

APLICACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS (2a. Parte) PROGRAMAS COMPUTARIZADOS DE ELUCIDACIONES ESTRUCTURALES DE GLUCÓSIDOS

TOMASZ M. STAWIŃSKI

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

LESZEK Z. KAWĘCKI

Sección de Graduados, Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica (ESIME)
Instituto Politécnico Nacional de México

Resumen: La solución de espectros de masas para elucidaciones estructurales de glucósidos es, dada la complejidad de estos compuestos, un difícil problema de análisis químico. En este caso se propone simplificar la solución aplicando los programas patrón para las deducciones de iones-fragmento. La combinación de programas permite establecer caminos-patrón de fragmentación aprovechando la posibilidad de aparición de estructuras más comunes.

APPLICATION OF MASS SPECTRUM (2nd. Part) COMPUTER PROGRAMS OF STRUCTURAL ELUCIDATION OF GLUCOSIDES

Abstract: The solution of mass spectrum data for structural elucidation of glucosides is, up to now, a difficult problem of chemical analysis. It's due to complex internal structure of this class of compounds. We propose in this case a more easy way to apply a computer program (pattern program) for fragment-iones. The combination of different programs permits obtained a pattern way of fragmentation, to make good use of the probability of existency of more comun structures.

INTRODUCCIÓN

La interpretación de los espectros de masas de glucósidos (cardenolidos y saponinas) constituye un arduo problema de análisis químico. Esto se debe en parte a la complicada estructura de ese grupo de compuestos y, por otra parte, a los escasos datos y trabajos realizados en el campo (Komori, 1975, 1976). Sin embargo, se ha demostrado (Stawiński, 1986) que los argumentos de Schulten (Schulten, 1978) respecto a usar otras técnicas variables, descartando la de EI (impac-

to electrónico), no tienen suficiente base. Hay un argumento que no se puede descartar fácilmente. Dado que los glucósidos están constituidos por dos diferentes grupos de compuestos —la genina y el(los) azúca(res)—, el espectro de masas tiene a veces una imagen confusa, especialmente en la región de pesos moleculares bajos, donde los iones-fragmento de azúcares y los de la genina tienden a superponerse (traslaparse). Brown (1970) en sus trabajos subraya inconvenientes de ese tipo y recomienda cambiar la técnica en estos casos. Sin embargo, aparte de la interpreta-

ción que se usa con más frecuencia, es decir, la posición de las señales, el problema se puede enfocar en las diferencias de las abundancias relativas de las señales. Claro que la abundancia relativa, o bien su variación, depende de la energía del haz electrónico, y si se interpretan los espectros es imposible calcular cada vez transiciones metastables correspondientes (*metastables transitions*) o SSA (*steady state approximation*) (Burse, 1966, 1967, 1968; McLafferty, 1967; Williams, 1968). Sin embargo, como se ha demostrado (Stawiński, 1986), los glucósidos naturales poseen las estructuras constituidas por un grupo relativamente reducido de azúcares, y lo más común es que existan como mono- o diglucósidos. Anteriormente se ha demostrado (Stawiński, 1979) que los caminos de fragmentación están bien definidos (Brown, 1968, 1969).

El objetivo del presente trabajo es proponer la formación de un programa rutinario de elucidaciones estructurales, independientemente de las necesidades del grupo de trabajo y disponibilidad del equipo; éste se puede ampliar o reducir libremente.

METODOLOGÍA

Se han estudiado los espectros de masas de 22 glucósidos-patrón divididos en grupos de mono-, di-, tri- y tetraglucósidos. Los espectros se han corrido en varias condiciones cambiando la energía del haz electrónico y temperatura; se han observado los cambios en las posiciones y abundancias relativas de iones fragmento; se ha establecido el programa de diferenciación de los fragmentos, las correlaciones entre pérdidas comunes de los fragmentos, y se han establecido los programas (*flow chart*) de elucidaciones estructurales. Los espectros se corrieron en el equipo *DuPont 500 B*, *Varian-MAT 311* y *JEOL-JMS-01SG*, asegurando que las repeticiones se hicieran en las mismas condiciones externas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los glucósidos analizados en todos los casos se presentan en la tabla 1. El común denominador de la elección fue el fácil acceso para obtener las muestras, así como la posibilidad de comparar los espectros con datos espectroscópicos de varios trabajos. La figura 1 presenta cambios en la abundancia relativa de algunos iones seleccionados del espectro. Los cambios se obtuvieron variando las condiciones externas (corriente de aceleración, "eV"). El esquema de la figura 2 corresponde al esquema general de la fragmentación de glucósidos. La figura 3 muestra los espec-

tros del glucósido, de su genina y del azúcar. Todos los espectros se corrieron en las mismas condiciones del trabajo de equipo (espectrómetro *DuPont 500B*).

Independientemente de la elección antes presentada (las muestras fáciles de obtener), desde el punto de vista analítico todos los glucósidos presentados en la tabla 1 poseen los puntos de fusión ubicados en intervalos de $\pm 50^\circ\text{C}$, lo cual permitió que, durante los trabajos, se corrieran los espectros en condiciones similares respecto a la temperatura de la muestra (10°C por debajo del punto de fusión). (Brown, 1970.)

La figura 1 presenta los cambios en abundancias relativas de algunos iones considerados como principales en los espectros (ion molecular, ion patrón, etcétera). Como se desprende de la gráfica, el cambio (aumento) es lineal para los iones. Esta dependencia significa que el único factor que influye en la utilidad práctica del espectro es el potencial, que permite obtener bien marcado el ion molecular. En todos los casos (los 10 glucósidos presentados en el trabajo —tabla 1— y los 12 glucósidos restantes) las condiciones estándar (70 eV) propiciaron la obtención de los iones moleculares con abundancias relativas entre 3 a 5%. Sin embargo, hay que subrayar que el efecto térmico (temperatura de la muestra) puede provocar otros cambios. Durante los trabajos se respetaba el régimen recomendado por Brown, y considerado por muchos autores como el mejor, de manejar la temperatura 10°C por debajo del punto de fusión (Brown, 1971).

El esquema de fragmentación encontrado en los espectros se presenta en la figura 2. Es fácilmente apreciable que todo el espectro se puede dividir en tres regiones —la de la fragmentación del glucósido, la de la genina y la de azúcares. Las dos últimas, por lo menos en parte, se traslapan provocando imagen confusa y frecuentes errores de interpretación.

La figura 3 presenta un ejemplo del espectro del glucósido y los de su genina y del azúcar, respectivamente. Todos los espectros se corrieron en las mismas condiciones. Los iones más importantes y los iones comunes (posición en el espectro), se subrayaron. Cabe señalar que aun si la posición es la misma (número de m/z), varía la abundancia entre los espectros, de manera que hasta en el caso de dificultades analíticas (o interpretación), la hidrólisis drástica (Wall, 1952) del glucósido permite distinguir su genina, y otro espectro de azúcar(-es) permite establecer la secuencia de la cadena. Los grupos de esteroides y triterpenos, así como los de azúcares, ya se estudian a fondo (trabajos de Djerassi y Budzikiewicz, banco de información del *Org. Mass Spectrom.*) y la simple

TABLA 1. Muestras de glucósidos

Nombre	Otros nombres	Fórmula molecular	Peso molecular	M.p (°C)	Tipo de glucósido
Convallatoxina	Convallaton Corglycon	$C_{29}H_{42}O_{10}$	550	245	Mono
Oleandrina	Polinarin	$C_{32}H_{48}O_9$	576	250	Mono
Glucosid A	—	$C_{33}H_{52}O_8$	576	247	Mono
Digitalina	Diginorgin	$C_{36}H_{56}O_{14}$	712	243	Di
Glucosid B	—	$C_{39}H_{62}O_{12}$	722	210	Di
Glycyrrizin amoniacal	—	$C_{42}H_{60}O_{16}$	854	300	Di
Digitoxina	Carditoxin	$C_{41}H_{64}O_{13}$	764	250	Tri
Gitoxina	Bigitalin	$C_{41}H_{64}O_{19}$	780	285	Tri
Lanatosid C	—	$C_{49}H_{76}O_{20}$	984	248	Tetra
Digitoxina	—	$C_{56}H_{92}O_{29}$	1228	230	Penta

Datos según *Merck Index*.

Fórmula elemental de la glycyrrizin amoniacal: $C_{42}H_{60}O_{16}(NH_3)_2$.

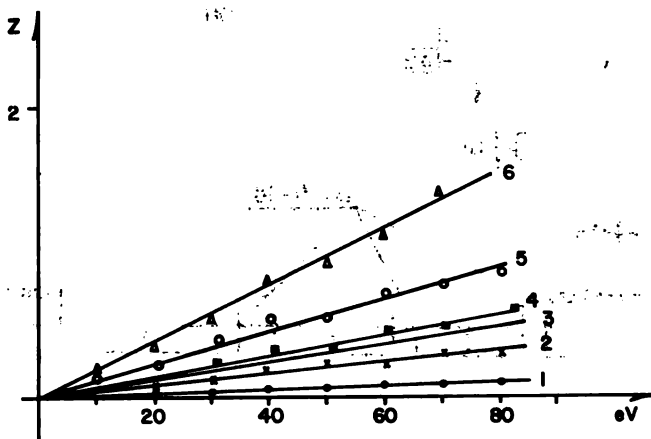


Fig. 1. Cambios en abundancias relativas de algunos iones-fragmento. (1) - Ion molecular de convallatoxina; (2) Ion $m/z = 340$ de strophantina; (3) Ion molecular de oleandrina; (4) Ion $m/z = 504$ (GA1) de digitoxina; (5) Ion $m/z = 105$ de thevetosa; (6) Ion $m/z = 162$ (M-18) de glucosa.

$$Z = \frac{(\text{abundancia relativa del ion } X)_n}{(\text{abundancia relativa del ion } X)_{n-1}}$$

donde n — potencial eV.

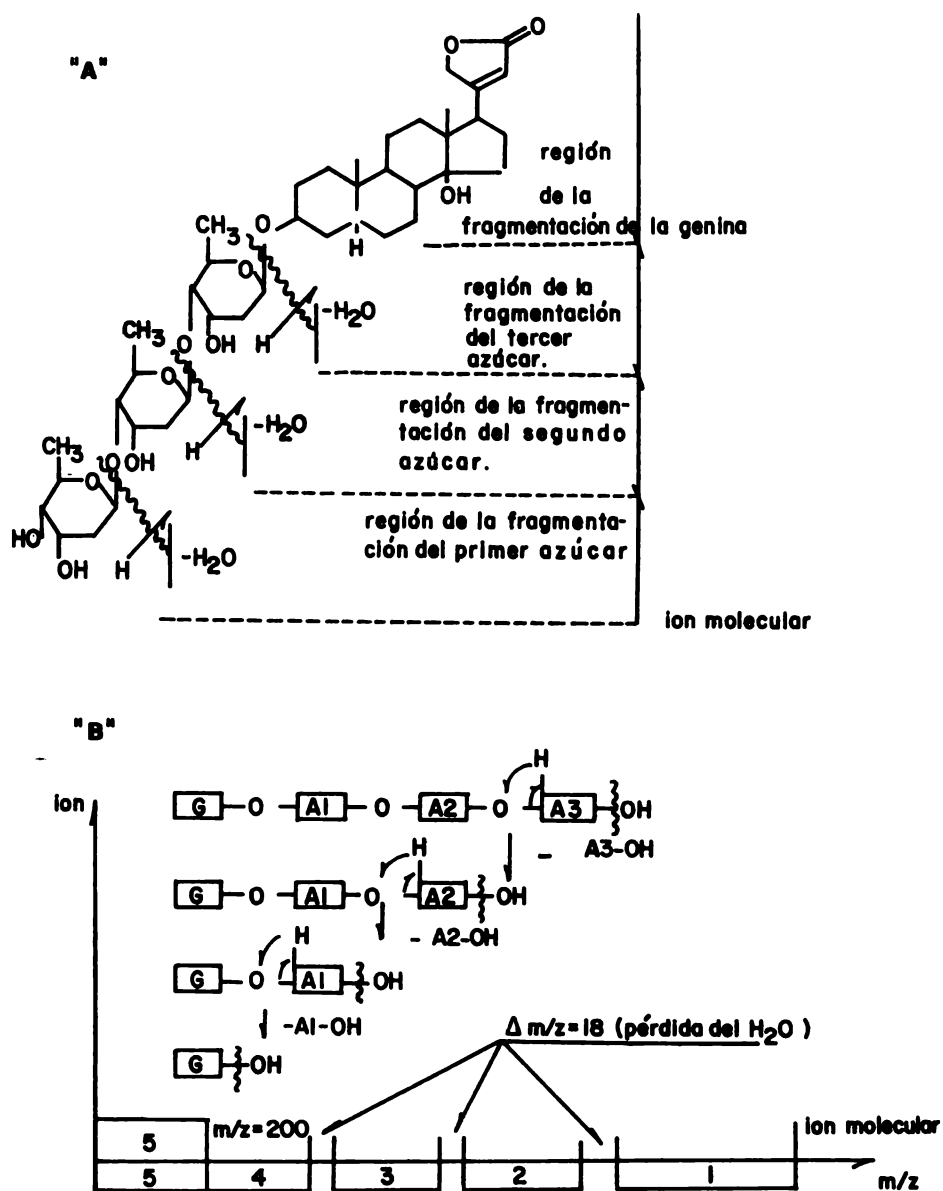


Fig. 2. Esquema de fragmentación del glucósido (ejemplo de digitoxina).

"A" — Regiones analíticas del espectro.

"B" — Esquema general de fragmentación. Regiones analíticas del espectro: (1)—Región de los iones del primer azúcar; (2) — Región de los iones del segundo azúcar; (3) — Región de los iones del tercer azúcar; (4) — Región de la fragmentación de la genina; (5) — Región de la fragmentación de la genina y de los azúcares. Regiones divididas por marcadas pérdidas de $m/z = 18$ que corresponden a las pérdidas del H_2O de los enlaces entre azúcares. G - Genina; A1, A2, A3 — el azúcar correspondiente a la posición estructural.

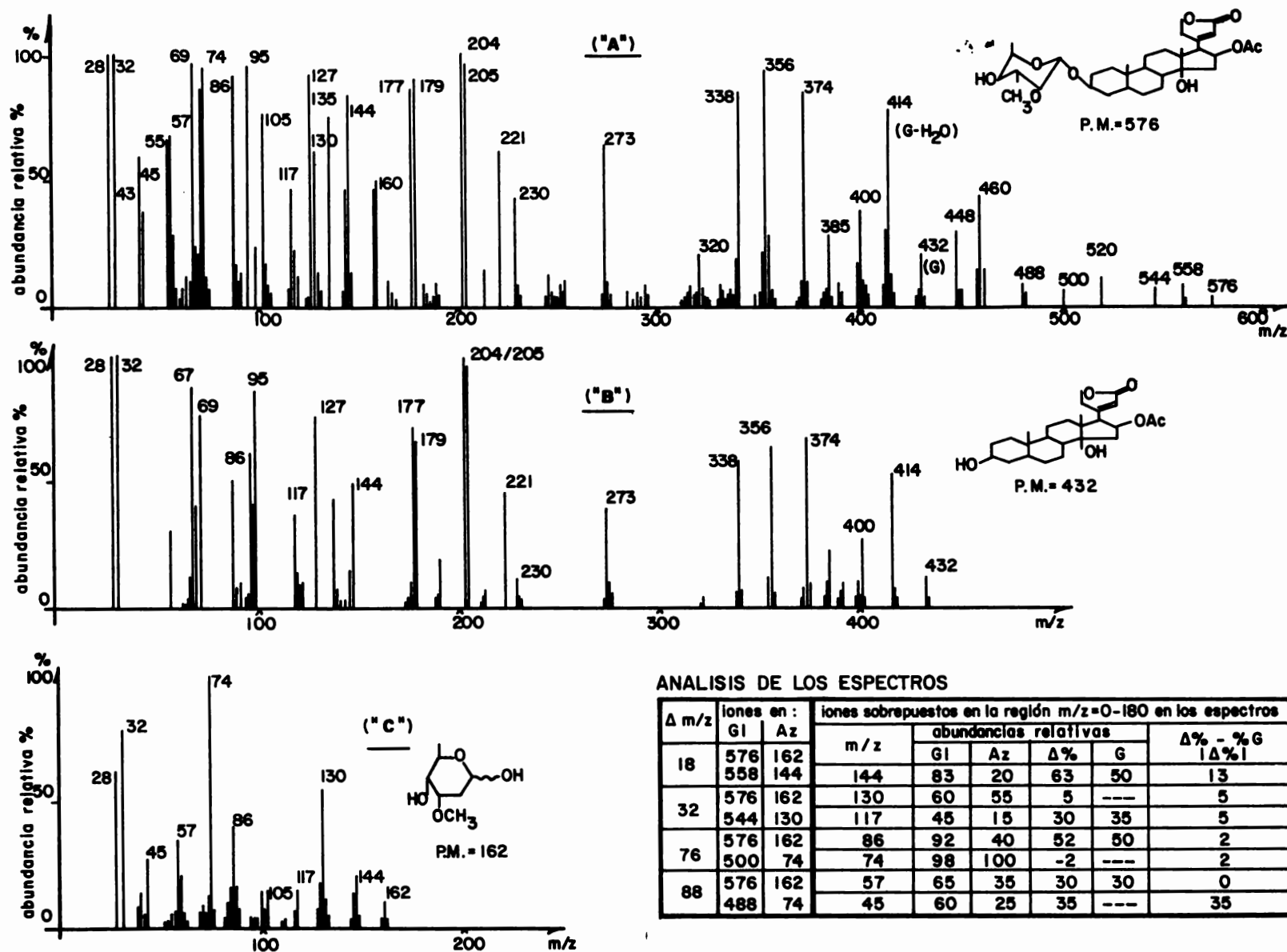


Fig. 3. Espectros de masas de oleandrina ("A"), su genina —acetilgigoxigenina ("B") y el azúcar — D-cymarosa ("C"). Gl — glucósido, G — genina, Az — azúcar. Espectro EI, equipo *DuPont 500 B*, inyección directa, 70 eV.

comparación de espectros permite definir la composición del compuesto. Sin embargo, contando con una computadora (o equipo computarizado), se puede formar el propio banco de información. La información recibida durante los trabajos permitió establecer tres organigramas (*flow charts*) independientes para

la elucidación estructural y/o comparación con otros datos almacenados. Los *flow charts* se presentan en las figuras 4, 5 y 6. El primer organigrama (*algoritmo*) establece la búsqueda de los iones fragmento y permite analizar los iones o fragmentos desprendidos de la estructura durante los rompimientos bajo el haz

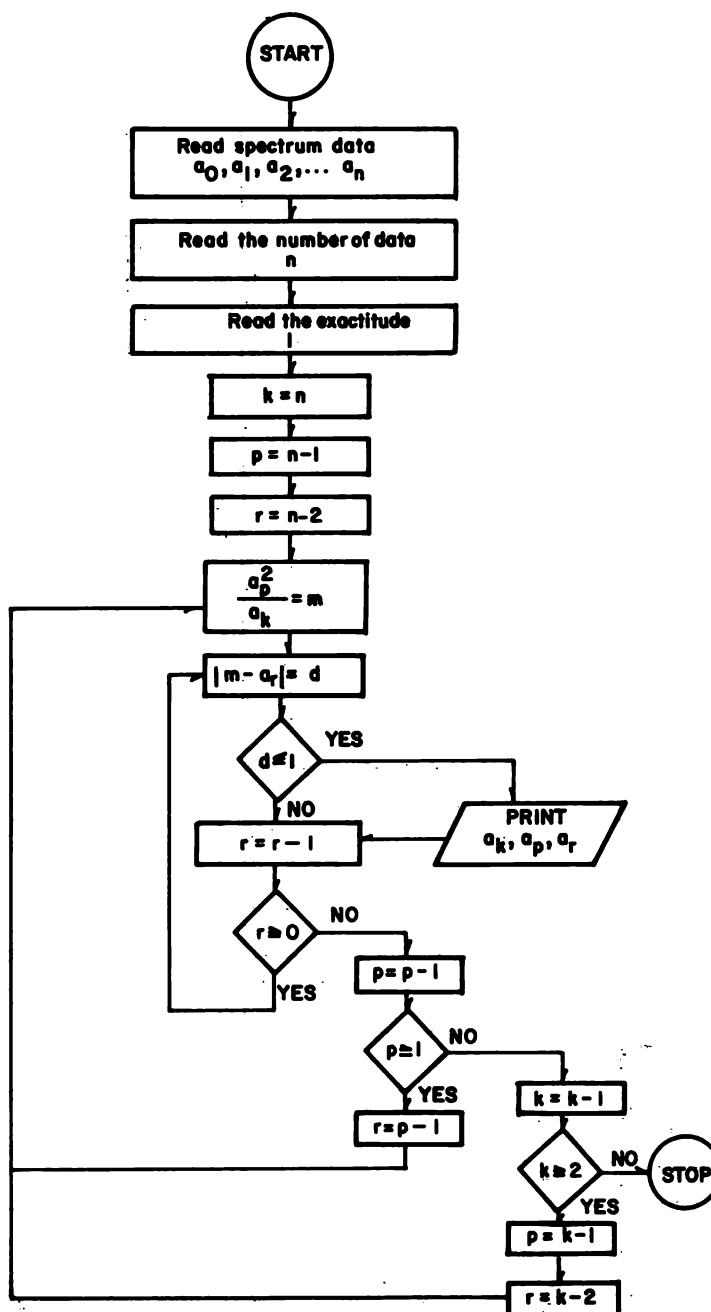


Fig. 4. *Flow chart* para la determinación de fragmentos analíticos o iones diagnósticos.

electrónico. El segundo sirve para definir las posiciones y las diferencias en las abundancias relativas en el caso de la sobreposición de los iones por analizar. El tercer *flow chart* permite definir diferencias analíticas entre dos espectros. Los programas pueden usarse en forma independiente o en conjunto según las necesidades analíticas.

CONCLUSIONES.

1. Se demuestra que los espectros de masas de los glucósidos (cardenolidos o saponinas) obtenidos con la técnica de EI (impacto electrónico) muestran marcados pasos de fragmentación.
2. Un cambio en las condiciones externas de la corri-

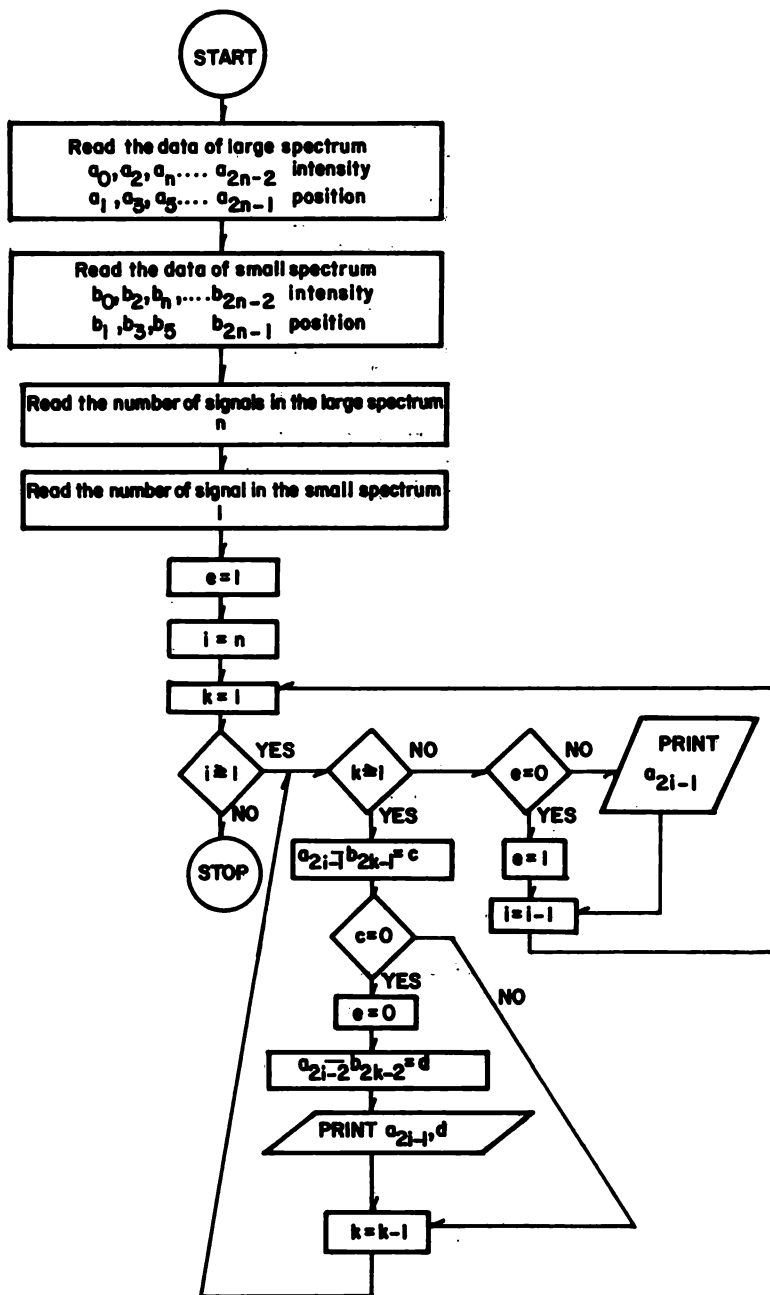


Fig. 5. Flow chart de comparación de espectros.

da del espectro, cambia la abundancia relativa de los iones; sin embargo, la abundancia cambia tanto en el espectro del glucósido como en los espectros de sus componentes (genina y azúcares). La tendencia en todos los casos es la misma. Por lo tanto, las señales del espectro se pueden tomar como constantes.

- Las regiones del espectro pueden separarse en dos corridas independientes, después de la hidrólisis del compuesto original, si la confusión analítica es demasiado grande.

- Se han establecido tres programas de resoluciones analíticas que pueden usarse de manera rutinaria.

Agradecimiento

Los autores agradecen la ayuda que les brindaron los señores Ing. Humberto Gómez R., de la Facultad de Química de la UNAM, y el Profr. Armando Guerra T., de la Sección de Computación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

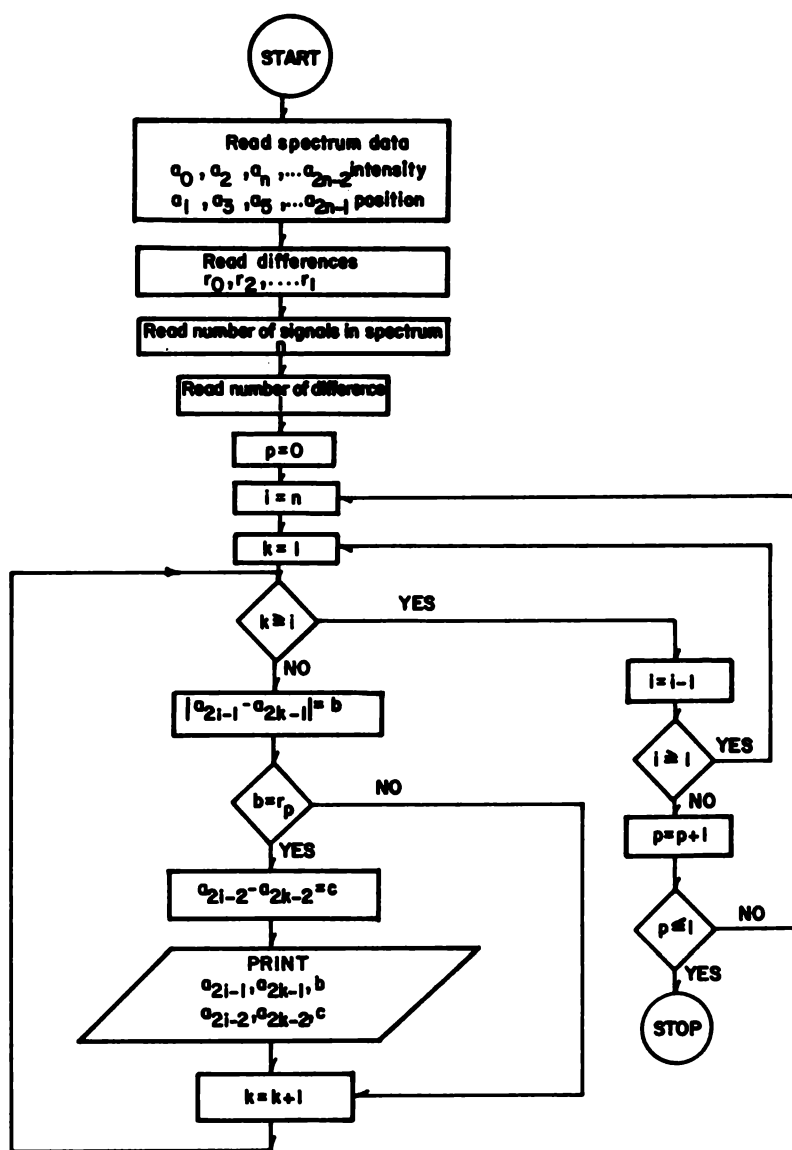


Fig. 6. Flow chart de comparación de espectros corridos en diferentes condiciones (T, eV).

BIBLIOGRAFIA

1. Brown, P.; Pettit, G.R. y Robins, R.K., *Org. Mass Spectr.* 2, 500 (1969).
2. Brown, P. y Pettit, G.R., *Org. Mass Spectr.*, 3, 67 (1970).
3. Brown, P.; Brüschweiler, F.R.; Pettit, G.R. y Reichstein, T., *J. Am. Chem. Soc.* 92, 4470 (1970).
4. _____, *Org. Mass Spectr.* 5, 597 (1971).
5. Bursey, M.M. y McLafferty, F.W., *J. Amer. Chem. Soc.*, 88, 529 (1966).
6. Derocque, J.L., *Org. Mass Spectr.* 10, 81 (1975).
7. Komori T.; Ida, Y. y Kawasaki, T., *Biomedical mass Spectrom.*, 2, 65 (1975).
8. Komori, T.; Kiguchi, R. y Kawasaki, T., *Chem. Pharm. Bull.*, 24 (11), 2610 (1976).
9. McLafferty, F.W. y Rike, W.T., *J. Amer. Chem. Soc.* 89, 5951 (1967).
10. Schulten, H.R.; Komori, T. y Kawasaki, T. *Tetrahedron*, 34, 1003 (1978).
11. Stawiński, T.M., y Gomez, H., *Rev. Soc. Mex. de Química*, edición especial. Congreso latinoamericano de IUPAC. Monterrey, México (1979).
12. Stawiński, T.M., *Acta Mexicana de Ciencia y Tecnología* (en prensa) (1986).
13. Wall, M.E. y Eddy, R.C., *Analit. Chem.* 24, 1337 (1952).
14. Williams, D.H.; Cooks, R.G. y Howe, I.; *J. Am. Chem. Soc.* 90, 6759 (1968).