

EMPLEO DE MÉTODOS ANALÍTICOS MODERNOS PARA EL AISLAMIENTO Y LA IDENTIFICACIÓN DE RESINAS GLICOSÍDICAS DE LA FAMILIA CONVULVACEAE

ANALYTICAL METHODS FOR ISOLATION AND IDENTIFICATION OF RESIN GLYCOSIDES FROM CONVULVACEAE FAMILY

Jhon Fredy Castañeda-Gómez¹, Paula Andrea Charry¹, Rogelio Pereda-Miranda²

¹ Programa de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Quindío.
jfcastaneda@uniquindio.edu.co, pacharrys@uqvirtual.edu.co

² Departamento de Farmacia, Lab.123, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. pereda@unam.mx.

Recibido: Agosto 10 de 2013

Aceptado: Agosto 21 de 2013

*Correspondencia del autor: Universidad del Quindío, Av. Bolivar calle 12 Norte Armenia Quindío Colombia.
e-mail: jfcastaneda@uniquindio.edu.co

RESUMEN

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) ha sido una de las herramientas esenciales y poderosas para la purificación de moléculas orgánicas simples y complejas. En el campo de las macromoléculas, este método analítico de separación ha permitido la purificación de numerosos glicolípidos que constituyen las resinas glicosídicas, como moléculas únicas presentes en especies vegetales pertenecientes a la familia Convolvulaceae.

Como una contribución a la divulgación científica, en el presente artículo se describen las técnicas para la purificación de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas, mediante la cromatografía de líquidos, como el “corte de núcleo - rasurado de pico” y el “reciclaje”. Adicionalmente, se detallan las características espectroscópicas y espectrométricas por las técnicas de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas a través de los métodos de ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB) y por electrospray (ESI), para la identificación de estos glicolípidos complejos.

Palabras clave: Convolvulaceae, Resinas Glicosídicas, Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia, Resonancia Magnética Nuclear.

ABSTRACT

High-Performance Liquid Chromatography has been a powerful technique for purification from simple and complex molecules. Resin Glycosides has been isolated from convolvulaceae species and purified by Preparative-scale recycling HPLC. This paper has been written as an effort to contribute to the scientific knowledge about chemistry of resin glycosides, especially, purification techniques from some intact glycolipids by HPLC, as well as, the spectroscopic characteristics by Nuclear Magnetic Resonance and spectrometric details by fast-atom bombardment mass spectrometry (FABMS) and electrospray ionization (ESIMS), for the identification of these class of molecules.

Keywords: Convolvulaceae, Resin Glycosides, High Performance Liquid Chromatography, Nuclear Magnetic Resonance

INTRODUCCIÓN

La familia *Convolvulaceae* pertenece al grupo de las angiospermas que posee alrededor de 55 géneros y 1650 especies en el mundo (1). En Colombia, se estiman alrededor de 13 géneros y 81 especies, dentro de las cuales 39 especies corresponden al género *Ipomoea* (2). Esta familia es la que mejor representa las propiedades medicinales purgativas y alucinógenas de los vegetales, donde los géneros más significativos de esta familia son *Ipomoea*, *Convolvulus*, *Exogonium* y *Operculina* (3). El género *Ipomoea* se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, en especial en las regiones tropicales, subtropicales y templadas de ambos hemisferios. La mayoría de las plantas del género *Ipomoea* son enredaderas con tallos enroscados que alcanzan de 1 a 5 metros. Una de las características más notables de esta familia es la presencia de células secretoras de resinas glicosídicas en sus tejidos foliares y radiculares (4).

Las resinas glicosídicas constituyen un conjunto de glicolípidos de alto peso molecular, cuya porción hidrofílica está compuesta de un núcleo oligosacárido y la porción hidrofóbica por una aglicona que está representada por un ácido graso mono o dihidroxilado de 16 o 14 átomos de carbono unidos a través de un éster cíclico intramolecular. La mayoría de las veces, el núcleo oligosacárido se encuentra esterificado por ácidos grasos saturados con diferentes longitudes de cadena (5) (Figura 1).

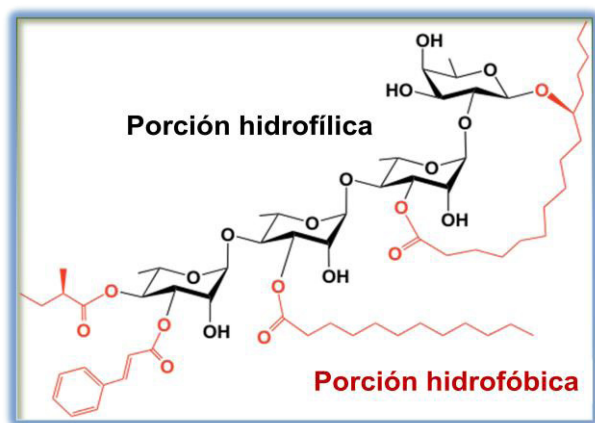


Figura 1. Estructura general de un glicolípido

La diversidad estructural de las resinas glicosídicas surge de las variaciones en el número y tipo de unidades sacáridas que componen el núcleo oligosacárido, en la secuencia de glicosidación, en la posición de lactonización y en el tipo, número y posición de los ácidos que se encuentran acilando al núcleo. Así, se han podido identificar desde disacáridos hasta heptasacáridos y dímeros tipo éster constituidos por tres hasta cinco azúcares en cada unidad oligomérica. Estos núcleos se componen principalmente de cuatro carbohidratos, tres 6-desoxihexosas como son la D-fucosa (Fuc), D-quinovosa (Qui), L-ramnosa (Ram), D-xilosa (Xil), y la D-glucosa (Glu), como la única hexosa presente en esta clase de metabolitos aislados de plantas pertenecientes a la familia *Convolvulaceae* (5) (Figura 2).

En cuanto a la secuencia de glicosidación, se han encontrado lipooligosacáridos lineales o ramificados y los ácidos que con mayor frecuencia representan a las agliconas de las macrolactonas son los ácidos (11*S*)-hidroxihexadecanoico (ácido jalapínico) y el (11*S*)-hidroxitetradecanoico (ácido convolvulinico) (5). Sin embargo, otras agliconas han sido identificadas como son el ácido 3,11-dihidroxitetradecanoico (ácido ipurólico) y el ácido (11*S*)-hidroxi-4-oxotetradecanoico, las cuales han sido encontradas en las resinas glicosídicas de las semillas de la planta *Pharbitis nil* y en las hojas de la planta *Ipomoea squamosa*, respectivamente. Los ácidos 12-hidroxipentadecanoico, 12-hidroxihexadecanoico y 12-hidroxieptadecanoico fueron identificados en las resinas glicosídicas de la planta *Ipomoea turpe-thum* (6). Los ácidos carboxílicos que frecuentemente se encuentran acilando los núcleos oligosacáridos son derivados de cadena corta que incluyen a los ácidos acético (ac), propiónico (pa), *n*-butírico (ba), isobutírico (iba), (2*S*)-2-metilbutírico (mba), 3-metilbutírico (3-mba), (-)-(2*R*,3*R*)-3-hidroxi-2-metilbutírico (ácido nílico, nla), y 2-metil-2-butenóico (tiglico, tga). También, se han encontrado ésteres derivados de ácidos arilalquílicos como el (2*E*)-3-fenil-2-propenoico (ácido cinámico, CA) y ésteres derivados de ácidos grasos con diferentes longitudes de cadena, tales como, el *n*-hexanoico (hexa) o caproico, *n*-octanoico (octa) o caprílico, *n*-decanoico (deca) o cáprico, *n*-dodecanoico (dodeca) o láurico, *n*-hexadecanoico (hexadeca) o palmítico, *n*-octadecanoico (octadeca) o esteárico, y *n*-eicosanoico (eicosa) o ácidos araquidónicos (5).

Cabe mencionar que los constituyentes individuales que componen las resinas glicosídicas de una misma especie comparten, en la mayoría de los casos, un mismo núcleo oligosacárido. Por lo tanto, los núcleos oligosacáridos

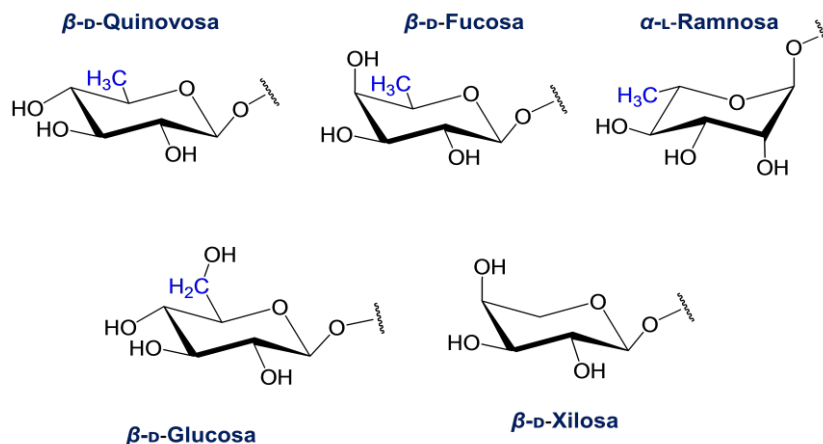


Figura 2. Carbohidratos comunes en las resinas glicosídicas

de las resinas glicosídicas pueden ser identificados a través de métodos de degradación (hidrólisis alcalina), permitiendo la obtención de los ácidos glicosídicos que son distintivos de las especies que los biosintetizan.

MÉTODOS Y RESULTADOS

(a) Métodos de Separación de Resinas Glicosídicas

Las resinas glicosídicas son compuestos anfipáticos debido a la presencia de largas cadenas alifáticas enlazadas a un extremo polar. Esta clase de moléculas no es muy fácil de aislar y purificar, ya que siempre se presentan como mezclas complejas de homólogos constituidas con el mismo núcleo oligosacárido pero con diferentes sustituyentes alquilo o arilo que difieren en la longitud de la cadena. Aunque, existen muy pocos reportes sobre el aislamiento de glicolípidos a través de la cromatografía de capa delgada, este procedimiento no es adecuado para la purificación de los constituyentes individuales. Los métodos de separación como la cromatografía de columna abierta usándose silicagel, sephadex, intercambio iónico y filtración en gel fueron también empleados para la separación de estos compuestos, pero sin resultados exitosos (5). La naturaleza química (moléculas anfipáticas) y la complejidad de las resinas glicosídicas constituyen la necesidad del empleo de métodos cromatográficos y espectroscópicos modernos para el aislamiento de los constituyentes individuales y su caracterización estructural (3, 5).

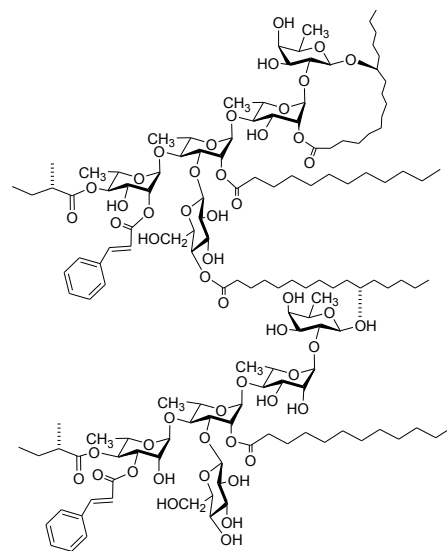
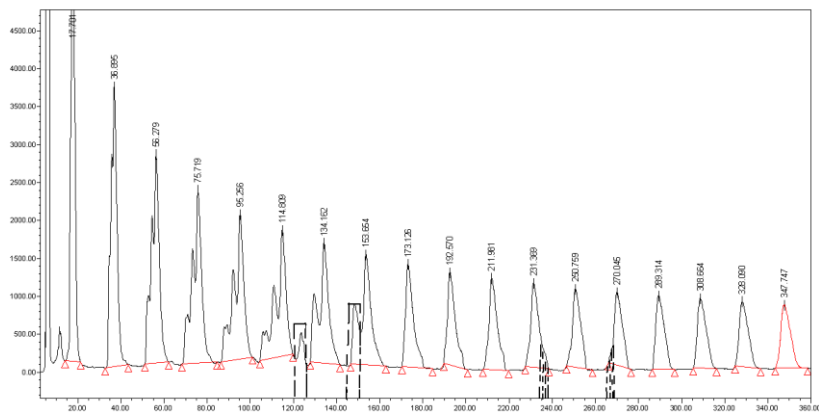
La cromatografía de líquidos de alta eficiencia provee la separación de componentes de una mezcla con resolución máxima en un tiempo corto a través de la disponibilidad de partículas de tamaño pequeño de forma

esférica e irregular ($< 25 \mu\text{m}$), tamaño de poro de 60 y 130 Å y fases estacionarias modificadas. Encontrar las mejores condiciones analíticas para la separación es el principal desafío técnico para la separación de macromoléculas, como los glicolípidos. Es decir, establecer la mejor fase estacionaria y la fase móvil, el modo de elución por gradiente o isocrático y la carga de muestra máxima que se requiere para que se obtengan picos adecuados correspondientes a los congéneres individuales, constituyen los principales objetivos para establecer la composición química de las resinas glicosídicas obtenidas de fuentes naturales. La ventaja del empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, es el escalamiento a nivel semi-preparativo que permite la purificación de grandes cantidades de muestra sin afectar la resolución. Columnas de fase normal y columnas de fase modificada como la octilsilica C_8 , octadecilsilica C_{18} , ciano y fenil, han demostrado ser fases estacionarias adecuadas para el aislamiento de macromoléculas, como los glicolípidos (7- 11). Hasta ahora, la fase que más éxito ha tenido en la separación de este tipo de moléculas es la columna silicaaminopropilmetilo, una columna también usada para el análisis de carbohidratos. Las técnicas como corte de núcleo y rasurado de pico, empleadas individualmente o combinadas, han sido usadas en la purificación de los constituyentes individuales glicosilados. Inicialmente, cada pico del conjunto de picos mostrados en el cromatograma es colectado mediante una válvula a nivel semipreparativo o preparativo (Cantidad de muestra: 50 mg/500 μL).

La técnica de cromatografía de reciclaje, ha permitido la purificación de cada pico colectado, hasta que los componentes sobrepuestos son separados, como se ha demostrado para los batatinósidos, intrapilosinas,

murucoidinas, orizabinas, pescapreínas, tricolorinas, purginósidos, purginas, albinósidos etc. Esta técnica consiste en hacer pasar la muestra por la columna o fase estacionaria durante varios ciclos de manera manual o automática a través de una válvula de reciclaje. El procedimiento finaliza hasta que se observe un pico de comportamiento gaussiano, sin la presencia de picos minoritarios, como indicativos de impurezas en la muestra (5).

Los purginósidos y las purginas, son glicolípidos que se aislaron de la planta *Ipomoea purga*. Estas moléculas fueron purificadas mediante cromatografía de líquidos en el modo reverso y a través de las técnicas de “corte de núcleo”, “rasurado de pico” y “reciclaje”. Cabe destacar, que las purginas son dímeros de oligosacáridos de alto peso molecular que sólo pudieron ser purificadas mediante estas técnicas cromatográficas (7, 8) (Figura 3).



Condiciones instrumentales:

Columna C₁₈ (19 × 300 mm, 7 μm)
 Fase móvil: MeOH; flujo de elución: 8.0 mL/min;
 Detector: IR;
 Volumen de inyección de la muestra: 500 μL (50 mg/500 μL).

Figura 3. Purificación de la purgina I mediante la técnica de cromatografía de reciclaje.

(b) Métodos de Identificación de Glicolípidos Naturales:

Los principales métodos para la elucidación de las resinas glicosídicas involucran el uso de reacciones químicas degradativas o la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas de alta resolución, como el mejor camino para la caracterización completa de estas moléculas complejas (5).

La ruptura de polisacáridos a moléculas simples mediante reacciones químicas como la saponificación, fue una metodología que se empleó en el pasado debido a la carencia de métodos para el aislamiento de glicolípidos en sus constituyentes intactos. La saponificación del material crudo libera los ácidos grasos correspondientes a los sustituyentes que esterifican los núcleos oligosacáridos. De esta manera, los ácidos glicosídicos obtenidos son sometidos a una segunda reacción de hidrólisis en medio ácido para la liberación de los carbohidratos co-

respondientes y la aglicona perteneciente al fragmento que forma la macrolactona en las resinas glicosídicas intactas. Los ácidos grasos libres o sus derivados metilados o etil ésteres son analizados mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (5) (Tabla 1).

La longitud de la cadena de la aglicona que forma la macrolactona y su posición de hidroxilación son determinados mediante el análisis directo por espectrometría de masas de impacto electrónico (EIMS) de la aglicona (ácidos grasos hidroxilados C₁₄ o C₁₆) o por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-EIMS) de sus derivados metil éster o silylados. Las unidades de azúcar son convertidas a sus derivados volátiles por tratamiento con clorotrimetilsilano y luego analizadas por GC-MS. Para evitar la anomerización de los monosacáridos se recomienda realizar la silylación de los grupos hidroxilo y la mercaptalación de la función aldehído. Los monosacáridos pueden ser también

Tabla 1. Algunos ácidos grasos identificados mediante CG-MS de resinas glicosídicas

Ácido Orgánico	t_R (min)	m/z
Ácido isobutírico	1.12	$[M]^+$ 88 (20), 73 (28), 70 (55), 61 (100)
Ácido 2-metilbutírico	2.0	$[M]^+$ 102 (8), 87 (2), 74 (12), 57 (100)
Ácido hexanoico	6.5	$[M]^+$ 116 (2), 99 (3), 87 (21), 73 (63), 60 (100), 41 (16), 39 (7)
Ácido octanoico	7.0	$[M]^+$ 144 (2), 115 (8), 101 (18), 73 (75), 60 (100), 55 (28)
Ácido decanoico	7.4	$[M]^+$ 172 (2), 155 (1), 143 (8), 129 (50), 115 (12), 112 (8), 87 (16), 73 (100), 60 (90), 57 (32), 55 (30)
Ácido cinámico	7.7	$[M]^+$ 148 (84), 147 (100), 131 (22), 103 (42), 102 (21), 77 (28), 74 (5), 51 (12), 50 (5)
Ácido dodecanoico	8.01	$[M]^+$ 200 (9), 183 (2), 171 (15), 157 (38), 143 (9), 129 (45), 115 (22), 101 (15), 85 (30), 73 (100), 60 (68), 57 (30), 55 (30)

detectados mediante cromatografía líquida de alta eficiencia usando una columna analítica de carbohidratos. Procedimientos como la permetilación de los ácidos glicosídicos, seguido por hidrólisis ácida, reducción del anillo de piranosa a los correspondientes alditoles y acetilación deben ser usados para establecer el número y las posiciones relativas de los enlaces glicosídicos. Esta estrategia permite la discriminación entre los grupos hidroxilo libres los cuales son metilados en los alditoles y los grupos hidroxilo involucrados en los enlaces glicosídicos (acetilados en los alditoles) (5).

El empleo de una combinación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas de alta resolución ha facilitado la elucidación de oligosacáridos y polisacáridos sin recurrir a métodos que destruyan o degraden los productos naturales intactos. Las glicoresinas naturales, aun aquellas con cuatro sustituyentes éster son sólidos polares con puntos de fusión generalmente por encima de los 100 °C, por lo tanto, son consecuentemente no volátiles y difíciles de vaporizar en una fuente de ionización por impacto electrónico sin que ocasione daño térmico. El método de ionización química no es un método analítico adecuado para estos compuestos, aun para sus derivados peracetilados y permetilados que son fácilmente volatilizados o ionizados. Las técnicas de ionización suave como la ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB) y la ionización por electrospray (ESI), han hecho una contribución grandiosa al campo de la elucidación de glicolípidos. La muestra se ioniza a especies moleculares protonadas (modo positivo) o desprotonadas (modo negativo). La principal ventaja en el análisis por FAB es debido al uso de una matriz líquida, la cual facilita la producción de iones moleculares

del soluto, ayuda a mantener una emisión persistente de estos iones moleculares y permite la disipación de la energía de la fuente primaria. El glicerol es la matriz comúnmente usada en el análisis de oligosacáridos no derivatizados en el modo positivo. Otras matrices para muestras hidrofóbicas son: el alcohol 3-nitrobenilo (3-NOBA), tioglicerol y la trietanolamina. La calidad de la espectrometría de masas depende del pH, el cual es regulado mediante la adición de trazas de HCl y de la fuerza iónica de la matriz, la cual debe ser incrementada por impregnación de la muestra con soluciones metanólicas de NH_4SCN , NaCl ó NaOAc. Estos aditivos promueven la formación de cationes pseudo-moleculares abundantes tales como $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$ y $[M + NH_4]^+$ ó aniones tales como $[M + SCN]^-$, y también facilitan la fragmentación característica de los enlaces glicosídicos para propósitos de diagnóstico. El uso de la trietanolamina conduce a una fragmentación adecuada en el modo negativo para la identificación de la secuencia de glicosidación. El número de unidades en estos oligómeros es obtenido a través de la detección de iones moleculares y fragmentos (12, 13). La ionización por electrospray también proporciona información valiosa sobre la composición, la secuencia, la ramificación de la cubierta oligosacárida y el tipo de unidades de azúcar. El espectro de masas reportado para las purginas, ilustra la naturaleza de estos compuestos como dímeros tipo-éster en el modo negativo (7) (Figura 4).

Los espectros unidimensionales de resonancia magnética nuclear de protón (RMN 1H) y de carbono (RMN ^{13}C) proporcionan una información general acerca de las estructuras químicas de los glicolípidos. Así, el análisis de los espectros por RMN ^{13}C permite determinar

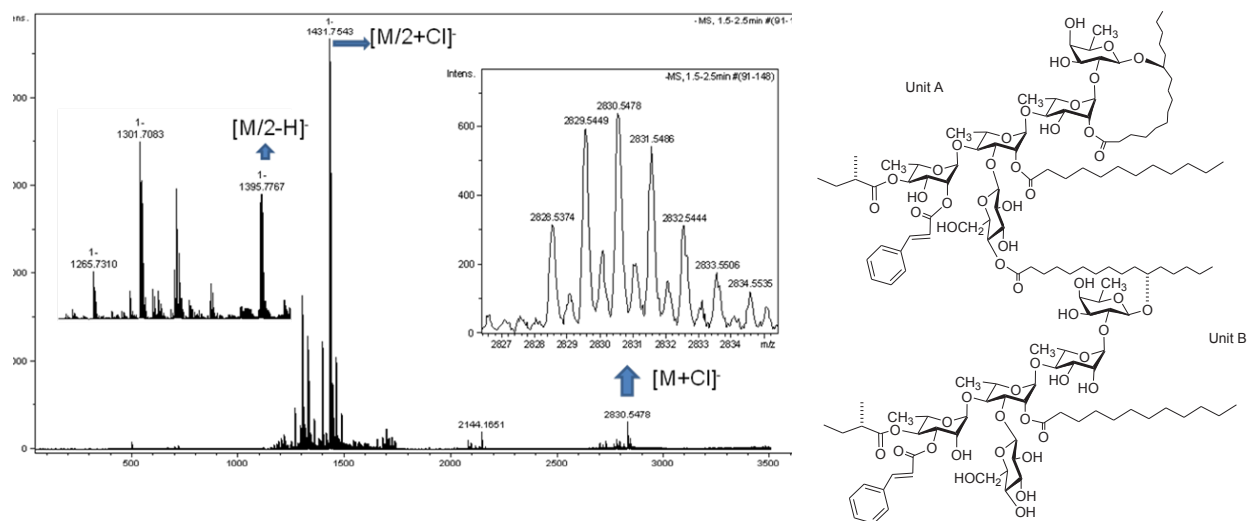


Figura 4. Espectro de masas por electrospray de la purgina I, un glicolípido que presenta una estructura dimérica tipo éster.

el número de señales anoméricas en la región comprendida entre δ_c 95 - 110 ppm, que indican el número de monosacáridos que se encuentran constituyendo el núcleo oligosacárido en estas moléculas. Las resonancias de protones correspondientes a las señales anoméricas en el espectro RMN 1H en la región comprendida entre δ_c 4.5 - 6.0 ppm pueden ser identificadas mediante el experimento HSQC que permite la correlación C-H a un enlace de distancia ($^1J_{CH}$). Una vez que se determinan las señales de los protones anoméricos, se analizan sus multiplicidades para identificar el tipo de azúcar mediante los patrones de acoplamiento. De esta forma, las señales que se presentan como singuletes anchos pueden ser atribuidos a las unidades monosacáridas de L-ramnosa y las señales anoméricas que se presentan como dobletes con constantes de acoplamiento de 7.5 Hz ($^3J_{H-H}$) son atribuidas a la unidad de D-fucosa, cuya presencia se confirma mediante la señal generada por el protón localizado en el carbono C_5 como un cuarteto con constantes de acoplamiento de 6.5 Hz ($^3J_{H-H}$) y centrada en δ_H 3.7 ppm aproximadamente (3, 5).

Las señales anoméricas correspondientes a las unidades de D-glucosa se asignan debido a su multiplicidad como dobletes con constantes de acoplamiento de 7.5 Hz ($^3J_{H-H}$). Todas las señales vecinales a los protones anoméricos de estas unidades deben presentar concordancia con las características determinadas por los patrones de acoplamiento como doblete de dobletes (pseudo-tripletes) con constantes de acoplamiento aproximadamente de 9.5 Hz ($^3J_{H-H}$) y que resultan de la orientación ecuatorial de los sustituyentes en el anillo glucopiranosido (3, 5).

Otras señales de diagnóstico para identificar glicolípidos son las señales dobles observadas entre δ_H 1.4-1.7 ppm en el espectro de RMN 1H y que corresponden a los protones de los grupos metilo de las 6-desoxihexosas. Un ejemplo para ilustrar la caracterización espectroscópica de un glicolípido, es el purginósido II, que fue aislado del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Ipomoea purga* (Figura 5).

El empleo de las técnicas bidimensionales en la RMN (1H - 1H COSY y TOCSY) permite la asignación de las señales restantes de cada uno de los protones metinos en cada monosacárido. El procedimiento de asignación de señales mediante estas técnicas se inicia con la localización de los protones anoméricos y el establecimiento de los cuadros de conectividad de cada uno de los protones con su metino vecinal correspondiente a lo largo de toda la unidad sacárida. Es importante mencionar que para la identificación se tiene en cuenta la localización de las señales mejor resueltas, e.g., H_5 de la fucosa, H_3 de la primera unidad de ramnosa (ram) y H_2 de la tercera unidad de ramnosa (ram''), las cuales facilitan el diagnóstico para su asignación correcta, en especial en aquellos casos donde los protones vecinos a estos protones fácilmente identificables se encuentran localizados en regiones con sobreposición de señales. En los casos, donde se observa un desplazamiento de protón por arriba de δ_H 5.5 ppm, indica una posición de esterificación en el carbono correspondiente, debido al efecto desprotector de los sustituyentes éster en el núcleo oligosacárido (7) (Figura 6).

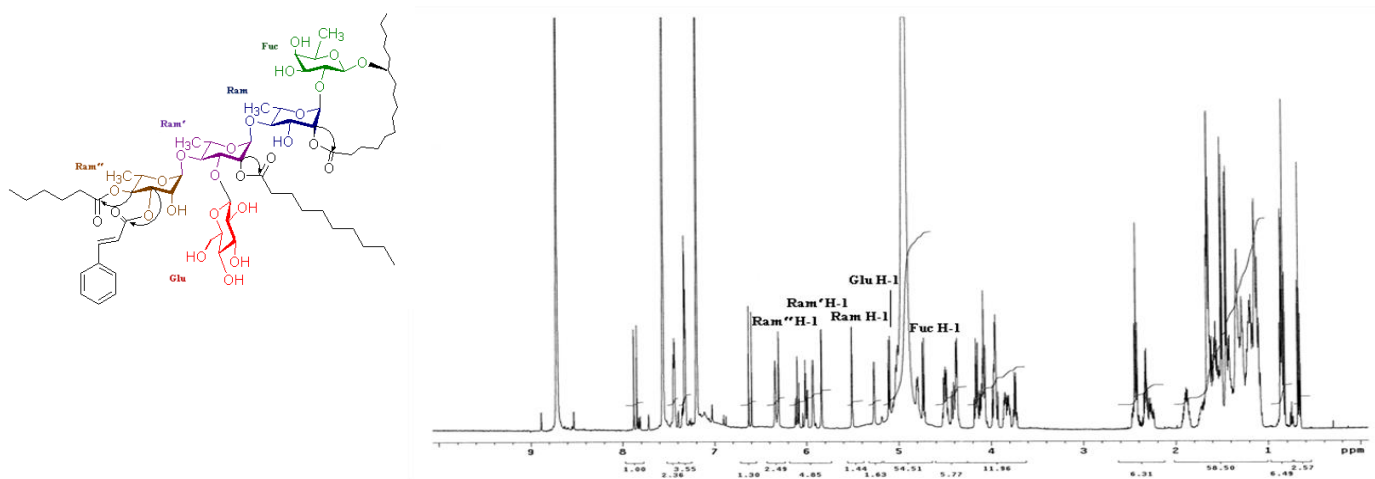


Figura 5. Espectro de RMN ¹H del puriginosido II

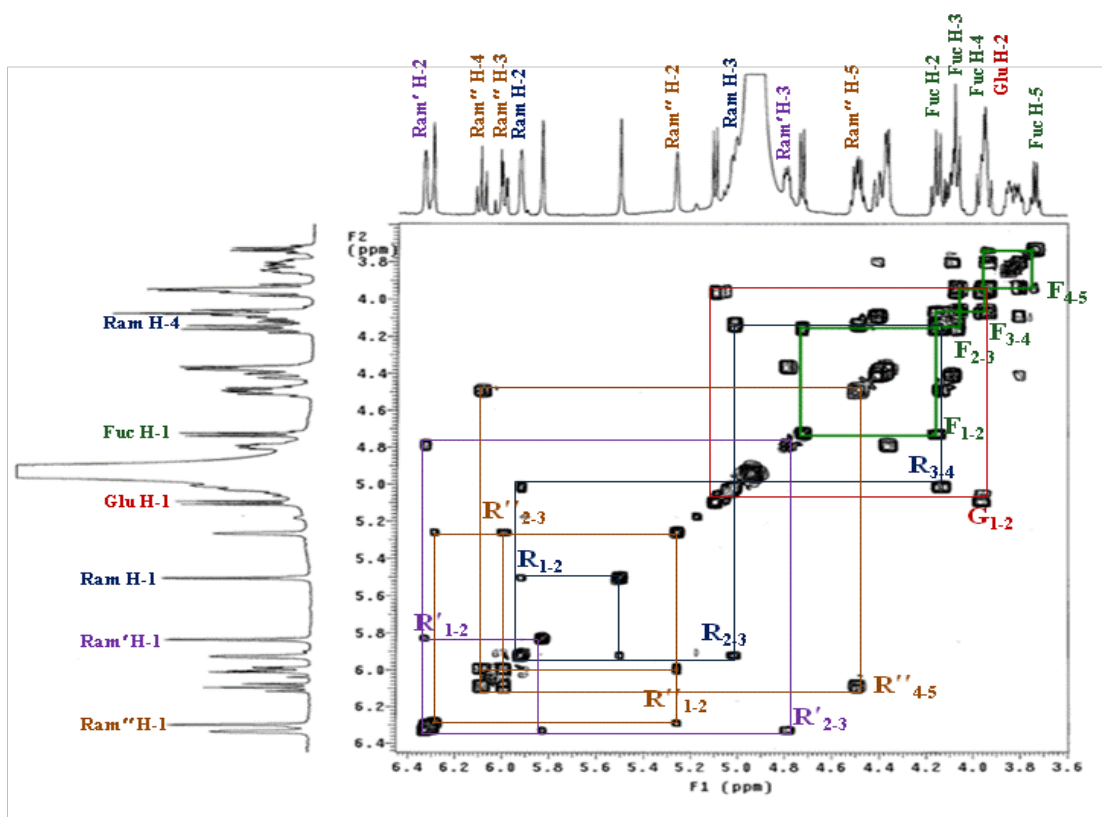


Figura 6. Espectro ¹H-¹H COSY del puriginosido II. Sección de la porción oligosacárida

El empleo de la técnica bidimensional de correlación homonuclear TOCSY permite determinar las interacciones vecinales, así como las correlaciones a larga distancia ^1H - ^1H entre los protones de una unidad monosacárida, siendo de gran utilidad cuando existe sobreposición de señales localizadas entre δ_{H} 3.70 – 4.20 y 4.40 – 4.60 ppm. El procedimiento de asignación de señales mediante el empleo de la técnica TOCSY, se complementa con las señales espectroscópicas asignadas a través del espectro COSY, que de igual manera, se inicia con las posiciones de los protones anoméricos o cualquier señal oligosacárida diagnóstica y resuelta en el espectro, siguiendo en línea recta las señales de conectividad que determinan las interacciones con todos los protones pertenecientes a cada unidad de azúcar, así se realiza la asignación inequívoca de las señales de cada una unidad sacárida específica (5, 7) (Figura 7).

Después de llevarse a cabo la identificación de los protones correspondientes a las unidades sacáridas a tra-

vés de las técnicas RMN ^1H bidimensionales (COSY y TOCSY), se procede con la asignación de los desplazamientos químicos de los carbonos correspondientes a los protones oligosacáridos mediante la técnica de RMN bidimensional heteronuclear ^{13}C - ^1H a un enlace de distancia ($^1J_{\text{C-H}}$) HSQC. Este procedimiento se inicia con la localización de los carbonos anoméricos en la región comprendida entre δ_{C} 95 – 110 ppm en el espectro de carbono obtenidos a través de la técnica de RMN ^{13}C . Posteriormente, se establece la conectividad entre cada carbono anomérico con su correspondiente protón (1, 2). Siguiendo con este análisis, se localizan y se asignan los desplazamientos químicos de los carbonos restantes en el espectro de RMN ^{13}C . Una vez identificados los desplazamientos químicos de todos los protones pertenecientes a cada monosacárido en el espectro de RMN ^1H , se procede a llevar a cabo el establecimiento de las conectividades ^{13}C - ^1H en el espectro HSQC para determinar inequívocamente la asignación de cada señal de carbono (5, 7) (Figura 8).

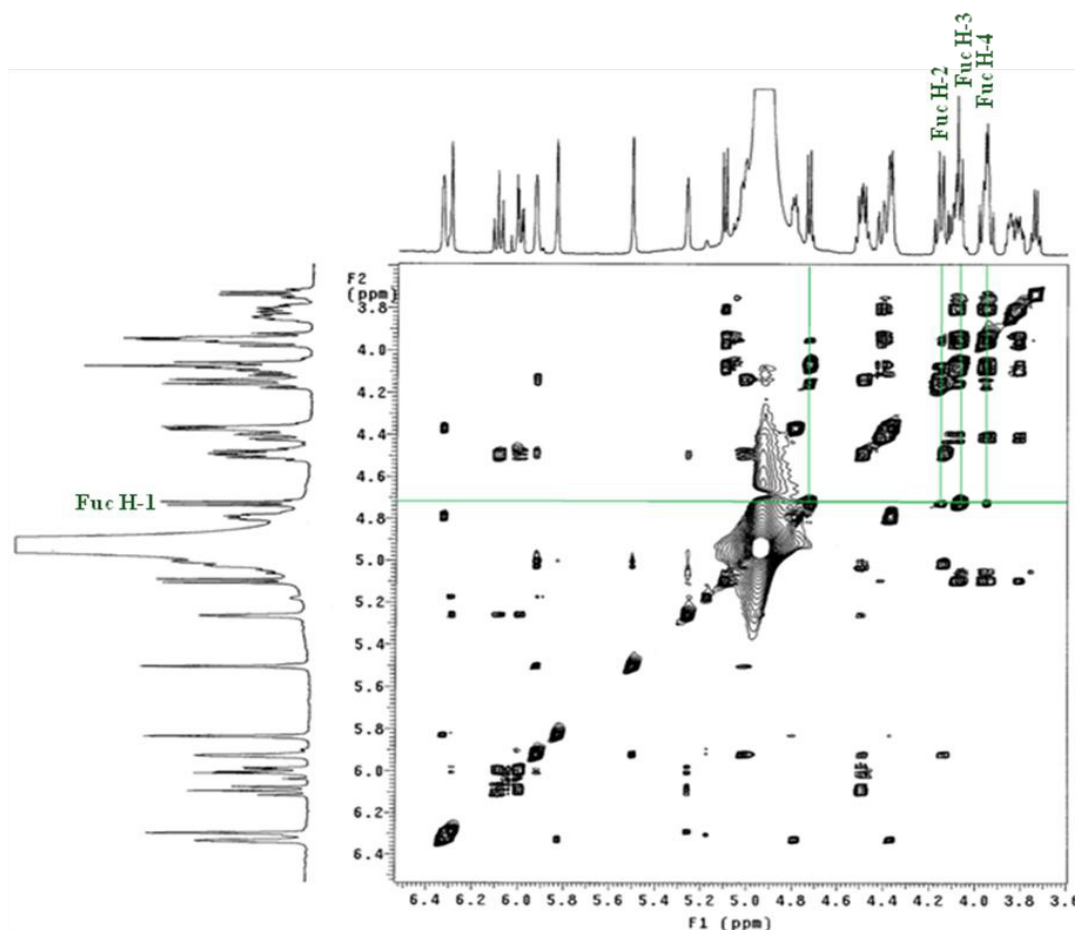


Figura 7. Espectro TOCSY del purginósido II

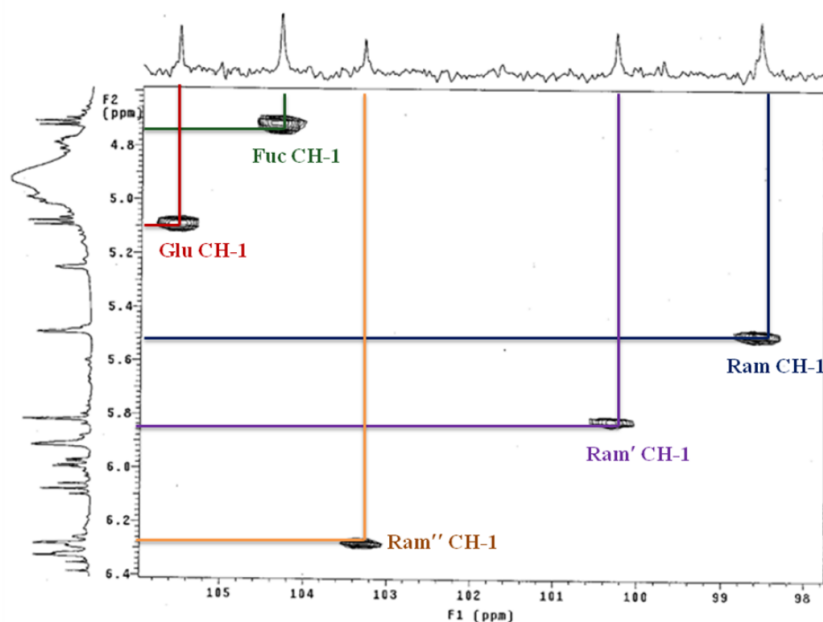


Figura 8. Espectro HSQC del purginósido II.

Posteriormente, se procede a la determinación de las correlaciones ^{13}C - ^1H a tres enlaces de distancia ($^3J_{\text{C-H}}$) a través de la técnica HMBC para el establecimiento de los enlaces glicosídicos. De esta manera, se identifican los núcleos oligosacáridos constitutivos de las estructuras de los glicolípidos. Este procedimiento se logra identificando las conectividades C-H entre los átomos de protones anoméricos y los carbonos enlazados directamente a la posición donde se establece el enlace glicosídico entre dos unidades monosacáridas (5, 7) (Figura 9).

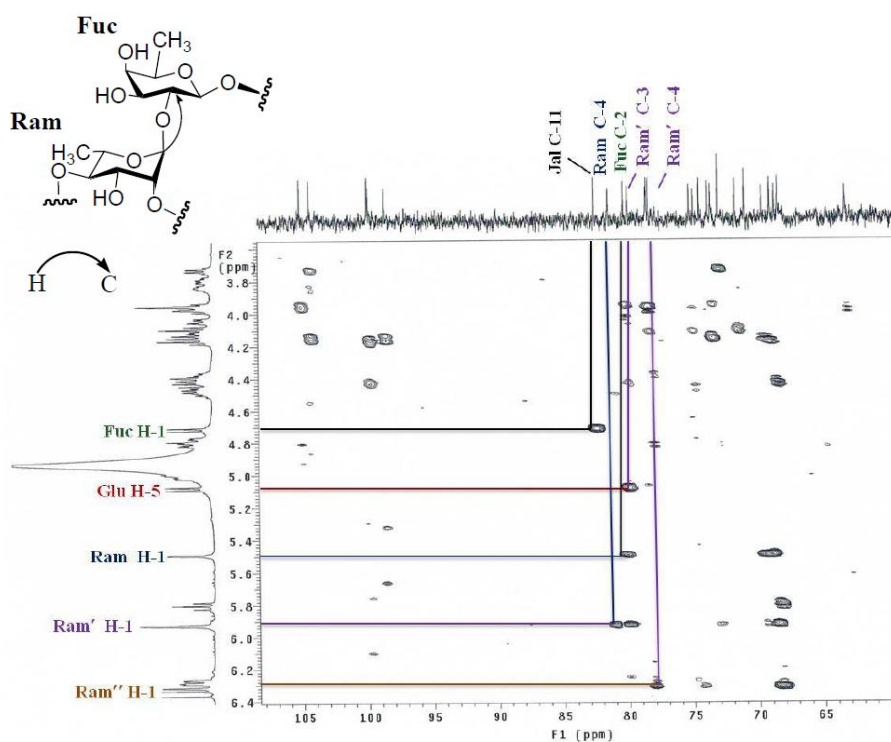


Figura 9. Espectro HMBC para el purginósido II. Correlaciones $^3J_{\text{C-H}}$ para la identificación de la secuencia de glicosidación.

Para la identificación de las posiciones de esterificación en el núcleo oligosacárido, inicialmente, se deben elucidar los ésteres que se encuentran acilando los núcleos (el ácido 2-metilbutanoico y *trans*-cinámico, así como los ácidos de cadena larga, *n*-hexanoico, *n*-decanoico y *n*-dodecanoico).

En particular, el residuo éster de 2-metilbutanoilo genera las siguientes señales diagnósticas en el espectro de RMN ^1H , un triplete de cuartetos a δ_{H} 2.50 ppm con valores de constantes de acoplamiento de 7.5 y 7.0 Hz, atribuida a los protones alfa al grupo carbonilo del éster; un doblete centrado en δ_{H} 1.20 ppm ($J = 7$ Hz) atribuida a los protones del grupo metilo enlazado a la posición dos; un triplete en δ_{H} 0.89 ppm con constante de acoplamiento de 7.5 Hz correspondiente a los protones del grupo metilo terminal. En el espectro de RMN ^{13}C , el desplazamiento para C_2 se localiza en $\delta_{\text{C}} \sim 42$ ppm. En tanto que el éster de cinamoilo genera en el espectro de RMN ^1H dos señales atribuidas a los protones H_2 y H_3 como dobletes centrados en δ_{H} 6.3 ($J = 16$ Hz) y 7.6 ppm ($J = 16$ Hz), respectivamente. Adicionalmente, las señales aromáticas se localizan alrededor de δ_{H} 7.3 ppm. En el espectro de RMN ^{13}C , las señales vinílicas C_2 y C_3 se localizan en δ_{C} 119 y 145 ppm, y las señales aromáticas se presentan entre 128 y 145 ppm.

Los residuos de *n*-hexanoilo, *n*-decanoilo y *n*-dodecanoilo generan una señal diagnóstica como un triplete que aparece entre δ_{H} 2.42 ppm – 2.34 ppm, con una constante de acoplamiento cercana a los 7.5 Hz atribuida a los protones del grupo metileno alfa al grupo carbonilo. En algunos casos, esta señal aparece como un doble de doble de dobles para cada protón, cuyos valores de las constantes de acoplamiento son de aproximadamente 14, 10 y 7 Hz. Esta característica aparece en aquellos casos donde hay alguna restricción en el núcleo oligosacárido que restringe la libertad conformacional de la cadena alifática de estos ácidos y generan señales no equivalentes magnéticamente, tal y como sucede para los protones del grupo metileno alfa al carbonilo de la aglicona que forma la macrolactona. Estos últimos generan dos señales características desplazadas en 2.2 y 2.4 ppm que presentan un patrón de acoplamiento identificado como un doble

de doble de dobles con constantes de acoplamiento de $J = 15.0, 8.0$ y 4.0 Hz (5).

Posteriormente, para identificar las posiciones de esterificación se debe realizar la asignación correcta de los núcleos de carbono correspondientes a cada uno de los grupos carbonilo. Por lo tanto, se realiza el análisis de las interacciones ^{13}C - ^1H a dos y tres enlaces de distancia entre el núcleo de carbono de los grupos carbonilo y los protones H_2 de cada sustituyente y de la aglicona mediante el espectro HMBC.

Una vez que se ha identificado cada uno de los grupos carbonilo correspondiente a los sustituyentes y a la aglicona, se lleva a cabo su localización en el núcleo oligosacárido mediante el establecimiento de las conectividades mediante las correlaciones C-H a tres enlaces de distancia mediante el espectro HMBC (5, 7) (Figura 10).

CONCLUSIONES

Los procesos de extracción y el aislamiento mediante técnicas convencionales como la cromatografía de columna y la cromatografía en capa fina, no son adecuados para la purificación de las mezclas de resinas glicosídicas obtenidas de especies pertenecientes a la familia Convolvulaceae. Afortunadamente, el desarrollo de técnicas analíticas modernas en la cromatografía líquida de alta eficiencia como el “rasurado de pico”, “corte de núcleo” y “reciclo” y mediante el uso de cantidades de muestra a nivel semipreparativo es posible resolver la mezcla compleja de resinas y la completa purificación de los componentes individuales. Finalmente, el empleo de diferentes técnicas de RMN: ^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, y NOESY, auxiliado por la espectrometría de masas (FABMS, ESIMS, MALDIMS) ha facilitado la identificación de estos compuestos que han demostrado presentar una alta complejidad estructural, que por mucho tiempo, los estudios fitoquímicos de esta clase de moléculas, sólo se limitaban a pruebas de degradación química.

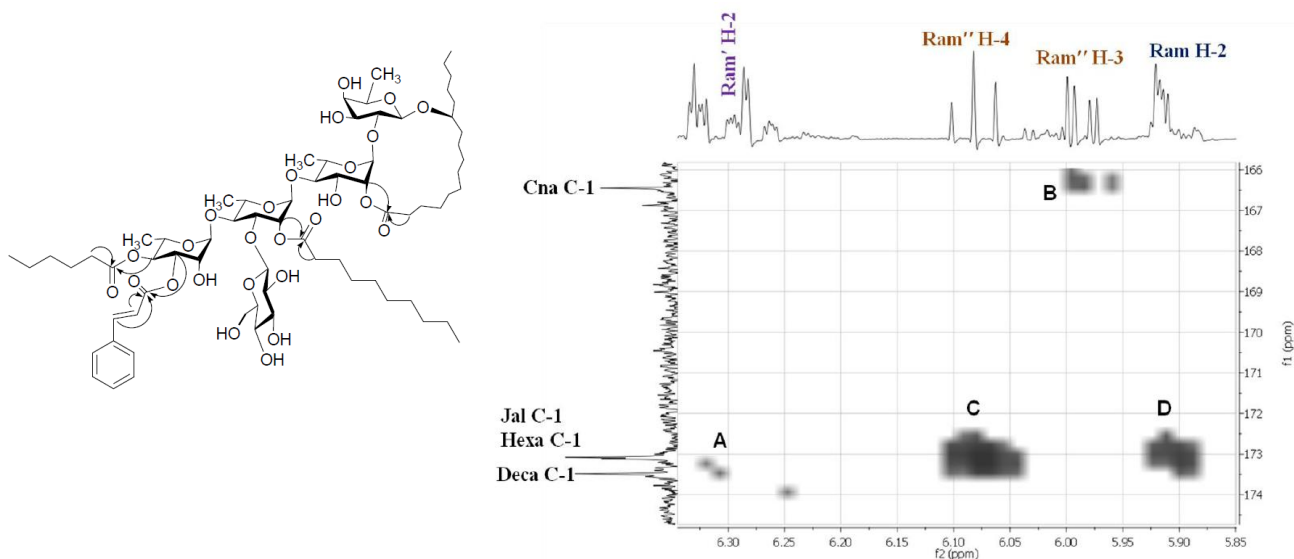


Figura 10. Espectro HMBC para el purginósido II. Correlaciones 3JC-H para la identificación de las posiciones de esterificación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Trease GE, Evans WC. "Pharmacognosy". 15a ed. Edinburgo: WB Saunders; 2002.
2. Linares E. "Aproximación al conocimiento de los bejucos de Colombia". Bogotá: Unibiblos; 2001.
3. Pereda-Miranda R, Bah M. "Byodinamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies Transcending Boundaries". *Curr. Top. Med. Chem.* 2003;(3):111–131.
4. Bruneton J. "Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes Medicinales". Paris: Techique et documentation-Lavoisier; 1993.
5. Pereda-Miranda R, Rosas-Ramírez D, Castañeda-Gómez J. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Vol 92. Chapter 2. New York: Kinghorn, A. D., Falk, H., Kobayashi, J., Eds.; Springer-Verlag; 2010.
6. Ding W, Jiang Z-H, Wu P, Xu L, Wei X. "Resin glycosides from the aerial parts of *Operculina turpethum*". *Phytochemistry*. 2012;(81):165-184.
7. Castañeda-Gómez J, Pereda-Miranda R. "Resin Glycosides from the Herbal Drug Jalap". *Journal of Natural Products*. 2011;(74):1148-1153.
8. Castañeda-Gómez J, Figueroa-Gonzales G, Jacobo N, Pereda-Miranda R. Purgin II, a resin glycoside ester type dimer and inhibitor of multidrug efflux pumps from *Ipomoea purga*. *Journal of Natural Products*. 2012;(76):64-71.
9. Cruz-Morales S, Castañeda-Gómez J, Figueroa-Gonzales G, Mendoza-García AD, Lorence A, Pereda-Miranda R. "Mammalian multidrug resistance lipopentasaccharide inhibitors from *Ipomoea alba* seeds". *Journal of Natural Products*. 2012;(75):1603-1611.
10. (a) Hernández-Carlos B, Bye R, Pereda-Miranda R. "Orizabins V-VIII, tetrasaccharide glycolipids from the Mexican scammony root (*Ipomoea orizabensis*)". *Journal of Natural Products*. 1999;(62):1096-1100. (b) Pereda-Miranda R.; Hernández-Carlos B. "HPLC isolation and structural elucidation of diastereoisomeric niloyl éster tetrasaccharides from the Mexican scammony root". *Tetrahedron*. 2002;(58):3145.
11. Chérigo L, Pereda-Miranda R. "Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*". *Journal of Natural Products*. 2006;(69):595.
12. Bah M, Pereda-Miranda R. "Detailed FAB-mass spectrometry and high resolution NMR investigations of tricolorins A-E, individual oligosaccharides from the resins of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae)". *Tetrahedron*. 1996;(52):13063.
13. Bah M, Pereda-Miranda R. "Isolation and Structural Characterization of New Glycolipid Ester Type Dimers from the Resin of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae)". *Tetrahedron*. 1997;(53):9007.