, K. Fujimoto, M. Kawata, T. Fukunaga, T. Kawasaki and K. Miyahara, *Chem. Pharm. Bull.* **40**(6), 1400 (1992).
- 33.- M. Ono, K. Kuwabata, T. Kawasaki and K. Miyahara, *Chem. Pharm. Bull.* **40**(10), 2674 (1992).
- 34.- N. Noda, S. Yoda, T. Kawasaki and K. Miyahara, *Chem. Pharm. Bull.* **40**(12), 3163 (1992).
- 35.- M. Ono, T. Ueguchi, H. Murata, T. Kawasaki and K. Miyahara, *Chem. Pharm. Bull.* **40**(12), 3169 (1992).
- 36.- M. Ono, F. Yamada, N. Noda, T. Kawasaki and K. Miyahara, *Chem. Pharm. Bull.* **41**(6), 1023 (1993).
- 37.- M. Ono, K. Nakagawa, T. Kawasaki and K. Miyahara, *Chem. Pharm. Bull.* **41**(11), 1925 (1993).

- 38.- Y. Fang, W. Chai, S. Chen, Y. Zhao, J. Peng, H. Huang and B. Xin, *Carbohydr. Res.* **245**, 259 (1993)
- 39.- N. Noda, N. Takahashi, K. Miyahara and C. Tang, *Phytochemistry* **36**(2), 365 (1994).
- 40.- N. Noda, K. Tsuji, K. Miyahara and C. Yang, *Chem. Pharm. Bull.* **42**(10), 2011 (1994).
- 41.- N. Noda, K. Tsuji, T. Kawasaki, K. Miyahara, H. Hanazono and C. Yang, *Chem. Pharm. Bull.* **43**(6), 1061 (1995).
- 42.- K. Miyahara, X. Du, M. Watanabe, C. Sugimura, S. Yahara and T. Nohara, *Chem. Pharm. Bull.* **44** [3], 481 (1996).
- 43.- M. Bah and R. Pereda *Rev. Latinoamer. Quím.* **24** [2], 112, 113 (1996).
- 44.- I. Kitagawa, N. I. Baek, K. Kawashima, Y. Yokokawa, M. Yoshikawa, K. Ohashi and H. Shibuya. *Chem. Pharm. Bull.* **44** [9], 1680 (1996).
- 45.- I. Kitagawa, N. I. Baek, Y. Yokokawa, M. Yoshikawa, K. Ohashi and H. Shibuya. *Chem. Pharm. Bull.* **44** [9], 1693 (1996).
- 46.- M. Bah and R. Pereda. *Tetrahedron* **52** [41], 13063 (1996).
- 47.- Recent Advances in Phytochemistry. Vol. 29. *Phytochemistry of Medicinal Plants.* J. T. Arnason, R. Mata and J. T. Romeo Eds. Chapter 5, p. 97 - 104. Plenum Press, N. Y. USA 1995.
- 48.- M. Bah and R. Pereda, *Tetrahedron* **53**, 9007 (1997).
- 49.- A. Bashir, A. Hamburger, J. D. Msonthi and K. Hostettmann, *Phytochemistry* **32**, 741 (1993).
- 50.- T. Kawasaki, H. Okabe and Y. Nakatsu, *Chem. Pharm. Bull.* **19**, 1144 (1971).
- 51.- J. A. Linajes Palacios. La raíz de jalapa *Ipomoea purga*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana, México. 1991.
- 52.- J. K. MacLeod, A. Ward and P. B. Oelrichs, *J. Nat. Prod.* **60**, 467 (1997).
- 53.- R. Molyneaux, R. McKenzie, B. Sullivan and A. Elbein *J. Nat. Prod.* **58**, 878 (1995).
- 54.- K. Irakua, H. Miramoto and H. Okabe, *Chem. Pharm. Bull.* **45** [12], 1955 (1997).
- 55.- H. Miramoto, T. Kawasaki and H. Okabe, *Chem. Pharm. Bull.* **45** [5], 786 (1997).
- 56.- M. Ono, T. Kawasaki and K. Miyahara, *Chem. Pharm. Bull.* **37** (12), 3209 (1989).
- 57.- M. R. Bendall, D. M. Dodrell and D. T. Pegg, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 4603 (1981).

- 58.- O. W. Sorensen, G. W. Eich, G. Bodenhausen and R. E. Ernst. *Prog. NMR Spectros.* **16**, 163-92 (1983).
- 59.- H. Kessler, M. Gehrke and C. Griesinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **27**, 490-536 (1988).
- 60.- G. Eich, G. Bodenhausen and R. R. Ernst *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 3731 (1982).
- 61.- G. Bodenhausen and R. Freeman. *J. Magn. Reson.* **28**, 471 (1977).
- 62.- W. F. Reynolds, D. W. Hughes, M. P. Dumont and R. G. Enríquez,
J. Magn. Reson. **63**, 413 (1985).
- 63.- W. F. Reynolds, S. McLean, M. Perpich-Dumont and R. G. Enríquez, *Magn. Reson. Chem.* **27**, 162 (1989)
- 64.- K. A. Carpenter, W. F. Reynolds, J.P. Yang and R. G. Enríquez, *Magn. Reson. Chem.* **30**, S35 (1992)
- 65.- W. P. Aue, E. Bartholdi, and R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **64**, 2229 (1975).
- 66.- L. Braunschweiler and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **53**, 521 (1983).
- 67.- A. Bax, M. Ikura, L. E. Kay, D. A. Torchia and R. Tscudin, *J. Magn. Reson.* **86**, 304 (1990).
- 69.- T. J. Norwood, J. Boyd, J. E. Heritage, N. Soffe and I. D. Campbell, *J. Magn. Reson.* **87**, 488 (1990).
- 70.- A. Bax and M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2093 (1986).
- 71.- J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachman and R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **71**, 4546 (1979).
- 72.- Pulse Field Gradients: Lecture Notes. Paul Keifer, Varian Associates, 1993.
- 73.- A. Bax and S. Pochapsky, *J. Magn. Reson.* **99**, 638 (1992).
- 74.- M. von Kienlin, C. T. W. Moonen, A. van der Toom and P. C. M. van Zijl, *J. Magn. Res.* **93**, 423 (1991).
- 75.- R. E. Hurd, *J. Magn. Reson.* **87**, 422 (1990).

- 76.- A. L. Davis, J. Keeler, E. D. Laue and D. Moskau, *J. Magn. Reson.* **98**, 207 (1992).
- 77.- P. L. Rinaldi and P. A. Keifer. *J. Magn. Reson. Series A*, **108**, 259 (1994).
- 78.- S. Schwartz and R. Schmidt, *J. Chem. Phys.* **69**, 2378 (1977).
- 79.- I. León, R. G. Enríquez, W. F. Reynolds and M. Yu, *Magn. Reson. Chem.* en prensa 1998.
- 80.- K. R. Williams and R. W. King, *J. Chem. Educ.* **67** [4], A 93 (1990).
- 81.- C. M. Contreras, L. Chacón and R. G. Enríquez, *Phytomedicine* **3** [1], 41 (1996)
- 82.- W. F. Reynolds, S. McLean, J. Poplawski, R. G. Enríquez, L. I. Escobar and I. León, *Tetrahedron* **42**, 3419 (1987).
- 83.- S. McLean, M. Perpik-Dumont, W. F. Reynolds, H. Jacobs and S.S. Lachmansing, *Can. J. Chem.* **65**, 2519 (1987).
- 84.- S. McLean, W. F. Reynolds, J. P. Yang, H. Jacobs and L. L. Jean-Pierre, *Magn. Reson. Chem.* **32**, 422 (1992).
- 85.- G. P. Reddy, C. Chang and A. Bush, *Analyt. Chem.* **65** [7], 913 (1993).
- 86.- K. Hostettman and A. Marston, *Saponins*. Cambridge University Press, Cambridge 1995.
- 87.- K. Hiller, G. Baden, G. Reznicek, J. Jurenitsch and W. Kubelba. *Pharmazu* **46**, 405 (1991).
- 88.- J. C. Hoch and A. S. Stern. *NMR Data Processing*. Chapter 2. Wiley - Liss Inc. N. Y. 1996.
- 89.- W. F. Reynolds, M. Yu, R. G. Enríquez and I. León, *Magn. Reson. Chem.* **35**, 505 (1997).
- 90.- W. F. Reynolds, R. G. Enríquez, L. I. Escobar and X. Lozoya, *Can. J. Chem.* **62**, 2421 (1984).

Harald Guenther, 10:24 AM 1/28/199, Your MS R-123, Magnetic Resonance

From: "Harald Guenther" <guenmr@in400.chemie.uni-siegen.de>
Date: Wed, 28 Jan 1998 10:24:40 +0100
X-Mailer: Z-Mail (3.2.0 26oct94 MediaMail)
To: bgranozi@alchemy.chem.utoronto.ca
Subject: Your MS R-123, Magnetic Resonance in Chemistry

Dear Professor Reynolds,
its my pleasure to inform you that your manuscript submitted for the Special Issue is accepted for publication. You should receive the proofs within about 6-8 weeks.

Yours sincerely,
H. Guenther
Editor-in-Chief

Editor in Chief

Prof. Harald Guenther
University of Siegen
FB 8, OC II
Adolf-Reichwein-Str. 2
57068 Siegen
Germany
Phone +49-271-740-4390 or -4400
FAX +49-271-740-2512
e-mail guenmr@in400.chemie.uni-siegen.de

Isolation and Identification by 2D N.M.R. of Two New Complex Saponins from *Michrosechium Helleri*

Ismael Leon¹, Raul Enriquez², Stewart McLean³,
William F. Reynolds^{3*} and Margaret Yu³.

¹Centro de Investigaciones en Quimica, Universidad Autonoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Colonia Champila 62210, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

²Instituto de Quimica, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacan, Mexico, DF 45100

³Department of Chemistry, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada M5S 3H6

* Author to whom correspondance should be addressed

Dedicated to Professor J.D. Roberts on the occasion of his 80th birthday.

Key Words: complex saponins, 2D n.m.r., coupled HSQC

Abstract

Two complex saponins, amole F and amole G have been characterized and spectra assigned using only 1D and 2D n.m.r. methods. Amole F and G respectively have seven or six monosaccharides linked to the triterpene aglycone bayogenin. In addition to standard 2D methods, a series of TOCSY spectra with different mixing times and a high resolution coupled HSQC spectrum were particularly useful for assigning the monosaccharide units. It is concluded that saponins of this complexity are approaching the limit of structural complexity that can be solved by n.m.r. alone, although the limit might be pushed further by access to ultra-high field n.m.r. spectrometers.

Introduction

Microsechium helleri (popularly known as amole) is a little studied plant which grows in Guatemala and the southern region of Mexico¹. Conversations with the inhabitants of the region where it was harvested indicated that traditional uses of aqueous extracts of the rhizomes of this plant are as laundry soap and as a lotion to prevent hair loss. The former use suggested the presence of saponins in the plant since many saponins have detergent properties². However, there appeared to be no pharmacological or phytochemical investigations of this plant reported in the literature. Consequently, we decided to undertake such an investigation. Herein we report the isolation and the identification, mainly by 2D n.m.r., of two complex saponins, amole F and amole G, isolated from a methanolic extract of the roots of Microsechium helleri.

Results and Discussion

Since we were interested in subjecting the two isolated saponins, which were available in limited amounts, to subsequent pharmacological testing, we avoided classical degradative techniques and similar destructive methods which are commonly used in investigating complex saponins². Instead, we used only n.m.r. methods. ¹H, ¹³C and DEPT-edited ¹³C spectra of the two compounds suggested that each was a saponin. They appeared to share a common triterpene

aglycone unit, with amole F having seven associated monosaccharide units while amole G had only six. Many of the ^{13}C peaks in the saccharide region also had identical chemical shifts (within 0.02 ppm) for the two compounds, suggesting close structural similarities for amole F and G.

a) Identification of the Aglycone Unit:

The structure and stereochemistry of the common aglycone unit was determined by a combination of COSY, ROESY, HSQC and HMBC spectra. ROESY spectra were used in place of NOESY since the molecules were found to have correlation times in solution such that n.O.e. effects were near zero³. HSQC spectra were used in place of HMQC spectra to take advantage of the significantly better ^{13}C resolution (and sensitivity) of the former spectra^{4,5}. Two sets of HMBC spectra were acquired with optimization of J_{CH} for 5 Hz and 10 Hz.

The approach used to identify the aglycone unit and to assign its spectrum was similar to that which we had reported earlier for other triterpenes⁶⁻⁸. In particular, 2-bond and 3-bond cross-peaks from methyl protons in the HMBC spectra allow determination and assignment of much of the molecular skeleton of the aglycone. Starting points were provided by a geminal methyl pair (subsequently assigned as C-29 and C-30) and a geminal $\text{CH}_3/\text{CH}_2\text{OH}$ pair (subsequently assigned as C-24 and C-23). These results, in combination with the

results of the COSY and HSQC spectra allowed identification of the aglycone as 2,3,23-trihydroxyolean-12-en-oic acid. The assignment of stereochemistry at C-3 as well as determination that the third OH group was bonded to C-23 rather than C-24 was provided by the ROESY spectra. Key observations included ROESY cross-peaks between H-3 and H1_{axial}, between H-5 and both H-23 protons and between H-24 and H-25 methyl peaks. Finally, the stereochemistry at H-2 was determined from high resolution coupled HSQC spectra⁵ (see below for further discussion). This showed only small (<5 Hz) and unresolved vicinal couplings of H-2 to H-3 and the two H-1 protons, indicating that it was α -equatorial. Other ROESY cross-peaks confirmed the expected stereochemistry of the oleanene skeleton (see 1). Thus, the aglycone is 2 β ,3 β ,23-trihydroxy-olean-12-en-28-oic acid, a known triterpenoic acid with the trivial name bayogenin⁹. The ¹H and ¹³C chemical shifts for bayogenin in the two compounds were identical (within 0.02 ppm) and are listed in Table 1.

b) Structures of the Polysaccharide Portions of Amole F and G.

Inspection of the normal and DEPT-edited spectra of amole F and G suggested that the former contained two hexapyranose units, two 6-deoxy hexapyranose units and three pentapyranose units while the latter had one less hexapyranose unit. However, identification of individual monosaccharide units

proved to be a very challenging task. To aid in this assignment, several additional 2D spectra were obtained, starting with a series of five TOCSY spectra with mixing times ranging from 0.01s to 0.12s. Inspection of cross-sections through anomeric protons (as well as through CH₃ protons for the two 6-deoxy sugars) as a function of mixing time greatly facilitated the identification of sequences of protons in each monosaccharide unit. The HSQC spectra allowed assignments of directly coupled ¹³C-¹H pairs. However, this still left many ambiguities due to numbers of protons with very similar chemical shifts (particularly in the region δ3.15-3.40). Fortunately, many of these ambiguities could be resolved by observation of 2- or 3-bond connectivities in the HMBC spectra between clearly resolved and assignable protons and ambiguous carbons. However, this did not resolve all ambiguities, mainly because of the limited ¹³C resolution in the HMBC spectrum (the presence of ¹H multiplet structure along f₁ in an HMBC spectrum limits resolution to >0.2 ppm, even if sufficient f₁ data points can be collected or linear predicted). Fortunately, high resolution coupled HSQC spectra⁵, which were obtained to aid in stereochemical assignments, allowed us to eliminate the remaining ambiguities. These spectra covered the saccharide region with an f₂(¹H) spectral window of 1775 Hz and an f₁(¹³C) spectral window of 6200 Hz, 2048 data points with zero filling to 8192 and 256 time increments with linear prediction to

2048 and zero filling to 4096. This provided excellent resolution along both axes.

Part of the spectrum for amole F is illustrated in Figure 1. Two partially overlapping peaks are observed at $\delta 78.22$ and $\delta 78.21$ with relatively similar ^1H chemical shifts. Cross-sections through the shoulders of the two peaks showed that the peak at $\delta 78.22$ was bonded to a proton at $\delta 3.27$ while the peak at $\delta 78.21$ was bonded to a proton at $\delta 3.31$. The former was a clean triplet, corresponding to two vicinal couplings of ca 10 Hz, while the latter showed a similar triplet structure but with an additional coupling of ca 4 Hz. The differences in coupling patterns (in conjunction with information from other spectra) aided assignment of the former signal to C-3 of a xylose unit while the latter could be assigned to C-5 of a glucose unit. The same approach helped to resolve other ambiguous assignments.

However, the main advantage of the coupled HSQC spectrum was the useful stereochemical information which it supplied. This included not only the magnitudes of vicinal couplings but also the magnitudes of one-bond ^{13}C - ^1H couplings for anomeric carbons. The latter information is useful because equatorial anomeric protons have $^1J_{\text{CH}} \sim 170$ Hz while the corresponding axial protons have $^1J_{\text{CH}} \sim 160$ Hz¹⁰. There was one additional advantage to the use of coupled HSQC spectra beyond those which we have previously described⁵. In

some cases, protons on adjacent carbons have nearly coincident chemical shifts.

The resultant strong coupling significantly complicates the determination of vicinal coupling constants from either 1D ^1H spectra or most 2D spectra.

However, in a coupled HSQC spectrum, one is determining ^1H - ^1H coupling from a ^1H - ^{13}C - ^{12}C - ^1H unit and the large one-bond ^{13}C - ^1H coupling effectively produces weak ^1H - ^1H coupling¹¹. The information from the coupled HSQC spectrum allowed easy assignment of six of the seven monosaccharides in amole F as two β -glucose units, two α -rhamnose units and two β -xylose units. In the case of glucose and xylose units, this was based on the observation that each methine proton showed large vicinal couplings (ca 10 Hz) to adjacent methine protons (and to one of the C-5 methylene protons of xylose). For rhamnose, the anomeric ^{13}C - ^1H coupling was 171 Hz while H_1 - H_2 and H_2 - H_3 couplings were both small, requiring H_1 and H_2 to both be equatorial. Although the absolute stereochemistries of the individual monosaccharide units were not determined (since this would have required sample degradation), it is assumed that they are β -D-glucose, β -D-xylose and α -L-rhamnose (see 2), based on observations of other plant saponins². Amole G differed in having only one β -glucose unit.

The remaining pentapyranose unit differed from the other monosaccharides in showing only one large vicinal coupling constant, between H-4 and one of the

H-5 protons. Cross-sections through individual carbon peaks in the coupled HSQC spectrum are illustrated in Figure 2. The anomeric ^{13}C - ^1H coupling constant is 172 Hz, suggesting an equatorial orientation for the anomeric hydrogen. This is supported by the observation that H-1 shows stronger cross peaks to C-3 and C-5 than to C-2 in the HMBC spectrum optimized for $J_{\text{CH}} = 10$ Hz, suggesting that H-1 is anti to C-3 and C-5. Vicinal coupling constants for protons H-1 through H-4 are all ca 4 Hz while there is a coupling of ca 10 Hz between H-4 and one of the H-5 protons. These data are entirely consistent with α -arabinose, assumed to be the L-isomer based on observations for related plant saponins². However, the coupling constants indicate that α -arabinose is in its normally less stable¹² ^1C chair conformation (the ^1C chair has three of four OH or OR groups axial compared to only one of four for the alternate $\text{C}1$ chairs, see 2). A possible reason for this observation is provided below. Complete ^1H and ^{13}C chemical shift assignments for the various monosaccharide units are given in Table 2.

The final information required is the linkage sites between monosaccharides and to the aglycone unit. This was easily established from the HMBC spectra. In each case of an interglycosic link, 3-bond connectivity peaks were observed between one anomeric hydrogen and a particular carbon on the second

monosaccharide unit, along with a cross-peak between the corresponding attached proton on the second monosaccharide unit with the anomeric carbon of the first unit. Similarly cross-peaks between H-1 of one glucose and C-3 of the aglycone (and H-3 of the aglycone with C-1 of glucose) established one point of attachment to the aglycone while a clear cross-peak between H-1 of arabinose and the ester carbon (C-28) of the aglycone established the second point of attachment. The interglycosidic links are shown in 1 along with points of attachment to the aglycone. Thus amole F, has the structure 3-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(1-3)- β -D-glucopyranosyl]-28-O- $\{\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1-3)- β -D-xylopyranosyl-(1-4)- $[\beta$ -D-xylopyranosyl-(1-3)]- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- α -L-arabinopyranosyl-(1-)-bayogenin. Amole G differs in having only one glucose ring attached to C-3 of the aglycone.

The α -L-arabinose unit has the aglycone unit O-linked to C-1 and a branched tetrasaccharide unit O-linked to C-2. Adoption of the 1C_4 chair form (see 2) puts these two bulky groups in an anti arrangement, minimizing steric hindrance. Thus, it appears that it is this need to minimize repulsion between attached groups which requires the α -arabinose unit to adopt the normally less stable 1C_4 chair.

Finally, the ROESY spectra show a number of significant interglycosidic n.O.e. peaks within the pentasaccharide unit ester linked to C-28, in addition to those between the pairs of protons at either end of each interglycosidic link. Clearly assignable peaks are listed in Table 3. The presence of these additional peaks suggest there are strongly preferred conformations within the pentasaccharide unit, along with restricted rotation about interglycosidic bonds. The presence of these peaks has potential value in determining the preferred conformation within the pentasaccharide unit. At the same time, they make the ROESY spectra less useful than the HMBC spectra for determining specific sites of interglycosidic links, since the HMBC cross-peaks are specific to these sites while the ROESY cross-peaks are not.

c) Comparisons with Structures of Related Saponins:

Saponins based on a hydroxylated olean-12-en-28-oic acid aglycone unit are the most common of all plant saponins². Of these, 3-hydroxyolean-12-en-28-oic acid and 3 β ,23-dihydroxy-olean-12-en-oic acid are the most common aglycones. Relatively fewer saponins are based on the 2 β ,3 β ,23-trihydroxy compound (bayogenin) found in this investigation². A search of the literature revealed no saponins with an identical structure to either amole F or amole G. However, a series of even more complex saponins with a bayogenin aglycone unit

have been isolated and characterized¹³. Three of these saponins, isolated from Solidago canadensis, have an identical core skeleton to amole F but with one or two additional attached monosaccharide units. The first two compounds have either an α -L-rhamnose unit or a β -D-apiose unit linked to C-3 of the arabinose unit while the third has the same additional α -rhamnose unit plus a β -D-galactose unit linked to C-2 of the terminal rhamnose unit. All three were characterized with the aid of chemical degradation and derivatization, in addition to spectroscopic methods^{13a}. N.m.r. assignments were provided for only the first two compounds^{13b}. These are generally in good agreement with our results with two main exceptions. First, the chemical shifts for the arabinose units were significantly different from those which we have obtained. This is undoubtedly related to the presence of the additional group linked to C-3 of arabinose. With this third attached group, there is a major steric hindrance in either chair form of α -arabinose. In fact, it was concluded that their arabinose units existed in strongly distorted chair conformations^{13b}. Second, there were a much larger number of uncertain assignments in the earlier investigation, *e.g.* 13 in the compound with the one additional α -rhamnose unit^{13b}. This is undoubtedly partly due to the increased spectral complexity but also due to the additional spectral information which was available to us, particularly from the coupled HSQC spectra. For

example, in the earlier work, the carbon at $\delta 78.21$ was tentatively assigned to C-5 of the internal glucose unit while that at $\delta 77.33$ was assigned to C-5 of the external glucose. The main problem in making this assignment was obviously the nearly equal chemical shifts of the two attached protons (see Table 2). Our investigation reverses these assignments. As discussed above, the coupled HSQC spectrum shows that the proton attached to the carbon at $\delta 78.21$ shows a large (ca 10 Hz) and a small (ca 4 Hz) coupling to the two H-6 protons in addition to a diaxial coupling (ca 10 Hz) to H-4. By contrast, the proton attached to the carbon at $\delta 77.33$ shows only one large coupling (to H-4) and two smaller unresolved couplings (see Figure 1). Cross-sections through the two C-6 carbons shows that one of the protons bonded to the carbon at $\delta 62.62$ shows a large vicinal coupling while both protons attached to the carbon at $\delta 62.14$ show small vicinal couplings. Thus the carbon at $\delta 77.33$ is bonded to the carbon at $\delta 62.14$ rather than the carbon at $\delta 62.62$, as previously assigned. Cross-sections through anomeric protons in a TOCSY spectrum with a 0.12s mixing time allowed completion of the glucose assignments by demonstrating that the methylene protons at $\delta 3.71$ and $\delta 3.80$ attached to the carbon at $\delta 62.14$ were part of the same coupled spin system as the anomeric hydrogen at $\delta 4.56$ while the methylene protons at $\delta 3.62$ and $\delta 3.87$ belonged to the same spin system as the $\delta 4.48$ anomeric proton.

d) Consideration of the Limitations of N.M.R. for Determining Structures of Saponins and Complex Polysaccharides

The discussion given immediately above concerning one specific assignment problem clearly illustrates the difficulties in using n.m.r. spectroscopic methods to determine the structure and assign the spectrum of a compound of this level of complexity. In certain important ways, the investigation of a complex polysaccharide is more difficult than the investigation of a protein of higher molecular weight. First, almost all of the ^1H and ^{13}C chemical shifts occur in much narrower spectral windows for a polysaccharide than for a protein. Second, the individual peptide fragments are bonded in a regular and predictable fashion in a protein whereas a hexapyranose unit can be linked to an adjacent monosaccharide through one of C-1, C-2, C-3, C-4 or C-6. Finally, polysaccharides have only two spin $\frac{1}{2}$ nuclei compared to three for a doubly labelled protein, limiting the possibilities of spreading frequency information along three or four axes. The possibility of using 3D methods for polysaccharide structure elucidation has been discussed¹⁴. However, it would be difficult to obtain adequate resolution along the two time-incremented axes, even with the aid of linear prediction¹⁵, in any reasonable time. This problem is further aggravated by the necessity of working

at natural ^{13}C abundance. These problems balance against the larger number of assignments for a protein to create a problem of comparable difficulty.

Based on this investigation, we doubt if it will be generally feasible to use n.m.r. methods alone to characterize a polysaccharide much more complex than amole F, at least while working at magnetic field strengths commonly available in Chemistry laboratories. If one has sufficient sample to allow degradative methods, combined with chemical derivatization to identify individual monosaccharides, the degree of complexity of problems which can be tackled successfully can be at least modestly increased¹³. However, if one wishes to determine structures of more complex polysaccharides by spectroscopy alone, the only viable solution appears to be access to higher field spectrometers. Since these molecules are still of low enough molecular weight to produce sharp ^1H and ^{13}C peaks, the 60% increase in spectral dispersion on going from 500 to 800 MHz would be of great value in resolving spectral ambiguities.

Experimental

- a) Isolation of Amole F and G: *Michrosecium helleri* was collected in May 1993 in Santiago Tlazoyoaltepec, Municipio Elta, Oaxaca, Mexico. A voucher specimen is deposited at the IMSS herbarium in Mexico City. The rhizomes were cut in slices, air dried and extracted successively with hexane, CH_2Cl_2 and CH_3OH . The methanolic extract was injected into an HPLC system (Varian 1090)

using $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ in 3:1 proportion with a flux of 1ml/min at 31°C , on a C18 reverse phase column of 300 mm length, 4 mm i.d. Peaks were detected with a UV detector (Varian 5090) at 220 nm. Several peaks were observed in the chromatogram of which two were purified by repeat HPLC injections, yielding 8mg of amole F and 10 mg of amole G.

b) N.M.R. Spectral methods: All spectra were collected on a Varian Unity 500 spectrometer, equipped with an inverse detection 5 mm probe (90°H pulse width $9.5\mu\text{s}$, ^{13}C 90° decoupler pulse width $9.4\mu\text{s}$). Spectra were collected for samples in CD_3OD at a probe temperature of 25°C . Peak positions of the residual CD_2H peak ($\delta 3.30$) and the $^{13}\text{CD}_3$ peak ($\delta 49.02$) were measured relative to internal $(\text{CH}_4)_3\text{Si}$ on the solutions used in the experiments. In subsequent, experiments, most measurements were then made relative to the CD_2H and $^{13}\text{CD}_3$ peaks to allow narrowing of spectral windows. Most experiments were run using standard Varian software, except for the coupled HSQC spectra which were obtained with minor modification of the standard HSQC pulse sequence⁵. ^1H and ^{13}C spectra were respectively obtained with spectral windows of 2900 Hz and 23000 Hz, 32768 points (zero filled to 65536) and 60° pulses. HMBC spectra were obtained using the same ^1H and ^{13}C spectral windows as listed above, 1024 data points (zero filled to 2048), 256 time increments (linear predicted to 2048 with zero filling to 4096); a 0.6 s relaxation delay and 80 transients per increment.

Decoupled HSQC spectra were obtained with the same ^1H spectral window and data points as above, a ^{13}C spectral window of 17000 Hz, again with 256 increments linear predicted to 2048, a relaxation delay of 2.0 s (to minimize decoupler heating), a BIRD nulling delay of 0.3 s and 16 transients per increment. Many of the acquisition parameters for the coupled HSQC spectra are described in the text. In this case a BIRD null delay of 0.85s was used (chosen to minimize OH and CD_2H peaks) along with a relaxation delay of 0.5s, with 16 transients per increment. All of the above 2D spectra were acquired and processed in phase sensitive mode, except for the HMBC spectra which were processed mixed mode (phase sensitive along f_1 and absolute value along f_2), as recommended by the original authors¹⁶. Gaussian weighting was used in all cases except for the absolute value HMBC axis where a 1/3 shifted sine bell was used.

COSY spectra were acquired in absolute value mode with 2900 Hz spectral windows along both axes, 1024 data points and time increments (both zero filled to 2048), 16 transients per increment and a 0.6s relaxation delay. Pseudoecho processing was used along both axes, followed by triangular folding. TOCSY spectra and ROESY spectra were both measured in phase sensitive mode, using the same spectral windows and data points as for COSY, 16 transients per increment, 256 increments (linear predicted to 1024 with zero filling to 2048) and relaxation delays of 1.5 s. Isotropic mixing times for TOCSY spectra ranged from

0.01 s to 0.12 s while the ROESY spin-lock duration was 0.15 s. Gaussian weighting was used for both spectra.

Akcnnowledgments

Financial support from CoNaCyT (Mexico), DGAPA (Mexico) and NSERCC (Canada) is respectively acknowledged by IL, RGE and WFR.

References

1. J.V.A. Dieterle, *Fieldiana: Botany*, 24, part XI, 358 (1976)
2. K. Hostettmann and A. Marston, "Saponins", Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
3. D. Neuhaus and M.P. Williamson, "The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis", VCH, New York, 1989.
4. A. Bax, M. Ikura, L.E. Kay, D.A. Torchia and R. Tschudin, *J. Magn. Reson.* 86, 304 (1990).
5. W.F. Reynolds, S. McLean, L.-L. Tay, M. Yu, R.G. Enriquez, D.M. Estwick and K.O. Pascoe, *Magn. Reson. Chem.* 35, 455 (1997).
6. W.F. Reynolds, S. McLean, J. Poplawski, R.G. Enriquez, L.I. Escobar and I. Leon, *Tetrahedron*, 42, 3419 (1986).
7. S. McLean, M. Perpich-Dumont, W.F. Reynolds, H. Jacobs and S.S. Lachmansing, *Can. J. Chem.* 65, 2519 (1987).
8. S. McLean, W.F. Reynolds, J.-P. Yang, H. Jacobs and L.L. Jean-Pierre, *magn. Reson. Chem.* 32, 422 (1992).
9. R.A. Eade, J.J.H. Simes and B. Stevenson, *Austral. J. Chem.* 16, 900 (1963).
10. A.S. Perlin and B. Casu, *Tetrahedron Lett.* 2921 (1969).
11. This corresponds to the long established technique of using ^{13}C satellite peaks in ^1H spectra to determine coupling between otherwise magnetically

equivalent protons (A.D. Cohen, N. Sheppard and J.J. Turner, Proc. Chem. Soc. (London) 188 (1958)).

12. P.L. Durette and D. Horton in "Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, volume 26, p.49, Academic Press, New York, 1971.
13. (a) K. Hiller, G. Baden, G. Reznicek, J. Jurenitsch and W. Kulbelka, Pharmazu 46, 405 (1991). (b) G. Reznicek, J. Jurenitsch, M. Plasun, S. Korhammer, E. Haslinger, K. Hiller and W. Kublka, Phytochem. 30, 1629 (1991).
14. S. T. Thilborg, C. Cornett and E. Lemmich in "Saponins Used in Traditional and Modern Medicine", G. Waller and K. Yamasaki, ed., p. 151, Plenum Press, N.Y., 1996.
15. W.F. Reynolds, M. Yu, R.G. Enriquez and I. Leon, Magn. Reson. Chem., 35, 505 (1997).
16. A. Bax and M.F. Summer, J. Am.Chem. Soc., 108, 2093 (1986).

Table 1: ^{13}C and ^1H Chemical Shifts for Bayogenin Aglycone in Amole F^a (in ppm relative to $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ in CD_3OD).

Carbon ^b	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{\text{c}}$		Carbon	δ_{C}	δ_{H}	
		axial	equatorial			axial	equatorial
1	44.38	1.14	2.05	16	23.74	2.02	1.66
2	71.19	-----	4.31	17	48.24	-----	-----
3	83.92	3.61	-----	18	42.66	2.89	-----
4	42.96	-----	-----	19	47.11	1.71	1.12
5	48.18	1.30	-----	20	31.61	-----	-----
6	18.79	1.45	1.50	21	34.88	1.40	1.20
7	33.53	1.28 1.59	1.32	22	33.33	1.74	1.56
8	40.74	-----	-----	23	65.76	-----	3.24, 3.61
9	49.31	1.56	-----	24	14.81	0.94	-----
10	37.54	-----	-----	25	17.60	1.28	-----
11	24.70	1.99	1.89 1.92	26	18.04	0.78	-----
12	123.94	5.30	-----	27	26.39	1.16	-----
13	144.99	-----	-----	28	177.74	-----	-----
14	43.15	-----	-----	29	24.03	0.92	-----
15	28.88	1.65	1.14	30	33.53	-----	0.89

^a Chemical shifts for the same aglycone in amole G agreed within 0.02 ppm with those listed here.

^b Numbering as in 1.

^c Assignment of individual protons as axial or equatorial was determined from width of multiplets in HSQC spectra and presence or absence of 1-3 diaxial peaks in ROESY spectra.

Table 2: ^{13}C and ^1H Chemical Shifts for Monosaccharide Units in Amole F and G (in ppm relative to $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ in CD_3OD)

Monosaccharide ^a	Carbon	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	S_{H}^{b}	$(J_{\text{CH}})^{\text{c}}$	Monosaccharide	Carbon	δ_{C}	δ_{H}	(J_{CH})
A	1	93.80	5.66	(172)	X_2	1	106.05	4.54	(161)
	2	75.61	3.79			2	75.32	3.26	
	3	70.50	3.90			3	78.22	3.26	
	4	66.77	3.82			4	71.04	3.47	
	5	63.31	3.49(e),3.89(a)			5	67.04	3.22(a),3.85(e)	
R_1	1	101.00	5.00	(171)	G_1	1	105.12	4.48	(159)
	2	72.22	4.03			2	74.72	3.46	
	3	82.16	3.87			3	87.95	3.53	
	4	78.83	3.67			4	69.50	3.48	
	5	69.03	3.71			5	77.33	3.30	
	6	18.36	1.25			6	62.14	3.71,3.80	
R_2	1	102.66	5.14	(171)	G_2	1	105.24	4.55	(161)
	2	72.27	3.93			2	75.49	3.27	
	3	72.16	3.97			3	77.79	3.36	
	4	73.97	3.38			4	71.54	3.26	
	5	69.96	4.00			5	78.21	3.31	
	6	17.90	1.23			6	62.62	3.62,3.87	
X_1	1	104.80	4.70	(163)	$\text{G}_1\text{G}^{\text{d}}$	1	105.48	4.43	(160)
	2	76.28	3.19			2	75.39	3.27	
	3	84.39	3.38			3	78.21	3.36	
	4	70.21	3.49			4	71.09	3.36	
	5	66.95	3.16(a) 3.82(e)			5	77.73	3.27	
	6				6	62.28	3.70,3.80		

^a Labelling of monosaccharides as illustrated in 1. A = α -L-arabinose, G = β -D-glucose, R = α -L-rhamnose, X = β -D-xylose.

^b Chemical shifts were determined for amole F, unless otherwise indicated. The corresponding ^1H and ^{13}C chemical shifts for all A, R and X monosaccharides in amole G agreed within 0.02 ppm with those for amole F.

^c $^1J_{\text{CH}}$ for anomeric carbon (in Hz), determined from a coupled HSQC spectrum.

^d Data for single β -D-glucose unit in amole G.

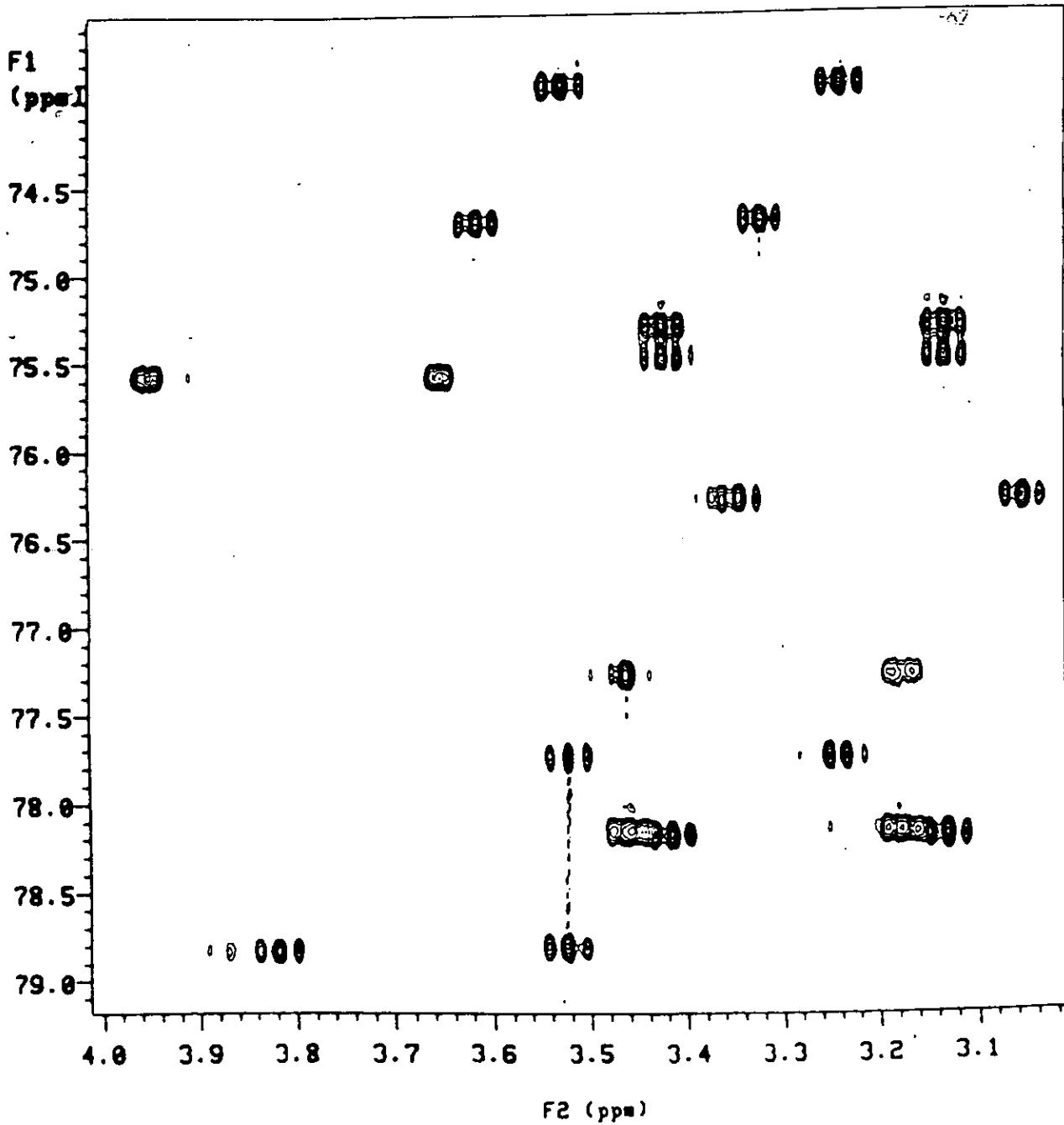
Table 3: Assignable Interglycosidic n.O.e Peaks from ROESY Spectrum of Amole F.

A (1) - R ₁ (5) ^a	R ₁ (4) - X ₂ (1)
A (2) - R ₁ (1)	R ₂ (1) - X ₁ (2)
R ₁ (3) - X ₁ (1)	R ₂ (1) - X ₁ (3)
R ₁ (4) - X ₁ (1)	R ₂ (5) - X ₁ (3)
R ₁ (5) - X ₁ (1)	G ₂ (1) - G ₁ (3)
R ₁ (2) - X ₂ (1)	G ₂ (1) - G ₁ (4)
R ₁ (3) - X ₂ (1)	

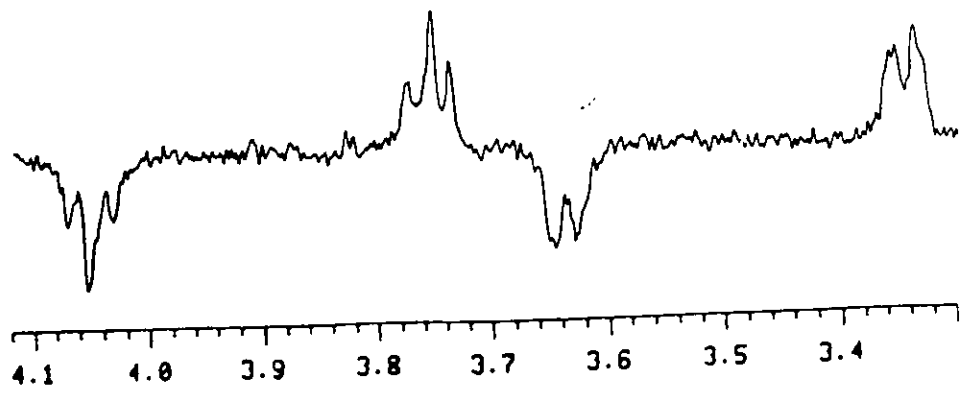
^a Letter with or without subscript corresponds to monosaccharide defined in 1. Number in brackets corresponds to the proton within that monosaccharide unit for which an n.O.e. peak is observed.

Figure 1: Expansion illustrating one region of the coupled HSQC spectrum of amole F. Both positive and negative contours are plotted to allow clearer observation of multiplet patterns.

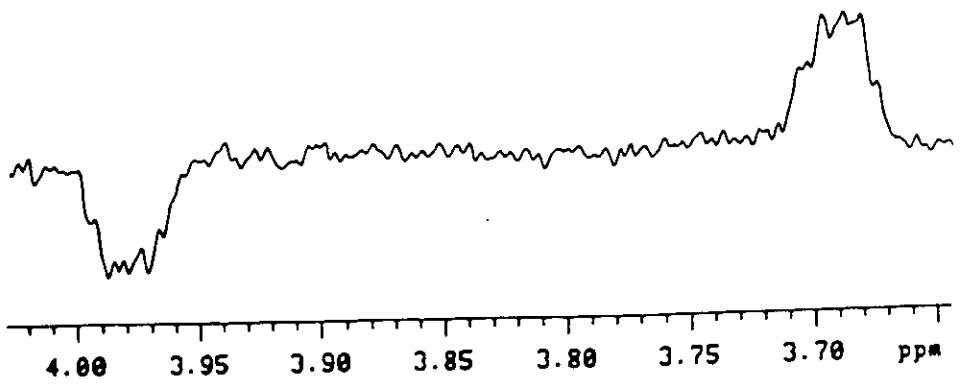
Figure 2: Cross-sections through individual carbons of arabinose from the coupled HSQC spectrum of amole F.



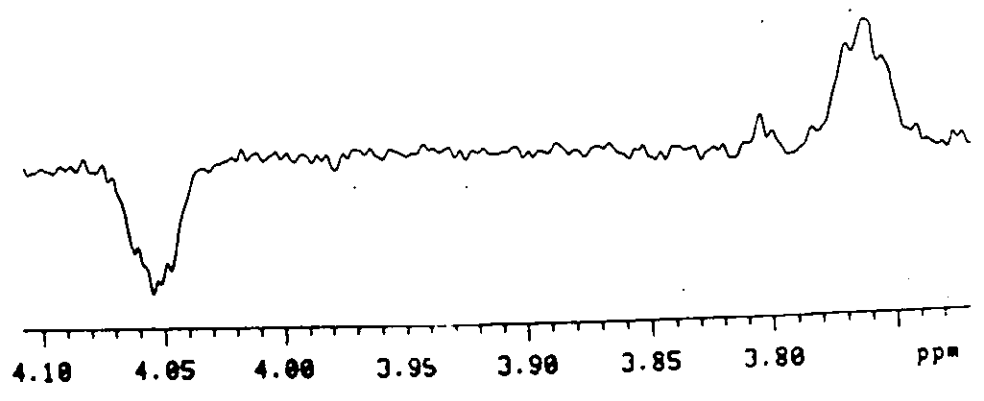
e) C-5



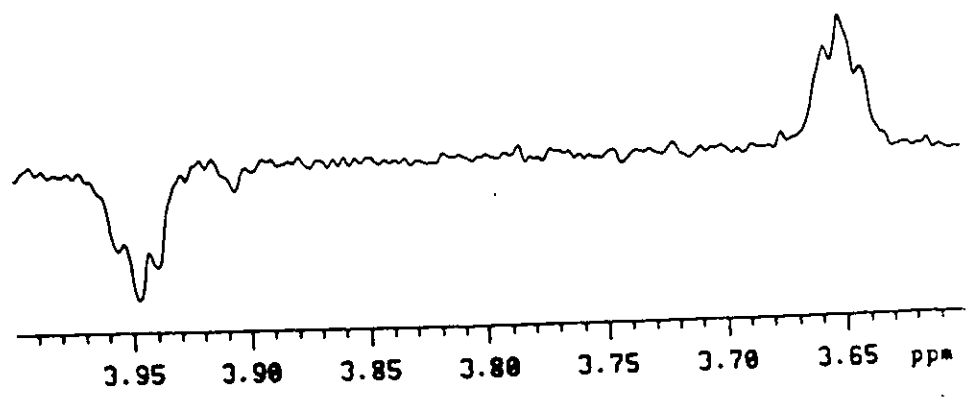
d) C-4



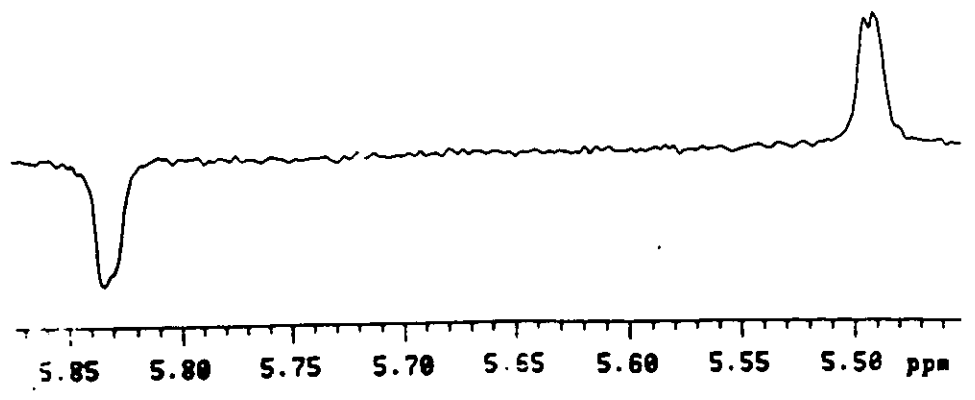
c) C-3

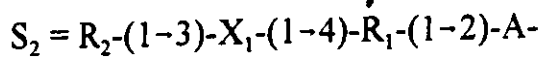
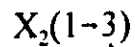
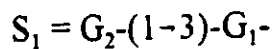
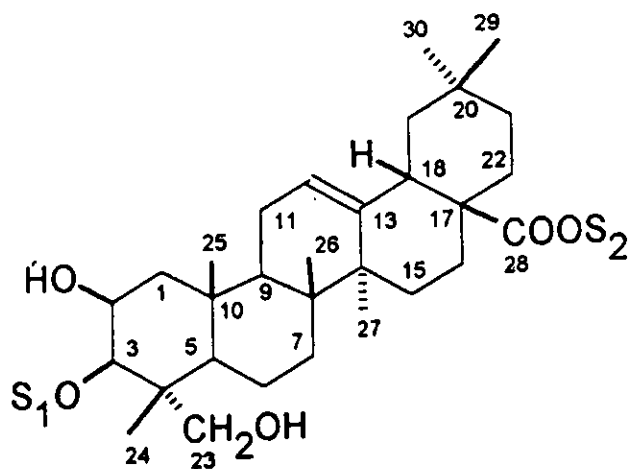


b) C-2



a) C-1





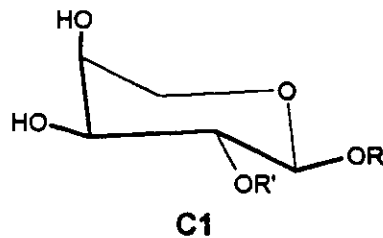
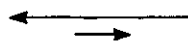
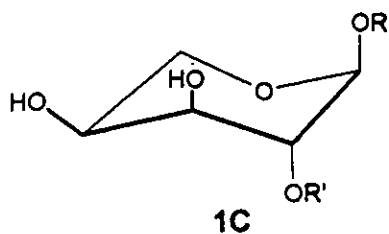
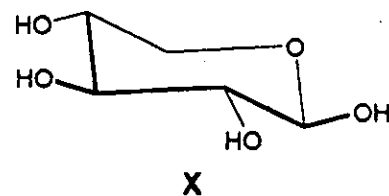
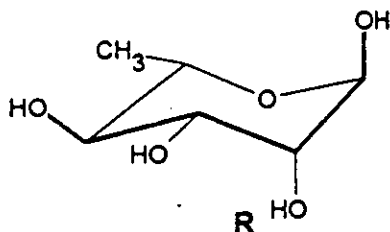
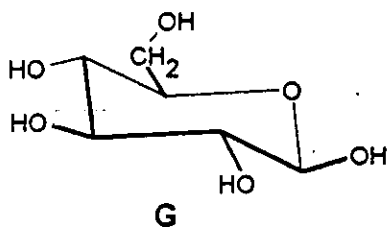
G = β -D-Glucose

R = α -L-Rhamnose

X = β -D-Xylose

A = α -L-Arabinose

1



R = Aglycone

1C, C1 = Chair conformations of A

R' = Tetrasaccharide

2

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF FIVE NEW
CYTOTOXIC TETRASACCHARIDE GLYCOSIDES FROM
IPOMOEA STANS**

Ismael León

**Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma
del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001 Col.
Chamilpa 62210 Cuernavaca , Morelos, México**

Raúl G. Enríquez

**Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de
México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México D. F.
, 04510 Mexico**

William F. Reynolds and Margaret Yu

**Department of Chemistry, University of Toronto. Toronto ,
Ontario , M5S 1A1 , Canada**

and Maria L. Villarreal

**Centro de Investigación Biomédica del Sur, I. M. S. S. ,
Argentina 1, Xochitepec, Morelos, Mexico**

Key words: *Ipomoea stans*, Convolvulacea, oligosaccharides, 2D NMR.

ABSTRACT

Five new tetrasaccharide glycosides, differing from the previously reported in the type of short-chain fatty acids ester linked to the tetrasaccharide core, have been isolated and identified from an oligosaccharide fraction of *Ipomoea stans* Cav. (Convolvulacea). Two of the structures of the new glycosides have only two short-chain acids esterified on the sugar units. Preliminary screening tests showed glycoside VII had pronounced cytotoxicity toward two human tumor cell lines.

INTRODUCTION

Aqueous infusions of the root from *Ipomoea stans* Cav. have been used in Mexican traditional medicine for treating epileptic seizures¹. We continue our phytochemical investigation of this species in the hope of isolating and identifying pharmacologically useful compounds. Two oligosaccharide fractions of different polarity were isolated from the root of *Ipomoea stans*, with the components of the less polar fraction already identified^{2,3} and the more polar fraction having inhibition of epileptic convulsions⁴. Preliminary tests of the more polar oligosaccharide fraction showed that is a mixture of closely related compounds. Detailed characterization of the glycosidic acid derivative using 2D NMR allowed identification of the acid as (S)-11-hydroxypalmitic acid-11-O- β -quinovopyranosil-(1-4)- α -rhamnopyranosil-(1-2)- β -glycopyranosil-(1-2)- β -quinovopyranoside².

We now report the results of further study on *Ipomoea stans* Cav. involving the isolation and identification of five new tetrasaccharide glycosides from the more polar fraction, and their preliminary screening for cytotoxic activity.

RESULTS AND DISCUSSION

The more polar oligosaccharide fraction from the ethyl acetate extract from the root of *Ipomoea stans* Cav. was separated by HPLC in the reverse mode phase. The integration areas suggested that these fractions, listed in order of increasing retention time, were present in relative amounts of IV A 10 %, IV B 10 %, V 40 %, VI 20 %, VII 20 %. Each compound was present with a purity of 90 - 95 %.

A combination of ^1H and ^{13}C NMR spectra in conjunction with COSY⁵, TOCSY⁶, HMQC⁸, HMBC⁹ and ROESY⁷ NMR experiments were used to assign structures and spectra of glycosides IVA, IVB and VII. Glycosides V and VI were assigned using COSY¹¹, HSQC¹², HMBC¹³ and ROESY spectra, with the first spectra obtained using pulse field gradient versions of these sequences.

^{13}C NMR assignments were obtained with HMQC or HSQC spectra via one bond ^{13}C - ^1H correlations, while HMBC spectra were used to assign the linkage sites within the tetrasaccharide core as well as the sites of esterification by short-chain fatty acids. The former were determined from observed three-bond ^1H -C-O- ^{13}C -H correlations between different monosaccharide units while the later were determined from three-bond ^1H -C-O- ^{13}C =O correlations between sugar protons and ester carbonyl groups. The linkage sites within the tetrasaccharide core were confirmed by ROESY cross-peaks between the pairs of protons on the carbons forming the C-O-C linkages.

The structures of five new tetrasaccharide glycosides differ in the identities of the short-chain fatty acids and ^{13}C and ^1H NMR spectral data for these compounds are given in tables 2-6. No chemical shifts data are reported for the hydroxipalmitic acid carbons and protons since these differed little from compound to compound and are very close to those previously reported². The main differences for the saccharide carbons and protons for the five compounds reported here are shown by C-6 (and to a less extent C-1 and C-5) of glucose, depending whether or not the CH_2OH is esterified. C-2 of rhamnose also shows some variation as the attached fatty acid is changed. There is one earlier report of the isolation from *Convolvulus scanononia* of two compounds with the same glycosidic acid¹⁴. However neither of those

compounds was identical to any of our compounds, since both had a tiglic acid ester at C-4 of the terminal quinovose.

The new compounds were subjected to a cytotoxic bioscreening assay using cultured cells representing colon carcinoma (HCT-15), UISO and OVCAR-5. Determined ED₅₀ values, using solutions of each compound, gave the following results

TABLE 1
CYTOTOXICITY ($\mu\text{g} / \text{mL}$)

Glycoside	HCT-15	OVCAR-5	UISO
IV A	26.3	34.7	24
V	100	25.1	26.3
VI	26.3	5.5	25.1
VII	24	1.5	4.0

According to NCI guidelines pure compounds with ED₅₀ values < 4 $\mu\text{g} / \text{mL}$ are considered active¹⁵, so the glycoside VII is the active compound in the more polar fraction of *Ipomoea stans* and specifically against OVCAR-5 and UISO. By comparing the results of the pure compounds with the earlier result for the crude fraction, we see that the cytotoxic activity of the more polar fraction is due to the glycoside VII.

Tricolorin A¹⁶ a structurally similar tetrasaccharide glycoside from *Ipomoea tricolor* also shows cytotoxic activity against P-338 and human breast cancer cells (ED₅₀ = 2.2 $\mu\text{g} / \text{mL}$). The observation of both cytotoxic and antibacterial activity in different tetrasaccharide derivatives emphasizes the value of carrying out more detailed structure-activity investigations for such derivatives. Cytotoxic activity seems to be unusually sensitive to minor variations in structure of these derivatives, as illustrated by the significant differences in cytotoxicity of glycosides VI and VII which have very similar structures.

In conclusion, glycosides IVA, IVB, V, VI and VII from the more polar chromatographic fraction of *Ipomoea stans* are macrocycles differing from the previously reported glycosides of less polar fraction in the type of short-chain fatty acids. The structures of glycosides VI and VII differ from the others in which they do not contain a short-chain acid in the glucose unit and these structures are similar to those reported for *Convolvulus scanononia*¹⁴ but differing in the absence of tiglic acid in the external quinovose. The higher polarity of the fraction of *Ipomoea stans* presumably reflects the fact that each of the isolated compounds in this fraction have one or more free OH in the tetrasaccharide unit than the compounds from the less polar fraction. Glycoside VII is the only one of all the new glycosides which shows a specific and high cytotoxicity activity.

EXPERIMENTAL

Glycosides IV A, IV B and VII were analyzed on a VARIAN UNITY 500 spectrometer equipped with a 5 mm inverse detection probe at 25 °C. Proton and carbon chemical shifts were referenced to internal tetramethylsilane (TMS). 10 mg of each oligosaccharide were dissolved in ca. 0.75 mL of acetone d₆. The COSY⁵, TOCSY⁶, HMQC⁸, HMBC⁹ and ROESY⁷ experiments were carried out using standard Varian software. COSY spectra were acquired in absolute value mode while TOCSY, ROESY and HMQC spectra were acquired in phase-sensitive mode and HMBC was processed using mixed-mode processing (phase sensitive along f1, absolute value along f2). Mixing times of 0.1 sec were used for TOCSY and ROESY experiments while HMBC experiments were optimized for 8 Hz coupling constants. A BIRD nulling delay of 0.25 seg was used for HMQC while J filters, BIRD pulses and HMQC delays were all set corresponding to J = 155 Hz.

Glycosides V and VI were analyzed on a VARIAN UNITY 500 spectrometer equipped with a 5 mm inverse pulse field gradient probe at 25 °C. Proton and carbon chemical shifts were referenced to internal tetramethylsilane (TMS). 10 mg of each oligosaccharide were dissolved in ca. 0.75 mL of acetone d₆. The pulse field gradient experiments COSY¹⁰, HMQC¹¹, HMBC¹² and ROESY¹³ experiments were carried out using standard Varian software.

Plant material

Samples of *Ipomoea stans* were collected near km marker 93 on the Puebla-Orizaba highway, in the state of Puebla, Mexico. Botanical classification was carried out by Dr. M. Martínez, Instituto de Biología, UNAM, and a voucher specimen (No. 2691) is on deposit at the IMSS Herbarium in Mexico City.

Extraction and isolation

The isolation and separation of the two oligosaccharide fractions is described in Ref. 1. Further separation of the more polar oligosaccharide fraction was carried out with a VARIAN 9010 liquid chromatograph with a VARIAN variable wavelength UV detector model 9050 set at 220 nm. A semiprep. (250 x 4 mm) MCH-10 column and a mixture of CH₃CN - H₂O (60 : 40) , in isocratic mode with a flux of 2 mL / min at 30 °C, were found to give good separation. Elution of all components was complete within 35 min. Up to 1.2 mg of sample per injection could be used without losing resolution. Repeated injections were carried out until ca. 20 mg of the major components were collected, along with lesser amounts of the minor components.

Biological testing

The HCT-15, UISO and OVCAR-5 cell lines were maintained in RPMI culture medium with 10 % fetal bovine serum (FBS). all cell lines were cultured at 37 °C in an atmosphere of 5 % CO₂ in air (100 % humidity). The cells at a log phase of their growth were treated in triplicate at various concentrations of the compounds (0.5 - 100 µg / mL), and incubated for 72 hr at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂. The cell concentration was determined by protein analysis. results were expressed as the dose that inhibits 50 % control growth after the incubation period (ED₅₀). The values were estimated from a semi-log plot of the drug concentration (µg / mL) against the percent of viable cells.

Acknowledgments

Financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to W.F.R. , CONACYT to I.L.R. and Instituto Mexicano del Seguro Social to M.L.V. is gratefully acknowledged. We also acknowledge to Paul Keifer from VARIAN ASSOCIATES, for running the experiments in the pulse field gradient version.

LITERATURE CITED

- 1.-J. L. Díaz, " Usos de las Plantas Medicinales de México " Monografías Científicas II, IMEPLAM, México 1976, p. 329.
- 2.-R. G. Enríquez, I. Leon, F. Perez, F. Walls, K. A. Carpenter, F. V. Puzzuolli and W. F. Reynolds. *Can. J. Chem.* **70**, 1000 (1992).
- 3.-W. F. Reynolds, M. Yu, R.G. Enriquez, H. Gonzalez, I. Leon, G. Magos and M. L. Villarreal *J. Nat. Prod.* **58**, 1730 (1995).
- 4.- C. M. Contreras , L. Chacon and R. G. Enríquez. *Phytomedicine* **3**, 41 - 44 (1996).
- 5.- W. P. Aue, E. Bartholdi and R. Ernst. *J. Chem. Phys.* **64**, 2229 (1976)
- 6.- D. Bax and D. G. Davis. *J. Magn. Reson.* **65**, 355 (1985)
- 7.- A. A. Bothner-By, R. L. Stephens, J. Lee, C. D. Warren and W. Jeanloz. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 811 (1984)
- 8.- A. Bax and S. Subramanian. *J. Magn. Reson.* **67**, 565 (1986)
- 9.- A. Bax and M. F. Summers. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2093 (1986)
- 10.- N. Noda, H. Kogitsu, T. Kawasabe and K. Mijahara *Phytochemistry* **29**, 3565 (1990)

- 11.- R. E. Hurd. J. Magn. Reson. 87, 422 - 428 (1990).
- 12.- L. E. Kay, P. A. Keifer and T. Saarinen. J. Am. Chem. Soc. 114, 10663 (1992).
- 13.- P. L. Rinaldi and P. A. Keifer. J. Magn. Reson. Series A, 108, 259 (1994).
- 14.- N. Noda, H. Kogitsu, T. Kawasabe and K. Mijahara. Phytochem. 29, 3565 (1990).
- 15.- R. I. Geran, N. H. Greenberg, M. M. McDonald, A. M. Cchumacher and B. J. Abbott. Cancer Chemoter. Rep. Part 3, 1 (1972).
- 16.- R. Pereda-Miranda, R. Mata, A. L. Anaya, D.B.M. Wickramaratne, J. M. Pezzuto and A. D. Kinghorn. J. Nat. Prod. 56, 571 (1993).

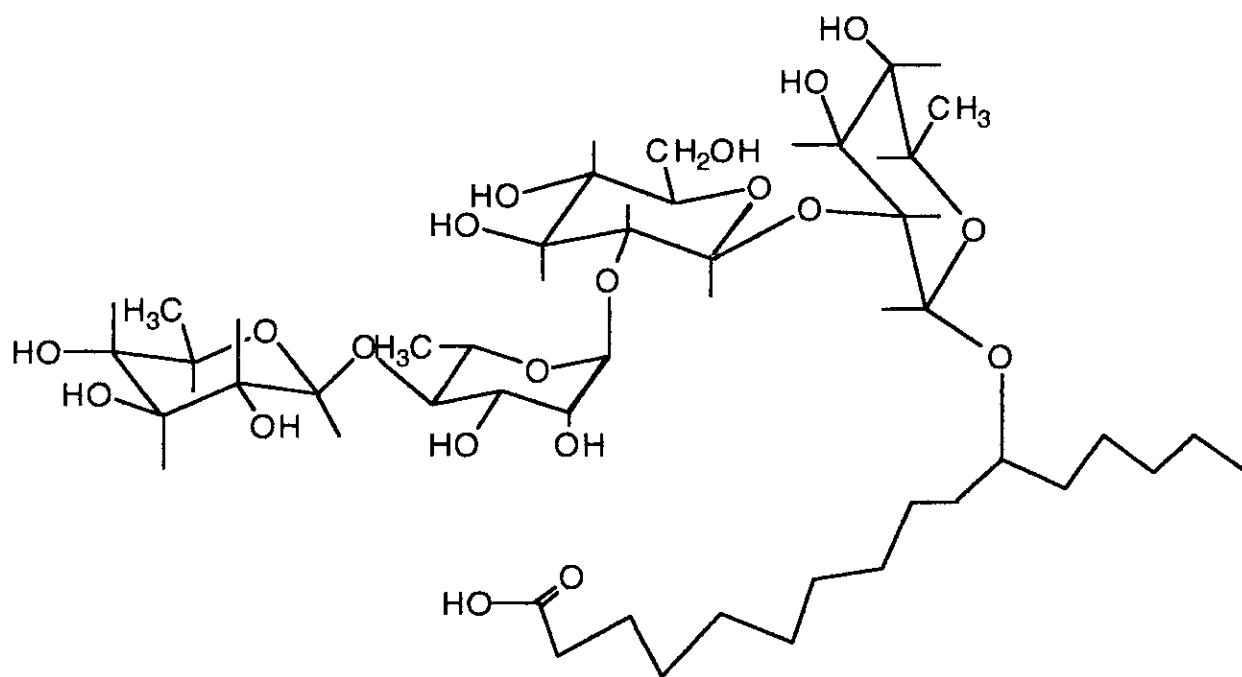
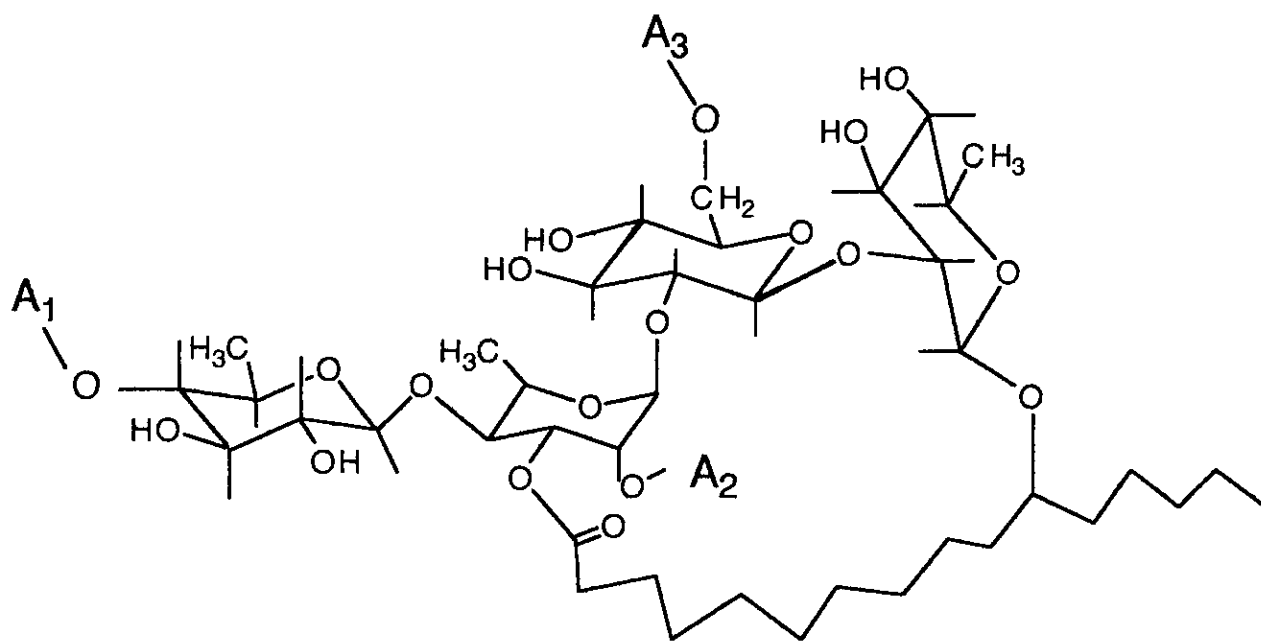


Figura 1.- Structure of the glycosidic acid from *Ipomoea stans*.



IV A

A₁ = A₃ = 3 - Hydroxy-2- methylbutanoic acid
 A₂ = 2 - Methylpropanoic acid

IV B

A₁ = A₃ = 3 - Hydroxy-2- methylbutanoic acid
 A₂ = 3 - Methylbutanoic acid

V

A₁ = A₃ = 3 - Hydroxy-2- methylbutanoic acid
 A₂ = 2 - Methylbutanoic acid

VI

A₁ = 2- Methylpropanoic acid
 A₂ = 2- Methylbutanoic acid
 A₃ = H

VII

A₁ = A₂ = 2- Methylbutanoic acid
 A₃ = H

Figure 2.- Structures of the glycosides of the more polar fraction from *Ipomoea stans*.

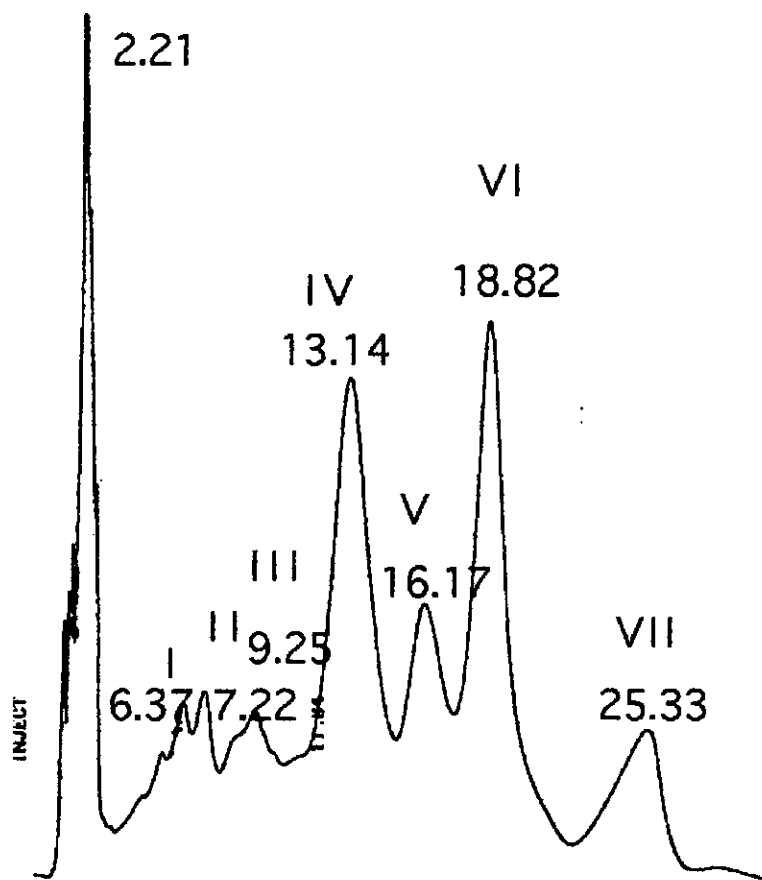


Figure 3.- Chromatogram of the more polar fraction from the root of *Ipomoea stans*.

TABLE 2

CHEMICAL SHIFTS OF GLYCOSIDE IV A

	QUINOVOSE (INT)		GLUCOSE		RHAMNOSE		QUINOVOSE (EXT)	
	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C
1	4.53	100.60	5.10	100.48	5.40	96.93	4.48	104.59
2	3.56	79.49	3.47	79.29	5.55	69.99	3.26	75.20
3	3.57	78.28	3.62	77.40	5.48	71.87	3.53	75.37
4	3.02	77.24	3.39	72.38	3.77	78.68	4.61	76.79
5	3.25	72.24	3.51	74.63	4.27	68.68	3.54	70.59
6	1.23	18.23	4.19	64.58	1.30	18.46	1.18	17.92
6'			4.46					

	A 1		A 2		A 3	
	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C
1		175.14		176.17		175.65
2	2.48	48.28	2.62	34.60	2.52	48.67
3	3.89	70.30	1.18	19.28	3.96	69.68
4	1.19	20.97	1.22	19.72	1.16	20.73
5	1.12	13.38			1.12	13.38

TABLE 3

CHEMICAL SHIFTS OF GLYCOSIDE IV B

	QUINOVOSE (INT)		GLUCOSE		RHAMNOSE		QUINOVOSE (EXT)	
	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C
1	4.42	100.69	5.07	100.27	5.36	96.38	4.43	104.41
2	3.52	79.26	3.43	79.16	5.50	69.78	3.22	74.97
3	3.52	78.13	3.58	77.13	5.44	71.42	3.50	75.23
4	2.98	77.04	3.35	72.16	3.72	78.46	4.57	76.59
5	3.20	72.12	3.47	74.46	4.20	68.58	3.48	70.46
6	1.19	18.12	4.16	64.43	1.28	18.42	1.12	17.79
6'			4.41					

	A 1		A 2		A 3	
	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C
	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \text{O}=\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$		$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \text{O}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$		$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \text{O}=\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	
1		175.14		176.17		175.65
2	2.48	48.28	2.44	34.60	2.52	48.67
3	3.89	70.30	1.69	19.28	3.96	69.68
4	1.19	20.97	0.97	19.72	1.16	20.73
5	1.12	13.38			1.12	13.38

TABLE 4

CHEMICAL SHIFTS OF GLYCOSIDE V

	QUINOVOSE (INT)		GLUCOSE		RHAMNOSE		QUINOVOSE (EXT)	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	4.51	100.37	5.08	100.27	5.39	96.86	4.45	104.44
2	3.53	79.19	3.46	79.13	5.54	70.24	3.25	75.00
3	3.53	78.15	3.58	77.32	5.50	71.75	3.52	75.28
4	3.01	77.06	3.37	72.16	3.76	78.33	4.58	76.62
5	3.23	72.16	3.50	74.49	4.25	68.59	3.50	70.39
6	1.22	18.18	4.18	64.45	1.30	18.35	1.17	17.16
6'			4.43					

	A 1		A 2		A 3	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
	OH O=C-CH-CH-CH ₃ CH ₃		OH O=C-CH-CH ₂ -CH ₃ CH ₃		OH O=C-CH-CH-CH ₃ CH ₃	
1		174.94		175.56		175.36
2	2.49	48.52	2.46	41.61	2.47	48.30
3	3.96	69.58	1.55,	27.68	3.89	69.81
3'			1.71			
4	1.16	20.68	1.00	11.90	1.19	20.92
5	1.09	13.26	1.17	17.86	1.11	13.40

TABLE 5

CHEMICAL SHIFTS OF GLYCOSIDE VI

	QUINOVOSE (INT)		GLUCOSE		RHAMNOSE		QUINOVOSE (EXT)	
	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C
1	4.43	100.78	5.02	101.37	5.49	96.40	4.45	104.37
2	3.53	79.59	3.46	78.77	5.64	69.00	3.23	75.27
3	3.42	78.25	3.58	77.04	5.50	71.45	3.52	75.28
4	3.02	77.04	3.35	72.30	3.77	78.38	4.58	76.14
5	3.20	72.10	3.31	76.47	4.21	68.59	3.49	70.53
6	1.21	18.15	3.62	63.17	1.29	18.45	1.12	17.91
6'			3.82					

A 1

A 2

A 3

$$\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$$

H

 δ ¹H δ ¹³C δ ¹H δ ¹³C

1		176.24		175.33
2	2.56	34.65	2.46	41.63
3	1.14	19.32	1.57,	27.71
3'			1.71	
4	1.14	19.32	0.99	11.98
5			1.17	17.26

TABLE 6

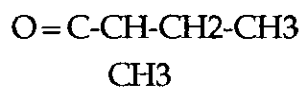
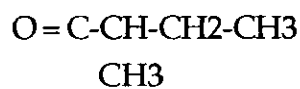
CHEMICAL SHIFTS OF GLYCOSIDE VII

	QUINOVOSE (INT)		GLUCOSE		RHAMNOSE		QUINOVOSE (EXT)	
	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C
1	4.44	100.94	5.02	101.60	5.50	96.63	4.46	104.61
2	3.52	79.73	3.46	78.98	5.67	69.17	3.25	75.47
3	3.42	78.42	3.60	77.18	5.49	71.62	3.52	75.31
4	3.02	77.24	3.36	72.57	3.75	78.58	4.60	76.25
5	3.21	72.38	3.32	76.73	4.21	68.77	3.49	70.72
6	1.22	18.23	3.63	63.31	1.29	18.51	1.15	18.08
6'			3.84					

A 1

A 2

A 3



H

	A 1		A 2	
	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C
1		176.23		175.83
2	2.39	42.09	2.47	41.74
3	1.45	27.31	1.55,	27.79
3	1.69		1.71	
4	0.91	11.98	1.00	12.05
5	1.13	17.17	1.18	17.33

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CYTOTOXIC AND
ANTIBACTERIAL TETRASACCHARIDE GLYCOSIDES
FROM *IPOMOEA STANS*

WILLIAM F. REYNOLDS,* MARGARET YU,

Department of Chemistry, University of Toronto, Toronto, Ontario, M5S 1A1, Canada

RAUL G. ENRIQUEZ,* HILDA GONZALEZ, ISMAEL LEON,

Instituto de Química, U.N.A.M., Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Mexico, D.F., 04510 Mexico

GIL MAGOS,

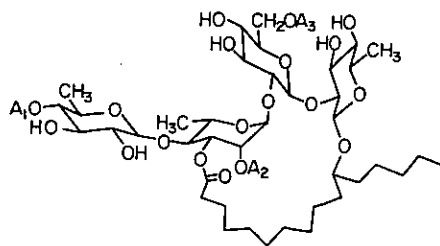
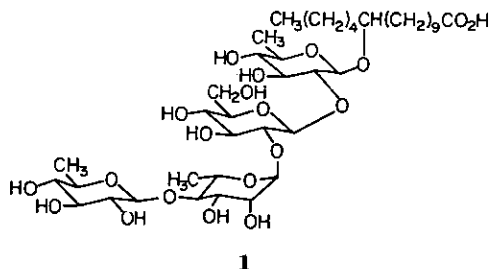
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, U.N.A.M.,
Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Mexico, D.F., 04510 Mexico

and MARIA L. VILLAREAL

Centro de Investigación Biomedica del Sur, I.M.S.S., Argentina 1, Xochitepec, Morelos, Mexico

ABSTRACT.—Three new tetrasaccharide glycosides, differing from one reported previously in the type of short-chain fatty acids ester-linked to the tetrasaccharide core, have been isolated and identified from an oligosaccharide fraction of *Ipomea stans*. Preliminary screening tests showed that the fraction containing these compounds had pronounced cytotoxicity towards three human tumor cell lines as well as specific antibiotic activity against two bacterial strains.

Extracts from *Ipomea stans* Cav. (Convolvulaceae) have been used in Mexican traditional medicine for treating epileptic seizures (1). We have recently undertaken a detailed phytochemical investigation of this species in the hope of isolating and identifying pharmacologically useful compounds (2). Initially, two polysaccharide fractions of different polarity were isolated from the roots of *Ipomea stans*, with the less polar one being isolated in much higher yield. The ^{13}C -nmr spectral data suggested that the fractions were actually a mixture of closely related compounds. Mild acid hydrolysis of portions of the two fractions yielded a single glycosidic acid derivative which proved to be a tetrasaccharide with 11-hydroxypalmitic acid ether-linked to a terminal anomeric carbon. Detailed characterization using 2D nmr techniques allowed identification of the hydrolysis product as (*S*)-11-hydroxypalmitic acid 11-*O*- β -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-quinovopyranoside [**1**]. Subsequent chromatographic purification of the less polar crude fraction yielded a



- 2** $A_1 = A_2 = 2$ -Methylbutanoic acid
 $A_3 = 3$ -Hydroxy-2-methylbutanoic acid
- 3** $A_1 = A_2 = 2$ -Methylpropanoic acid
 $A_3 = 3$ -Hydroxy-2-methylbutanoic acid
- 4** $A_1 = 2$ -Methylpropanoic acid
 $A_2 = 2$ -Methylbutanoic acid
 $A_3 = 3$ -Hydroxy-2-methylbutanoic acid
- 5** $A_1 = 2$ -Methylbutanoic acid
 $A_2 = 3$ -Methylbutanoic acid
 $A_3 = 3$ -Hydroxy-2-methylbutanoic acid

TABLE 1. Assigned ^{13}C - and ^1H -Nmr Chemical Shifts for Tetrasaccharide Components of Compounds 3-5 in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

Sugar	Carbon	Compound					
		3		4		5	
		$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
glc	1	100.16	5.08	100.25	5.07	100.24	5.06
	2	79.08	3.45	79.10	3.44	79.18	3.44
	3	77.18	3.58	77.26	3.58	77.25	3.58
	4	72.08	3.34	72.13	3.34	72.06	3.34
	5	74.50	3.48	74.53	3.47	74.42	3.49
	6		4.18		4.16		4.17
rha		64.45	4.45	64.48	4.44	64.49	4.45
	1	96.69	5.37	96.86	5.37	96.89	5.34
	2	69.83	5.52	69.86	5.53	69.96	5.52
	3	71.73	5.47	71.79	5.46	71.76	5.47
	4	78.50	3.74	78.34	3.74	78.38	3.74
	5	68.45	4.26	68.57	4.24	68.59	4.24
qui ₁	6	18.20	1.28	18.29	1.27	18.27	1.27
	1	100.28	4.52	100.40	4.51	100.42	4.52
	2	79.18	3.53	79.25	3.53	79.29	3.54
	3	77.96	3.52	78.06	3.52	78.01	3.53
	4	76.95	3.00	76.99	2.99	77.02	2.99
	5	72.10	3.24	72.16	3.22	72.13	3.23
qui ₂	6	18.02	1.20	18.09	1.20	18.09	1.20
	1	104.42	4.46	104.43	4.44	104.40	4.44
	2	75.18	3.24	75.31	3.20	75.29	3.22
	3	74.88	3.50	75.00	3.49	75.06	3.50
	4	76.15	4.57	76.19	4.56	76.08	4.58
	5	70.48	3.49	70.58	3.46	70.55	3.48
	6	17.72	1.12	17.90	1.11	17.93	1.12

^aGlc=D-glucose, rha=L-rhamnose, qui=quinovose, qui₁ is the sugar bonded to 11-hydroxypalmitic acid (2).

^bChemical shifts in δ (ppm) relative to internal $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$.

pure compound which was shown to have structure **2** (2).

We now report the results of further study on *Ipomoea stans* involving the isolation and identification of three additional tetrasaccharides from the more abundant crude fraction, and the preliminary screening of the two crude fractions for antibacterial and cytotoxic activity.

Careful hplc separation of the less polar fraction of *L. stans* provided four further fractions. Area integration suggested that these fractions, listed in order of increasing retention time, were present in relative amounts of ca. 10%, 35%, 20%, and 35%, respectively. The fraction with the longest retention time was confirmed to be pure **2**. Each of the other

three fractions contained ca. 80-90% of a single compound with traces of its nearest neighbors (by retention time). These were characterized without further purification. A combination of ^1H -, ^{13}C -, and DEPT nmr spectra in conjunction with the COSY, TOCSY, HMQC, HMBC, and ROESY nmr techniques was used to identify the major component of each fraction. TOCSY spectra were particularly useful for identifying and assigning ^1H -nmr spectra for individual monosaccharides and short-chain fatty acids since these allowed us to obtain "edited" ^1H -nmr sub-spectra for these individual molecular fragments (2). HMQC then allowed assignment of the corresponding carbons via one-bond ^{13}C - ^1H correlations

TABLE 2. Assigned ^{13}C - and ^1H -Nmr Chemical Shifts for Short-Chain Fatty Acid Components of Compounds 3–5.

Acid	Carbon	Compound					
		3		4		5	
		$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
A-1	1	176.53	—	176.47	—	175.98	—
	2	34.56	2.56	34.57	2.55	41.92	2.37
	3	19.03	1.13 ^c	19.15	1.12	27.30	1.42,1.65
	4	19.03	1.15 ^c	19.15	1.12	11.85	0.90
	5	—	—	—	—	16.82	1.11
A-2	1	176.31	—	175.85	—	174.94	—
	2	34.73	2.61	41.63	2.44	43.77	2.25
	3	19.52	1.19	27.60	1.53,1.70	26.37	2.09
	4	19.52	1.19	11.82	0.97	22.57	0.99
	5	—	—	17.08	1.15	22.57	0.99
A-3	1	175.46	—	175.49	—	175.44	—
	2	48.40	2.49	48.48	2.47	48.41	2.49
	3	69.63	3.96	69.48	3.92	69.45	3.93
	4	20.52	1.15	20.60	1.14	20.58	1.14
	5	13.25	1.10	13.39	1.09	13.37	1.10

^aNo chemical shift data are listed for the 11-hydroxypalmitic acid fragment since the observed ^{13}C - and ^1H -nmr chemical shifts for the different compounds were identical within 0.05 ppm for ^{13}C and 0.02 ppm for ^1H with each other and with the previously reported values for **2** (2).

^bChemical shifts in δ (ppm) relative to internal $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$.

^cThe CH_3 protons showed a slight non-equivalence, reflecting the fact that the 2-methylpropanoic acid is bonded to a chiral carbon.

while HMBC spectra were used to assign the linkage sites within the tetrasaccharide core as well as the sites of esterification by short-chain fatty acids. The former were determined from observed three-bond $^1\text{H}\text{-C-O-}^{13}\text{C}\text{-H}$ correlations between different monosaccharide units while the latter were determined from three-bond $^1\text{H}\text{-C-O-}^{13}\text{C}=\text{O}$ correlations between sugar protons and ester carbonyl groups. The linkage sites within the tetrasaccharide core were confirmed by ROESY cross-peaks between the pairs of protons on the carbons forming the C-O-C linkages. ROESY spectra were more useful than NOESY spectra for these compounds since the molecular tumbling rates were such that nuclear Overhauser enhancements were near zero (2).

The structures of the three additional compounds [**3–5**] (in order of increasing retention time) were also determined. They differ from **2** only in the identities of the short-chain fatty acids A_1

and A_2 . ^{13}C - and ^1H -nmr spectral data for **3–5** are given in Tables 1 and 2. No data are reported for **2** since the chemical shifts for this compound were identical within experimental error to those previously reported (2). There is one earlier report of the isolation of two compounds with the same glycosidic acid as **1** from *Convolvulus scanononia* (3). However, neither of these compounds was identical to any of compounds **2–5**. Both had 2-methylbutanoic acid attached to C-2 of the rhamnose unit (as observed in **2** and **4**) but with no ester linkage at C-6 of glucose and with either no ester linkage or a tiglic acid ester at C-4 of the terminal quinovose unit.

Because compounds **2–5** were isolated in very limited (≤ 10 mg) amounts with **3–5** being no more than 90% pure, we decided to carry out preliminary screening tests for cytotoxic and antibacterial activity on the more abundant crude extract from which these compounds were

isolated, because the effort to obtain larger amounts of purified individual compounds for detailed testing could only be justified if the crude extract showed promising activity.

The less polar oligosaccharide extract (corresponding to a roughly 35:10:35:20 mixture of compounds 2–5) was subjected to a cytotoxic bio-screening assay using cultured cancer cells representing nasopharyngeal carcinoma (KB), colon carcinoma (HCT-15), and squamous cell cervix carcinoma (SQC-1 UISO). Determined ED₅₀ values using this extract were 1.5, 1.5, and 3.2 µg/ml for KB, HCT-15, and SQC-1 UISO, respectively. According to NCI guidelines, pure compounds with ED₅₀ values ≤4 µg/ml are considered active (4). For purposes of comparison, the same tests were also carried out using the less abundant, more polar polysaccharide extract. In that case, ED₅₀ values were 2.0, 25.1, and 16.2 µg/ml for KB, HCT-15, and SQC-1 UISO, respectively. It is known that the more polar extract is composed of two or more oligosaccharides with the same basic structures, 1, but with two rather than three short-chain fatty acids (2). Thus, the two mixtures showed surprisingly large differences in cytotoxicity in spite of only minor structural differences. Because the less polar, more active fraction is known to contain four or more compounds, this sensitivity to structure raises the possibility that at least one of the compounds in the less polar fraction may have even more potent activity. Thus, detailed screening of individual pure compounds is desirable.

In order to establish selective or generalized toxicity towards various cells and microorganisms, the possible antimicrobial and fungicidal properties of the major polysaccharide mixture were also evaluated using different bacteria grown *in vitro*, and *Candida albicans*, and two dermatophytes in culture (see Experimental). The lowest concentration which elicited complete suppression of micro-

organism growth (MIC value) was determined in each case. The two polysaccharide mixtures exhibited strong antibiotic activity only towards *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* (with respective MIC values of 25 and 12.5 µg/ml for the two bacteria, compared to MIC values of 8 and 16 µg/ml using nystatin with the same bacteria) and neither showed significant antifungal activity against the dermatophytes tested. Essentially identical results were obtained using the minor polysaccharide mixture, suggesting that, unlike cytotoxic activity, the antibacterial activity is insensitive to minor differences in structure.

A recent publication has described the isolation and characterization of a structurally similar tetrasaccharide, tricolorin A, from *Ipomoea tricolor* having different monosaccharide units and other minor structural differences (5). This compound was cytotoxic against P-388 and human breast cancer cells (ED₅₀ 2.2 µg/ml) and antibacterial against *S. aureus*. The observation of both cytotoxic and antibacterial activity in different tetrasaccharide derivatives emphasizes the value of carrying out more detailed structure-activity investigations for such derivatives.

Further work is planned to isolate as many pure compounds as possible from *I. stans*, and to test them individually for cytotoxic and antibacterial activity. In turn, this may suggest possible chemical modifications which would further enhance activity.

EXPERIMENTAL

GENERAL EXPERIMENTAL PROCEDURES.—All measurements were carried out on a Varian Unity-500 spectrometer equipped with a 5-nm inverse detection probe. Portions (3–10 mg) of each sample were dissolved in ca. 0.75 ml of (CD₃)₂CO. COSY, HMQC, HMBC, and ROESY experiments were carried out using standard Varian software. COSY spectra were acquired in absolute value mode while TOCSY, ROESY, and HMQC spectra were acquired in phase-sensitive mode and HMBC was processed using mixed-mode processing (phase

sensitive along f_1 , absolute value along f_2). Mixing times of 0.1 sec were used for TOCSY and ROESY experiments while HMBC experiments were optimized for 8 Hz coupling constants. A BIRD nulling delay of 0.25 sec was used for HMQC while J filters, BIRD pulses, and HMQC delays were all set corresponding to $J=155$ Hz.

PLANT MATERIAL.—Samples of *Ipomoea stans* were collected near km marker 93 on the Puebla-Orizaba highway, in the state of Puebla, Mexico. Botanical classification was carried out by Dr. M. Martinez, Instituto de Biología, UNAM, and a voucher specimen (No. 2691) is on deposit at the IMSSM Herbarium in Mexico City.

EXTRACTION AND ISOLATION.—Details of the isolation and separation of the two oligosaccharide fractions are given in Ref. (2). Further separation of the less polar fraction was carried out with a Varian 9010 liquid chromatograph with a Varian variable uv detector model 9050 set at 220 nm. A semi-prep. (250×5 mm) MCH-10 column and a mixture of MeCN-H₂O (65:35) in isocratic mode were found to give a good separation at 30°. Elution of all components was complete within 55 min. Up to 1.3 mg of sample per injection could be used without losing resolution. Repeat injections were carried out until ca. 10 mg each of the two major components were collected, along with lesser amounts of the minor components.

BIOLOGICAL TESTING.—The KB, HCT-15, and SQC-1 UIISO cell lines were maintained in RPMI culture medium with 10% fetal bovine serum (FBS). All cell lines were cultured at 37° in an atmosphere of 5% CO₂ in air (100% humidity). The cells at a log phase of their growth cycle were treated in triplicate at various concentrations of the compounds (0.5–100 µg/ml), and incubated for 72 h at 37° in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The cell concentration was determined by protein analysis. Results were expressed as the dose that inhibits 50% control growth after the incubation period (ED₅₀). The values were estimated from a semi-log plot of the drug concentration (µg/ml) against the percent of viable cells. According to NCI guidelines described in the literature (4), pure compounds with ED₅₀ values ≤4 µg/ml are considered active.

Antimicrobial screening studies were performed with cultures of *Escherichia coli* (ATCC

8937), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Shigella sonnei* (ATCC 11060), and *Candida albicans* (ATCC 10231). The dermatophytes tested were *Trycophyton mentagrophytes* (NRRL 1942) and *Microsporium gypsum* (NRRL-A 2605). The bacteria were maintained in Trypticase soy agar (TSA), and the yeast and the dermatophytes on Sabourand's dextrose agar (SDA). The screening method was based on conventional disk assay procedures reported for the study of natural products with antibacterial activity and fungicidal action (6,7), using gentamicin and nystatin as reference standards. Observations were performed in duplicate and results expressed as the lowest concentration that elicited complete suppression of microorganism growth (MIC values).

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to W.F.R., Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología to R.G.E., and Instituto Mexicano del Seguro Social to M.L.V. is gratefully acknowledged.

LITERATURE CITED

1. J.L. Diaz, "Usos de las Plantas Medicinales de Mexico," *Monografías Científicas II*, INEPLAM, Mexico, 1976, p. 329.
2. R.G. Enriquez, I. Leon, F. Perez, F. Walls, K.A. Carpenter, F.V. Puzzuoli, and W.F. Reynolds, *Can. J. Chem.*, **70**, (1992).
3. N. Noda, H. Kogitsu, T. Kawasake, and K. Mijahara, *Phytochemistry*, **29**, 3565 (1990).
4. R.I. Geran, N.H. Greenberg, M.M. McDonald, A.M. Schumacher, and B.J. Abbott, *Cancer Chemother. Rep.*, Part 3, 1 (1972).
5. R. Pereda-Miranda, R. Mata, A.L. Anaya, D.B.M. Wickramaratne, J.M. Pezzuto, and A.D. Kinghorn *J. Nat. Prod.*, **56**, 571 (1993).
6. J.D. Paxton, in: "Methods in Plant Biochemistry, Vol. 6." Ed. by K. Hostettman, Academic Press, London, 1991, p. 33.
7. D.A. Vanden Berghe and A.J. Vlietinck, in: "Methods in Plant Biochemistry, Vol. 6." Ed. by K. Hostettman, Academic Press, London, 1991, p. 47.

Received 19 January 1995

Investigation of the Advantages and Limitations of Forward Linear Prediction for Processing 2D Data Sets

William F. Reynolds,^{1*} Margaret Yu,¹ Raul G. Enriquez² and Ismael Leon³

¹ Department of Chemistry, University of Toronto, Toronto, Ontario, M5S 3H6, Canada

² Instituto de Quimica, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacan, Mexico, D.F., 04510, Mexico

³ Centro de Investigaciones in Quimica, Universidad Autonoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

Although the potential advantages of f_1 forward linear prediction for the processing of multi-dimensional NMR spectra are well established, this method is surprisingly little used for 2D spectra used for organic structure determination. A detailed investigation of the advantages and limitations of f_1 forward linear prediction for this purpose is reported. This is a reliable technique which is particularly useful for ^1H -detected ^{13}C - ^1H shift correlation spectra, allowing up to 16-fold linear prediction of the ^{13}C axis of HSQC spectra. In general, the use of linear prediction allows one to obtain comparable 2D spectra in one quarter of the time or double the sensitivity in a comparable time relative to similar spectra without linear prediction. The one exception is the absolute value COSY spectrum, where linear prediction beyond a factor of two gives poor results. Linear prediction is generally superior to zero filling as a time-saving technique, although the difference between the two approaches disappears as the f_1 data point resolution approaches the natural linewidth. By contrast, f_2 forward linear prediction is not recommended. © 1997 by John Wiley & Sons, Ltd.

Magn. Reson. Chem. 35, 505-519 (1997) No. of Figures: 10 No. of Tables: 2 No. of References: 29

Keywords: 2D NMR; linear prediction; zero filling

Received 12 February 1997; revised 24 March 1997; accepted 24 March 1997

INTRODUCTION

The potential utility of forward linear prediction for processing multidimensional NMR data sets has long been recognized.^{1,2} This technique is particularly useful as a means of minimizing the acquired data matrix and consequently the total acquisition time for 3D and 4D NMR spectra of proteins.³ By contrast, as pointed out in a recent paper on the use of forward linear prediction for 2D NOESY spectra,⁴ this technique has been surprisingly little used for 2D spectra of smaller organic molecules such as natural products. For example, checking the experimental sections of papers on organic structure determination by 2D NMR in the 1995 and 1996 volumes of this journal revealed only eight papers (out of approximately 100) which explicitly mentioned the use of linear prediction,⁴⁻¹¹ three of which came from this research group.^{5,6,8} We find this failure to make more extensive use of linear prediction in 2D NMR very surprising since we have consistently found it to be a useful and reliable method for improving the resolution and sensitivity of 2D spectra. This is particularly true for ^1H -detected ^1H - ^{13}C shift correlation

spectra¹² where one is faced with the problem of digitizing a wide ^{13}C spectral window. Reference 4, while providing quantitative information concerning the accuracy of NOESY cross-peak areas with linear prediction, offered only qualitative comments concerning the resolution and sensitivity advantages of this approach. Consequently, we decided to carry out a quantitative evaluation of the advantages and limitations of forward linear prediction for other common 2D experiments used in organic structure elucidation. In addition, we wished to compare the relative merits of linear prediction and the more commonly used method of zero filling. Since our goal was to encourage the more widespread use of linear prediction, we used the standard linear prediction software package provided by the spectrometer manufacturer in order to evaluate the advantages which would be routinely available to non-expert users.

RESULTS AND DISCUSSION

Forward f_1 linear prediction of HSQC data sets

As a first basic test of the reliability of linear prediction, three HSQC¹³ data sets were acquired for the aliphatic

* Correspondence to: W. F. Reynolds.
Contract grant sponsor: NSERCC.
Contract grant sponsor: DGAPA (UNAM).

proton and carbon region of our standard test molecule, kauradienoic acid (**1**).¹⁴ HSQC was chosen rather than HMQC¹⁵ because the limiting f_1 (^{13}C) resolution is determined by the natural ^{13}C linewidth for HSQC but by the ^1H multiplet width for HMQC (since the ^1H multiplet structure appears along both f_1 and f_2 with the latter sequence^{12,16}). The sample contained 6 mg of **1** dissolved in *ca.* 1 ml of CDCl_3 . All three data sets used an f_2 spectral window of 1770 Hz, an f_1 spectral window of 6300 Hz and 256 f_2 data points, zero filled to 512. In the first experiment (see Table 1), we collected 16 transients per time increment and 256 time increments (total acquisition time 5 h 42 min) and linearly predicted the f_1 data to 1024, with zero filling to 2048. Experiment 2 had four transients per time increment and 1024 time increments (total acquisition time 5 h 43 min) with f_1 zero filling to 2048 and no linear prediction. Experiment 3 had four transients per time increment and 256 increments (total acquisition time 1 h 26 min), linearly predicted to 1024 with zero filling to 2048. All other

acquisition and processing parameters were identical for the three experiments (see Experimental). All data were acquired in the hypercomplex mode to generate phase-sensitive spectra.

Our assumption was that, provided that the raw data had a sufficient signal-to-noise ratio to allow accurate prediction, the first experiment should show twice the signal-to-noise ratio of the second experiment in about the same overall time while the third should show a comparable signal-to-noise ratio to the second in one quarter of the time. The signal-to-noise ratio was measured for ^1H cross-sections through individual $^{13}\text{CH}_2$ peaks. The latter were chosen since they have the lowest signal-to-noise ratio of the different CH_n groups in **1**. Noise levels were measured from ^1H spectral regions with no peaks to avoid any contributions from t_1 ridges. These measurements showed that the average signal-to-noise ratio for CH_2 groups was 237:1 in the first experiment, 117:1 in the second and 116:1 in the third, i.e. almost exactly the ratios predicted above. Two typical CH_2 cross-sections from experiments 1 and 2 are displayed in Fig. 1, clearly illustrating the higher sensitivity for the experiment with linear prediction.

Contour plots for the three experiments, illustrated in Fig. 2, show an additional interesting and unexpected feature. It appears that the experiments using linear prediction, and particularly the first experiment, show weaker t_1 ridges from the CH_3 singlets. There are many sources of instability which may lead to t_1 ridges¹⁷ with the actual origins being dependent on the individual spectrometer and its environment.¹⁸ This observation,

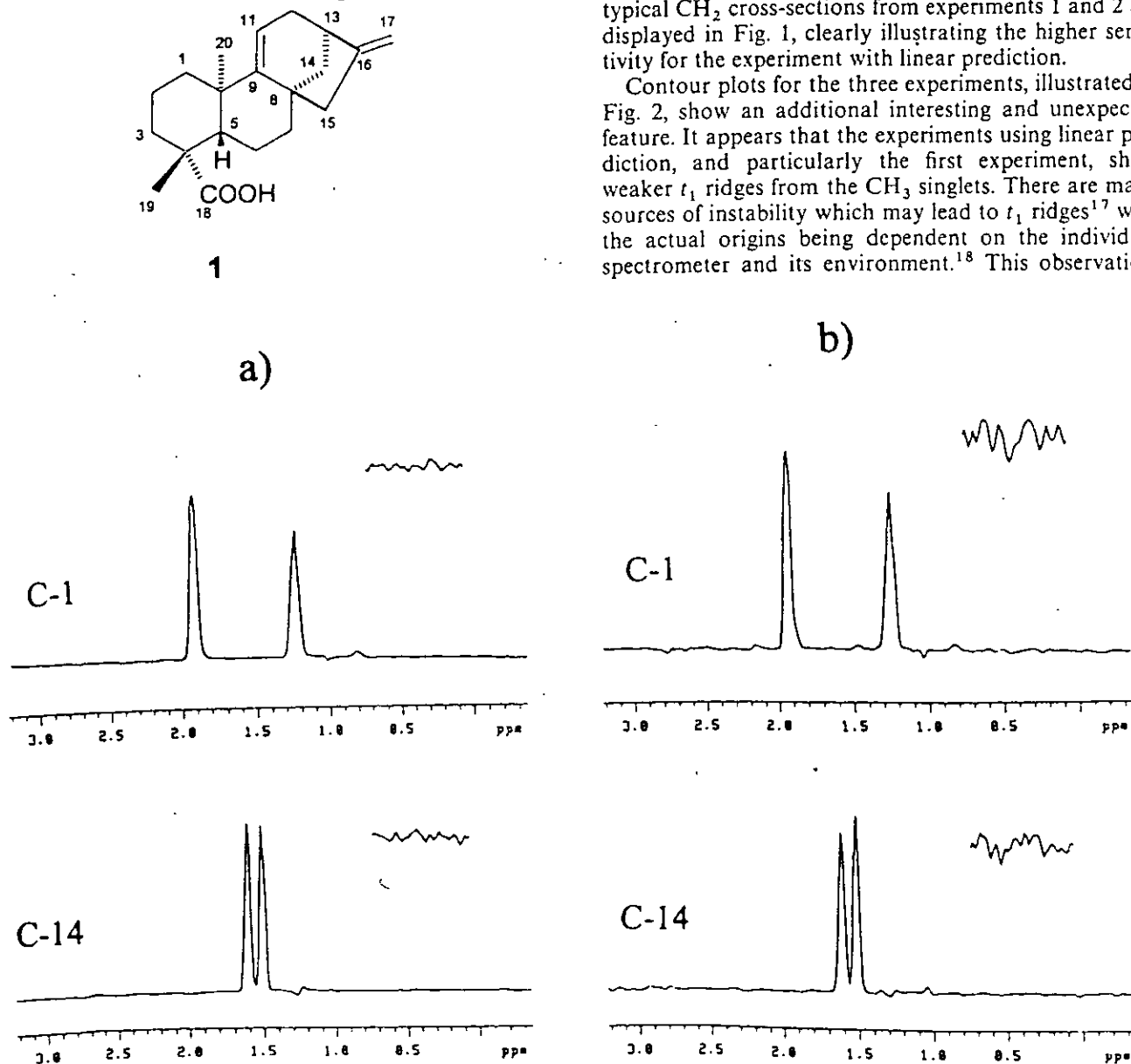


Figure 1. Typical cross-sectional spectra for CH_2 groups of **1** obtained in (a) experiment 1 and (b) experiment 2. Spectra for a given carbon are plotted at the same vertical scale with noise insets $\times 10$.

Table 1. Acquisition and processing parameters for various 2D experiments involving kauradienoic acid (1) discussed in the text

Experiment ^a	Segment ^b	Sample ^c mg	NT ^d	SW2 ^e	SW1 ^e	NP ^f	TP2 ^g	NI ^h	LP1 ⁱ	TP1 ^j	LP2 ^k
1	HSQC	6	16	1770	6300	256	512	256	1024	2048	—
2	HSQC	6	4	1770	6300	256	512	1024	—	2048	—
3	HSQC	6	4	1770	6300	256	512	256	1024	2048	—
4	HSQC	6	16	3500	16 000	512	1024	256	1024	2048	—
5	HSQC	6	4	3500	16 000	512	1024	1024	—	2048	—
5a	HSQC	6	4	3500	16 000	512	2048	1024	—	2048	1024
6	HSQC	6	4	3500	16 000	512	1024	256	1024	2048	—
6a	HSQC	6	4	3500	16 000	512	1024	256	4096	8192	—
6b	HSQC	6	4	3500	16 000	512	1024	128	1024	2048	—
6c	HSQC	6	4	3500	16 000	512	1024	64	1024	2048	—
6d	HSQC	6	4	3500	16 000	512	1024	128	512	1024	—
6e	HSQC	6	4	3500	16 000	512	1024	256	—	2048	—
6f	HSQC	6	4	3500	16 000	512	1024	128	—	2048	—
6g	HSQC	6	4	3500	16 000	512	1024	64	—	2048	—
6h	HSQC	6	4	3500	16 000	512	1024	256	1024	8192	—
6i	HSQC	6	4	3500	16 000	512	2048	256	1024	2048	1024
6j	HSQC	6	4	3500	16 000	512	2048	256	1024	2048	—
7	HSQC	1.5	16	3500	16 000	512	1024	256	1024	2048	—
8	HSQC	1.5	4	3500	16 000	512	1024	1024	—	2048	—
9	HSQC	1.5	4	3500	16 000	512	1024	256	1024	2048	—
9a	HSQC	1.5	4	3500	16 000	512	1024	256	—	2048	—
9b	HSQC	1.5	4	3500	16 000	512	1024	828	—	2048	—
9c	HSQC	1.5	4	3500	16 000	512	1024	64	—	2048	—
9d	HSQC	1.5	4	3500	16 000	512	1024	256	4096	8192	—
9e	HSQC	1.5	4	3500	16 000	512	1024	256	1024	8192	—
10	HMQC	6	16	3500	16 000	512	1024	256	256	2048	—
11	HMQC	6	4	3500	16 000	512	1024	1024	—	2048	—
12	DQCOSY	1.5	8	1770	1770	2048	4096	256	2048	4096	—
12a	DQCOSY	1.5	8	1770	1770	2048	4096	256	—	4096	—
12b	DQCOSY	1.5	8	1770	1770	2048	4096	256	512	4096	—
13	DQCOSY	1.5	8	1770	1770	2048	4096	2048	—	4096	—
14	COSY	1.5	16	3500	3500	1024	2048	1024	1024	2048	—
14a	COSY	1.5	16	3500	3500	1024	2048	256	1024	2048	—
14b	COSY	1.5	16	3500	3500	1024	2048	512	1024	2048	—
14c	COSY	1.5	16	3500	3500	1024	2048	256	—	2048	—

^a Experiments labelled only with a number correspond to the original experiment described in the text while those with a number followed by a letter, e.g. 5a, correspond to a reprocessed data set.

^b Sequence used in experiment. The COSY experiment was run in the absolute value mode and all others in the phase-sensitive mode, using the hypercomplex method.

^c Samples were either 6 or 1.5 mg of 1 dissolved in ca. 1 ml of CDCl₃.

^d Number of transients collected per time increment.

^e f_2 spectral window.

^f f_1 spectral window.

^g Number of f_2 data points.

^h Total number of f_2 points after zero filling.

ⁱ Number of f_1 time increments used in processing data set.

^j Extent of linear prediction along f_1 axis. Where no number appears, no linear prediction was carried out.

^k Total number of f_1 points after zero filling.

^l Extent of linear prediction along the f_2 axis. Where no number appears, no linear prediction was carried out.

which we have reproduced in repeated experiments, represents another advantage of linear prediction.

While the experiments described above clearly demonstrate the sensitivity and resolution advantages of forward f_1 linear prediction, we carried out a number of additional experiments designed to probe possible limitations. First, the three experiments described above were repeated (as experiments 4–6, respectively) using ¹H and ¹³C spectral windows (3500 Hz and 16 000 Hz, respectively) which included all protons and protonated carbons for 1. The number of ¹H data points was doubled to 512 (with zero filling to 1024), with all other parameters kept identical with those listed previously

(see Table 1). The new experiments were run for two reasons. The first was to confirm that the conclusions described above still held when using wider spectral windows and the second was to allow us to test the usefulness of more extensive linear prediction. As noted previously,¹² there is no sensitivity or resolution advantage in linear prediction (or straight data acquisition) which provides data point resolution which is less than the f_1 linewidths. The use of a wider spectral window allowed us to test more extensive f_1 linear prediction without running into this limitation.

The observed average signal-to-noise ratios were 200:1, 108:1 and 122:1 for experiments 4, 5 and 6,

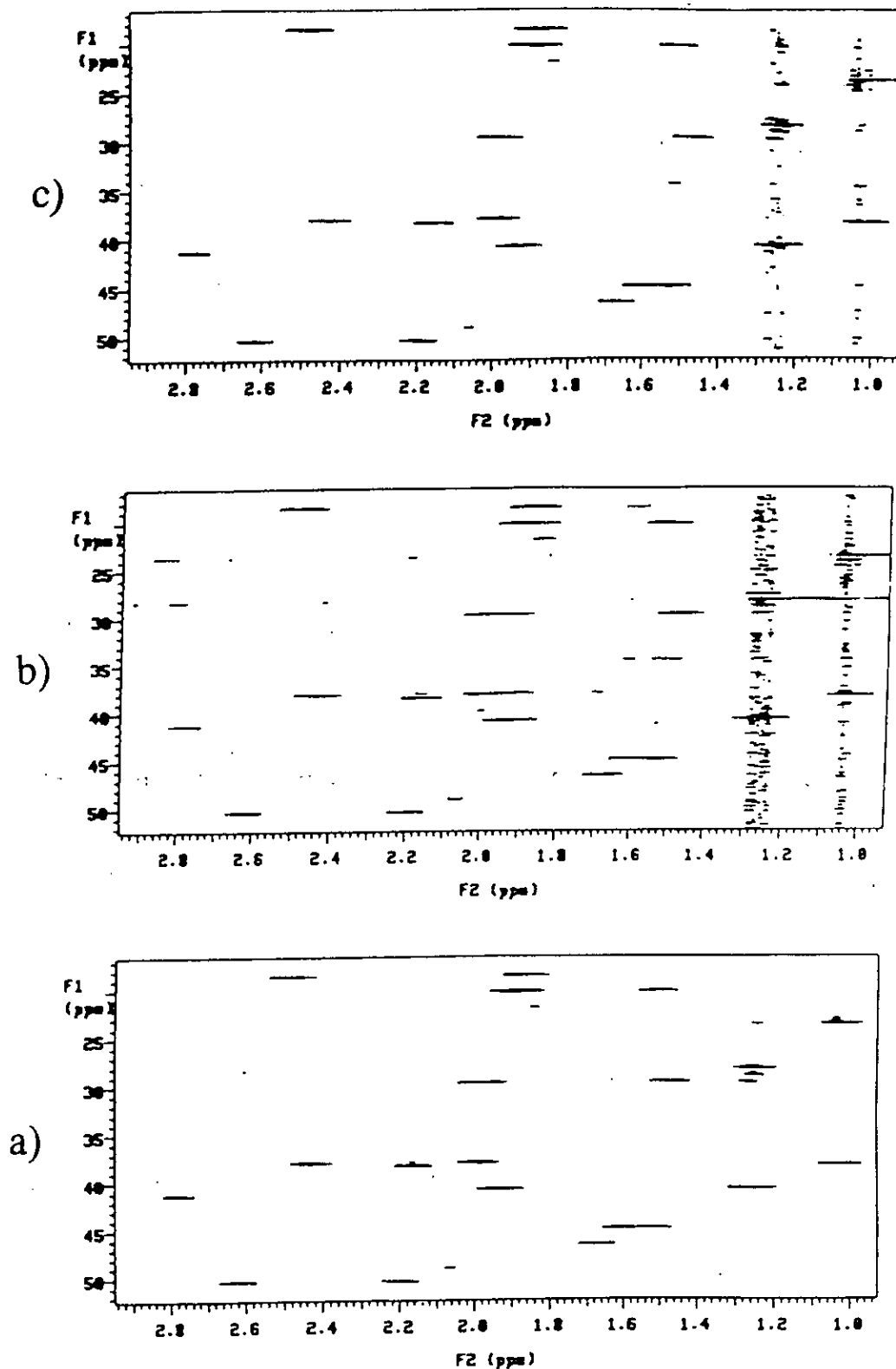


Figure 2. Contour plots for the full HSQC spectra of **1** obtained in the first set of experiments with (a) experiment 1, (b) experiment 2 and (c) experiment 3. All spectra are plotted with the same vertical scale and threshold. Note the increased t_1 ridges for experiments 2 and 3.

respectively. These are similar to those noted above, confirming that the advantages of linear prediction hold, even with wider spectral windows. Experiment 6 was then reprocessed with linear prediction from 256 to 4096 (with zero filling to 8192), i.e. 16-fold linear predic-

tion. This experiment was chosen because the weaker signal-to-noise ratio compared with experiment 4 should provide a more rigorous test of extended linear prediction. To our surprise, the spectrum with 16-fold linear prediction (experiment 6a) had an average signal-

to-noise ratio for CH₂ cross-sections which was almost twice that for the spectrum with fourfold linear prediction (239:1 compared with 122:1). As observed previously,¹² this was mainly due to the increase in peak height associated with the linewidth narrowing in f_1 . This line narrowing arises because extended linear prediction provides access to a larger fraction of the interferogram envelope, providing better data point resolution and allowing the use of less extreme apodization. However, there are limits to the gains which can be realized in this manner (see later). Typical CH₂ cross-sections are illustrated in Fig. 3 and contour plots for one region of the 2D spectra are shown in Fig. 4. Figure 4(b) is plotted at half the vertical scale of Fig. 4(a) to allow for the approximate twofold increase in signal intensities. The narrower lines are apparent in Fig. 4(b). Finally, in order to confirm the accuracy of extended linear prediction, ¹³C chemical shifts were estimated from the mid-points of ¹³C signals in the contour plot for experiment 6a. The estimated chemical shifts are listed in Table 2, along with the ¹³C chemical shifts determined from a 1D ¹³C spectrum for the same sample. The maximum difference is 0.03 ppm, demonstrating that the extensive linear prediction has not resulted in any significant errors in peak position.

We next investigated the minimum number of increments necessary for reliable linear prediction. This was done by reprocessing experiment 6 using only part of the time increments. Three spectra (experiments 6, 6b and 6c, respectively) were compared (1) using all 256 increments and linearly predicting to 1024, (2) using the first 128 time increments and linearly predicting to 1024

Table 2. Comparison of ¹³C chemical shifts determined from a 2D HSQC spectrum of 1 with 16-fold linear prediction and from a regular 1D ¹³C spectrum

Carbon	δ_c^b	δ_c^c
1	40.74	40.75
2	20.12	20.15
3	38.25	38.28
6	18.47	18.46
7	29.64	29.66
11	111.48	111.49
12	37.92	37.92
13	41.24	41.24
14	44.93	44.94
15	50.30	50.31
17	105.49	105.47
19	28.22	28.24
20	23.60	23.61

^a In CDCl₃ measured relative to internal tetramethylsilane.

^b From 2D HSQC spectrum (experiment 6a).

^c From 1D ¹³C spectrum.

and (3) using the first 64 time increments and linearly predicting to 1024. Assuming that linear prediction still works well with a smaller number of time increments, then similar quality spectra would be expected in each case, as was observed above when comparing experiments 5 and 6. In fact, this is not the case. Contour

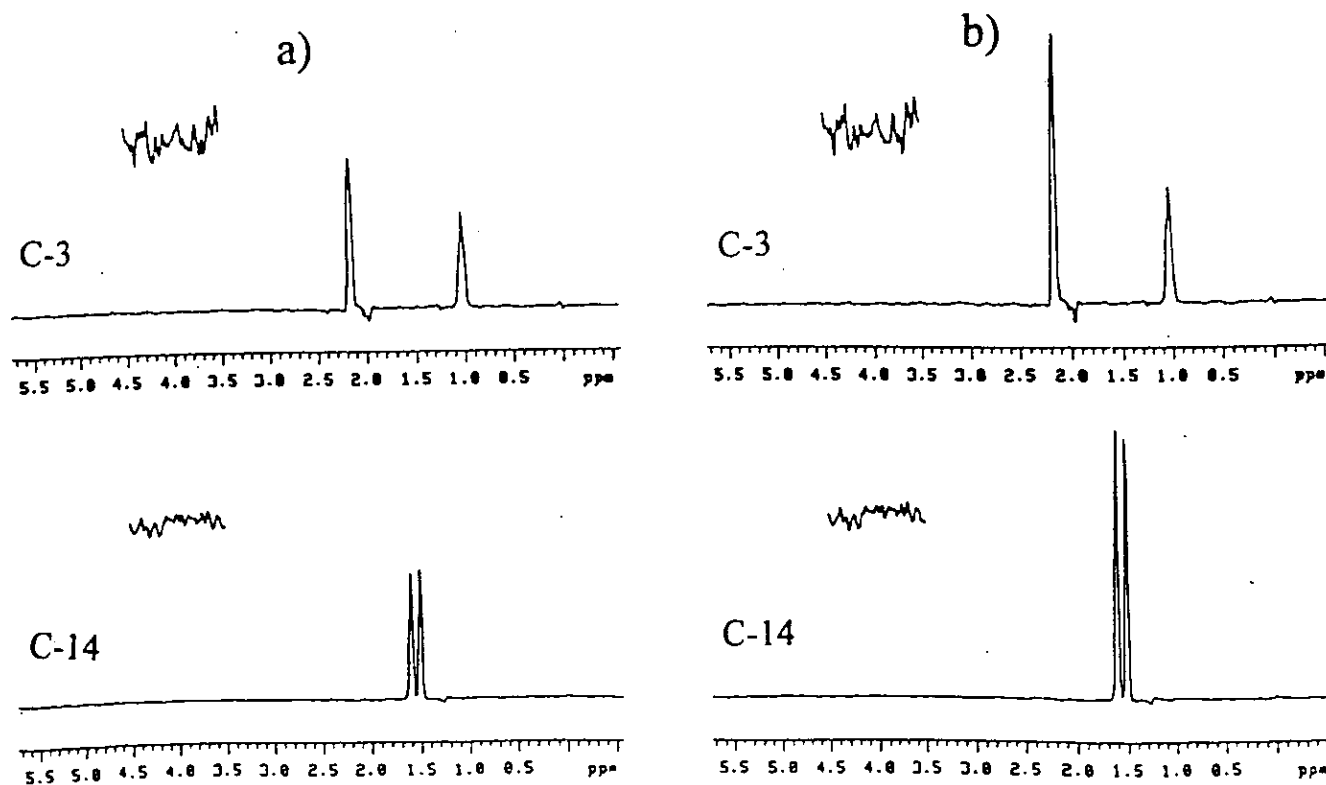


Figure 3. Cross-sectional spectra for two CH₂ groups of 1 obtained in the second set of experiments with (a) experiment 6 with linear prediction to 1024 and (b) experiment 6a with linear prediction to 4906. Spectra for the same carbon are plotted at the same vertical scale with noise insets $\times 20$. The full spectra were obtained with a ¹³C spectral window of 16 000 Hz and an ¹H spectral window of 3500 Hz.

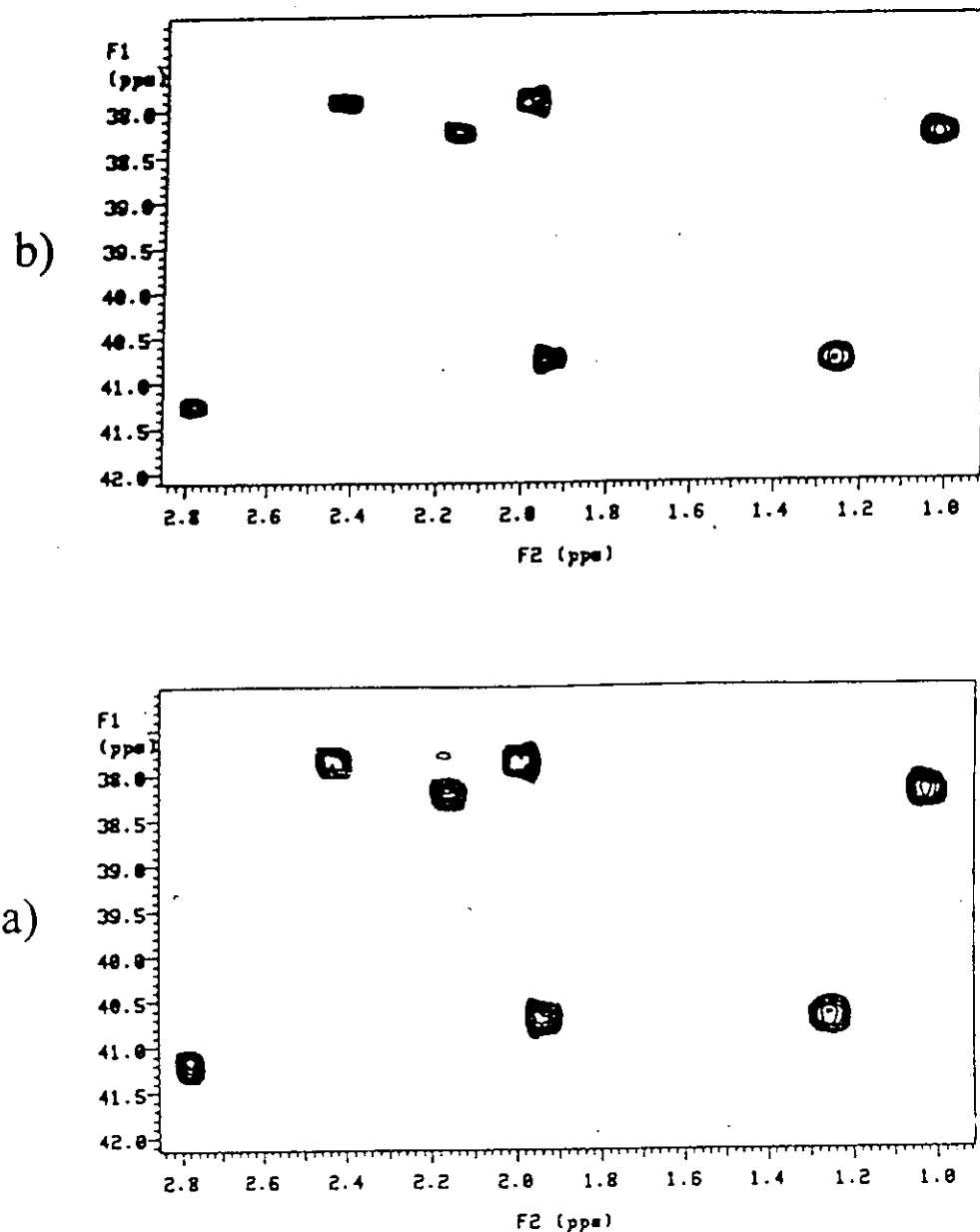


Figure 4. Contour plots for a region of the HSQC spectra of **1** obtained with (a) experiment 6 with linear prediction to 1024 and (b) experiment 6a with linear prediction to 4096; (b) is plotted at the same threshold as (a) but with half of the vertical scale to allow for the increased intensity shown in Fig. 3(b). ^{13}C peaks from bottom to top of each spectrum correspond to C-13, C-1, C-3 and C-12.

plots for the three spectra are illustrated in Fig. 5. They show a significant deterioration in quality from 4- to 8- to 16-fold linear prediction. Reprocessing the data from experiment 6 using the first 128 time increments combined with linear prediction to 512 instead of 1024 gave a spectrum (experiment 6d) which showed no significant distortions but with a twofold increase in f_1 linewidth. Thus, for this particular series of experiments, it appears that the collection of 256 increments with linear prediction to 1024 (or further if necessary) provides the optimum combination of resolution, sensitivity and quality of spectra. Fewer increments lead to imperfect spectral prediction or loss of resolution while the use of a greater number of increments offers no advantages over linear prediction. In principle, the optimum number of increments should depend on the particular molecule-experiment combination, being determined by

factors such as natural f_1 linewidth, f_1 spectral window and the number of peaks being detected. However, in practice, we have observed that 256 increments usually represents a good choice for HSQC, HMQC and HMBC experiments with wide ($> 15\,000$ Hz) f_1 spectral windows when acquiring spectra for natural products and other organic compounds up to molecular mass 2000.

Finally, to check whether these conclusions would still be valid for more dilute solutions, a new sample containing 1.5 mg of **1** (a fourfold dilution) was prepared and three new data sets (experiments 7-9) were obtained with parameters identical with those in experiments 4-6. In this case, experiment 7 showed an average CH_2 cross-section signal-to-noise ratio of 59:1, experiment 8 27:1 and experiment 9 28:1. Since the signal-to-noise ratios are again essentially identical with

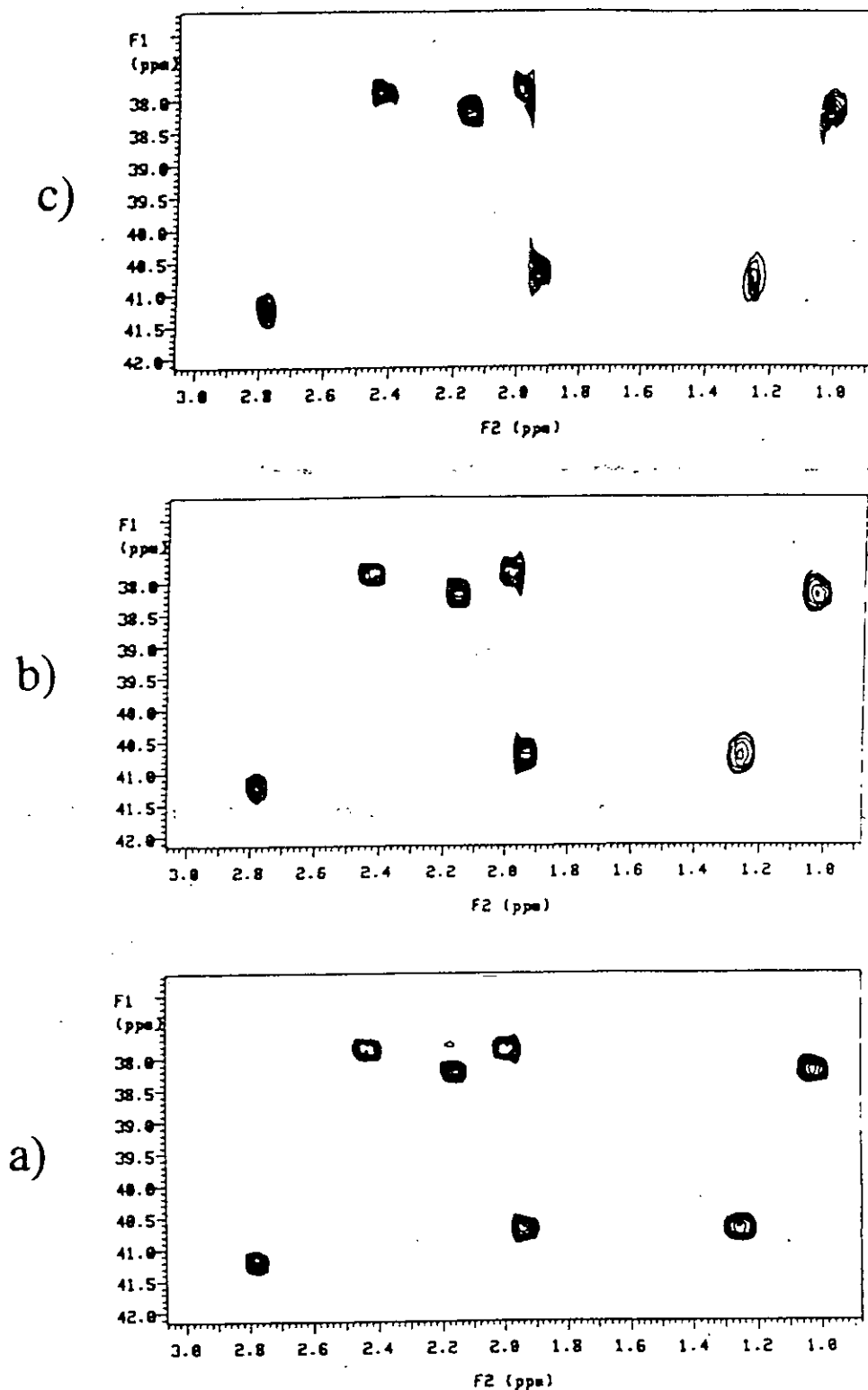


Figure 5. Contour plots for (a) experiment 6, (b) experiment 6b and (c) experiment 6c. All spectra are plotted at the same vertical scale and threshold.

the expected values, it appears that fourfold linear prediction is still reliable, even for a relatively dilute solution.

The results presented above demonstrate that linear prediction provides a very robust method for minimizing the time and maximizing the sensitivity of 2D HSQC spectra. It might be argued that our results are

biased by the use of a test molecule with relatively low molecular mass (300) and that the shorter ^1H and ^{13}C relaxation rates of larger molecules might lead to less satisfactory results with linear prediction. However, based on earlier results, we are confident that this is not true. For example, Babcock *et al.*⁴ reported increased resolution and sensitivity with linear prediction for

NOESY spectra of a nucleotide decamer. Similarly, we have successfully used linear prediction for HMQC, HMBC, COSY, TOCSY and ROESY spectra for a number of compounds with molecular masses in excess of 1000.^{19,20} For example, Fig. 6 shows three expansions of crowded regions of a coupled HSQC spectrum obtained for a saponin currently under investigation in

our laboratory.²⁰ It consists of a triterpene with seven saccharide units. The spectrum, obtained with 1024 f_2 data points and 256 time increments, with linear prediction to 2048, covers the sugar region (f_1 spectral window 6300 Hz, f_2 spectral window 1770 Hz). Even with such a large data set for a large natural product (molecular mass > 1600), individual chemical shifts can

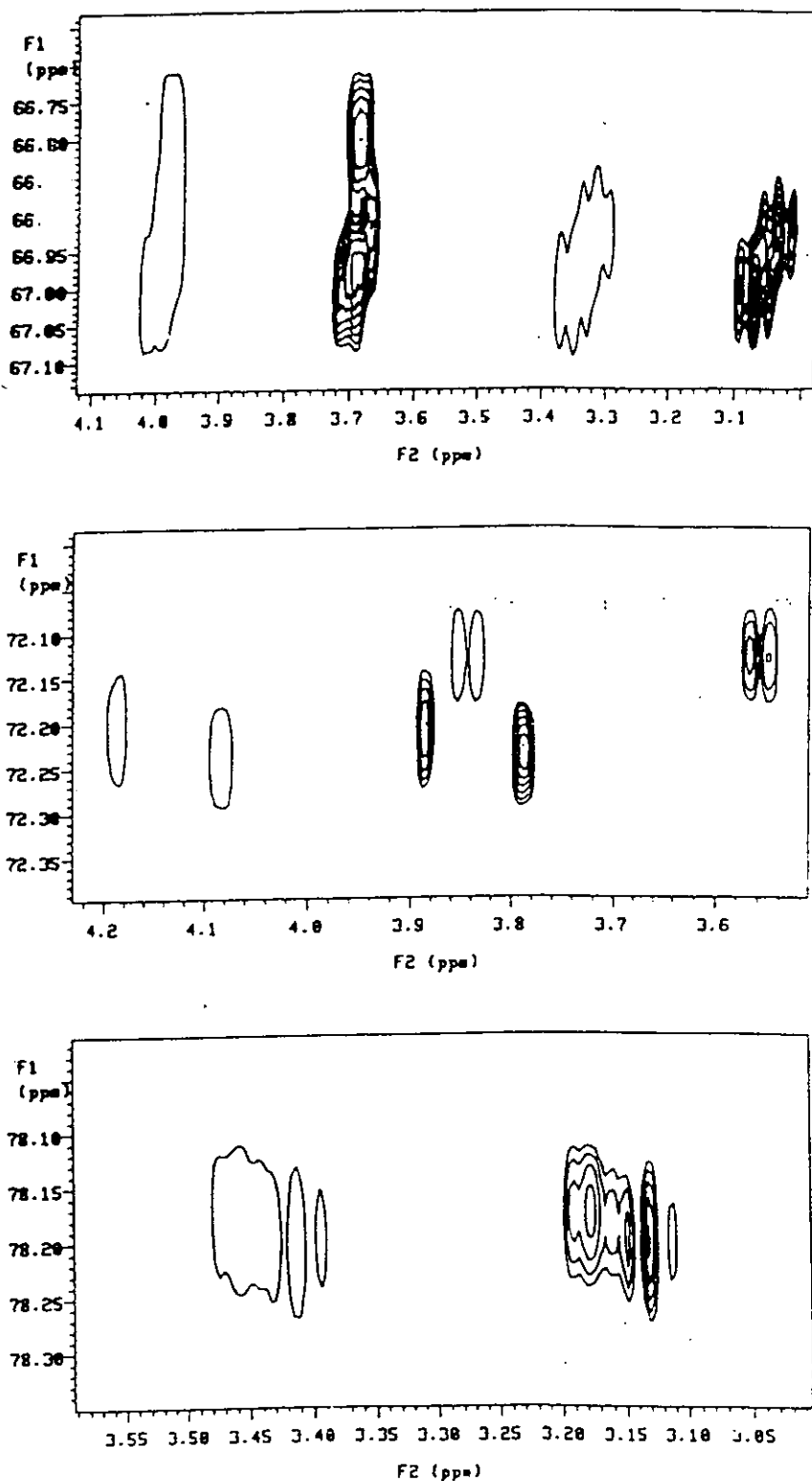


Figure 6. Expanded contours plots illustrating spectrally crowded regions for a coupled HSQC spectrum of the saponin described in the text. Each CH peak appears as an antiphase doublet with splitting = $^1J_{CH}$. Filled contours are positive and open contours are negative.

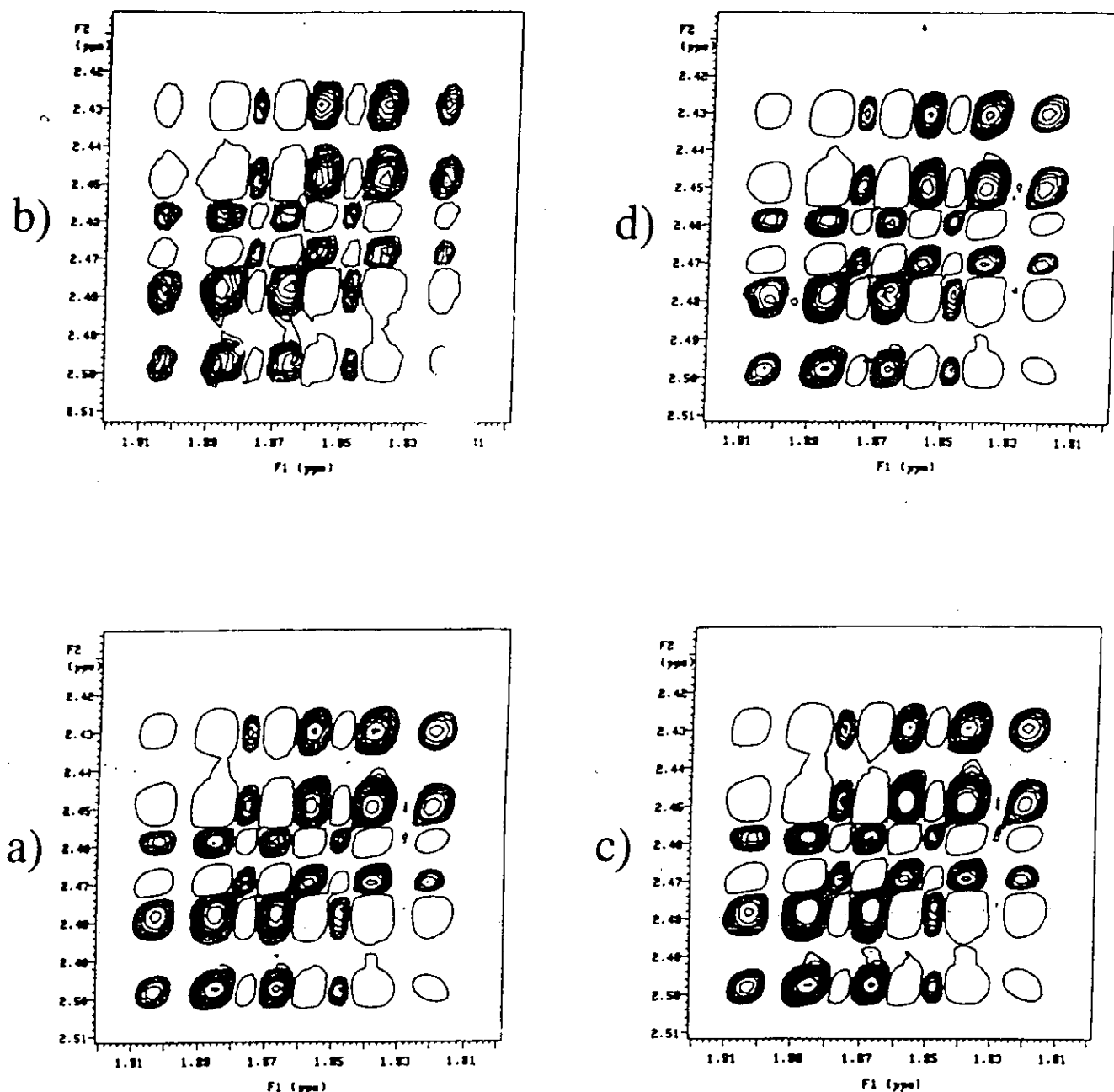


Figure 7. Typical DQ COSY cross peak (corresponding to $H-6_a/H-6_b$) for **1** with (a) experiment 12, (b) experiment 13, (c) experiment 12a and (d) experiment 12b. Note the close similarity of the spectra in (a) and (d), corresponding to linear prediction to 2048 and 512, respectively, with zero filling to 4096 in each case.

still be estimated for crowded spectral regions with the aid of linear prediction.

Consideration of other 2D experiments

Unlike HSQC (and hybrid sequences such as HSQC TOCSY), all of the other commonly used 2D experiments for organic structure elucidation show 1H multiplet structure along f_1 . Consequently, as we have pointed out for HMQC,¹² these sequences generally do not show increased sensitivity with increasing linear prediction beyond data point resolution comparable to multiplet width. Nevertheless, our experience has been that, for a given desired data point resolution, it is still

better to use linear prediction in order to save time or improve sensitivity. To illustrate this, we obtained two HMQC spectra for **1**, using the full spectral windows and respectively using 16 transients per increment with 256 increments predicted to 1024 and using four transients per increment with 1024 increments and no linear prediction (experiments 10 and 11). All other parameters were identical with those used for experiments 4–9. The average CH_2 cross-section signal-to-noise ratio was 160:1 for experiment 10 and 77:1 for experiment 11, consistent with the expected twofold difference in sensitivity. These values are *ca.* 70–80% of those obtained for the corresponding HSQC spectra on the same sample (see above), reflecting the detrimental impact of the increased HMQC f_1 multiplet width on signal-to-

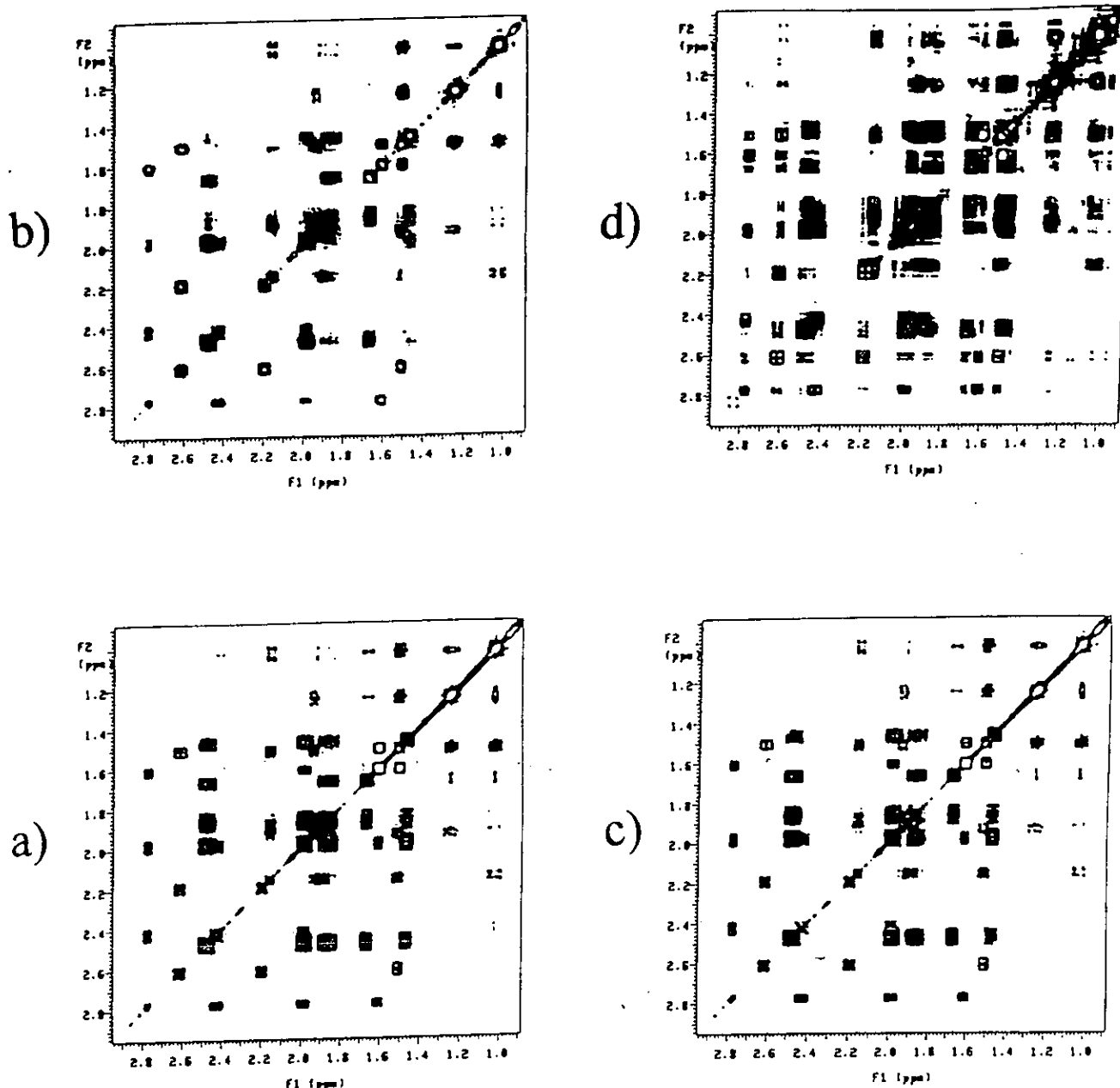


Figure 8. Absolute value COSY spectra for 1 obtained with (a) experiment 14, (b) experiment 14a, (c) experiment 14b and (d) experiment 14c. The spectrum in (b) (256 increments predicted to 1024) is clearly inferior to that in (a) (1024 increments), while that in (c) (512 increments predicted to 1024) is much closer to that in (a). Spectrum (d) illustrates the artifacts generated by extensive f_1 zero-filling (256 increments with zero filling to 2048).

noise ratio. This difference becomes more pronounced with increased linear prediction since the signal-to-noise ratio continues to increase for the HSQC spectrum (see Fig. 3) but actually decreases slightly for the HMQC spectrum.

The HMBC experiment²¹ with its very wide ^{13}C spectral window, along with ^1H multiplet structure along f_1 , represents a special case. Unlike other cross peaks, cross peaks involving methyl singlets have no f_1 multiplet structure and consequently increase in resolution and sensitivity with increasing linear prediction up to at least 16-fold prediction. These cross peaks are often important for structural and spectral assignments of natural products, particularly in the case of triterpenes.^{22–24} Consequently, it may be useful to

process HMBC spectra twice, once with fourfold linear prediction for most CH and CH_2 cross peaks but with more extensive prediction for CH_3 groups and other singlets.

Many of the 2D homonuclear correlation experiments also benefit from linear prediction, e.g. NOESY.⁴ One sequence of this type which provides a particularly rigorous test of linear prediction is the phase-sensitive DQ COSY sequence.²⁵ Cross peaks obtained with this sequence consist of complex two-dimensional arrays of closely spaced peaks, half positive in phase and half negative. In order to test the ability of linear prediction to reproduce these patterns, two double quantum COSY spectra were obtained for the aliphatic region of 1, using the dilute (1.5 mg ml^{-1}) sample. The spectral

widths were identical along both axes (1770 Hz) and 2048 points were collected and zero-filled to 4096. Experiment 12 used eight transients per time increment with 256 increments and linear prediction to 2048 (total acquisition time 2 h 7 min). Experiment 13 also had eight transients per time increment but 2048 increments and no linear prediction (total acquisition time 21 h 35 min). f_1 zero filling to 4096 was used in each case (i.e. better than 1 Hz data point resolution along each axis). The two spectra were similar in quality, even though the linearly predicted spectra took well under one eighth of the time of the experiment without linear prediction. Typical examples of complex cross peaks obtained for the two spectra are illustrated in Fig. 7(a) and (b). It is clear that eightfold linear prediction is capable of reproducing even complex, tightly spaced two-dimensional multiplet patterns.

By contrast, linear prediction does not work as well for absolute COSY spectra. This is illustrated in Fig. 8. Experiment 14 [Fig. 8(a)] used f_1 and f_2 spectral windows of 3500 Hz, 1024 data points and 1024 time increments (both zero filled to 2048). The spectrum was processed using the recommended²⁶ pseudo-echo weighting followed by triangular folding. Experiment 14a [Fig. 8(b)] was identical except that only the first 256 time increments were used and then linear predicted to 1024. The spectrum in Fig. 8(b) is clearly inferior to that in Fig. 8(a). Pseudo-echo processing produces a weighted interferogram which has zero intensity at the beginning and end of the evolution time with a maximum near the middle. Thus, when only the first quarter of the time increments are experimental, the predicted time increments contribute far more to the interferogram than the experimental points, in contrast to earlier spectra. This problem could be overcome by using the first 512 time increments, with linear prediction to 1024. This spectrum [Fig. 8(c)] is almost identical with that in Fig. 8(a). Some cross peaks are slightly weaker than in Fig. 8(a) but can be clearly observed by a small increase in the vertical scale. Fourfold linear prediction does work better if one uses a less extreme weighting function such as Gaussian multiplication, but at the expense of loss of resolution. Hence we suggest that no more than twofold linear prediction should be used for absolute value COSY spectra. This still represents a useful time saving.

Comparison of f_1 forward linear prediction with zero filling

In all of the spectra to date, linear prediction has been accompanied with zero filling to twice the number of points, to allow use of all linear predicted points as real points. Many reported studies used only f_1 zero filling without any linear prediction. To compare with the results presented above, a number of the spectra were reprocessed using no linear prediction, but with zero filling to yield the same total number of points as used previously. To begin, we reprocessed experiment 6 with zero filling in place of linear prediction. The initial processing (experiment 6e) used all 256 increments with zero filling to 2048. Typical ^{13}C cross-sections through a specific ^1H signal (H-13) for experiment 6 with linear

prediction and for experiment 6e with only zero filling are compared in Fig. 9(a) and (b). The spectrum with only zero filling showed broader and less intense peaks than that with linear prediction and individual f_1 cross-sections through specific f_2 frequencies of experiment 6e showed significant truncation wiggles [e.g. see Fig. 9(b)]. The average signal-to-noise ratio for $^{13}\text{CH}_2$ cross-sections was 79:1 with zero filling compared with 122:1 with linear prediction. Hence linear prediction is clearly superior in this case. In assessing this observation it should be noted that we used the same f_1 Gaussian weighting for both spectra (see Experimental). Reprocessing experiment 6e with more severe Gaussian weighting (0.009 s time constant in place of 0.036 s) eliminated the wiggles but gave significantly broader and less intense lines [see Fig. 9(c)]. Next, the same data set was reprocessed using only the first 128 or the first 64 time increments with zero filling to 2048 (experiments 6f and 6g). The spectral deterioration was even more noticeable in these cases and very pronounced truncation wiggles were observed. Similar observations were made on reprocessing the spectrum from experiment 9, using 256, 128 and 64 time increments with zero filling to 2048 (experiments 9a-c). Finally, the reprocessing of a number of stored HMBC data sets which used 256 increments in conjunction with 25 000–28 000 Hz f_1 spectral windows consistently showed significant improvement in resolution and sensitivity for fourfold linear prediction over zero filling.

By contrast, the difference between linear prediction and zero filling is significantly less for more extensive linear prediction. For example, when experiment 6 was linearly predicted to 1024 with zero filling to 8192 (experiment 6h), the sensitivity loss was less than 20% (signal-to-noise ratio 202:1 compared with 239:1) relative to linear prediction to 4096 followed by zero filling to 8192 (experiment 6a). Typical ^{13}C cross-sections for experiments 6a and 6h are illustrated in Fig. 9(d) and (e), respectively. Furthermore, the two spectra obtained by the reprocessing of experiment 9 with linear prediction to 4096 and zero filling to 8192 (experiment 9d) and with linear prediction to 1024 with zero filling to 8192 (experiment 9e) had nearly identical signal-to-noise ratios. The latter two spectra also showed only a one third increase in sensitivity relative to experiment 9, much less than the doubling of sensitivity for spectrum 6a compared with spectrum 6. Thus, for spectra with marginal signal-to-noise ratios, it appears that little is gained by linear prediction beyond a factor of four.

The most spectacular failure of zero filling was observed for the absolute value COSY spectrum. Reprocessing of experiment 14, using the first 256 time increments with zero filling to 2048 gave the spectrum illustrated in Fig. 8(d). It contains many spurious peaks. The nature of the weighting function used (see above) meant that the weighted interferogram was severely truncated. This led to intense truncation wiggles which appeared as t_1 ridges in the absolute value display. In turn, these lead to the spurious cross peaks after triangular folding. Hence zero filling beyond a factor of two is not recommended for absolute value COSY spectra. By contrast, reprocessing of the DQ COSY spectrum from experiment 12 using zero filling from 256 to 4096 with no linear prediction (experiment 12a) gave

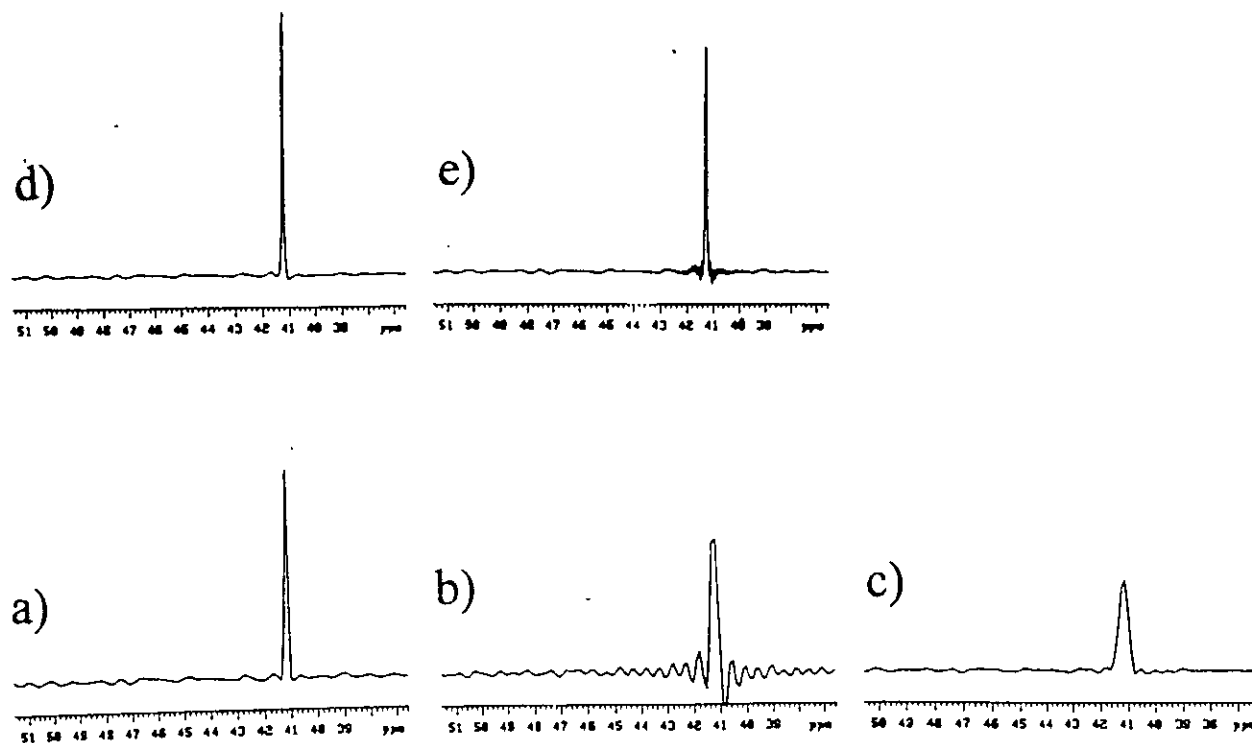


Figure 9. ^{13}C cross-sections through the chemical shifts of H-13 of 1 for spectra with varying degrees of linear prediction, zero filling and Gaussian multiplication: (a) 256 increments with linear prediction to 1024 and zero filling to 2048, Gaussian time constant = 0.036 s (experiment 6); (b) 256 increments with zero filling to 2048, Gaussian time constant = 0.036 s (experiment 6e); (c) repeat of experiment 6e with Gaussian time constant = 0.009 s; (d) 256 increments with linear prediction to 4096 and zero filling to 8192, Gaussian time constant = 0.144 s (experiment 6b); (e) 256 increments with linear prediction to 1024 and zero filling to 8192, Gaussian time constant = 0.144 s (experiment 6h).

a spectrum [Fig. 7(c)] which was only marginally inferior to that from experiment 12 with linear prediction to 2048 [Fig. 7(a)]. When experiment 12 was reprocessed, using linear prediction to only 512 points, followed by zero filling to 4096 (experiment 12b), the resultant spectrum [Fig. 7(d)] was essentially indistinguishable from that in Fig. 7(a). Inspection of the raw interferograms showed that most of the signal intensity had decayed away by 256 increments, reflecting the narrow spectral window (1770 Hz) and consequent long evolution time (0.15 s). Thus, with 2048 real points along each axis, the data point resolution is significantly less than the line-widths.

Based on these observations, one can conclude that the advantages of linear prediction over zero filling are greatest when the interferograms are significantly truncated but that these advantages become smaller as the signal level at the end of the evolution time (with or without linear prediction) approaches the noise level. This limit, which depends on the maximum f_1 evolution time, the T_2 relaxation time and the inherent signal-to-noise ratio of the experiment, is usually reached when the data point resolution approaches the natural f_1 line-widths, but sooner for weak spectra such as in experiment 9. Hence it is best to use linear prediction up to this limit with zero filling used beyond this point if better data point resolution is required.

f_2 linear prediction and linear prediction along both axes

There are obvious advantages to f_1 linear prediction since doubling the number of acquired increments auto-

matically doubles the total acquisition time. However, this is not generally true for f_2 . The actual acquisition time is usually only a small fraction of the total experiment time and thus the number of f_2 data points can be increased significantly with minimal impact on the total experiment time. The exception to this is provided by HSQC and HMQC spectra, which require ^{13}C decoupling during acquisition. In these cases, the necessity for keeping the decoupler duty cycle low to minimize thermal gradients in the sample means that an increased acquisition time must usually be accompanied by an increased preacquisition delay and consequent significant increase in the total experiment time. To test whether there would be advantages in f_2 linear prediction under these circumstances, the data set from experiment 5 (four transients per increment and 1024 time increments) was reprocessed using f_2 linear prediction to 1024 points from 512 (experiment 5a). The CH_2 cross-sections for the latter data set showed increased f_2 resolution but with a small loss in overall sensitivity. However, f_2 linear prediction without simultaneous f_1 linear prediction sacrifices the advantages of the latter. Since the spectrometer software allows linear prediction along both axes, this was tested for the data set from experiment 6 using linear prediction to 1024 along both axes (experiment 6i). A contour plot showed noticeable losses of sensitivity, resolution and precision of peak position compared with a spectrum with only f_1 linear prediction (experiment 6). There are two main problems with f_2 linear prediction. First, the narrow f_2 spectral window results in a sufficiently long acquisition time that most of the signal has decayed away before the

start of linear prediction. The second and more serious problem is that each FID contains cosine and sine components corresponding to all f_2 frequencies. By contrast, the f_1 interferograms have far fewer frequencies components, i.e. only those associated with one specific f_2 frequency. Hence f_2 forward linear prediction is inherently more difficult than f_1 linear prediction. This suggested that additional zero filling might be a viable alternative in this case. To test this, experiment 6 was reprocessed with the 512 data points zero filled to 2048 and with 256 time increments linear predicted to 1024 and zero filled to 2048 (experiment 6j). A contour plot

for an expanded region of the spectrum is illustrated in Fig. 10 with a cross-sectional plot for C-1 above the contour plot. This shows somewhat improved resolution compared with a similar plot from experiment 6, owing to the improved definition of multiplet structure with additional points combined with the use of a less severe weighting function. The average signal-to-noise ratio also improved from 122:1 to 152:1. Thus, in contrast to f_1 processing, modest zero filling seem to be better than linear prediction for f_2 processing. However, if excellent f_2 resolution is required for an HMQC or HSQC spectrum, it is probably better

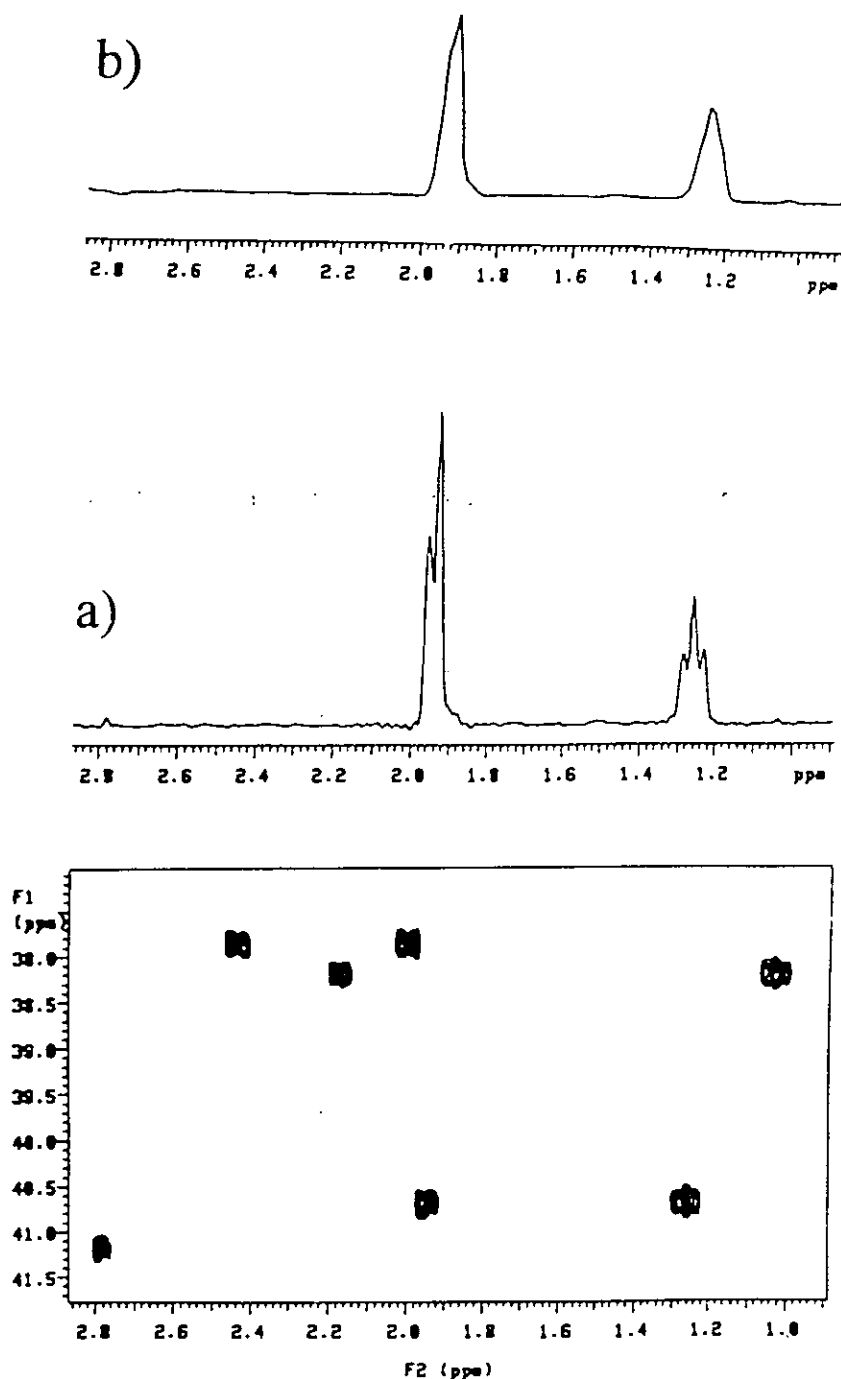


Figure 10. Contour plot of a region of the HSQC spectrum of 1 obtained with experiment 6j. The cross-sectional plots above the contour plot are for C-1, showing the improved f_2 resolution with zero filling to 2048 [cross-section (a), experiment 6j] vs. zero filling to only 1024 [cross-section (b), experiment 6].

to run a ^{13}C coupled spectrum^{12,27} since more data points can be acquired with a relatively short pre-acquisition delay.

CONCLUSION

It has been confirmed that f_1 forward linear prediction is a powerful technique for improving resolution and/or sensitivity of routine 2D spectra, and also as for minimizing the time needed to acquire spectra of the desired quality. For ^1H -detected ^{13}C - ^1H shift correlation sequences, the optimum number of increments appears to be 256 in most cases. With this number of increments, f_1 linear prediction seems surprisingly robust, with HSQC spectra showing improved resolution and sensitivity, and also accurate prediction of ^{13}C chemical shifts, up to 16-fold linear prediction. With the exception of absolute value COSY spectra, other 2D spectra show improvements out to at least fourfold linear prediction. Fourfold forward f_1 linear prediction gives better results than the corresponding amount of zero filling in almost all cases. In view of the obvious advantages of f_1 forward linear prediction for 2D NMR, we strongly encourage its regular use. By contrast, f_2 forward linear prediction is not advantageous but modest f_2 zero filling may yield improved results.

EXPERIMENTAL

All spectra were obtained on a Varian UNITY 500 spectrometer equipped with a 5 mm inverse detection probe (^1H 90° pulse width = 9.5 μs , ^{13}C decoupler pulse width = 9.4 μs) and operating at 25 °C. All spectra were acquired without sample spinning, using the hyper-

complex method²⁸ to acquire phase-sensitive spectra. HSQC and HMQC spectra were acquired using a pre-acquisition delay of 1.6 s and a BIRD nulling delay of 0.4 s. GARP ^{13}C decoupling²⁹ was used during acquisition. The coupled HSQC spectrum for the saponin was acquired with a BIRD nulling delay of 0.25 s and a pre-acquisition delay of 0.6 s. The DQ COSY spectra were acquired using a preacquisition delay of 1.6 s with a homospoil pulse applied during the delay to destroy residual magnetization.

Gaussian weighting functions were used for both axes of the phase-sensitive 2D spectra, with the functions matched to the acquisition time or the evolution time (with or without linear prediction and/or zero filling). This was done using the interactive software which displays the FID or interferogram with the shape of the weighting function superimposed. The latter was adjusted to approach zero at the end of the acquisition or evolution time. This typically involved using a Gaussian time constant which was 0.6 times the acquisition or evolution time. Linear prediction was carried out using standard Varian software which is based on the algorithm of Barkhuisjen *et al.*¹ The latter is a linear least-squares procedure based on singular value decomposition. Linear prediction for HSQC and HMQC spectra assumed up to eight peaks per f_2 frequency, while the linear predicted DQ COSY and absolute value COSY spectra allowed for up to 32 peaks per f_2 frequency.

Acknowledgements

Financial support from NSERCC (Canada) and DGAPA (UNAM) (Mexico) is acknowledged by W.F.R. and R.G.E., respectively. Helpful discussions with Professor Lewis Kay (Toronto), Professor A. D. Bain (McMaster) and Dr V. V. Krishnamurthy (Varian Associates) are acknowledged.

REFERENCES

- H. Barkhuisjen, R. deBeer, W. M. M. J. Bovee and D. van Ormondt, *J. Magn. Reson.* **61**, 465 (1985).
- C. F. Tirendi and J. F. Martin, *J. Magn. Reson.* **81**, 577 (1989).
- G. Zhu and A. Bax, *J. Magn. Reson.* **90**, 405 (1990); **98**, 192 (1992).
- D. M. Babcock, P. V. Saharabachbre and W. H. Gneimer, *Magn. Reson. Chem.* **34**, 851 (1996).
- W. F. Reynolds, M. Yu, B. Ortiz, A. Rodriguez, F. Yuste, F. Walls, R. G. Enriquez and D. Gnecco, *Magn. Reson. Chem.* **33**, 3 (1995).
- W. F. Reynolds, A. Maxwell, B. Telang, K. Bedaisie and G. Ramcharan, *Magn. Reson. Chem.* **33**, 412 (1995).
- S. M. Kristensen and J. J. Led, *Magn. Reson. Chem.* **33**, 461 (1995).
- W. F. Reynolds, J.-P. Yang and R. G. Enriquez, *Magn. Reson. Chem.* **33**, 705 (1995).
- M. H. M. Sharaf, P. L. Schiff, A. N. Tackie, C. H. Phoebe, L. Howard, C. Meyers, C. E., Hadden, S. K. Wrenn, A. O. Davis, C. W. Andrews, D. Minick, R. L. Johnson, J. P. Schockcor, R. C. Crouch and G. E. Martin, *Magn. Reson. Chem.* **33**, 761 (1995).
- H. Hani, A. Elgamal, H. S. M. Soliman, G. Toth, J. Halasz and H. Duddeck, *Magn. Reson. Chem.* **34**, 697 (1996).
- G. Toth, J. Halasz, S. Boros, A. Levai, C. Nemes and T. Patonay, *Magn. Reson. Chem.* **34**, 932 (1996).
- W. F. Reynolds, S. McLean, L.-L. Tay, M. Yu, R. G. Enriquez, D. M. Estwick and K. O. Pascoe, *Magn. Reson. Chem.* **35**, 455 (1997).
- G. Bodenhausen and D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.* **69**, 185 (1980).
- W. F. Reynolds, R. G. Enriquez, L. I. Escobar and X. Lozoya, *Can. J. Chem.* **62**, 2421 (1984).
- A. Bax and S. Subramanian, *J. Magn. Reson.* **67**, 565 (1986).
- A. Bax, M. Ikura, L. E. Kay, D. A. Torchia and R. Tschudin, *J. Magn. Reson.* **68**, 304 (1990).
- A. F. Mehlkopf, D. Korbee, T. A. Tiggelman and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **58**, 315 (1984).
- G. A. Morris, *J. Magn. Reson.* **100**, 316 (1992).
- W. F. Reynolds, M. Yu, R. G. Enriquez, H. Gonzalez, I. Leon, G. Magos and M. L. Villareal, *J. Nat. Prod.* **58**, 1730 (1995).
- W. F. Reynolds, M. Yu, R. G. Enriquez and I. Leon, to be published.
- A. Bax and M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2093 (1986).
- W. F. Reynolds, S. McLean, J. Poplowski, R. G. Enriquez, L. I. Escobar and I. Leon, *Tetrahedron* **42**, 3419 (1986).
- S. McLean, M. Perpik-Dumont, W. F. Reynolds, H. Jacobs and S. S. Lachmansing, *Can. J. Chem.* **65**, 2519 (1987).
- S. McLean, W. F. Reynolds, J.-P. Yang, H. Jacobs and L.-L. Jean-Pierre, *Magn. Reson. Chem.* **32**, 422 (1994).
- U. Piantini, O. W. Sorensen and R. R. Ernst, *J. Am. Chem.*

- Soc.* 104, 6800 (1982).
26. A. Bax and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **44**, 542 (1981).
27. D. Yang, X. Xu and C. Ye, *Magn. Reson. Chem.* **30**, 711 (1992).
28. D. J. States, R. A. Haberkorn and D. J. Ruben, *J. Magn. Reson.* **48**, 286 (1982).
29. A. J. Shaka, P. B. Barber and R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **64**, 547 (1985).