

APLICACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS (1a. Parte). ANÁLISIS ESTADÍSTICO-FUNCIONAL DE GLUCÓSIDOS

TOMASZ M. STAWIŃSKI

Departamento de Biofísica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB)
Instituto Politécnico Nacional, México.

Resumen: En este trabajo se evalúa el uso de la espectrometría de masas para elucidaciones estructurales de glucósidos cardiacos y/o saponinas, relacionando el uso de tal técnica analítica con la aparición de los glucósidos en la naturaleza.

APPLICATION OF MASS SPECTRUM (1st. Part) STATISTICAL FUNCTIONAL ANALYSIS OF GLUCOSIDES

Abstract: In this paper has been presented the evaluation of the use of mass spectra technique in the structural elucidation of glucoside compounds in relation with the natural existence of them.

INTRODUCCIÓN

Los glucósidos (especialmente cardenolidos y esaponinas) constituyen uno de los grupos más importantes de productos naturales. La razón de su importancia se debe a dos hechos: i) su alta actividad biológica, ii) su estructura constituida por dos compuestos que pertenecen a otras dos familias importantes de productos naturales: una genina esteroideal o terpenoide y una cadena de azúcares (oligosacarido). Los glucósidos han sido por muchos años tema de trabajo de varios grupos de investigación, y han dado como producto varios trabajos sobre elucidación estructural. Sin embargo, en su inmensa mayoría las investigaciones estructurales siguen el tedioso camino propuesto en los años treinta y modificado en los cincuenta (Wall, 1952). Lo que sorprende, a pesar del desarrollo de la técnica de la espectrometría de masas, es un número relativamente corto de los trabajos donde se aplica la técnica. Se puede considerar que en los últimos veinte años este campo ha estado prácticamente desierto (Komori, 1975, 1976). La razón

principal consiste en el alto índice de peso molecular de tales compuestos. Para poder eliminar el obstáculo, en varios casos se propone usar los derivados (acetilados o metilados), o emplear técnicas especiales (por ejemplo la de desorción por efecto del campo - FID). En ambas instancias existe un problema. Cuando se usan derivados se necesitan grandes muestras, cuando se emplean técnicas específicas, se requiere una instrumentación muy especializada. En cualquier caso, no siempre se cuenta con la muestra o el equipo.

La intención de este trabajo es demostrar que en varios casos la simple técnica de impacto electrónico (EI) es el instrumento suficiente para elucidación estructural y que desde el punto de vista analítico se puede obtener la información estructural requerida.

METODOLOGÍA

En base a las revisiones bibliográficas y trabajos presentados anteriormente (Komori, 1975, 1976; Brown, 1969, 1970, 1971; Sheibley, 1965; Merck index, 1974;

Stawiński, 1979) se han constituido varios conjuntos de glucósidos dividiéndolos en grupos de mono-, tri-, tetra-, penta y poliglucósidos. Por otra parte se constituyeron los conjuntos de azúcares dividiéndolos en 8 grupos —glucosa, rhamnosa, arabinosa, fructosa, chinovosa, digitalosa, galactosa y varios. Los conjuntos de azúcares fueron determinados por la formación de los conjuntos de glucósidos. Se ha evaluado el número total de 573 glucósidos de estructuras conocidas, formando cinco conjuntos de glucósidos y cuatro de azúcares. El análisis estadístico-funcional se ha hecho usando la computadora HP-3150. El número total de glucósidos o de azúcares en cada conjunto se tomó como 100% y se calculó el porcentaje que pertenece a cada grupo dentro del conjunto. Las curvas obtenidas se han evaluado desde el punto de vista del análisis funcional. Para evaluar más detalladamente las ecuaciones de las curvas, se hicieron varios conjuntos mezclando al azar los datos bibliográficos. En todos los casos se compararon los datos experimentales con ocho ecuaciones tipo.

RESULTADOS

Los resultados correspondientes a la formación de las curvas se presentan en las tablas 1 y 2, y en las figuras 1 y 2. Los resultados del análisis funcional se presentan en las figuras 3 y 4 y en las tablas 3 y 4.

DISCUSIÓN

Como se desprende de las tablas 1 y 2 y de las figuras 1 y 2, que presentan los datos porcentuales y los trazos de las curvas de varios conjuntos, el aumento del número de glucósidos totales incrementa el porcentaje de participación de monoglucósidos (desde 33.3% hasta 79%) y al mismo tiempo disminuye la participación de estructuras más complejas (tri- o tetraglucósidos) desde 28.9% a 5% (triglucósidos) y de 9.5% a 1.5 de tetraglucósidos, respectivamente. El único aumento en la participación se demuestra en los pentaglucósidos: de 0% a 0.5%. Esto se explica fácilmente tomando en cuenta que el aumento de datos bibliográficos produce invariablemente un incremento en las posibilidades de encontrar estructuras más complejas.

Los datos aportados en las tablas 3 y 4 y las figuras que corresponden al comportamiento de azúcares, ofrecen un panorama distinto. En todos los casos, el aumento de muestras provoca una pequeña disminución de la participación de glucosa en la construcción de la cadena de los compuestos a favor del grupo

nombrado como *varios*. La participación de otros azúcares es casi la misma.

El análisis porcentual permite discutir la opinión de que la espectrometría de masas (Schulten, 1978) clásica no sirve para elucidaciones estructurales, dada la variabilidad de las cadenas, el alto peso molecular de los compuestos y la escasa posibilidad de obtener iones moleculares a partir de los tetraglucósidos (el peso molecular de altos glucósidos se considera en el intervalo arriba de 1,200 u.m.). Pero, sin pretender analizar todos los compuestos conocidos de este grupo, se ha demostrado que los glucósidos mono- y dicuyos pesos moleculares oscilan entre 400 y 600 u.m., tienen la mayor participación. Por otro lado, es bien conocida la estructura de las geninas (Budzikiewicz, Djerassi, 1964, 1975) terpenicas y/o esteroidales, así como las fragmentaciones de los azúcares comunes (Waller, 1972), que en este trabajo constituyeron los conjuntos de 1 a 4. Sin discutir la utilidad de otras técnicas (FID, derivados, etc.), se puede constatar que en el 93% la técnica de EI (impacto electrónico) es suficiente para obtener los datos analíticos necesarios. Más aún si aumentamos el porcentaje a 98% incluyendo los triglucósidos, que constituyen apenas el 5% de todos los compuestos analizados.

En el análisis de los conjuntos de oligosacaridos, la situación es muy parecida. En la mayoría de los casos se encuentra la glucosa como constituyente principal (Aprox. 60%) de las cadenas. El segundo azúcar (rhamnosa) tiene una participación de 22 a 24%. Es así que entre dos azúcares tenemos casi 85% de todas las distribuciones posibles. En un solo caso (conjunto 2) se obtuvo la disminución de la participación de glucosa con 48% a favor del grupo denominado *varios* (17%), lo cual indica que no se deben descartar posibles complicaciones en la interpretación de los espectros de masas. Sin embargo (aunque tales datos no están incluidos en este trabajo, el grupo denominado *varios* fue constituido por sólo 7 azúcares diferentes.

Hay que recordar que los conjuntos de glucósidos (conjuntos de 1 a 4) eran elegidos al azar (el conjunto 5 incluye todos los compuestos analizados). Los conjuntos de azúcares fueron determinados por la primera elección y los azúcares que componen los conjuntos corresponden a los que constituyen las cadenas de los compuestos incluidos en los conjuntos de glucósidos (Tabla 1).

Análisis funcional

Las curvas obtenidas como resultado del análisis de distribución porcentual fueron analizadas desde el

TABLA 1. Distribución porcentual de varios tipos de glucósidos

| Tipo del compuesto | Conjunto 1* | | Conjunto 2 | | Conjunto 3 | | Conjunto 4 | | Conjunto 5 | |
|--------------------|-------------|------|------------|------|------------|------|------------|------|------------|-----|
| | No. | % | No. | % | No. | % | No. | % | No. | % |
| MONO— | 7 | 33.3 | 65 | 78 | 72 | 69.2 | 95 | 72 | 424 | 74 |
| DI— | 6 | 28.6 | 17 | 20.5 | 23 | 22.1 | 25 | 19.2 | 92 | 16 |
| TRI— | 6 | 28.6 | 1 | 1.5 | 7 | 6.8 | 9 | 6.9 | 40 | 7 |
| TETRA— | 2 | 9.5 | 0 | 0 | 2 | 1.9 | 2 | 1.5 | 9 | 1.5 |
| PENTA— | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.4 | 6 | 1.0 |
| POLI— | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0.5 |
| Total | 21 | 100 | 83 | 100 | 104 | 100 | 130 | 100 | 573 | 100 |

*Conjunto elegido al azar (datos de una sola publicación - Brown, 1969). Datos correspondientes a esta publicación no fueron tomados en cuenta en la formación de conjuntos de azúcares.

TABLA 2. Distribución porcentual de azúcares

| Tipo de azúcar | Conjunto 1 | | Conjunto 2 | | Conjunto 3 | | Conjunto 4 | |
|----------------|------------|------|------------|------|------------|------|------------|-----|
| | No. | % | No. | % | No. | % | No. | % |
| Glucosa | 70 | 67.3 | 72 | 48.9 | 109 | 59.2 | 481 | 57 |
| Rhamnosa | 20 | 19.2 | 35 | 23.8 | 37 | 20 | 203 | 24 |
| Varios* | 6 | 5.8 | 25 | 17.0 | 15 | 8 | 93 | 11 |
| Arabinosa | 6 | 5.8 | 8 | 5.4 | 9 | 5 | 50 | 6 |
| Fructosa | 2 | 1.9 | 3 | 2 | 6 | 3 | 9 | 1 |
| Chinovosa | — | — | 2 | 1.4 | 4 | 2 | 4 | 0.5 |
| Digitalosa | — | — | 1 | 0.75 | 4 | 2 | 3 | 0.4 |
| Galactosa | — | — | 1 | 0.75 | 1 | 0.8 | 1 | 0.1 |
| Total | 104 | 100 | 147 | 100 | 185 | 100 | 844 | 100 |

*Secuencia ordenada por la computadora.

TABLA 3. Datos de análisis funcional de los conjuntos de glucósidos.

| Conjunto | Coeficiente de regresión | Valor de | | Error residual | % de error | Media de | |
|----------|--------------------------|----------|------|----------------|------------|------------------|------------------|
| | | A | B | | | error % absoluto | error cuadrático |
| 3 | 0.999 | 236 | 1.19 | 2.13 | 3.09 | 3.34 | 1.23 |
| 4 | 0.978 | 398 | 1.48 | 17.89 | 24.8 | 24.03 | 6.49 |
| 5 | 0.989 | 242 | 1.23 | 2.20 | 3.42 | 3.60 | 1.30 |

*Los conjuntos 1 y 2 fueron eliminados del análisis.

TABLA 4. Datos del análisis funcional de los conjuntos de azúcares

| Conjunto | Coeficiente de regresión | Valor de | | Error residual | % de error | Media de | |
|----------|--------------------------|----------|------|----------------|------------|------------------|------------------|
| | | A | B | | | error % absoluto | error cuadrático |
| 2 | 0.975 | 84.1 | 0.66 | 23.23 | 35.05 | 42.0 | 115 |
| 3 | 0.970 | 144.0 | 0.84 | 19.0 | 29.53 | 33.0 | 86 |
| 4 | 0.976 | 87.5 | 0.69 | 21.0 | 33.0 | 38.0 | 97 |

TABLA 5. Algunos valores obtenidos para los conjuntos

| Conjunto* Glucósidos Azúcares | Glucosa % | Monoglucósido % | $\frac{A_{G1}^{**}}{A_{Az}}$ | $\frac{B_{G1}^{***}}{B_{Az}}$ |
|-------------------------------------|---------------|--------------------|------------------------------|-------------------------------|
| $\frac{3}{2}$ | 48.9 | 69.2 | $\frac{236}{84.1} = 2.80$ | $\frac{1.19}{0.669} = 1.77$ |
| $\frac{4}{3}$ | 59.2 | 72.0 | $\frac{398}{144} = 2.76$ | $\frac{1.48}{0.840} = 1.76$ |
| $\frac{5}{4}$ | 57 | 74 | $\frac{242}{87.5} = 2.76$ | $\frac{1.23}{0.69} = 1.78$ |
| Valor promedio | **** 58.15 | **** 73.8 | 2.77 | 1.77 |

* Conjuntos agrupados a base de estructuras correspondientes (tablas 1 y 2).

** Los valores A_{G1} y A_{Az} corresponden a las curvas de glucósidos y azúcares, respectivamente (tablas 3 y 4).

*** Los valores B_{G1} y B_{Az} corresponden respectivamente a las curvas de glucósidos y azúcares (tablas 3 y 4).

**** Valores promedio que corresponden a todos los conjuntos.

punto de vista funcional. Los datos obtenidos se presentan en las tablas 3 y 4 y en las figuras 3 y 4. En todos los casos las curvas corresponden a la ecuación:

$$Y = A \times \exp(B \times X)$$

Los coeficientes de regresión tienen un valor entre 0.987 a 0.999 para los conjuntos de glucósidos y 0.970 - 0.975 para los azúcares. Del análisis funcional fueron eliminados dos conjuntos (conjuntos 1 y 2) de los glucósidos, pues el primer conjunto se basaba en una sola fuente bibliográfica y los compuestos ya fueron de antemano determinados para otros fines. El conjunto 2 incluye apenas tres tipos de compuestos y aunque se han obtenido datos computarizados, se descartó su uso considerándolos poco confiables.

Significado de las constantes A y B

Al considerar los valores promedio obtenidos como resultado de las constantes de las curvas (A y B) de los conjuntos de glucósidos y correspondientes a estos conjuntos de azúcares, en todos los casos se han recibido dos coeficientes (factores) llamados "factores de frecuencia". El primer factor fue calculado como $A_{G1} : A_{Az}$ y en todos los casos se obtuvieron valores constantes (aproximadamente 2.8). El segundo calculado como $B_{G1} : B_{Az}$ dio un valor numérico también constante (1.7). El significado analítico se determinó así: se toma como 100% el número total de los glucósidos analizados y el promedio de aparición porcentual de monoglucósidos (73.8% -ver la tabla 5). Obtenemos:

$$\begin{aligned}
 (\% \text{ glucósidos totales}) - (\% \text{ de monoglucósidos}) &= (\% \text{ del resto}) \\
 100\% - 73.8\% &= 26.2\%
 \end{aligned}$$

$$(\% \text{ del resto}) \times (\text{factor de frecuencia}) = (\% \text{ de monoglucósidos})$$

$$26.2 \times 2.77 = 73.36$$

Esto significa que el primer "factor de frecuencia" determina cuántas veces es más frecuente encontrar monoglucósidos que cualquiera otra estructura más compleja.

El segundo "factor de frecuencia" corresponde a la estructura de las cadenas de azúcares. Si se considera como 100% el número total de azúcares y se divide por el "factor", obtenemos:

$$\frac{100}{1.7} = 58.8$$

Si se compara con el valor promedio porcentual de aparición de glucosa 58.15 (tabla 5), se puede constatar que el factor señala la frecuencia con que se presenta la glucosa en el conjunto de azúcares.

Al analizar la ecuación de la curva obtenida (curva teórica) aparte de las constantes *A* y *B*, anteriormente analizadas, se determina que si el valor de $X \rightarrow \infty$ el valor de $Y \rightarrow 0$, lo que significa que si aumenta la complejidad de la estructura, disminuye la posibili-

dad de encontrar esas constantes en la naturaleza. Siguiendo la ecuación, la posibilidad de encontrar los pentaglucósidos es menor de 1%.

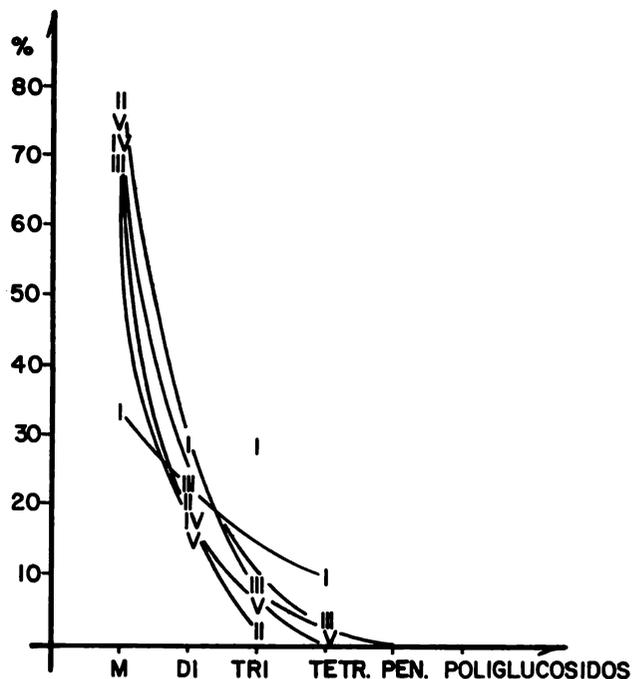


Fig. 1. Curvas de distribución de glucósidos.

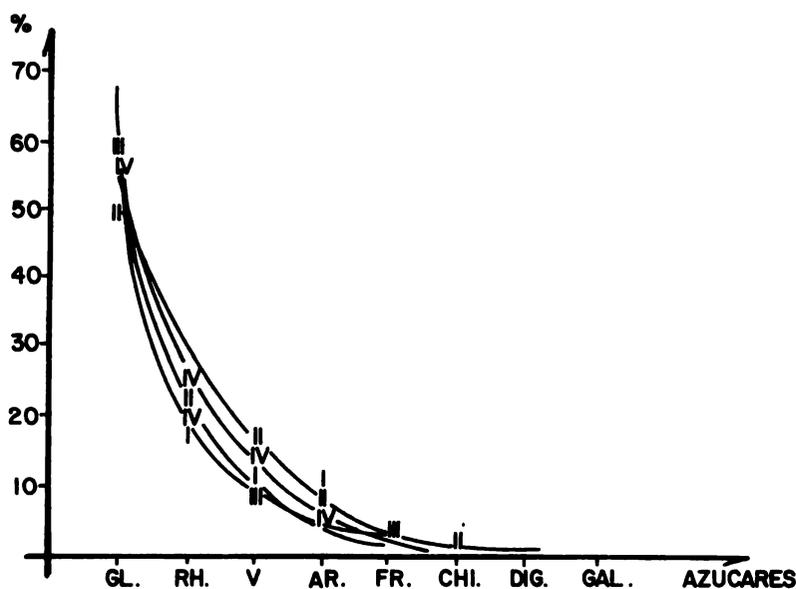


Fig. 2. Curvas de distribución de azúcares. (Secuencia, ver tabla 2).

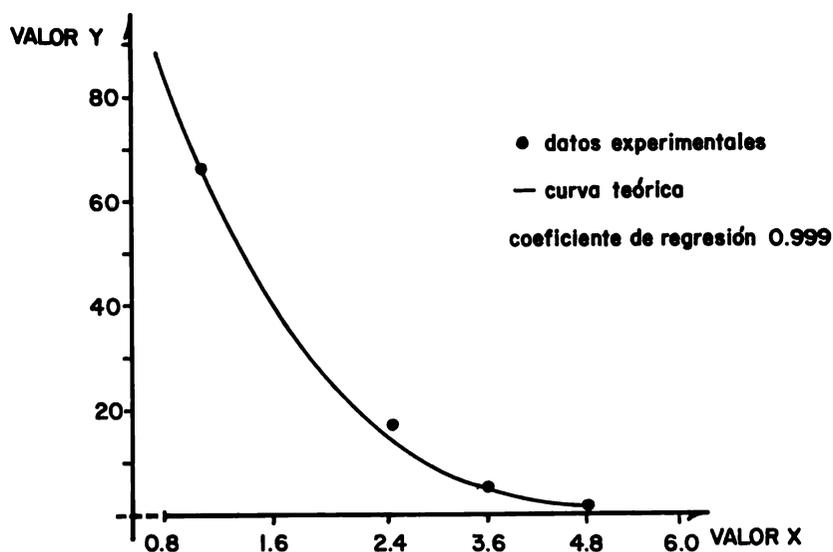


Fig. 3. Ejemplo de análisis funcional de glucósidos.

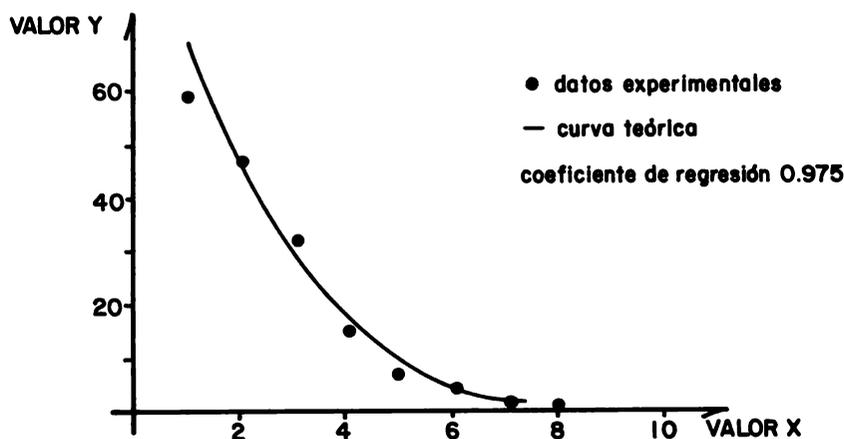


Fig. 4. Ejemplo de análisis funcional de azúcares.

CONCLUSIONES

1. El análisis estadístico-funcional de los conjuntos de glucósidos permitió establecer que los glucósidos tipo cardenólidos y/o saponinas con geninas esteroidales y/o terpenoidales que se encuentran con mayor frecuencia, son los monoglucósidos. Las estructuras más complejas (tri- y más) no constituyen ni el 8%.

2. Los azúcares encontrados más a menudo son los simples (glucosa, rhamnosa), bien conocidos en la espectrometría de masas.

3. No se sostienen los argumentos que se presentan en la bibliografía del tema (Schulten, 1978), es

decir, que la técnica de EI no sirve para determinaciones estructurales de esos compuestos, sin descartar el hecho de que aun los glucósidos más "simples" presentan fuertes problemas analíticos.

4. Las ecuaciones obtenidas durante el análisis funcional demuestran que las constantes tienen el significado analítico independiente de la técnica EI.

5. Dados los conocidos adelantos en el campo del análisis de los compuestos esteroidales, triterpenos y azúcares (técnica de espectrometría de masas) (Waller, 1972; Budzikiewicz, Djerassi, 1964, 1965), es posible establecer la determinación estructural mediante la técnica EI por lo menos en el 90% de los casos (análisis de mono-, di-, o triglucósidos).

Agradecimiento

El autor agradece la ayuda que le brindó el profesor Armando Guerra T., jefe del Centro de Computación de la ENCB.

BIBLIOGRAFIA

1. Brown, P.; Pettit, G.R. y Robins, R.K.: "Cardenolides - Mass spectra", *Org. Mass Spectrom.* 2,521 (1969).
2. Brown, P. y Pettit, G.R.: "EI and QI technique for cardenolides", *Org. Mass Spectrom.* 3,67, (1970).
3. Brown, P.; Brüschweiler, F.; Pettit, G. y Reichstein, T.: "FI Mass spectra cardenolides", *Org. Mass Spectrom.* 5,573 (1971).
4. Budzikiewicz, H. y Djerassi, C.: *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*, Vol. 2. Holden-Day Inc., San Fco. (1964).
5. Budzikiewicz, H. y Djerassi, C.: *Structure Elucidation of Steroids Natural Compounds*, Vol. 1. Holden Day Inc. San Fco. (1965).
6. Komori, T.; Ida, Y. y Kawasaki, T.: "Mass Spectra of Spirostanol and Furostanol Glycosides", *Bimedical Mass Spectrometry*, 2.65 (1975).
7. Komori, T., Higuchi, R. y Kawasaki, T.: "Massenspectren von Triterpensaponin des Oleanantyps", *Chem. Pharm. Bull.*, 24, (11), 2610 (1976).
8. *Merck Index* (1974).
9. Scheibley, F.E.: *Physical and chemical property and constants of glucosides*, ITN-Press (1965).
10. Schulten, H.R.; Komori, T. y Kawasaki, T.: "Field desorption mass spectrometry of natural products", *Tetrahedron*, 34, 1003 (1978).
11. Stawiński, T. y Gómez, H.: "Mass spectra of some glucosides". *Rev. Soc. Mexicana de Química*, edición especial, Congreso Latinoamericano de IUPAC, Monterrey (1979).
12. Wall, M.E. y Eddy, R.C.: "Elucidation estructural of glucosides", *Analit. Chem.*, 24, 1337 (1952).
13. Waller, G.: *Biochemical applications of mass spectrometry*, J. Wiley & Sons, New York, (1972).