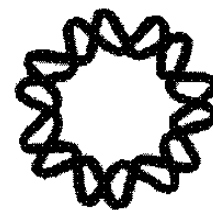




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“Aplicación de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en el establecimiento del perfil triterpénico del tipo nor-secofriedelano de la planta medicinal *Galphimia glauca*”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

ING. JORGE LOZADA LECHUGA

Asesor: Dr. Rogelio Pereda Miranda

México, D.F.

2006



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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 123 de la Facultad de Química de la
Universidad Nacional Autónoma de México

Agradecimientos:

La realización del presente trabajo se alcanzó gracias al apoyo de las siguientes instituciones y personas a las que deseo expresar mi más sincero reconocimiento:

- Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM (IN200902-2)
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 33459-B y 39950-Q y beca escolar)
- Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (Facultad de Química, UNAM), especialmente a M. Gutierrez, O. Yañes, R. Isela del Villar, y g. Duarte por el registro de las rotaciones ópticas, espectros de RMN y espectros de Masas.
- Al Doctor Carlos Cerda García-Rojas (CINVESTAV – IPN) por sus valiosas contribuciones y críticas a este proyecto.
- A la Doctora Ma. Luisa Villarreal Ortega (CEIB – UAEM) Por su apoyo incondicional al presente proyecto.
- A la Doctora Mabel Fragoso Serrano por su valiosa asistencia en la realización de este estudio.
- Al Doctor Alexandre T. Cardoso Taketa por su apoyo incondicional y valiosa asistencia en la realización y dirección de este proyecto.

Índice General:

	Página
Índice General.....	iv
Índice de Figuras	vi
Índice de Tablas.....	x
Resumen.....	xi
Abstract.....	xiv
1.- Antecedentes	1
1.1.- Introducción General.....	1
1.2.- Biosíntesis.....	2
1.3.- Propiedades terapéuticas.....	8
2.- Hipótesis	9
3.- Objetivos.....	10
4.- Parte Experimental.....	11
4.1.- Material Vegetal.....	11
4.2.- Determinación de las constantes físicas.....	11
4.3.- Extracción y aislamiento de los friedelanos.....	11
4.3.1.- Aislamiento del compuesto A.....	14
4.3.2.- Aislamiento del compuesto B1.....	18
4.3.3.- Aislamiento del compuesto B2.....	20
4.3.4.- Aislamiento del compuesto C.....	21
4.3.5.- Aislamiento del compuesto D.....	22
4.3.6.- Aislamiento del compuesto E1.....	23
4.3.7.- Aislamiento del compuesto E2.....	23
5.- Resultados.....	25
5.1.- Separación de los compuestos A-E2.....	25
6.- Discusión.....	37
6.1.- Δ^{20} Galfimina B.....	37
6.2.- $\Delta^{20(29)}$ Galfimina B.....	39
6.3.- Galfimina A.....	40
6.4.- Galfimina C.....	41

6.5.- Galfimina D.....	42
6.6.- Galfimina E.....	44
7.- Conclusiones.....	49
8.- Presentación del artículo generado en el presente estudio.....	50
9.- Apéndice.....	56
10.- Referencias.....	61

Índice de Figuras	Página
Figura 1.1.- Rutas del acetato/mevalonato y del gliceraldehído 3-fosfato para la producción de terpenos.	3
Figura 1.2.- Ruta biosintética del 2,3 epoxiesqualeno.	5
Figura 1.3.- Ruta biosintética propuesta para la formación del núcleo de friedelano a partir del bacareno.	6
Figura 1.4.- Ruta biosintética propuesta para la formación del friedelano a partir del 2,3 epoxiesqualeno.	7
Figura 5.1.- Cromatograma de la fracción A ₁₁₋₁₆ fase móvil: CH ₃ CN:H ₂ O (70:30), columna analítica de fase inversa, flujo: 0.65 ml/min. Detector: UV-DAF.	26
Figura 5.2.- Cromatograma de la fracción A ₁₁₋₁₆ : fase móvil: CH ₃ CN:H ₂ O (45:55), columna analítica de fase inversa, flujo: 0.65 ml/min. Detector: UV-DAF.	27
Figura 5.3.- Cromatograma del pico B usando la técnica de reciclaje de la muestra. Condiciones: columna preparativa de fase inversa C ₁₈ fase móvil: CH ₃ CN:H ₂ O (6:4), columna, flujo: 10 ml/min. Detector: UV-DAF.	28
Figura 5.4.- Cromatograma del pico B aislado de las hojas de <i>Galphimia glauca</i> .	28
Figura 5.5.- Cromatogramas en capa fina de la mezcla total de galfiminas (M) y cada uno de los picos aislados mediante HPLC (A-E) a partir de las	

hojas de *G. glauca* Cav. Izquierda: cromatoplaqueta de gel de sílice: Fase normal, gel de sílice; sistema de elución: $\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$ (1:1). Derecha: placa de sílica gel: Fase normal impregnada con AgNO_3 (4% H_2O -acetona, 4:1); sistema de elución: $\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$ (1:1) $\times 2$.

29

Figura 5.6.- Espectro de RNM ^1H del pico B. 500 MHz, CDCl_3 .

30

Figura 5.7.- Sección de campo bajo del espectro de RNM ^1H donde se señala la coexistencia de los isómeros “endo” (galfimina B Δ^{20}) y “exo” ($\Delta^{20(29)}$) presentes en el pico B del cromatograma principal.

31

Figura 5. 8.- Espectro protónico (^1H) del compuesto B1 (galfimina B, Δ^{20}) en el que se muestra a campo bajo (5.3 ppm) la señal múltiple que identifica al grupo metilo en C-29 del esqueleto de friedelano.

32

Figura 5.9.- Espectro de protones (^1H) del compuesto B2 ($\Delta^{20(29)}$) galfimina B, en donde se destacan las dos señales que identifican a los protones del metileno exocíclico en C-29.

32

Figura 5.10.- Cromatograma de las fracciones 32-41 de la columna de sílice de fase normal a partir de la cual se obtuvo al compuesto galfimina A. Condiciones: columna analítica de fase inversa C_{18} (tamaño de poro: 5 μm ; dimensiones: 4.6 x 250 mm); fase móvil, $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (45:55); flujo, 0.65 ml/min; detector, UV (232 nm).

33

Figura 5.11.- Análisis mediante CLAR de la fracción obtenida del corte de núcleo del pico C de la fracción primaria (A_{11-16}) de *Galphimia glauca*.

34

Figura 5.12.- Cromatograma del reciclaje del compuesto galfimina C. Condiciones instrumentales: columna semipreparativa de fase inversa, flujo: 3 ml/min. Detector: UV (232 nm). Volumen de inyección: 100 μl .

34

- Figura 5.13.-** Cromatograma del pico E usando la técnica de reciclaje de la muestra. Condiciones instrumentales: columna preparativa de fase inversa C₁₈ fase móvil: CH₃CN:H₂O (6:4), flujo: 10 ml/min. Detector: UV (232 nm). 35
- Figura 5.14.-** Espectro de protones (¹H) del compuesto ($\Delta^{20(29)}$) galfimina E en donde se muestran las señales que identifican a los protones del metileno exocíclico en C-29. 36
- Figura 6.1.-** Ampliación del espectro de RMN ¹H del compuesto Δ^{20} galfimina B a campo alto. 38
- Figura 6.2.-** Ampliación del espectro de RMN ¹H del compuesto Δ^{20} galfimina B a campo bajo. 38
- Figura 6.3.-** Ampliación del espectro de RMN ¹H del compuesto $\Delta^{20(29)}$ galfimina B a campo bajo. 39
- Figura 6.4.-** Experimento DEPT de RMN ¹³C (100 MHz) del compuesto $\Delta^{20(29)}$ galfimina B. 40
- Figura 6.5.-** Espectro de RMN ¹³C (100 MHz) del compuesto $\Delta^{20(29)}$ galfimina A. 41
- Figura 6.6.-** Espectro de RMN ¹H del isómero Δ^{19} de la galfimina B (la galfimina C) y ampliación de la región a campo bajo. 42
- Figura 6.7.-** Espectro de RMN ¹H del compuesto $\Delta^{20(29)}$ galfimina D, ampliación de la región a campo bajo. 43
- Figura 6.8.-** Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz) del compuesto Galfimina D. 44

	Página
Figura 6.9.- Ampliación del espectro de RMN ^1H del compuesto $\Delta^{20(29)}$ galfimina E a campo bajo.	45
Figura 6.10.- Estructura elucidada por RMN de los compuestos aislados de las hojas de <i>Galphimia glauca Cav.</i>	48
Figura 9.1.- Espectro de protones (^1H) del compuesto Δ^{20} Galfimina B.	56
Figura 9.2.- Espectro de protones (^1H) del compuesto $\Delta^{20(29)}$ Galfimina B.	56
Figura 9.3.- Espectro ^{13}C del compuesto $\Delta^{20(29)}$ Galfimina B.	57
Figura 9.4.- Experimento DEPT de ^{13}C del compuesto $\Delta^{20(29)}$ Galfimina B.	57
Figura 9.5.- Experimento DEPT de ^{13}C del compuesto Galfimina A.	58
Figura 9.6.- Espectro de ^{13}C del compuesto Galfimina C.	58
Figura 9.7.- Espectro de ^1H del compuesto Galfimina C.	59
Figura 9.8.- Espectro de ^{13}C del compuesto Galfimina D.	59
Figura 9.9.- Espectro de ^1H del compuesto $\Delta^{20(29)}$ Galfimina E.	60
Figura 9.10.- Espectro de ^1H del compuesto Δ^{20} Galfimina E.	60

Índice de tablas.

	Página
Tabla 4.1.- Gradiente de elución empleado en la columna A para el fraccionamiento primario del extracto metanólico.	13
Tabla 4.2.- Fracciones reunidas de la columna A del extracto de metanol.	14
Tabla 4.3.- Fracciones reunidas de la columna de gel de sílice de fase normal.	17
Tabla 6.1.- Datos de ^1H RMN para los compuestos aislados de las hojas de <i>Galphimia glauca</i> , en CDCl_3 .	46
Tabla 6.2.- Datos de ^{13}C RMN para los compuestos aislados en las hojas de <i>Galphimia glauca</i> .	47

Resumen

El uso de productos naturales extraídos de plantas medicinales comienza con el principio de la civilización humana y ha permanecido a través de La historia como una fuente importante de agentes terapéuticos auxiliares en el tratamiento de diversos padecimientos.

Aproximadamente 60% de los agentes antiinfecciosos y antitumorales comerciales y en etapa de desarrollo clínico son de origen natural.

Galphimia glauca (cav.) Kuntze (Malpigiáceae) es una planta medicinal que crece ampliamente en México, Centro y Sudamérica, la cual produce un nor - secofriedelano denominado con el nombre común galfimina B, el cual es el componente bioactivo mayoritario de los extractos de las partes aéreas de la planta.

El primer reporte sobre el aislamiento de la galfimina B y de su actividad farmacológica fue publicado hace ya una década. El mecanismo de aislamiento usado en ese estudio previo consistió en una serie de cristalizaciones fraccionadas a partir de una mezcla compleja de friedelanos.

Se han llevado a cabo estudios biotecnológicos *in vitro* sobre la mezcla de galfiminas presente en las fracciones sedantes de la planta, las cuales han

conllevado al aislamiento de un segundo nor – secofriedelano denominado 6-acetoxigalfimina B. Por esta razón se hace patente la necesidad de un estudio completo sobre el perfil de friedelanos presentes en las fracciones sedantes con el objetivo de estudiar a los mecanismos biosintéticos que rigen la producción de galfiminas en la planta silvestre así como en cultivos de células de la planta.

En el presente estudio se usaron técnicas de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) en escala analítica y preparativa para la resolución de las mezclas complejas de galfiminas, a partir de las cuales se obtuvieron cinco picos mayoritarios usando como base de estudio a la fracción metanólica extraída de las hojas de la planta.

Los picos obtenidos por técnicas de cromatografía en fase inversa en columnas preparativas empacadas de octadecilsilicio (C_{18}) fueron purificadas usando técnicas de reciclaje y corte de núcleo hasta obtener muestras cromatográficas homogéneas. Sin embargo, los espectros de Resonancia Nuclear Magnética (RNM) de los picos obtenidos mostraron la coexistencia de mezclas de diasterómeros en todos los picos, exceptuando al pico III (galfimina D).

Técnicas de argentación en columnas cromatográficas abiertas y en cromatofolios en placa fina empacados con sílica gel de fase normal fueron usadas para separar a las mezclas de diasterómeros de cada perfil cromatográfico, tras lo cual se procedió a la elucidación estructural de los

friedelanos a partir de técnicas de Resonancia Nuclear Magnética usando espectros de ^1H y ^{13}C .

Las técnicas de argentación en cromatografía en capa fina y columna abierta permitieron la purificación de los picos I, II, IV, y V, identificados como isómeros cuya diferencia estructural se manifiesta en el anillo E del esqueleto triterpénico representados como la serie endocíclica con doble enlace en las posiciones C_{20-21} para las galfiminas A, B, D y E y la serie exocíclica correspondiente a las posiciones C_{20-29} del doble enlace en el anillo E.

La elucidación estructural de las galfiminas se llevó a cabo usando técnicas modernas de resonancia Nuclear Magnética. La estructura genérica de las galfiminas aisladas reportó tres grupos metilo terciarios (Me25, Me26 y Me28); un grupo metilo secundario en posición C_4 (Me23); un grupo carbometoxi (C30); u alcohol terciario en C_{18} y un anillo de siete miembros con una lactona α,β insaturada.

ABSTRACT

The use of natural products obtained from medicinal plant sources begins since the raising of human civilization and these plants have been an important source of therapeutic agents for threatening of human diseases.

Approximately 60% of antitumor and antiinfective agents that are commercially available or in late stages of clinical trials today are of natural product origin.

Galphimia glauca (cav.) Kuntze (Malpigiaceae) is a medicinal plant that grown widely in México, Central and South America. *G. glauca* produces a nor-secofriedelane called galphimine B that is the mayor bioactive constituent obtained from aerial parts of the plant. The first report about isolation and structural elucidation was published around 10 years ago. The isolation was carried using fractional crystallization from a mixture of friedelanes.

Multiple *in vitro* studies have been done from the galphimine mixtures contained in the sedative fractions of the plant. Another nor – secofriedelane called 6 – acetoxygalphimine B was obtained from the bioactive mixture.

For this reason, now is necessary a detailed investigation about the complete set of friedelanes contained in the sedative fractions. The new objective was fixed in the study of the biosynthetic mechanisms of the galphimine production in both the wild plant and cell cultures.

In the present work, High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) techniques were used in both analytical and preparative scale for the screening of the galphimines. Five mayor peaks were obtained from the methanolic fractions of the plant leaves.

The mayor peaks obtained from preparative scale of reverse-phase chromatographic packed columns of octadecilsilicium (C_{18}) were purified using recycling and nuclear cut techniques. Chromatographically homogeneous peaks was obtained and stored for further analysis.

The Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra analysis of the peaks revealed the coexistence of a mixture of *endo-exo* diastereomers in everyone peaks, except in the peak III (galphimine D).

Argentation techniques in open chromatographic columns and chromatofolios of thin layer chromatography packed using normal - phase silica gel was used for the separation on the diastereomeric mixtures. Structural elucidation of the friedelanes was carried using 1H and ^{13}C NMR techniques.

Argentation techniques in both the thin layer and open column chromatography was of capital importance in the purification of the peaks I, II, IV and V, identified like isomers of the endocyclic series with a double-bond in the C_{20-21} position for the galphimines A, B, D y E; and the exocyclic series with a double-bond in the C_{20-29} position in the E-ring of the friedelane skeleton.

The structural elucidation of the complex of galphimines was carried using modern NMR techniques. The generic structure of the isolated galphimines consist in three tertiary methyl groups (Me25, Me26 y Me28); one secondary methyl group in C_4 position (Me23); one carbomethoxy group (C_{30}); one tertiary alcohol in a C_{18} position and one seven – member ring associated to an unsaturated α,β – lactone.

1. Introducción

1.1. Introducción General

El descubrimiento de nuevos agentes farmacológicamente activos obtenidos a partir de fuentes naturales como fermentaciones microbianas o extractos de plantas ha llevado al descubrimiento de numerosos principios bioactivos usados clínicamente que desempeñan un papel importante en el tratamiento de enfermedades. Aproximadamente 60% de los agentes antiinfecciosos y antitumorales comerciales y, en etapa de desarrollo clínico, son de origen natural (Shu,1998).

El uso de productos naturales extraídos de plantas para usos medicinales comienza con el principio de la civilización humana y al final del siglo XIX los productos naturales fueron la principal fuente de medicamentos (Seidl, 2002). En los últimos 10 años, el interés en la investigación de materias primarias naturales como fuente de nuevos agentes terapéuticos potenciales auxiliado por técnicas como la química combinatorial y el diseño molecular asistido por computadora suscitó un resurgimiento sustancial del mismo (Cragg *et al.*, 1997).

Los metabolitos secundarios son compuestos que no son necesarios para el crecimiento y reproducción en la planta, pero desempeñan un papel muy importante en la interacción de la misma con el medio ambiente asegurando que sobreviva en su ecosistema (Nugroho y Verpoorte, 2002). Los terpenos constituyen la familia más amplia y diversa de productos naturales y en su mayoría se clasifican como metabolitos secundarios ya que no se requieren para el crecimiento de la planta (Shibuya *et al.*, 1999).

Galphimia glauca es una planta de la familia *Malpighiaceae*, popularmente se conoce con el nombre de “calderona amarilla” o “tempazcolole”. Esta planta es un arbusto medicinal que crece ampliamente en México, Centro y Sudamérica (Dorsch *et al.*, 1992). En la medicina tradicional mexicana, las

infusiones de las partes aéreas de esta planta han sido usadas para tratar alteraciones del sistema nervioso (Tortoriello y Lozoya, 1993), como un calmante de los nervios, sedante o tranquilizante, utilizándose también para tratar diarrea, disentería, gastroenteritis, paludismo y desórdenes mentales (Camacho *et al.*, 2002). El principio biodinámico responsable de la actividad sedante es un norsecotriterpeno denominado con el nombre trivial de galfimina B ($C_{30}H_{44}O_7$) y forma parte de la familia de los friedelanos. Este triterpeno fue aislado de las partes aéreas del vegetal (Toscano *et al.*, 1993) y se ha demostrado que posee efectos sedativos en el sistema nervioso central en mamíferos (Osuna *et al.*, 2002). La acción de este compuesto se ejerce a nivel del área ventral tegmental del cerebro (Tortoriello, 1998). El lugar ideal para la recolección de *Galphimia glauca* en México es la población de Dr. Mora en el estado de Guanajuato, debido a que las poblaciones de otras regiones del país presentan un contenido metabólico desprovisto de este principio sedante (Tortoriello y Lozoya, 1991).

Se han iniciado los estudios clínicos en pacientes con problemas de ansiedad e insomnio y, por tal motivo, es indispensable contar con cantidades suficientes para la realización de estas investigaciones farmacológicas y toxicológicas. Debido a que la producción de galfimina B en la planta silvestre es variable durante el año y se restringe sólo a los ejemplares provenientes de la zona centro del país, se ha planteado el desarrollo de procedimientos biotecnológicos utilizando cultivos *in vitro* de *G. glauca* con la finalidad de obtener material vegetal que permita el abastecimiento continuo de este principio bioactivo en concentraciones comparables o superiores a las obtenidas en las plantas silvestres. También, recientemente se demostró la producción *in vitro* de galfimina B en cultivos de callos y células en suspensión y se observó que la producción de este principio activo no era continua, sino en forma de ciclos con un pico máximo de producción desfasado por uno a dos días en la generación de un segundo metabolito, denominado como la 6-acetoxigalfimina B (Osuna *et al.*, 1999). La síntesis química de la galfimina-B sería muy difícil y costosa como una alternativa para el abastecimiento de este compuesto en cantidades suficientes para la

evaluación de su potencial farmacológico y toxicológico de interés clínico, por lo tanto, la obtención de este compuesto a través de cultivos de células vegetales para su producción industrial es una opción prometedora (Osuna *et al.*, 2002).

1.2. Biosíntesis

Los triterpenos y esteroides se sintetizan a partir de seis unidades de isopreno y poseen un origen biosintético común debido a que todos son derivados del 2,3 epoxiescualeno, presumiblemente debido a una reacción en cadena provocada por la apertura del anillo epoxídico y una subsecuente ciclización en cadena de los dobles enlaces.

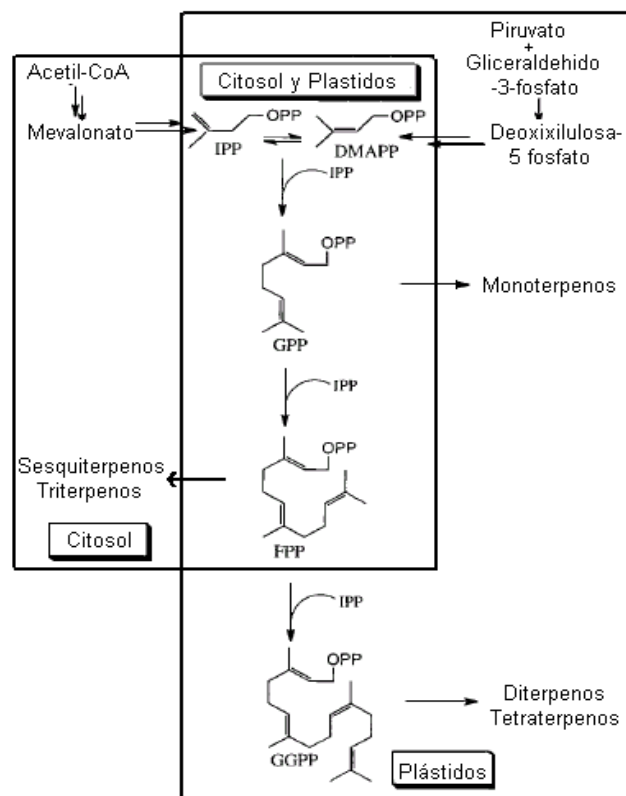


Fig.1.1. Rutas del Acetato/Mevalonato y del gliceraldehido 3-fosfato para la producción de terpenos (Trapp y Croteau, 2001).

Los átomos de carbono que forman a los triterpenos (C_{30}) y a los esteroides (C_{27}) se obtienen del isopreno el cual se biosintetiza por la unión de tres grupos acetato provenientes de acetil coenzima A. Posteriormente se forma el intermediario denominado 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA el cual se transforma por acción de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa en mevalonato mediante una reacción irreversible. El mevalonato es transformado en isopentenil pirofosfato en una serie de reacciones que involucran hidrólisis de ATP. Posteriormente se lleva a cabo la isomerización del isopentenil pirofosfato para obtener prenil difosfato. Debido a la pérdida posterior de un ión difosfato se obtiene un catión prenil. Este catión reacciona mediante un mecanismo de unión cabeza-cola con una unidad de isopentenil pirofosfato para producir un geranil pirofosfato. El geranil pirofosfato reacciona con una unidad de prenil difosfato para formar una unidad de farnesil pirofosfato. La síntesis del escualeno es llevada a cabo por una condensación cola-cola de dos moléculas de farnesil pirofosfato (Stryer L. 1995).

Los terpenos se sintetizan en plantas mediante la participación de dos rutas metabólicas compartimentalizadas a nivel celular. En primer lugar, la vía del acetato/mevalonato que origina principalmente los sesquiterpenos (C_{15}) y los triterpenos (C_{30}) en el citosol y, alternativamente, la vía del piruvato/gliceraldehido-3-fosfato, que a través del 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato, da origen a los monoterpenos (C_{10}), diterpenos (C_{20}) y tetraterpenos (C_{40}) en plástidos y mitocondrias (Trapp y Croteau, 2001) (Fig. 1.1). Una gran cantidad de triterpenos poseen un grupo hidróxido en el carbono 3 (C_3) para los cuales su precursor biosintético es el 2,3 epoxiesqualeno. (Fig. 1.2)

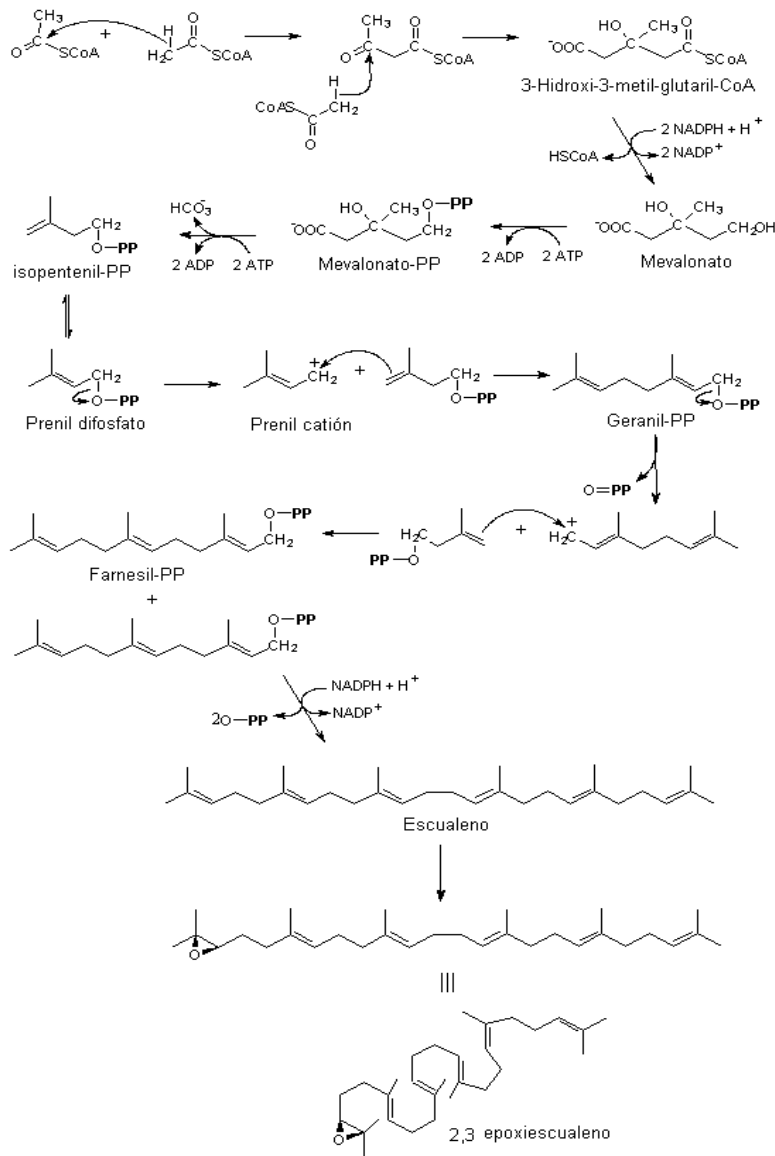


Fig. 1.2. Ruta biosintética del 2,3 epoxiesqualeno (Stryer, 1995)

Los triterpenos y los esteroides se biosintetizan a partir de seis unidades de isopreno y con un origen común a través de la apertura del anillo epoxídico del 2,3-oxidoesqualeno seguido por una serie de ciclizaciones intramoleculares, bajo control enzimático, para generar los sistemas tetra y pentacíclicos (Fig. 1.3 y 1.4) (Manitto, 1981; Hostettmann y Marston, 1995).

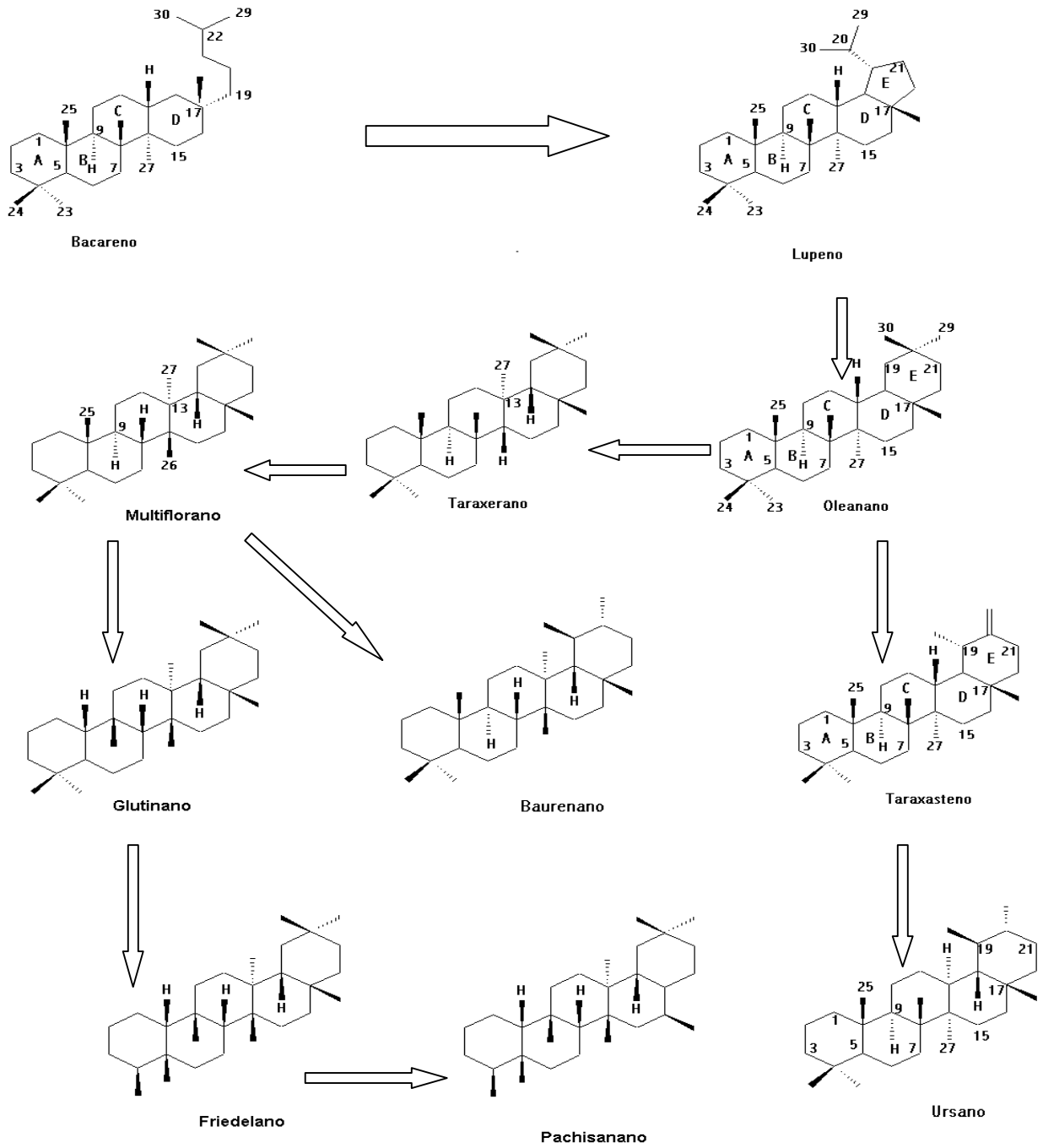


Fig. 1.3. Ruta biosintética propuesta para la formación del núcleo de friedelano a partir del bacareno.

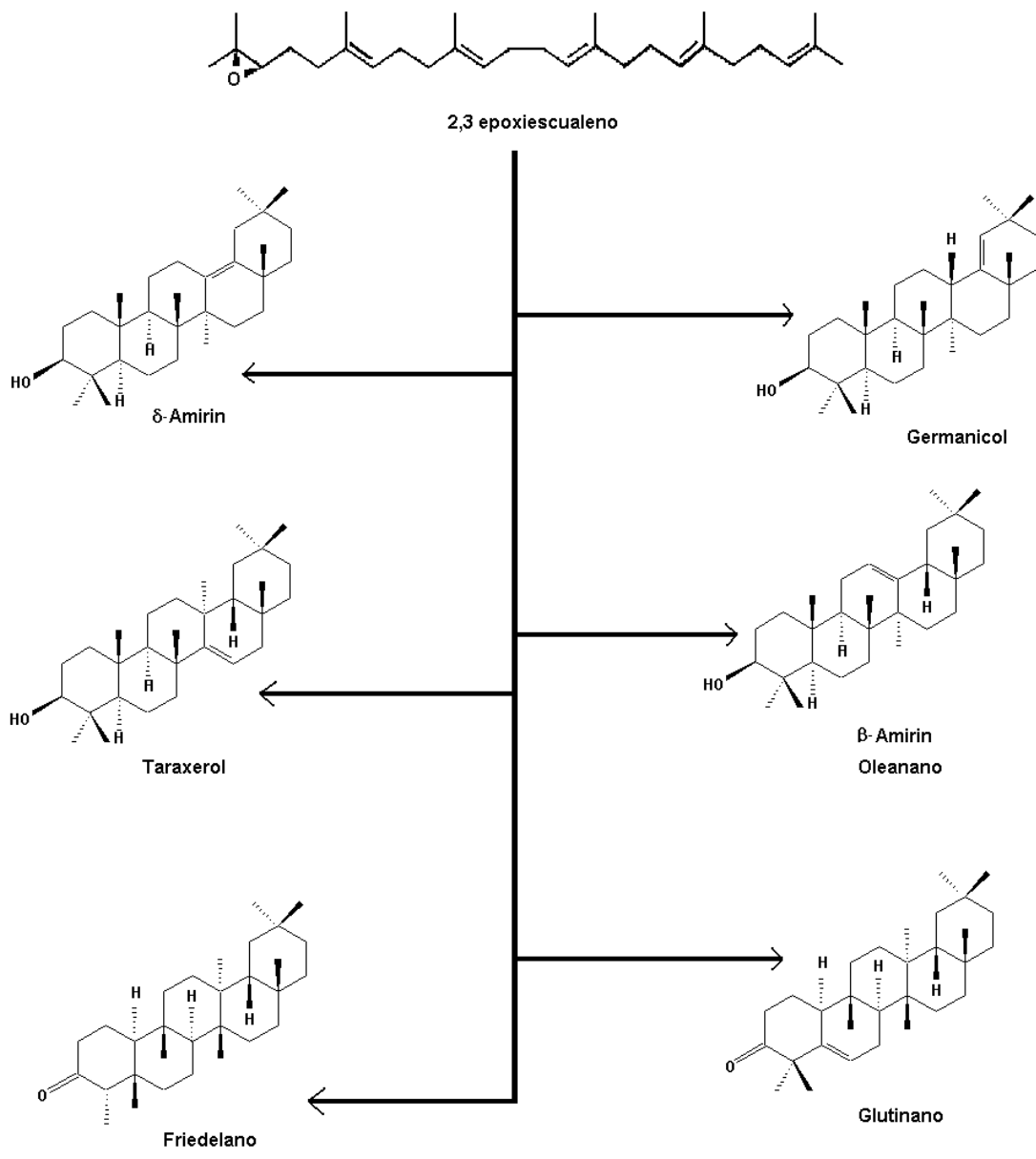


Fig. 1.4. Ruta biosintética propuesta para la formación del friedelano a partir del 2,3 epoxiescualeno.

1.3. Propiedades terapéuticas

Muchas de las funciones biológicas de los terpenos en las plantas se desconocen. Estos compuestos han sido asociados a mecanismos de protección contra el ataque de los hongos (Nugroho y Verpoorte, 2002; Dixon, 2001; Osbourn, 1996), bacterias (Dixon, 2001), insectos herbívoros (Paré y Thumlinson, 1998) y animales (Dixon, 2001). A su vez, se presume que este tipo de compuestos se encuentran relacionados con las funciones de comunicación y un pequeño número de estos compuestos forman parte del metabolismo primario, como precursores de hormonas y pigmentos (Trapp y Croteau, 2001).

Los triterpenos son una clase de isoprenoides con un amplio rango de actividades biológicas y una gran diversidad estructural, por esto son reconocidos como una importante y promisoría fuente de compuestos útiles en la industria farmacéutica (Morita *et al.*, 2000). Las propiedades farmacológicas de los triterpenos son muy vastas y reflejan su gran diversidad estructural. Por siglos las plantas que contienen triterpenos han sido empleadas con fines medicinales y también han sido empleados como venenos e insecticidas (Sturm *et al.*, 1996).

En la actualidad las propiedades que se han descrito en este tipo de compuestos son también muy variadas, ya que se han encontrado triterpenos con actividad fungicida, antibacteriana (Dixon, 2001), antitumoral (Hardas *et al.*, 2001), antialérgica (Campos *et al.*, 2001), hipocolesterolémica, actividad hepatoprotectora (Adnyana *et al.*, 2001), antioxidante, citotóxica para células normales y cancerígenas (Dai *et al.*, 2001), inmunomoduladora (Marciani *et al.*, 2000), como auxiliares en el tratamiento de enfermedades inmunodegenerativas (Lee *et al.*, 2001), con actividad anti-HIV (Ma *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1999; McKee *et al.*, 1997; Quéré *et al.*, 1996), antihipertensiva, antiinflamatoria (Ukiya *et al.*, 2002), analgésica, sedante (Wang *et al.*, 1997), diurética y expectorante (Hostettmann y Marston, 1995), entre otras.

2.- Hipótesis

El uso de técnicas de cromatografía líquida de alta resolución asistidas por técnicas modernas de espectroscopia de resonancia magnética nuclear permitirá establecer el perfil triterpénico con propiedades sedantes de *Galphimia glauca*, es decir, se elucidará la naturaleza química de los principios que se biosintetizan y acumulan en las partes aéreas (hojas). La diversidad estructural de los friedelanos constituye un indicador de la variabilidad ontogénica y geográfica en su metabolismo secundario biodinámico y, por lo tanto, la galfimina B y sus congéneres con propiedades sedantes se originan a partir de un posible precursor norsecofriedelánico común para toda la serie triterpénica mediante los procesos de desintoxicación operantes en las células vegetales.

3.- Objetivos

GENERAL

Establecer las condiciones instrumentales a nivel analítico y preparativo en la cromatografía líquida para lograr el aislamiento y la purificación de los friedelanos presentes en las hojas de *Galphimia glauca* y, de esta manera, contar con material puro que permita realizar la elucidación de su estructura molecular.

PARTICULARES

- Establecer las condiciones instrumentales de cromatografía líquida para el aislamiento y la identificación analítica de los diferentes friedelanos que se encuentran presentes en las hojas de la planta en estudio.
- Elucidar la estructura molecular de los constituyentes individuales aislados mediante técnicas espectrométricas (FAB-MS) y espectroscópicas de RMN ^1H y ^{13}C .
- Determinar las constantes físicas de los constituyentes individuales (punto de fusión y rotación óptica)

4.- Parte Experimental

4.1. Material vegetal

La planta *Galphimia glauca* Cav. se recolectó en la localidad de Dr. Mora en el estado de Guanajuato (Julio 2001). Los especímenes de referencia se depositaron en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) En el Centro Médico Nacional Siglo XXI en México. D. F. bajo los números de acceso 8645 y 8646.

4.2. Determinación de las constantes físicas

Los espectros de Resonancia Nuclear Magnética (RMN) de Hidrógeno (^1H) y de carbono-13 (^{13}C) se generaron en un equipo Bruker AMX-500 que operó a una frecuencia de 500 y 125.7 MHz, respectivamente. Se utilizó cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente y los desplazamientos químicos se expresaron en partes por millón (ppm) utilizando como referencia el tetrametilsilano (TMS). Las rotaciones ópticas se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer 241. Los espectros de masas registrados en un espectrómetro JEOL SX102A, se realizaron usando como método de ionización el bombardeo rápido de átomos (FAB-MS). El modo positivo de baja y alta resolución (HRFAB-MS y LRFAB-MS) se registró usando una matriz de glicerol o polietilenglicol. Los puntos de fusión no están corregidos y fueron determinados en un aparato Fisher-Johns.

4.3. Extracción y aislamiento de los friedelanos

Las hojas se secaron a la sombra y fueron separadas del resto de las partes aéreas en forma manual. Se trituraron usando un molino eléctrico y se

pulverizaron usando un mortero de porcelana. Ochocientos gramos de hojas secas se utilizaron para el presente estudio.

Las hojas de *G. glauca* se sometieron a un proceso de extracción utilizando disolventes de diferente polaridad. Primero, se realizó un desgrase utilizando una maceración con hexano (7L, 24 H x3). Posteriormente, se sometieron a una extracción utilizando cloroformo (7L, 24 H x3) y, por último, se sometieron a una extracción utilizando metanol (7L, 24 H x3). Los extractos se filtraron y posteriormente se procedió a remover el solvente usando un rotavapor y vacío.

La resolución de los constituyentes individuales presentes en las hojas de *G. glauca* se logró a través de la aplicación de técnicas en la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Estos análisis permitieron definir las condiciones óptimas para la separación y purificación de cada uno de los constituyentes. Diversas fases estacionarias fueron probadas, tanto en la CLAR como en columnas abiertas, que incluyeron la cromatografía de exclusión molecular por Sephadex® y columnas empacadas con gel de sílice y fases reversas, como el dimetiloctadecilsilicio (C₁₈) y el cianopropilmetilsilicio.

Para la identificación cromatográfica de la galfimina B y la acetoxigalfimina B se utilizaron muestras auténticas obtenidas *in vitro* a partir de cultivos de células vegetales de *G. glauca* (Osuna, 1999). Se compararon cada uno de los extractos preparados con los estándares de prueba mediante cromatografía en capa fina, utilizando placas de gel de sílice para registrar sus R_f en diferentes sistemas de elución. También, se utilizaron coeluciones en la cromatografía líquida de alta resolución utilizando diferentes columnas, tanto de fase normal como de fase reversa para el registro de los tiempos de retención (R_t).

Los extractos que se utilizaron para la purificación de las galfiminas fueron los extractos de cloroformo y metanol. La fracción de metanol (153.7 g) se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice (612 g; tamaño de partícula: 0.040–

0.063 mm) de 80 cm de altura por 8 cm de diámetro. Se utilizó un gradiente de polaridad creciente de CH₃OH en CHCl₃. Las fracciones recolectadas (450 ml c/u) se analizaron utilizando cromatografía de capa fina (placas de gel de sílice 60F₂₅₄; 0.2 mm de espesor) y se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica. Posteriormente, se realizó una etapa de eliminación de pigmentos a cada una de las fracciones colectadas utilizando carbón activado en polvo (5 g, 12 H x3) y se filtraron usando papel filtro (Wathman 32, 15.0 cm) a través de una cama de Celita (Celita 521, Aldrich) para remover las partículas finas de carbón activado.

Fracciones			Composición eluyente	
A1	a	A10	100%	CHCl ₃
A11	a	A15	98:2	CHCl ₃ :MeOH
A16	a	A19	97:3	CHCl ₃ :MeOH
A20	a	A26	95:5	CHCl ₃ :MeOH
A27	a	A32	93:7	CHCl ₃ :MeOH
A33	a	A35	92:8	CHCl ₃ :MeOH
A36	a	A39	90:10	CHCl ₃ :MeOH
A40	a	A43	85:15	CHCl ₃ :MeOH
A44	a	A47	80:20	CHCl ₃ :MeOH
A48	a	A50	50:50	CHCl ₃ :MeOH
A51	a	A52	100%	MeOH

Tabla 4.1. Gradiente de elución empleado en la columna A para el fraccionamiento primario del extracto metanólico.

De acuerdo a la similitud cromatográfica de cada una de las fracciones, éstas se reunieron de la manera siguiente:

Fracciones
A ₁₋₁₀
A ₁₁₋₁₆
A ₁₇₋₂₁
A ₂₂₋₂₃
A ₂₄₋₂₇
A ₂₈₋₃₃
A ₃₄₋₃₉
A ₄₀₋₄₄
A ₄₅₋₄₈
A ₄₉₋₅₂

Tabla 4.2 Fracciones reunidas de la columna A del extracto de metanol.

Se procedió a inyectar las fracciones recolectadas en un cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC) con el objetivo de determinar la presencia de las galfiminas en aquellos eluatos cuyo R_f correspondía al de las muestras auténticas, para lo cual se realizaron coeluciones de cada una de las fracciones con los estándares de galfimina-B ($R_f = 0.53$; $R_t = 26.2$ min) y 6-acetoxigalfimina-B ($R_f = 0.64$; $R_t = 33.4$ min).

4.3.1. Aislamiento del compuesto A (R_f 0.36; R_t 19 min)

Las pruebas preliminares para lograr la separación de los principios presentes en la fracción A₁₁₋₁₆ se efectuaron en columnas analíticas de fase

reversa (C₁₈) con un sistema de detección de luz ultravioleta (232 nm) con un detector de arreglo de fotodiodos (UV-DAF) y un flujo de 0.65 ml/min. El sistema cromatográfico fue el siguiente: columna analítica Waters Simmetry® de fase reversa C₁₈ (tamaño de poro: 5 μm; dimensiones: 4.6 x 250 mm); fase móvil: CH₃CN:H₂O (45:55) en elución isocrática; volumen de inyección: 10 μl. El escalamiento a un nivel preparativo se realizó de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

MUESTRA A INYECTAR

$$\mathbf{M_p = M_a(l_p/l_a)(D_p^2/D_a^2)}$$

Donde:

Da = Diámetro de la columna analítica

Dp = Diámetro de la columna preparativa

La = Longitud de la columna analítica

Lp = Longitud de la columna preparativa

Ma = Cantidad de materia de la columna analítica

Mp = Cantidad de materia de la columna preparativa

FLUJO A NIVEL PREPARATIVO

$$\mathbf{F_p = F_a (l_p/l_a)(D_p^2/D_a^2)}$$

Donde:

Fa = Flujo de la columna analítica

Fp = Flujo de la columna preparativa

Da = Diámetro de la columna analítica

Dp = Diámetro de la columna preparativa

La = Longitud de la columna analítica

Lp = Longitud de la columna preparativa

Las condiciones instrumentales a nivel preparativo adecuadas fueron las siguientes: Columna C₁₈ preparativa Waters Symmetry® (tamaño de poro: 7µm, dimensiones: 19 x 300 mm); fase móvil: CH₃CN:H₂O (45:55); flujo: 10 ml/min; detector: luz ultravioleta (232 nm) con un detector de arreglo de fotodiodos (UV-DAF); volumen de inyección: 500 µl.

TECNICAS DE ARGENTACION EN CROMATOGRAFIA

a) Columnas de gel de sílice impregnadas con AgNO₃

Para construir columnas de sílice de fase normal impregnadas con nitrato de plata se utilizó gel de sílice de fase normal (10 g, tamaño de poro de 0.040 – 0.063 mm) y una solución de AgNO₃ (2 g) en 10 ml de acetona y 20 ml de H₂O destilada. Posterior a la impregnación del soporte, éste se sometió a un calentamiento para eliminar la humedad durante 12 H en una estufa a una temperatura de 60 °C.

b) Cromatofolios de gel de sílice impregnadas con AgNO₃

Para construir cromatofolios de gel de sílice de fase normal tratadas con solución de AgNO₃ se usaron placas de gel de sílice (Si 60F₂₅₄ 0.2 mm espesor) bañadas en una solución de AgNO₃ (2 g de AgNO₃ en 10 ml de acetona y 20 ml de H₂O x3 repeticiones) y secadas por 12 H en una estufa a 60°C.

Para el aislamiento del compuesto A se utilizó la fracción A₁₁₋₁₆ de la columna A. Se recurrió a la técnica de corte de núcleo y reciclado de la muestra (Kubo y Nakatsu, 1990) para alcanzar la máxima pureza debido a que la diferencia en los tiempos de retención de los componentes de la muestra no fue suficiente para obtenerlos en estado homogéneo mediante una sola inyección. Fue

necesario el uso de 10 a 15 ciclos para obtener cada uno de los compuestos con un grado de pureza superior al 99%.

Con el objetivo de separar a los constituyentes contenidos en la fracción A₁₁₋₁₆ se utilizó la cromatografía en columna de fase normal, la cual consistió en una columna de gel de sílice (tamaño de partícula: 0.040–0.063 mm) empacada en una columna de vidrio de 25 × 2.5 cm. Se usó como eluyente una mezcla de AcOEt:CHCl₃ de composición 2:1. Se usó una muestra de 498 mg de la fracción A₁₁₋₁₆. Se colectaron 52 fracciones de 0.5 ml. Para el análisis de las fracciones se usaron placas de gel de sílice (60F₂₅₄; 0.2 mm espesor) y como sistema de elución se usó una mezcla de AcOEt:CHCl₃ de composición 2:1. La visualización de los constituyentes se realizó en una cámara de luz ultravioleta (254 nm); también, se utilizó una solución cromógena de vainillina en H₂SO₄ al 2% seguida por calentamiento de las placas a una temperatura superior a los 100 °C.

Fracciones	Rendimiento (mg)
15-16	31.7
17-18	44
19-20	7
21-24	96
24-26	10
44-50	8

Tabla 4.3 Fracciones reunidas de la columna de gel de sílice fase normal.

Se montó una columna abierta de gel de sílice impregnada con una solución de AgNO₃ empacada en una columna de vidrio de 20 × 2 cm. Se empleó como eluyente una mezcla de CHCl₃:AcOEt de composición 1:1. Se utilizó 15 mg de muestra enriquecida con el compuesto A obtenida del corte de la fracción A₁₁₋₁₆

a un tiempo de retención de 18.9 min y las fracciones 44-50 de la columna de gel de sílice fase normal. Para el análisis de las fracciones se usaron cromatofolios impregnados con una solución de AgNO_3 .

Se colectaron 42 fracciones y se reunieron de acuerdo con su similitud cromatográfica. Las fracciones 32 a 41 proporcionaron un rendimiento de 7.0 mg del pico A purificado. La visualización de las placas con luz UV (254 nm) no fue eficiente en esta etapa ya que no se observó la fluorescencia por la acción del nitrato de plata sobre los cromatofolios. Para revelar las placas se utilizó una solución de vainillina en H_2SO_4 al 2% sin usar calentamiento.

Se observó a través del uso de cromatofolios impregnados con AgNO_3 y por espectros de protones (^1H) que el pico A obtenido por reciclaje en HPLC y columna abierta correspondía a una mezcla de isómeros que sólo diferían en la posición “endo” o “exo” del doble enlace en el anillo E del esqueleto triterpénico (Δ^{20} y $\Delta^{20(29)}$). La purificación del isómero “endo” no se logró debido a su bajo rendimiento a partir de la mezcla original.

Galfimina A: (CHCl_3 :AcOEt 1:1 [$R_f = 0.36$]; $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$, 45:55; [$R_t = 18.9$ min]): Sólido amorfo blanco. p.f 117–119 °C [α] $^{25}_D -37$ (c 0.5, CHCl_3); FAB-MS (modo positivo) m/z : 533.3137 [M-H] $^+$ ($\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{O}_8$) 13 α -carbometoxi-4R-6 α ,7 α ,18 β -tetrahidroxi-30-nor-3,4-seco-fridela-1,20(29)-dien-3,24-ólido

4.3.2. Aislamiento del compuesto B1 (R_f 0.53; R_t 26.2 min):

La aplicación de las técnicas de sobrecarga de la columna y corte del núcleo (Hostettmann, 1986) permitieron colectar las fracciones correspondientes a los tiempos de retención (t_R) de 26.2 min. Se aplicó la técnica de reciclaje de la muestra problema usando como sistema de elución la mezcla de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (45:55) y una columna Watters Simmetry® (tamaño de poro: 7 μm , dimensiones:

19 x 300 mm). Se utilizaron de 12 a 15 ciclos para obtener la máxima separación de los compuestos. Cada uno de los eluatos colectados se evaporó usando un rotaevaporador (60 °C) y vacío. El compuesto B ($t_R = 26.2$ min) se analizó mediante espectroscopia de RMN a través de un espectro de protones (1H) mediante el cual se pudo confirmar que este pico correspondía a una mezcla de dos isómeros que sólo diferían en la posición “endo” o “exo” del doble enlace en el anillo E del esqueleto triterpénico (Δ^{20} y $\Delta^{20(29)}$).

Para la purificación del compuesto B1 (Galfimina B, isómero “endo” presente en el pico B del cromatograma principal) se utilizó la fracción A₁₁₋₁₆. Se ensayó una columna abierta de pequeñas dimensiones, la cual consistió en una columna de gel de sílice impregnada con AgNO₃ (Segura *et al*, 2000, Ruan *et al*, 1995) montada sobre una pipeta pasteur y se utilizó como eluyente una mezcla de CHCl₃:AcOEt de composición 2:1. Se colectaron 28 fracciones de aprox. 0.3 ml. Para el análisis de las fracciones eluidas se utilizaron placas de sílica fase normal tratadas con una solución de AgNO₃ para lo cual se utilizó como eluyente una mezcla de CHCl₃:AcOEt de composición 2:1. Las fracciones obtenidas en la columna abierta se sometieron a un proceso de reciclaje en CLAR utilizando una columna C-18 preparativa Waters Symmetry® funcionando bajo las condiciones previamente descritas.

Se empacó una nueva columna abierta de gel de sílice, la cual consistió de una columna de vidrio de 25 x 2 cm. Se utilizaron 22 mg del pico B obtenidos del reciclaje en CLAR de la fracción A₁₁₋₁₆. Se utilizó como fase estacionaria sílica de fase normal (10 g) impregnada con una solución de AgNO₃. Se utilizó como eluyente una mezcla de CHCl₃:AcOEt de composición 1:1. Para el análisis de las fracciones se utilizaron placas de sílica Si60F₂₅₄ impregnadas con una solución de AgNO₃. Las placas se revelaron utilizando una solución de vainillina en H₂SO₄ al 2%.

Se colectaron 50 fracciones de 0.5 ml c/u. Se reunieron las fracciones 32-35 las cuales tuvieron un rendimiento de 1.5 mg del compuesto B1. Estas fracciones se sometieron a una etapa de remoción de los residuos de nitrato de plata, para lo cual se usó una columna de sílica de fase normal y se usó como eluyente la mezcla de CHCl₃:AcOEt (9:1) montada en una pipeta Pasteur. Para obtener una mayor cantidad del compuesto B1, se sometieron 20 mg adicionales del pico B (fracción A₁₁₋₁₆), a los mismos procedimientos cromatográficos. Se utilizó como fase estacionaria gel de sílice (10 g), impregnada con una solución de AgNO₃ y como eluyente una mezcla de CHCl₃:AcOEt (1:1). Se colectaron 29 fracciones de las cuales se reunieron las fracciones 13 a 17 que contenían al compuesto B1. El análisis de las fracciones se llevó a cabo usando placas de sílica de fase normal tratadas con solución de AgNO₃. La fase móvil fue una mezcla de CHCl₃:AcOEt de composición 1:1 y la placa se desarrolló en dos ocasiones consecutivas bajo las mismas condiciones cromatográficas.

Galfimina B: (CHCl₃:AcOEt 1:1 [*R_f* = 0.53]; CH₃CN:H₂O 45:55 [*R_t* = 26.2 min]): Sólido amorfo blanco. p.f. 149–152 °C [α]_D²⁵ -51 (*c* 0.16, CHCl₃); FAB-MS (Modo positivo) *m/z*: 517 [M+H]⁺ (C₃₀H₄₅O₇) 13 α -carbometoxi-4*R*-7 α ,18 β -trihidroxi-30-*nor*-3,4-*seco*-fridela-1,20-dien-3,24-ólido.

4.3.3. Aislamiento del compuesto B2 (*R_f* 0. 48; *R_t* 26.2 min):

Las fracciones 24 a 27 de la columna de gel de sílice de fase normal segunda, las fracciones 49 y 50 de la columna de gel de sílice de fase normal tercera y las fracciones 24 a 27 de la columna de gel de sílice cuarta se reunieron para separar al compuesto B2 (diasterómero del compuesto B1, presenta doble enlace en la posición “exo” en el anillo E). A su vez se empacó una nueva columna utilizando 8 mg de la mezcla de compuestos que no se separaron en la columna anterior. La columna fue montada en una pipeta Pasteur y se utilizó sílica de fase

normal tratada con solución de AgNO_3 . Se utilizó como eluyente una mezcla de CHCl_3 :AcOEt (1:1). Se recolectaron 19 fracciones de las cuales se reunieron las fracciones 17 y 18 que contenían al compuesto B2.

Se empacó una nueva columna con 8 mg con las fracciones 36-46 de la columna última bajo condiciones idénticas a las descritas anteriormente. Se reunieron las fracciones 11 y 12 las cuales contenían al compuesto B2. Las fracciones se limpiaron de residuos de AgNO_3 usando una columna de sílica de fase normal y usando como eluyente una mezcla de AcOEt: CHCl_3 (9:1).

$\Delta^{20(29)}$ **Galfimina B:** (CHCl_3 :AcOEt 1:1 [$R_f = 0.48$]; CH_3CN : H_2O , 45:55; [$R_t = 26.2$ min]): Sólido amorfo blanco. p.f 148–150 °C [α] $^{25}_D -38$ (c 0.4, CHCl_3); FAB-MS (Modo positivo) m/z : 517 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ ($\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{O}_7$) 13 α -carbometoxi-4*R*-7 α ,18 β -trihidroxi-30-*nor*-3,4-*seco*-fridela-1,20(29)-dien-3,24-ólido.

4.3.4. Aislamiento del compuesto C (R_f 0.51; R_t 27.7 min)

Para el aislamiento del compuesto C se usó la muestra purificada a partir del corte en CLAR de la fracción A₁₁₋₁₆. Las técnicas de sobrecarga de la columna y corte del núcleo (Hostettmann, 1986) permitieron colectar a las fracciones correspondientes al tiempo de retención (t_R) de 27.7 min. La fracción se sometió a un proceso de reciclaje en CLAR (Kubo y Nakatsu, 1990) utilizando una columna C₁₈ preparativa Waters Symmetry® funcionando bajo las condiciones previamente descritas, utilizándose de siete a diez ciclos para obtener la máxima separación. Las fracciones obtenidas se concentraron al vacío.

Galfimina C: (CHCl_3 :AcOEt 1:1 [$R_f = 0.51$]; CH_3CN : H_2O 45:55 [$R_t = 27.7$ min]): Sólido amorfo blanco. p.f 119–121 °C [α] $^{25}_D -55$ (c 2.4, CHCl_3); FAB-MS (Modo positivo) m/z : 517 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ ($\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{O}_7$): 13 α -carbometoxi-4*R*-7 α ,18 β -trihidroxi-30-*nor*-19-metil-3,4-*seco*-fridela-1,19-dien-3,24-ólido.

4.3.5. Aislamiento del compuesto D (R_f 0.61; R_t 29.9 min):

La purificación del compuesto D se realizó de manera diferente a la de los demás compuestos, debido a que se observó que este compuesto se descomponía generando al compuesto E1 (6-acetoxigalfimina-B), probablemente debido a la existencia de residuos ácidos en los solventes.

La purificación del compuesto D se realizó a partir de la elución de la fracción 10 de la columna de sílice de fase normal y de la muestra purificada a partir del corte en CLAR de la fracción A₁₁₋₁₆, la cual fue separada usando placas preparativas de gel de sílice de fase normal (Si 60F₂₅₄, 0.5 mm espesor) usando como eluyente una mezcla de CHCl₃:MeOH de concentración 95:5. Posteriormente, se empacó otra columna de fase normal, la cual consistió de una columna de vidrio de 20 x 2 cm con sílice de fase normal impregnada con solución de AgNO₃. Se usó como sistema de elución una mezcla de CHCl₃:MeOH de concentración 95:5.

Se colectaron 9 fracciones las cuales se examinaron usando cromatografía de argentación en placa fina y como eluyente una mezcla de CHCl₃:MeOH de concentración 97:3. Para revelar a las placas se usó una solución de vainillina en H₂SO₄ en concentración del 2% sin usar calentamiento.

Galfimina D: (CHCl₃:AcOEt 1:1 [R_f = 0.61]; CH₃CN:H₂O 45:55 [R_t = 29.9 min]): Sólido amorfo blanco. p.f 247–248 °C [α]_D²⁵ -8 (*c* 0.3, CHCl₃); FAB-MS (Modo positivo) *m/z*: 575.3203 [M-H]⁺ (C₃₂H₄₇O₉) 12 α -acetoxi-13 α -carbometoxi-4*R*-7 α ,18 β -trihidroxi-30-*nor*-3,4-*seco*-fridela-1,20(29)-dien-3,24-ólido.

4.3.6. Aislamiento del compuesto E1 (R_f 0.53; R_t 33.4 min):

Para purificar al compuesto E1 (6-acetoxigalfimina B) se empacó una nueva columna abierta, la cual consistió de una columna de vidrio (30 x 1.5 cm) utilizando gel de sílice de fase normal. Se utilizaron 22 mg de la mezcla de compuestos E1 y E2 obtenidos del reciclaje en CLAR de la fracción A₁₁₋₁₆. Se utilizó como fase estacionaria sílice de fase normal impregnada con una solución de AgNO₃. Se utilizó como eluyente una mezcla de CHCl₃:AcOEt de composición 1:1 para las primeras 50 fracciones y una mezcla de CHCl₃:AcOEt 3:2 para las fracciones siguientes. Para el análisis de las fracciones se utilizaron placas de sílice Si60F₂₅₄ bañadas en una solución de AgNO₃ y como eluyente una mezcla de AcOEt:ciclohexano de composición 1:1. Las placas se revelaron utilizando una solución de vainillina en H₂SO₄ al 2% sin usar calentamiento.

Galfimina E: (CHCl₃:AcOEt 1:1 [R_f = 0.64]; CH₃CN:H₂O 45:55 [R_t = 33.4 min]): Sólido amorfo blanco. p.f 177–179 °C [α]_D²⁵ -22.4 (*c* 2.3, CHCl₃); FAB-MS (Modo positivo) *m/z*: 597 [M + Na]⁺, 557 [M + 1 - H₂O]⁺; HRFAB-MS *m/z*: 557.3117 ([M + 1 - H₂O]⁺, [M-H]⁺ (C₃₂H₄₅O₈)); (CH₃CN:H₂O 45:55 R_t = 33.4 min): 6 α -acetoxi-13 α -carbometoxi-4*R*-7 α ,18 β -trihidroxi-30-*nor*-3,4-*seco*-fridela-1,20-dien-3,24-ólido. También nombrado como 6-acetoxigalfimina B.

4.3.7. Aislamiento del compuesto E2 (R_f 0.53; R_t 33.4 min)

Para la purificación del compuesto E2 (diasterómero del compuesto 6 acetoxigalfimina-B, presenta doble enlace en la posición “exo” en el anillo E) se usaron las fracciones 74 a 82 de la columna abierta previa que contenían al compuesto E2 prácticamente puro. A estas fracciones les fueron removidos los residuos de AgNO₃ usando una columna de gel de sílice de fase normal montada en una pipeta Pasteur.

$\Delta^{20(29)}$ **Galfimina E**: (CHCl₃:AcOEt 1:1 [R_f = 0.59]; CH₃CN:H₂O 45:55 [R_t = 33.4 min]): Sólido amorfo blanco. p.f 176–178 °C [α]_D²⁵ -21 (c 0.7, CHCl₃); FAB-MS (Modo positivo) *m/z*: 575 [M-H]⁺ (C₃₂H₄₇O₉) 6 α -acetoxi-13 α -carbometoxi-4*R*-7 α ,18 β -trihidroxi-30-*nor*-3,4-*seco*-fridela-1,20(29)-dien-3,24-ólido.

5. Resultados

5.1. Separación de los compuestos A-E2

La resolución de los constituyentes individuales presentes en el extracto de metanol de las hojas de *Galphimia glauca* mediante la aplicación de los métodos de cromatografía en capa fina y en columna fue exitosa debido a que fue posible establecer los perfiles cromatográficos (R_f) necesarios para la identificación y el aislamiento de los constituyentes mayoritarios. Cabe destacar que la cromatografía en columna permitió obtener fracciones de menor complejidad diferenciadas en su polaridad, facilitando la separación de los diferentes constituyentes.

Las condiciones cromatográficas previamente descritas para la identificación de las galfiminas [columna analítica de fase inversa (C_{18}); sistema de elución: $CH_3CN:H_2O$, 7:3; flujo: 0.60 ml/min] obtenidas por Osuna y colaboradores (1999) no fueron adecuadas para la resolución de los componentes presentes en las hojas de *Galphimia glauca* debido a que los tiempos de retención (R_t) menores a 10 min en el sistema cromatográfico de fase inversa (C_{18}) no proporcionaron la resolución adecuada de la mezcla total. Al mismo tiempo, estas condiciones no permitieron la reinyección de las muestras utilizando el modo de reciclaje y así lograr la separación de sus constituyentes debido a la sobreposición de los picos. Por lo tanto, se procedió a investigar un sistema de elución que permitiera incrementar el tiempo de retención de cada subfracción. La figura 5.1 ilustra el cromatograma generado durante este análisis preliminar.

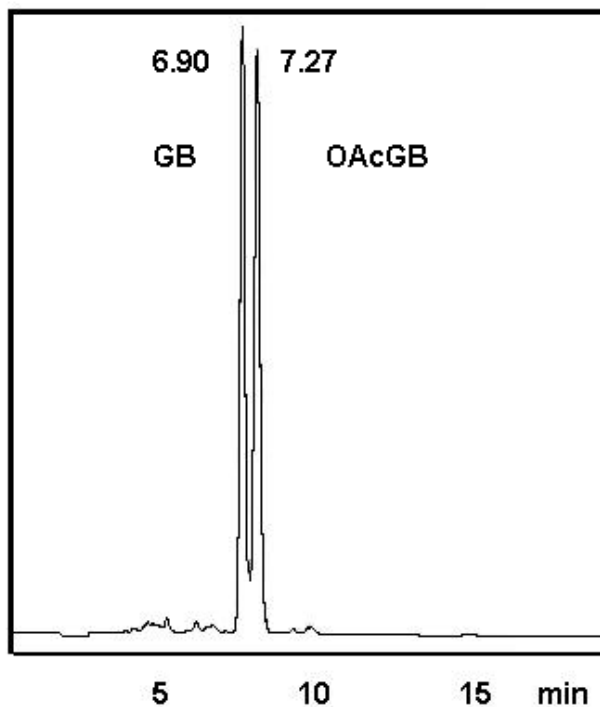


Fig.5.1. Cromatograma de la fracción A₁₁₋₁₆ fase móvil: CH₃CN:H₂O (70:30) , columna analítica de fase inversa, flujo: 0.65 ml/min. Detector: UV-DAF

Se sustituyó el sistema de elución en las condiciones cromatográficas usadas por Osuna y colaboradores (1999) por una mezcla de CH₃CN:H₂O de composición 45:55. Con el decremento en la proporción del disolvente aprótico (CH₃CN) los tiempos de retención aumentaron acompañados de una mejoría en la resolución del cromatograma. El perfil obtenido con el cambio de eluyente mostró cinco componentes que se designaron con las letras **A-E** (Fig. 5.2).

Una vez encontradas las condiciones analíticas óptimas para la resolución de los constituyentes de la fracción primaria se procedió al escalamiento de éstas y a la purificación a nivel preparativo de cada uno de los picos cromatográficos. El aislamiento y la purificación de los compuestos presentes se llevaron a cabo usando columnas preparativas de fase inversa (C₁₈) mediante la técnica de corte de núcleo para reunir cantidades suficientes de los picos **A** ($R_t = 19$ min); **B** ($R_t = 26.2$ min); **C** ($R_t = 27.7$ min); **D** ($R_t = 29.9$ min). y **E** ($R_t = 33.4$ min). Se inyectaron

cada una de estas subfracciones de manera independiente utilizando la técnica de reciclaje de muestra (Kubo y Nakatsu, 1990).

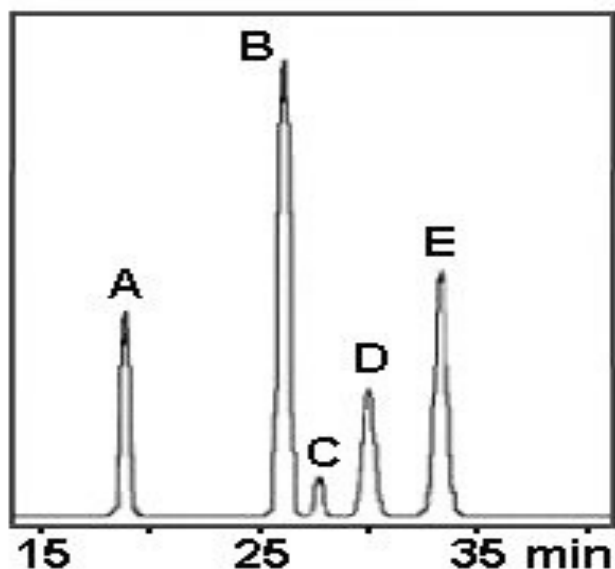


Fig. 5.2 Cromatograma de la fracción A₁₁₋₁₆: fase móvil: CH₃CN:H₂O (45:55) , columna analítica de fase inversa, flujo: 0.65 ml/min. Detector: UV-DAF.

La separación de los friedelanos presentes en el material vegetal en estudio se inició con la purificación del pico B del cromatograma principal el cual se había identificado previamente como galfimina B usando los estándares de Osuna y colaboradores (1999), además de ser el pico más abundante en la fracción primaria del extracto de metanol (Fig. 5.2). La figura 5.3 ilustra el cromatograma obtenido durante la purificación del pico B mediante la combinación de las técnicas de corte de núcleo y reciclaje de la muestra durante 45 minutos. La figura 5.4 ilustra el cromatograma generado por el compuesto B aislado de la fracción primaria A₁₁₋₁₆ después de su purificación mediante su reciclamiento a través de la misma columna cromatográfica.

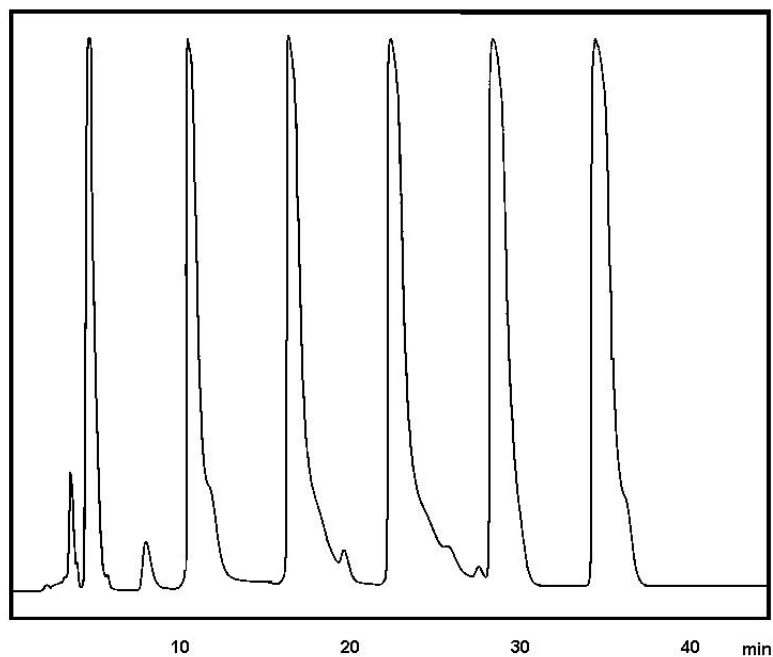


Fig. 5.3 Cromatograma del pico **B** usando la técnica de reciclaje de la muestra. Condiciones: columna preparativa de fase inversa C_{18} fase móvil: $CH_3CN:H_2O$ (6:4), flujo: 10 ml/min. Detector: UV-DAF

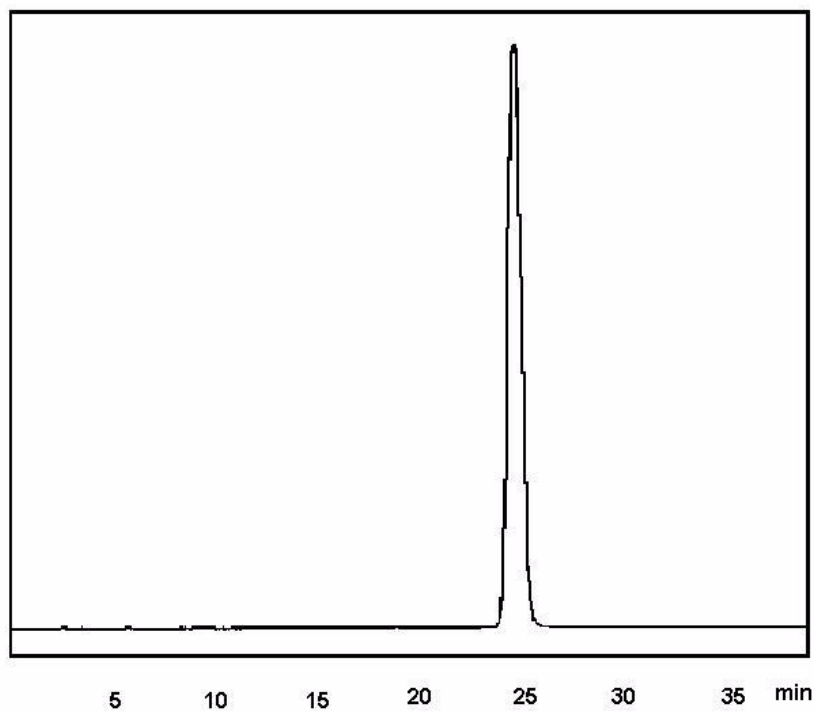


Fig. 5.4. Cromatograma del pico B aislado de las hojas de *Galphimia glauca*.

El análisis del pico B del cromatograma principal usando cromatografía en placa fina así como cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) indicaba su posible homogeneidad. Sin embargo, al analizar mediante técnicas de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) se llegó a la conclusión de que el pico B del cromatograma principal se trataba de una mezcla de isómeros los cuales únicamente se diferenciaban por la posición “endo” o “exo” del doble enlace en el anillo E del esqueleto triterpénico (Δ^{20} y $\Delta^{20(29)}$). Lo mismo ocurrió con los picos A, D y E del cromatograma, por lo cual se procedió a buscar las condiciones instrumentales necesarias para lograr la resolución de estas mezclas de diastereoisómeros. Ningún procedimiento en la cromatografía de líquidos permitió su resolución. Esta se logró gracias a la aplicación de la técnica de argentación en capa fina y columnas de gel de sílice (Segura *et al.*, 2001).

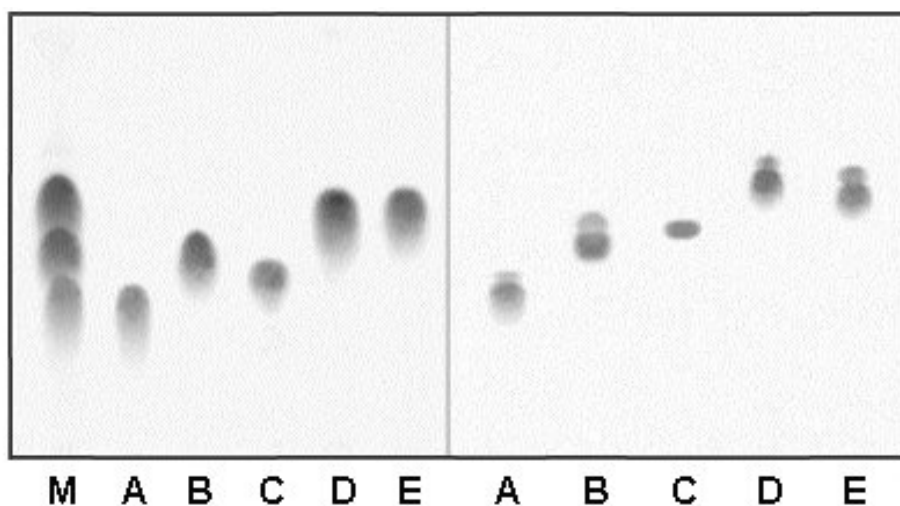


Fig. 5.5. Cromatogramas en capa fina de la mezcla total de galfiminas (M) y cada uno de los picos aislados mediante HPLC (A-E) a partir de las hojas de *G. glauca* Cav. Izquierda: cromatoplaqueta de gel de sílice: Fase normal, gel de sílice; sistema de elución: CHCl_3 :AcOEt (1:1). Derecha: placa de sílica gel: Fase normal impregnada con AgNO_3 (4% H_2O -acetona, 4:1); sistema de elución: CHCl_3 :AcOEt (1:1) $\times 2$.

En el espectro de MRN ^1H del pico B se observa a campo bajo (ca. 5.15 ppm) un multiplete ancho (Fig. 5.5 y 5.6) que corresponde al protón vinílico en posición C-21, señal asignable al isómero con la olefina endocíclica en el anillo E. Al mismo tiempo, se observa también a campo bajo del espectro (ca. 4.69 y 4.47 ppm) dos señales múltiples en forma de cuartetos con constantes de acoplamiento sumamente pequeñas ($J_{\text{HH}} \geq 2$ Hz) indicando la presencia de un metileno exocíclico vinílico. Estas evidencias experimentales permitieron concluir que el pico cromatográfico B (HPLC, $R_t = 26.2$ min) se trata de la mezcla de ambos isómeros Δ^{20} y $\Delta^{20(29)}$.

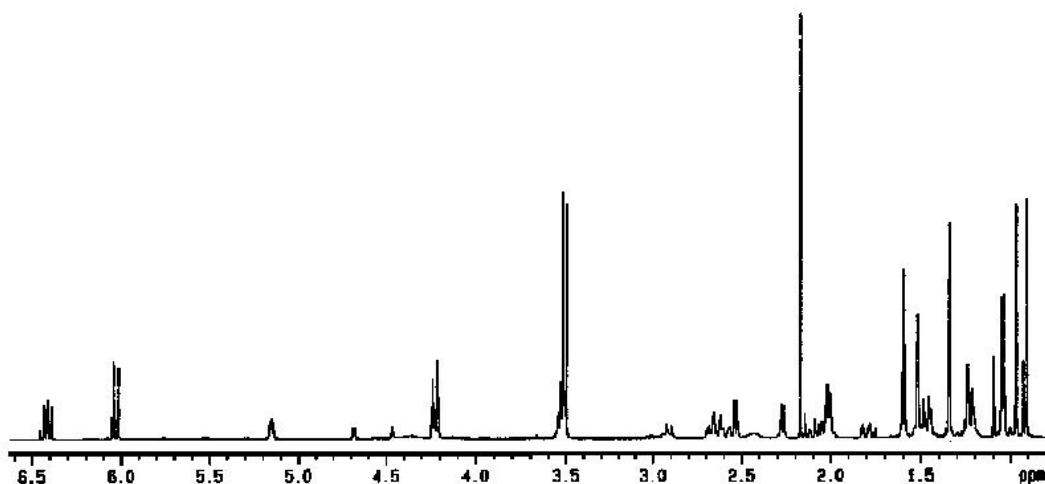


Fig. 5.6. Espectro de RNM ^1H del pico B. 500 MHz, CDCl_3 .

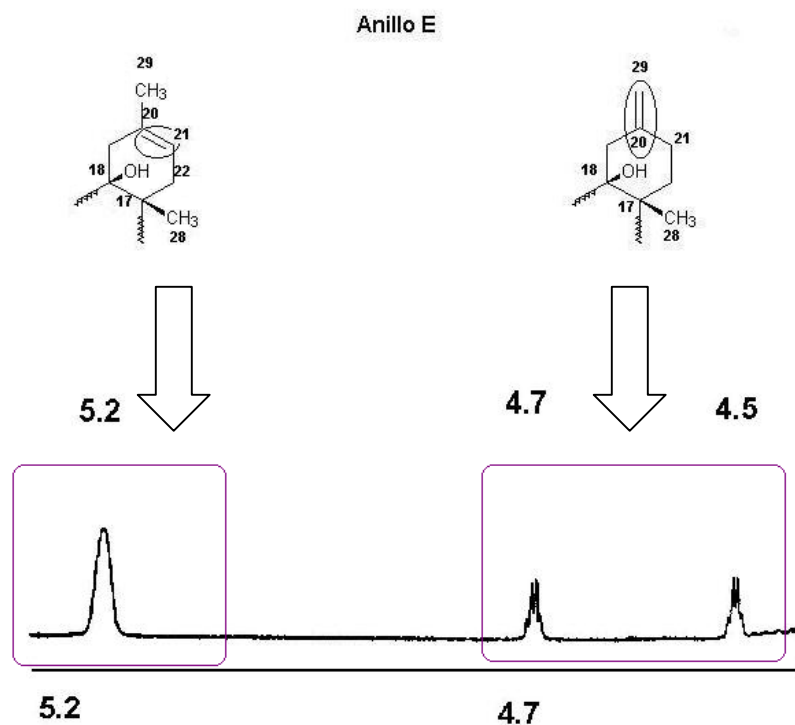


Fig. 5.7. Sección de campo bajo del espectro de RNM ¹H donde se señala la coexistencia de los isómeros “endo” (galfimina B Δ^{20}) y “exo” ($\Delta^{20(29)}$) presentes en el pico B del cromatograma principal.

El aislamiento de los componentes del pico B se llevó a cabo usando técnicas de argentación en columnas de gel de sílice y como prueba se usaron placas de gel de sílice tratadas con una solución de AgNO_3 , las cuales se migraron por dos veces usando el mismo sistema cromatográfico. El espectro de protones registrado para el compuesto B1 aislado por esta técnica (galfimina B) no mostró las dos señales múltiples centradas en 4.45 y 4.7 ppm que indicaban la presencia del diasterómero con la doble ligadura exocíclica. A su vez, el espectro de protones del compuesto B2 no mostraba el multiplete ancho en 5.3 ppm, asignable al diastereoisómero con la doble ligadura endocíclica.

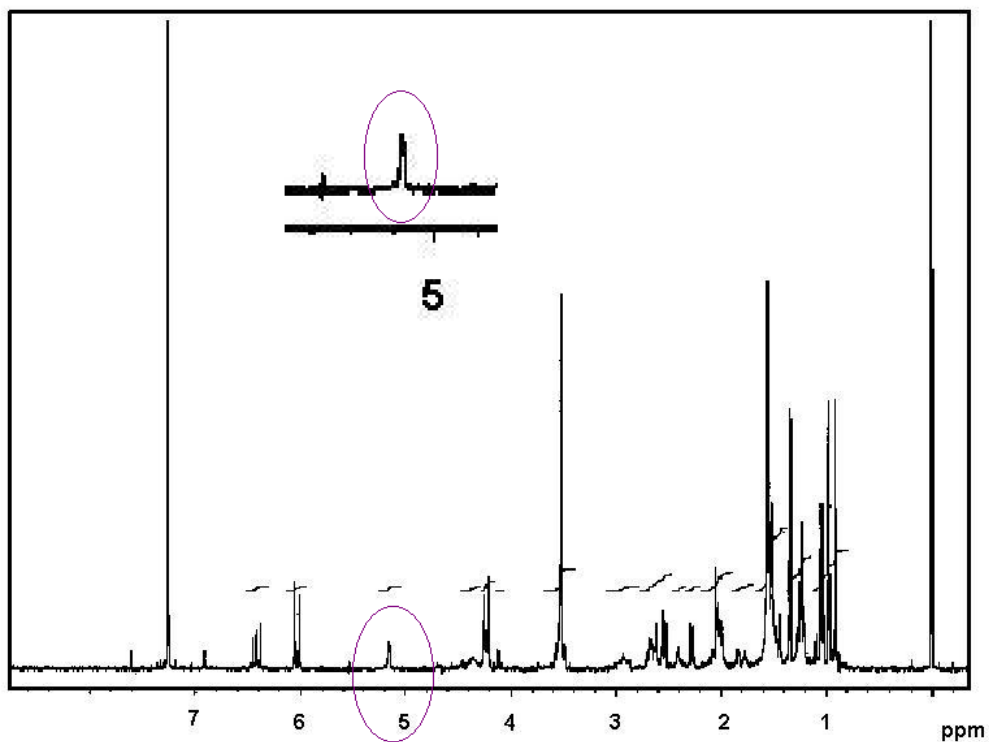


Fig. 5.8. Espectro protónico (^1H) del compuesto B1 (galfimina B, Δ^{20}) en el que se muestra a campo bajo (5.3 ppm) la señal múltiple que identifica al grupo metilo en C-29 del esqueleto de friedelano.

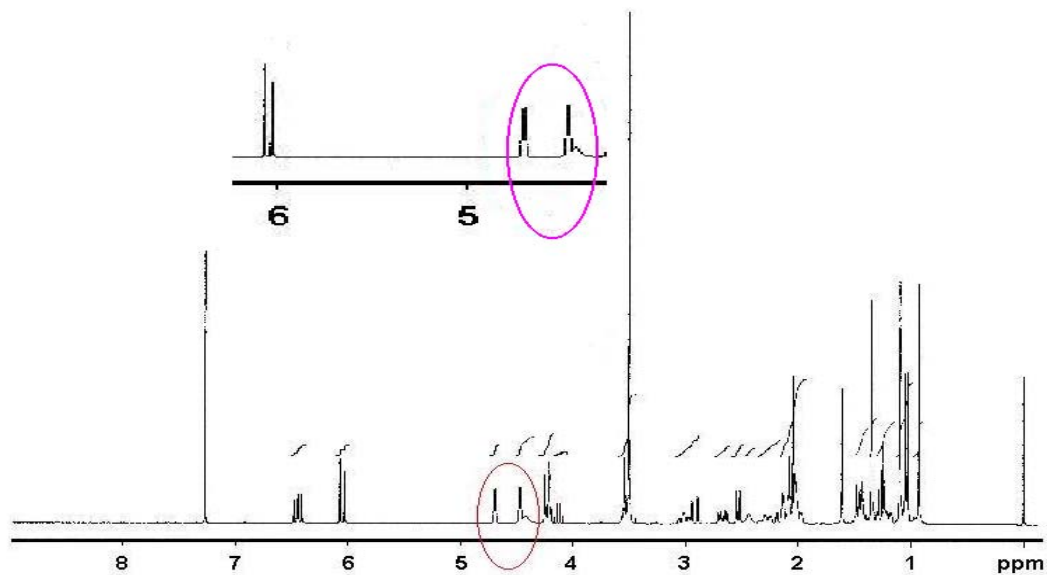


Fig.5.9. Espectro de protones (^1H) del compuesto B2 ($\Delta^{20(29)}$) galfimina B, en donde se destacan las dos señales que identifican a los protones del metileno exocíclico en C-29.

La separación de los componentes de la subfracciones A ($R_t = 19.0$ min) C ($R_t = 27.7$ min) y E ($R_t = 33.4$ min) se llevó a cabo usando las condiciones previamente descritas para la purificación de la galfimina B. Mediante la inyección de la muestra en columnas preparativas de fase inversa y la aplicación conjunta de las técnicas de corte de núcleo y reciclaje de la muestra, se logró la purificación de los picos A ($R_t = 19.0$ min) y E ($R_t = 33.4$ min).

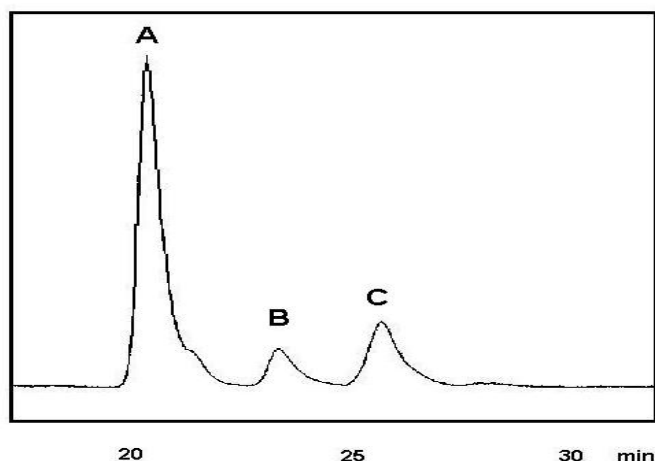


Fig.5.10. Cromatograma de las fracciones 32-41 de la columna de gel de sílice de fase normal a partir de la cual se obtuvo al compuesto galfimina A. Condiciones: columna analítica de fase inversa C_{18} (tamaño de poro: $5 \mu\text{m}$; dimensiones: 4.6×250 mm); fase móvil, $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (45:55); flujo, 0.65 ml/min; detector, UV (232 nm).

El tiempo de retención corto ($R_t = 22$ min) para el pico A (Fig. 5.10) en el sistema cromatográfico de fase inversa permitió su aislamiento usando fracciones enriquecidas de columnas abiertas las cuales resultaron adecuadas para resolver a los componentes de la fracción primaria A_{11-16} . Debido a los rendimientos bajos para este pico, únicamente se logró el aislamiento del isómero de la serie exocíclica, la $\Delta^{20(29)}$ galfimina A, mediante el empleo de las técnicas de argentación en columnas abiertas.

El pico C ($R_t = 27.7$ min) no se presentó como un par isomérico, según lo demostró la cromatografía en capa fina de argentación (Fig. 5.1). Así, su aislamiento se llevó a cabo usando métodos convencionales de cromatografía de

líquidos a nivel preparativo. En este proceso de separación fueron necesarios la aplicación de siete a diez procesos de reciclaje de la muestra (Fig. 5.12). De este pico se obtuvo el compuesto denominado con el nombre de galfimina C.

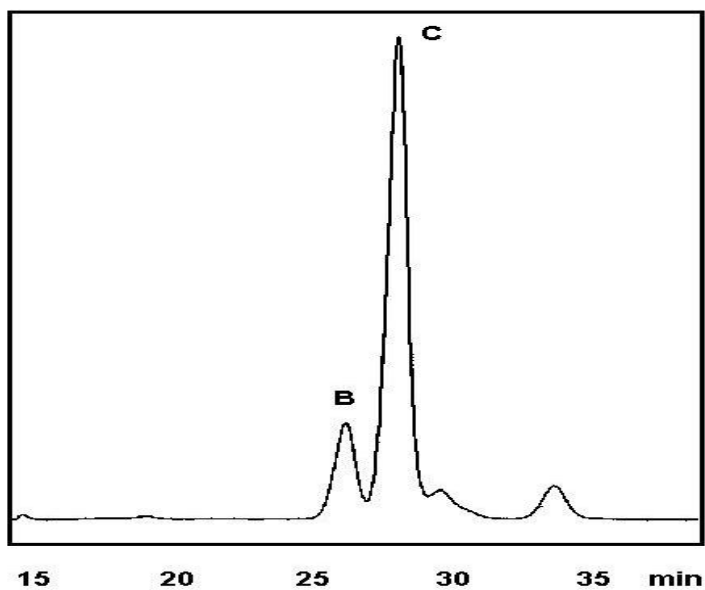


Fig.5.11. Análisis mediante CLAR de la fracción obtenida del corte de núcleo del pico C de la fracción primaria (A₁₁₋₁₆) de *Galphimia glauca*. Las condiciones instrumentales fueron idénticas a las de la Fig. 5.3.

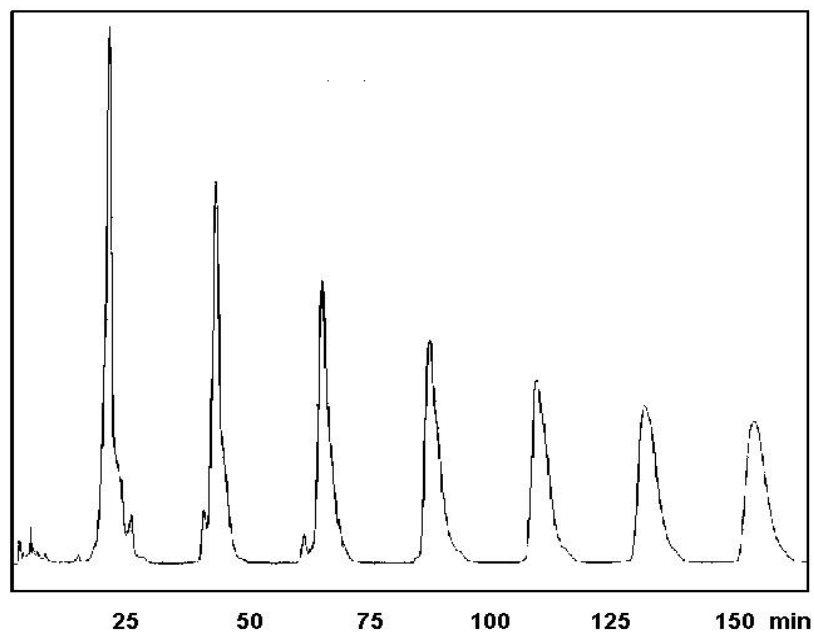


Fig.5.12. Cromatograma del reciclaje del compuesto galfimina C. Condiciones instrumentales: columna semipreparativa de fase inversa, flujo: 3 ml/min. Detector: UV (232 nm). Volumen de inyección: 100 µl.

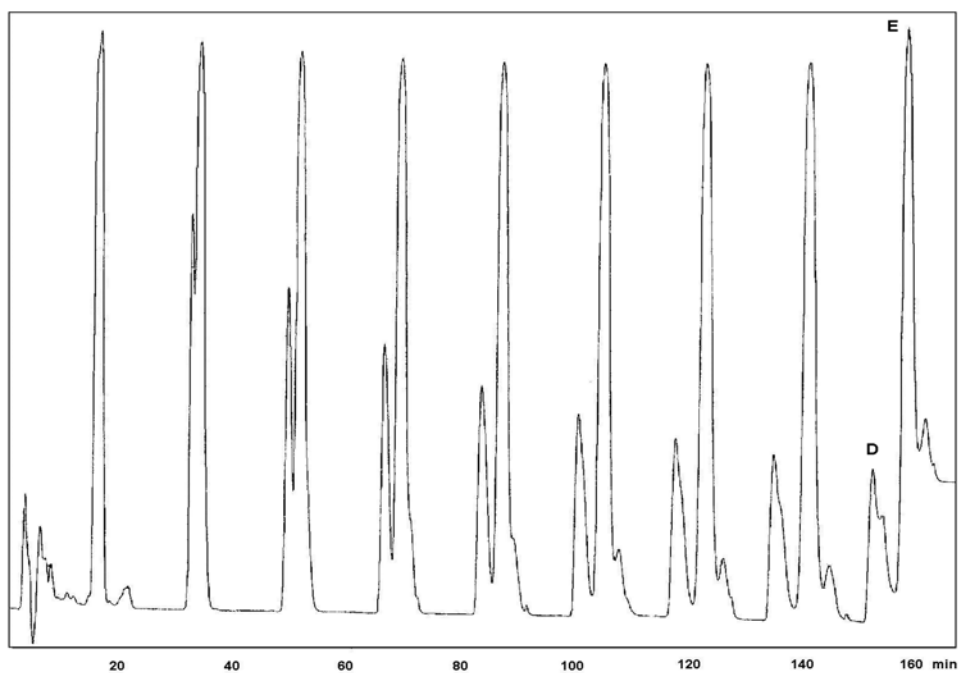


Fig.5.13. Cromatograma del pico E usando la técnica de reciclaje de la muestra. Condiciones instrumentales: columna preparativa de fase inversa C₁₈ fase móvil: CH₃CN:H₂O (6:4), flujo: 10 ml/min. Detector: UV (232 nm)

La purificación del pico E se llevó a cabo mediante corte en CLAR de la fracción primaria A₁₁₋₁₆ y una posterior reinyección usando de nueve a quince ciclos a través de la columna de fase inversa C-18 (Fig. 5.13). La separación del par isomérico se llevó a cabo usando columnas de gel de sílice tratadas con solución de AgNO₃.

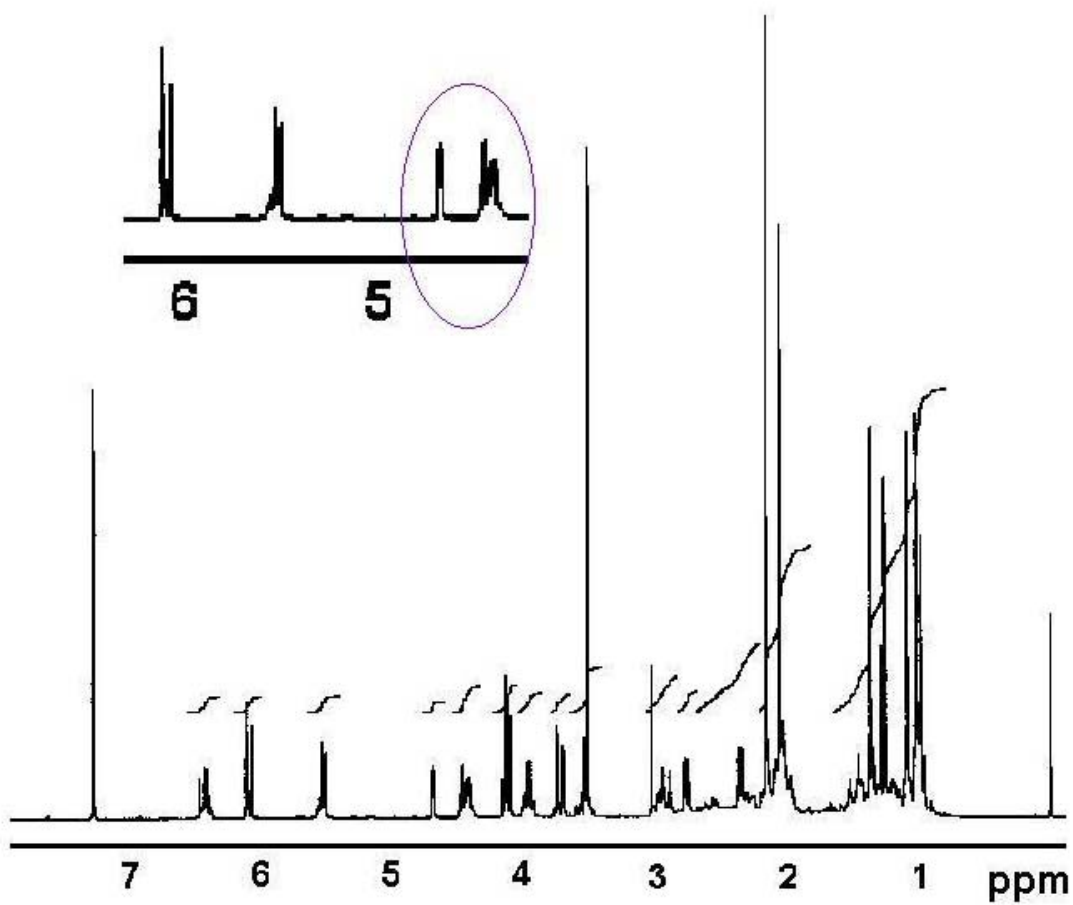


Fig.5.14. Espectro de protones (^1H) del compuesto ($\Delta^{20(29)}$) galfimina E en donde se muestran las señales que identifican a los protones del metileno exocíclico en C-29.

6.- Discusión

6.1. Δ^{20} Galfimina B:

La presente sección se iniciará con la descripción de las características espectroscópicas generales en la RMN para el núcleo de nor-secofriedelano, mismas que comparten todos los compuestos aislados en el presente estudio y que corresponden a la serie isomérica endocíclica:

Se observaron tres señales simples (3H, $\times 3$) para grupos metilo cuaternarios (δ 0.93, 0.97 y 1.36); un metilo vinílico (3H) centrado en δ 1.53 que indicaba una doble ligadura trisustituida; un metilo doblete (3H) centrado en δ 1.08 para la señal C-23. También, se observó una señal simple en δ 3.5 cuyo desplazamiento químico indicó la presencia de un grupo metóxilo de un éster (Fig. 6.1). Un sistema AB para los protones vinílicos conjugados a un grupo carbonilo apareció con sus desplazamientos químicos característicos en δ 6.05 (H-1, d) y 6.41 (H-2, dd). Esta última señal presentó un acoplamiento adicional con un protón alifático centrado en δ 2.54 (d) asignable al protón H-10 del esqueleto de friedelano. Los protones del grupo metileno geminal al oxígeno etéreo de la lactona macrocíclica del anillo A se observaron como dos dobletes de un sistema AB con una constante de acoplamiento geminal centrados en δ 3.53 y 4.22. La señal vinílica diagnóstica para el isómero "endocíclico" se observó como un multiplete centrado en δ 5.15 (Fig. 6.2). Por último, este friedelano presentó una posición de oxidación del núcleo triterpénico básico y que corresponde al carbono C-7. Esta asignación se realizó al observar una señal paramagnéticamente desplazada y centrada en δ 4.22.

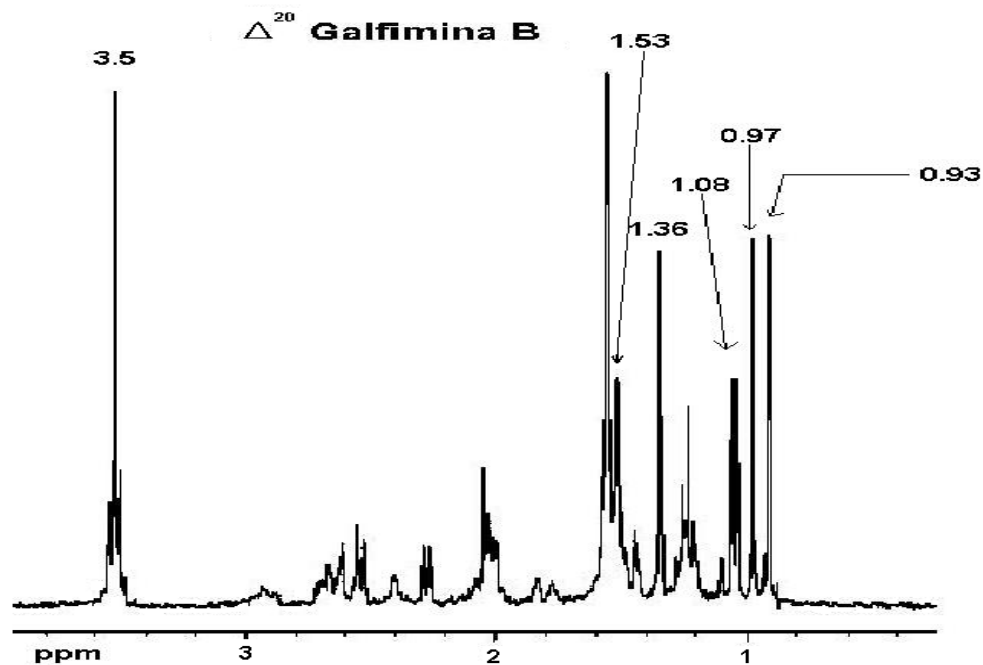


Fig. 6.1. Ampliación del espectro de RMN ^1H del compuesto Δ^{20} galimina B a campo alto.

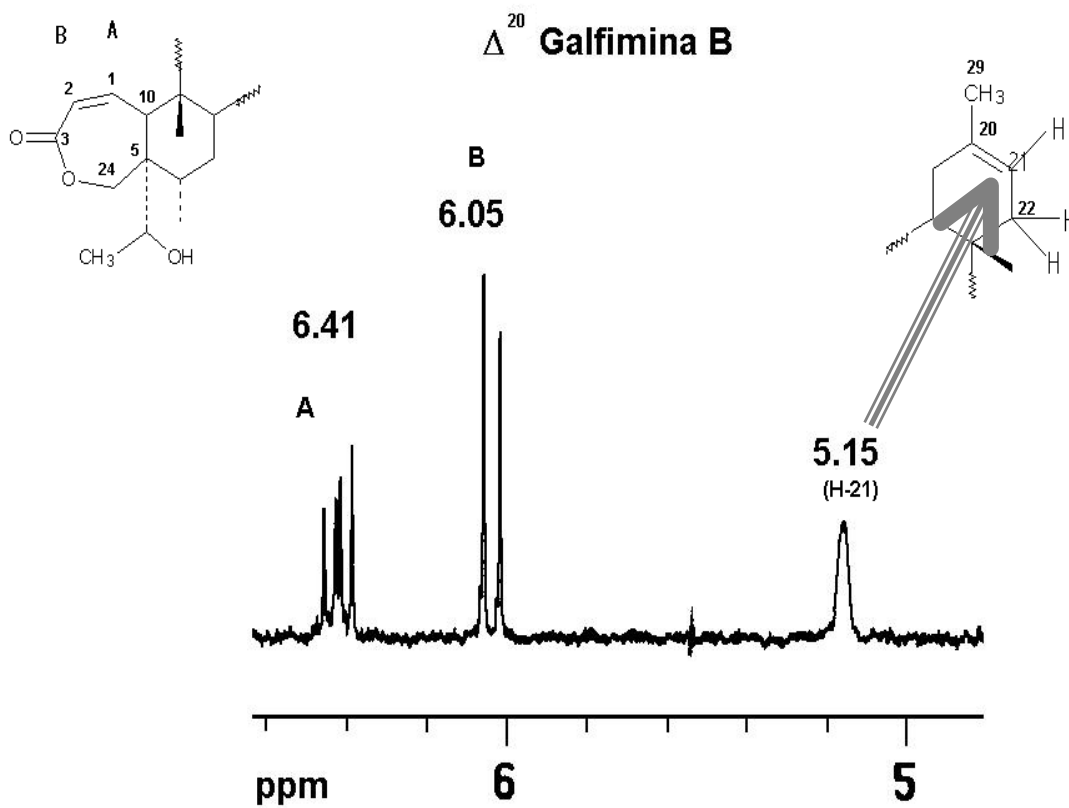


Fig. 6.2. Ampliación del espectro de RMN ^1H del compuesto Δ^{20} galimina B a campo bajo.

6.2. $\Delta^{20(29)}$ Galfimina B:

La única diferencia espectroscópica en la RMN para la serie isomérica exocíclica fue la presencia de un par de señales vinílicas (δ 4.5 y 4.7) correspondientes al grupo metilénico de la doble ligadura entre C-20 y C-29 (Fig. 6. 3). Evidentemente, estas señales sustituyen a las correspondientes al grupo metilo vinílico (H-29) y a la señal múltiple olefínica (H-21) que caracterizan a la serie endocíclica.

Los espectros de ^{13}C desacoplados y las técnicas de DEPT proveen información valiosa debido a que es posible identificar el número de carbonos presentes en las moléculas y sus grupos funcionales asociados en función del desplazamiento químico observado para cada una de las señales de ^{13}C (Fig. 6.4).

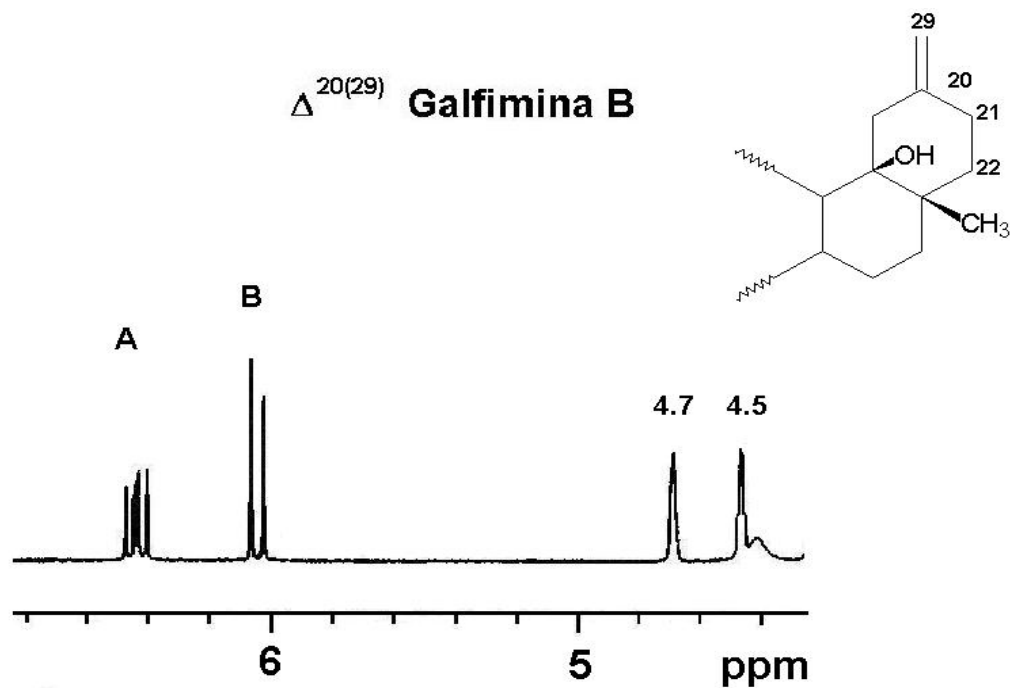


Fig. 6.3. Ampliación del espectro de RMN ^1H del compuesto $\Delta^{20(29)}$ galfimina B a campo bajo.

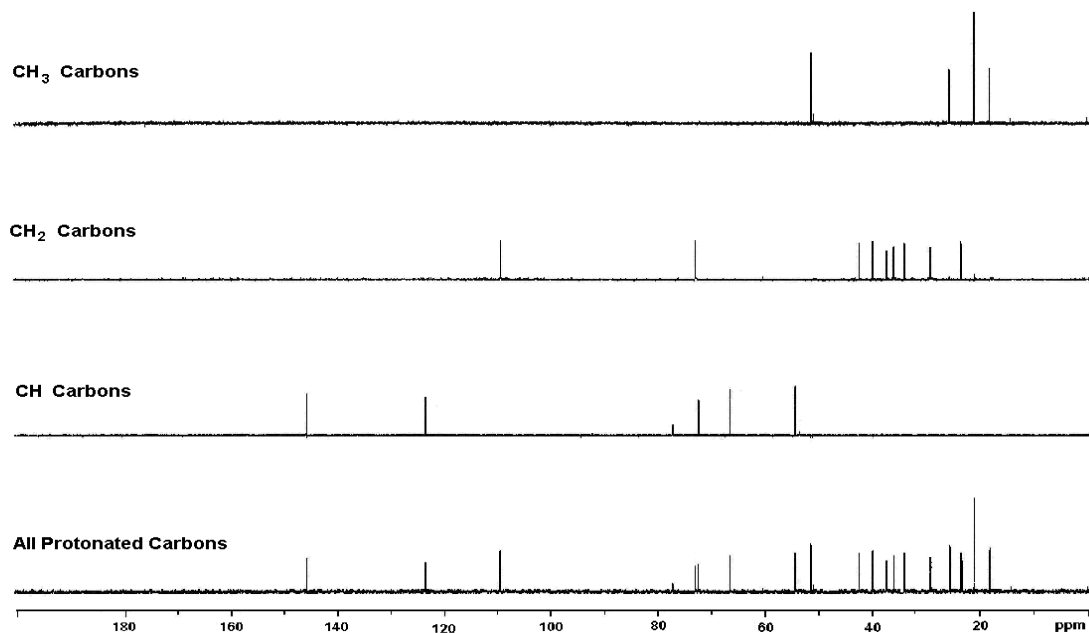


Fig. 6.4. Experimento DEPT de RMN ^{13}C (100 MHz) del compuesto $\Delta^{20(29)}$ galfimina B.

6.3. Galfimina A:

La espectrometría de masa mediante bombardeo rápido de átomos (FAB-positivos) permitió calcular una fórmula molecular de $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{O}_8$ para este pico denominado galfimina A, también constituido por la mezcla isomérica endocíclica y exocíclica. Así, se evidenciaba un grado de oxidación mayor que el observado para la galfimina B, permitiendo ubicar al grupo hidroxilo adicional en la posición C-6. El espectro de RMN ^1H mostró una señal multiplete en δ 4.4 para esta sustitución. El resto de las señales observadas corresponde a las anteriormente descritas para cada una de las series isoméricas. Cabe destacar que la presencia de un grupo hidroxilo con orientación alfa en la posición C-6 provoca un colapso en las señales del sistema AB para el metileno C-24, de tal suerte que estos protones resuenan con el mismo desplazamiento químico y, por lo tanto, se superponen generando un singulete ancho.

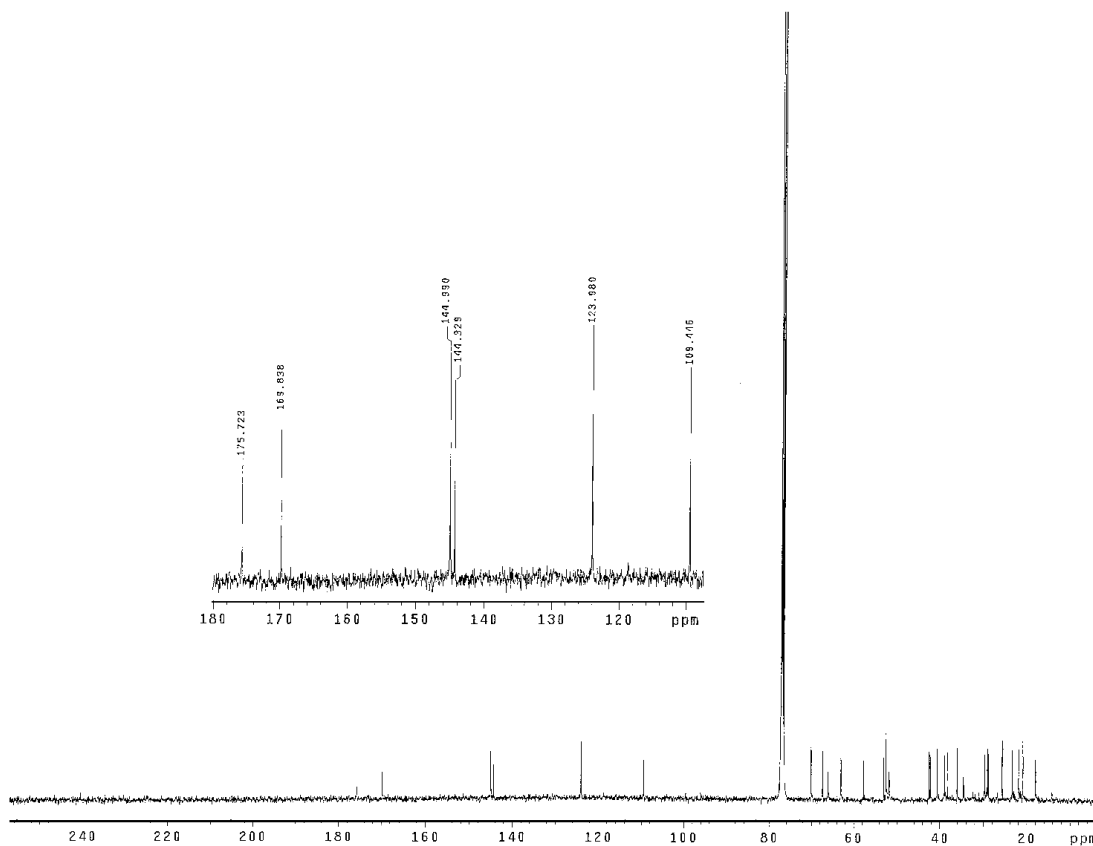


Fig. 6.5. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz) del compuesto $\Delta^{20(29)}$ galfimina A.

6.4. Galfimina C:

El cálculo del peso molecular para este pico permitió establecer la misma fórmula molecular que el determinado para la galfimina B, $\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{O}_7$. Por lo tanto, el análisis de la RMN ^1H estableció que se trataba de un diastereoisómero en el anillo E a través de las siguientes señales: la señal vinílica resuena como un singlete ancho en δ 5.3 y su asignación como el protón H-19 resulta de las interacciones alílicas detectadas en el espectro COSY con el grupo metilo en C-20 (Me-29) y el metileno en C-21, el cual interaccionaba a su vez con un segundo grupo metilénico asignado a la posición C-22. Estas correlaciones indicaron el establecimiento de la doble ligadura en la posición Δ^{19} permitiendo la detección de

una señal para el grupo metilo vinílico en δ 1.7. El ancho medio de esta señal ($W_{1/2} = 5$ Hz) proporcionó una evidencia adicional para esta asignación debido a que un valor mayor se registró para los protones vinílicos pertenecientes a la serie $\Delta^{20(21)}$ ($W_{1/2} = 9$ Hz).

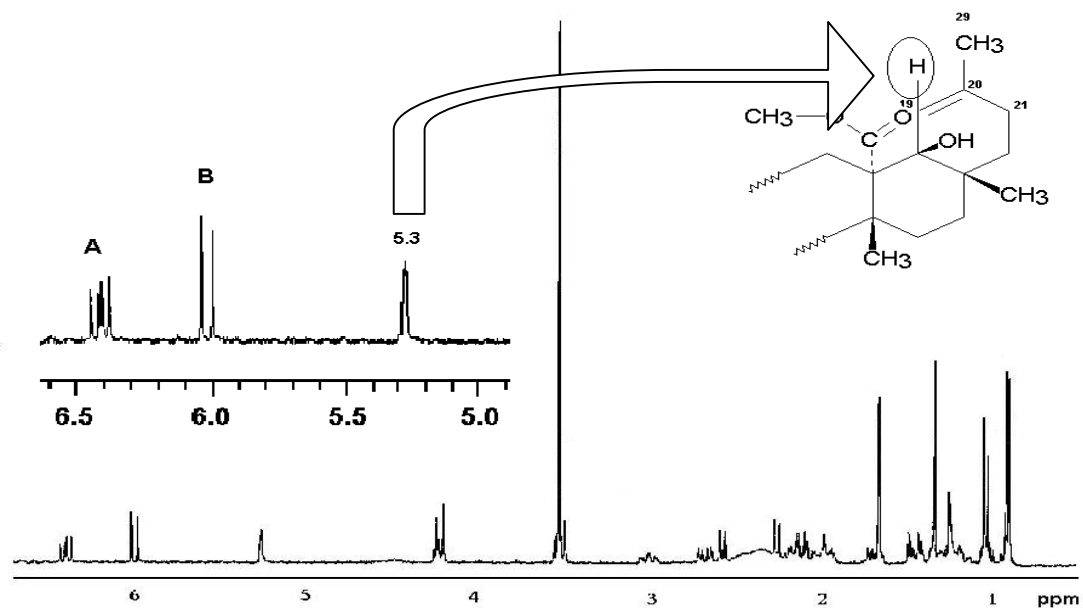


Fig. 6.6. Espectro de RMN ^1H del isómero Δ^{19} de la galfimina B (la galfimina C) y ampliación de la región a campo bajo.

6.5. Galfimina D:

Este pico que de nueva cuenta se resolvió en una mezcla isomérica exo y endo, presentó la fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{O}_9$. La diferencia de 42 unidades de masa atómica en relación con el pico A indicó que este pico debería corresponder a cualquiera de las dos posibles formas monoacetiladas de la galfimina de mayor polaridad. El desplazamiento a campo bajo de la señal H-7 (δ 5.5) permitió la ubicación del grupo acetato en esta posición del núcleo básico triterpénico de las galfiminas. El resto de las características espectroscópicas en la RMN para los dos isómeros fue similar al previamente descrito para ambas series (Fig. 6.6).

Galfimina D

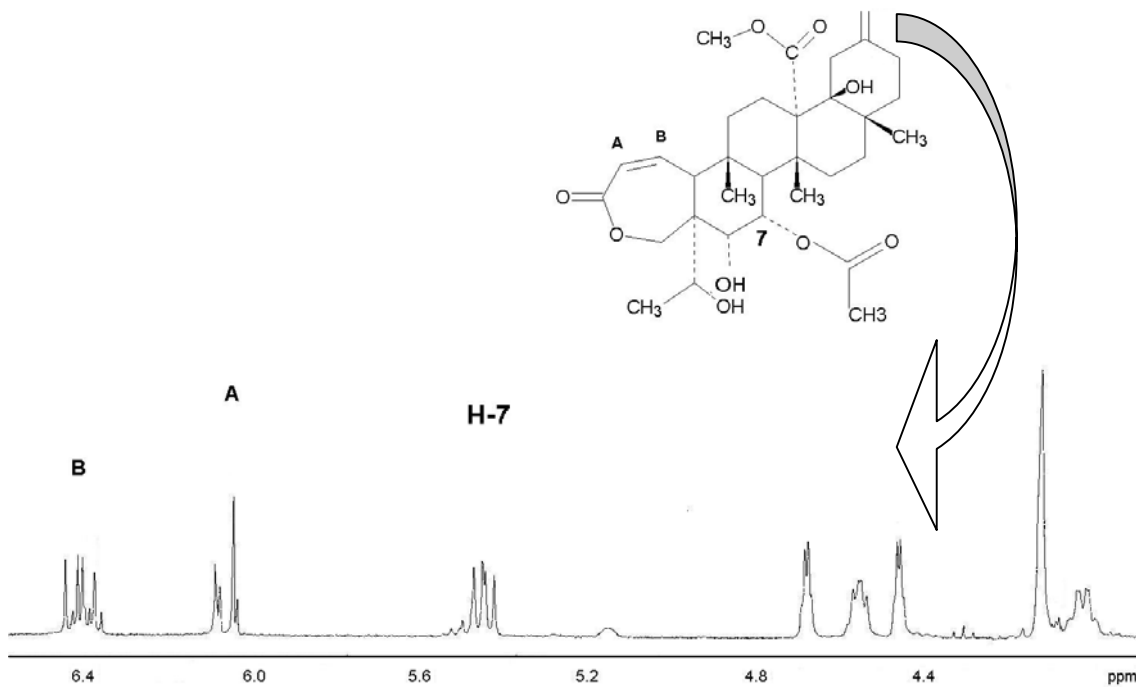


Fig. 6.7. Espectro de RMN ^1H del compuesto $\Delta^{20(29)}$ galfimina D, ampliación de la región a campo bajo.

El espectro de RMN ^{13}C de la galfimina D nos muestra la presencia de 32 señales, las cuales corresponden al número de carbonos que se encuentran presentes en la molécula (Fig. 6.7).

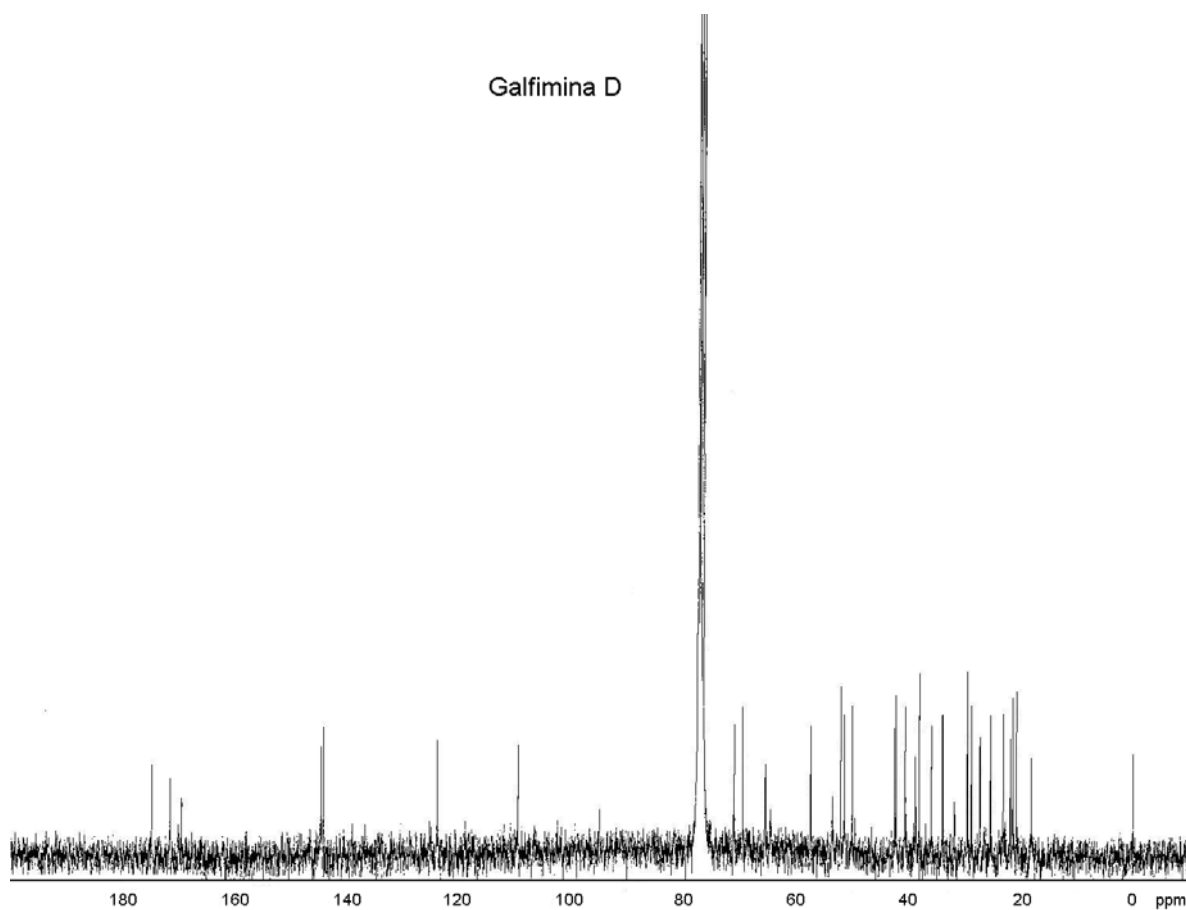


Fig. 6.8. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) del compuesto Galfimina D.

Galfimina E:

La mezcla isomérica para este pico correspondía al segundo derivado monoacetilado de la galfimina A con fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{O}_9$. En esta ocasión, la señal que sufrió el desplazamiento paramagnético correspondía a la señal asignada al protón H-6 (δ 5.5). El metilo H-24 de la lactona, al igual que sucedió con esta señal en la mezcla de galfiminas A, se observó como una señal simple que integró para dos protones (Fig.6.8).

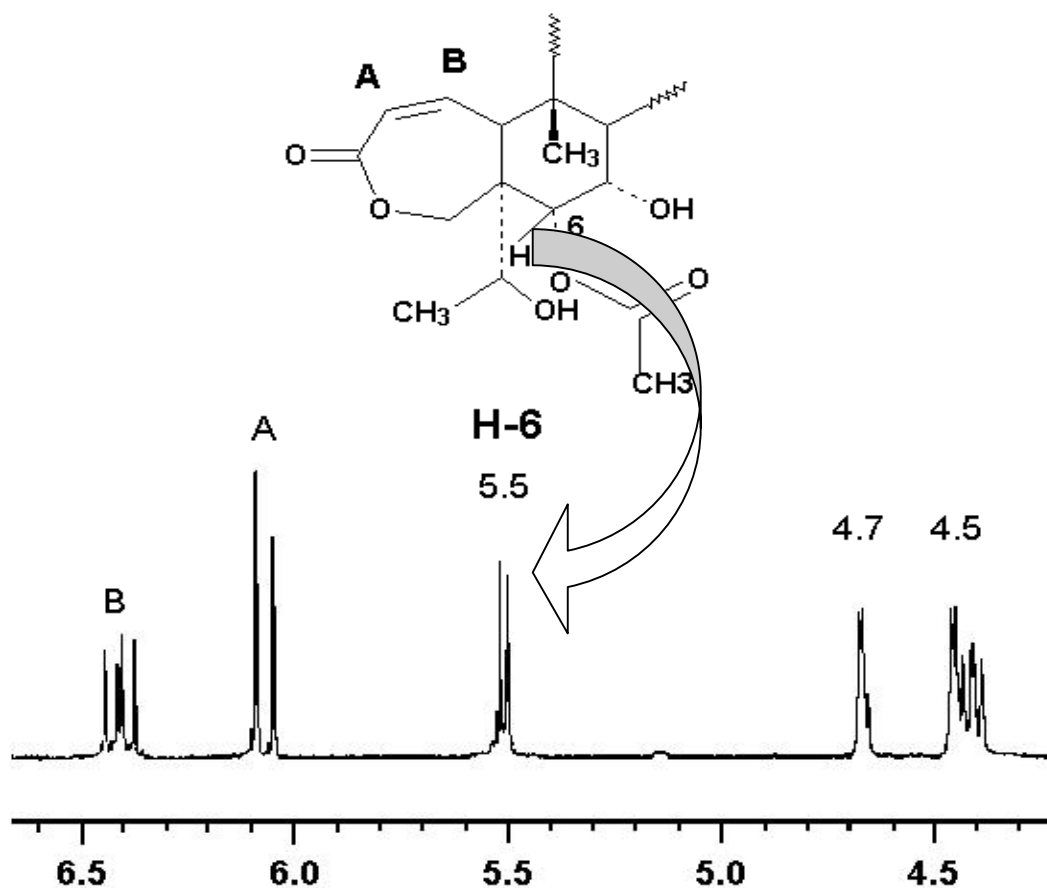


Fig. 6.9. Ampliación del espectro de RMN ^1H del compuesto $\Delta^{20(29)}$ galfimina E a campo bajo.

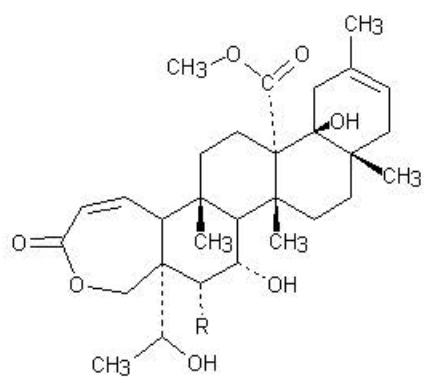
A continuación se presentan los datos de RMN completos tanto de ^{13}C (Tabla 1.1) como de ^1H (Tabla 1.2) de todos los compuestos aislados a partir de los extractos metanólicos de las hojas de *Galphimia glauca* Cav. También, se muestran las estructuras elucidadas usando espectroscopia de RMN (Fig. 6.9).

H	GA	Δ^{20} GB	$\Delta^{20(29)}$ GB	GC	$\Delta^{20(29)}$ GD	Δ^{20} GE	$\Delta^{20(29)}$ GE
1	6.40 (<i>dd</i> ; 12.2, 9.0)	6.41 (<i>dd</i> ; 12.0, 8.5)	6.43 (<i>dd</i> ; 12.1, 8.6)	6.42 (<i>dd</i> ; 11.7, 8.3)	6.41 (<i>dd</i> ; 12.2, 8.8)	6.40 (<i>dd</i> ; 12.0, 8.7)	6.41 (<i>dd</i> ; 12.2, 8.8)
2	6.07 (<i>d</i> ; 12.2)	6.05 (<i>d</i> ; 12.0)	6.04 (<i>d</i> ; 12.4)	6.02 (<i>d</i> ; 12.2)	6.07 (<i>d</i> ; 12.2)	6.07 (<i>d</i> ; 12.0)	6.07 (<i>d</i> ; 12.2)
4	3.94 (<i>q</i> ; 6.4)	3.52	4.12 (<i>q</i> ; 7.2)	3.53	4.02	3.95 (<i>q</i> ; 6.6)	3.95 (<i>q</i> ; 6.4)
6	4.38/ β	1.47/ β 2.67/ α	1.46/ β 2.67 (<i>dd</i> ; 15.9, 6.6)/ α	1.47/ β 2.68 (<i>dd</i> ; 16.1, 6.4)/ α	5.46/ β	5.53 (<i>d</i> ; 5.7)/ β	5.51 (<i>d</i> ; 5.9)/ β
7	4.17/ β	4.22/ β	4.20/ β	4.22/ β	4.56/ β	4.42 (<i>dd</i> ; 7.5, 6.0)/ β	4.42 (<i>dd</i> ; 7.8, 5.9)/ β
8	2.36 (<i>d</i> ; 7.9)/ α	2.27 (<i>d</i> ; 7.9)/ α	2.10/ α	2.25 (<i>d</i> ; 7.8)/ α	2.59/ α	2.53 (<i>d</i> ; 7.8)/ α	2.33 (<i>d</i> ; 7.8)/ α
10	2.60 (<i>d</i> ; 8.9)/ α	2.54 (<i>d</i> ; 9.0)/ α	2.54 (<i>d</i> ; 8.7)/ α	2.58 (<i>d</i> ; 8.8)/ α	2.76 (<i>d</i> ; 8.8)/ α	2.75 (<i>d</i> ; 8.7)/ α	2.75 (<i>d</i> ; 8.8)/ α
11	1.39 1.45	1.22 1.47	1.24 1.44	1.18 1.42	1.46 (2H)	1.23 1.46	1.43 (2H)
12	2.03 (2H)	2.03 (2H)	2.02 (2H)	1.97/ β 2.10 (<i>dd</i> ; 13.7, 4.4)/ α	2.04 (2H)	2.04 (2H)	2.02 (2H)
15	1.30/ β 2.96 (<i>td</i> ; 14.2; 4.7)/ α	1.22/ β 2.92 (<i>dd</i> ; 13.1; 3.3)/ α	1.20 (<i>ddd</i> ; 12.0, 4.8, 2.4)/ β 3.01 (<i>td</i> ; 13.2, 4.5)/ α	1.21/ β 2.98 (<i>td</i> ; 13.2, 4.4)/ α	0.81 (<i>ddd</i> ; 13.2, 5.4, 2.9)/ β 2.82 (<i>td</i> ; 13.2, 4.9)/ α	1.18/ β 2.89 (<i>td</i> ; 13.5, 4.5)/ α	1.14/ β 2.94 (<i>td</i> ; 13.2; 3.9)/ α
16	1.27/ α 2.00/ β	1.22/ α 2.00/ β	1.28/ α 2.01/ β	1.36/ α 2.05/ β	1.20/ α 1.99/ β	1.18 1.97	1.27/ α 2.00/ β
19	2.12 2.92 (<i>d</i> ; 15.0)	1.80 2.65	2.05 (<i>d</i> ; 15.0) 2.92 (<i>d</i> ; 15.0)	-	2.12 2.91 (<i>d</i> ; 15.6)	1.82 (<i>d</i> ; 15.0) 2.63 (<i>d</i> ; 15.0)	2.09 2.89 (<i>d</i> ; 14.7)
20	-	-	-	5.29 (br. s)	-	-	-
21	1.98/ α 2.30/ β	5.15	1.98/ α 2.27/ β	1.72 1.98	1.99/ α 2.28/ β	5.15 (br. s)	1.97/ α 2.25/ β
22	1.05/ β 2.16/ α	1.52/ β 2.59/ α	1.05/ β 2.14/ α	1.02/ β 2.16/ α	1.03/ β 2.12/ α	1.51 2.59	1.03/ β 2.16/ α
23	1.00 (<i>d</i> ; 6.3)	1.08 (<i>d</i> ; 6.0)	1.04 (<i>d</i> ; 6.3)	1.09 (<i>d</i> ; 6.4)	1.03 (<i>d</i> ; 6.4)	1.00 (<i>d</i> ; 6.3)	0.98 (<i>d</i> ; 6.3)
24	4.04 (2H)	3.52 4.22 (<i>d</i> ; 12.0)	3.52 4.23 (<i>d</i> ; 12.0)	3.51 4.22 (<i>d</i> ; 11.7)	4.12 (2H)	3.72 (<i>d</i> ; 12.2) 4.10 (<i>d</i> ; 12.2)	3.71 (<i>d</i> ; 12.2) 4.11 (<i>d</i> ; 12.2)
25	0.95 (<i>s</i>)	0.93 (<i>s</i>)	0.95 (<i>s</i>)	0.94 (<i>s</i>)	0.98 (<i>s</i>)	1.00 (<i>s</i>)	1.01 (<i>s</i>)
26	1.35 (<i>s</i>)	1.36 (<i>s</i>)	1.35 (<i>s</i>)	1.36 (<i>s</i>)	1.36 (<i>s</i>)	1.36 (<i>s</i>)	1.35 (<i>s</i>)
28	1.10 (<i>s</i>)	0.97 (<i>s</i>)	1.10 (<i>s</i>)	0.93 (<i>s</i>)	1.08 (<i>s</i>)	0.96 (<i>s</i>)	1.07 (<i>s</i>)
29	4.47 (<i>q</i> ; 2.2) 4.71 (<i>q</i> ; 2.2)	1.53 (<i>s</i>)	4.46 (<i>q</i> ; 2.4) 4.68 (<i>q</i> ; 2.4)	1.68 (<i>s</i>)	4.46 (<i>q</i> ; 2.4) 4.69 (<i>q</i> ; 2.4)	1.53 (<i>s</i>)	4.46 (<i>q</i> ; 2.4) 4.67 (<i>q</i> ; 2.4)
CH ₃ OC- CH ₃ CO-	3.54 (<i>s</i>) -	3.51 (<i>s</i>) -	3.50 (<i>s</i>) -	3.53 (<i>s</i>) -	3.52 (<i>s</i>) 2.16 (<i>s</i>)	3.52 (<i>s</i>) 2.15 (<i>s</i>)	3.49 (<i>s</i>) 2.13 (<i>s</i>)

Tabla 6.1. Datos de ¹H RMN para los compuestos aislados de las hojas de *Galphimia glauca*, en CDCl₃ (multiplicidades; *J* = Hz).

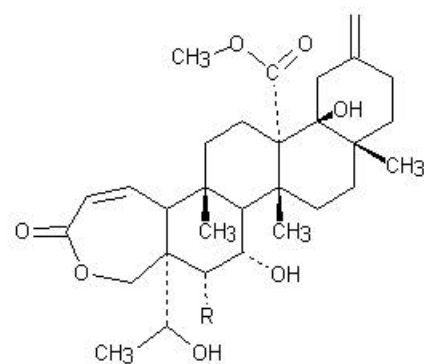
C	DEPT	$\Delta^{20(29)}\text{GA}$	$\Delta^{20}\text{GB}$	$\Delta^{20(29)}\text{GB}$	$\Delta^{19}\text{GC}$	$\Delta^{20(29)}\text{GD}$	$\Delta^{20}\text{GE}$	$\Delta^{20(29)}\text{GE}$
1	CH	144.85	145.74	145.82	145.90	144.38	144.7	144.41
2	CH	123.82	123.53	123.57	123.47	123.83	123.9	123.98
3	C	169.66	169.87	169.86	169.94	169.63	169.3	169.27
4	CH	62.88	72.45	72.36	72.45	64.40	63.8	63.78
5	C	52.45	48.34	48.34	48.34	52.09	51.5	51.52
6	CH ₂	65.93	37.34	37.35	37.29	70.95	69.9	69.85
7	CH	67.33	66.55	66.49	66.57	65.43	65.3	65.40
8	CH	52.83	53.81	54.37	54.24	50.06	52.8	53.16
9	C	38.80	40.52	40.26	40.65	38.83	39.3	38.99
10	CH	52.45	53.34	53.62	53.18	53.55	52.0	52.27
11	CH ₂	40.47	40.02	39.94	40.07	40.59	40.4	40.40
12	CH ₂	23.24	23.45	23.44	23.63	23.29	23.4	23.40
13	C	42.02	57.49	57.48	60.18	57.38	57.6	57.57
14	C	57.50	42.13	42.12	41.47	42.21	42.1	42.05
15	CH ₂	28.72	29.69	29.01	29.56	27.45	29.2	28.82
16	CH ₂	34.40	31.84	34.00	33.58	34.08	31.9	34.06
17	C	38.10	37.08	38.23	36.72	38.11	37.1	38.23
18	C	77.54	76.60	77.26	76.60	76.60	76.6	76.60
19	CH ₂	42.33	40.33	42.51	133.38	42.53	40.2	42.48
20	C	144.23	131.57	144.29	126.83	144.77	131.6	144.76
21	CH	28.90	118.77	29.26	27.00	28.95	118.8	29.03
22	CH ₂	35.87	38.64	36.02	32.54	35.98	38.7	36.06
23	CH ₃	17.79	18.08	18.05	18.08	18.21	18.0	18.00
24	CH ₂	69.96	72.97	72.98	73.00	69.44	69.4	69.38
25	CH ₃	21.73	20.36	20.96	20.35	22.02	21.4	22.02
26	CH ₃	20.72	21.59	20.96	20.25	20.95	21.7	21.06
28	CH ₃	25.51	26.64	25.63	25.46	25.54	26.6	25.60
29	CH ₃	109.27	22.92	109.47	23.11	109.38	22.9	109.40
30	C	175.55	175.15	174.96	176.22	175.01	175.1	174.84
	OCH ₃	51.54	51.34	51.38	51.18	51.44	51.3	51.36
	CH ₃ CO	-	-	-	-	21.58	20.9	20.90
	CH ₃ CO	-	-	-	-	171.68	169.7	169.65

Tabla 6.2. Datos de ^{13}C RMN para los compuestos aislados en las hojas de *Galphimia glauca*.



²⁰
Δ **Galfimina B** R= H

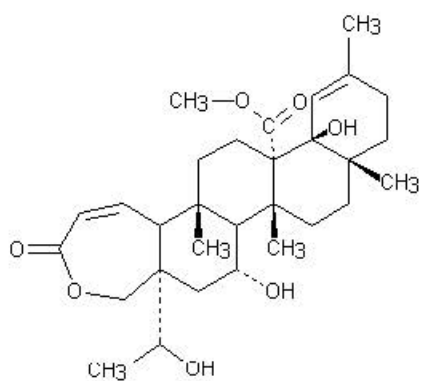
²⁰
Δ **Galfimina E** R= OAc



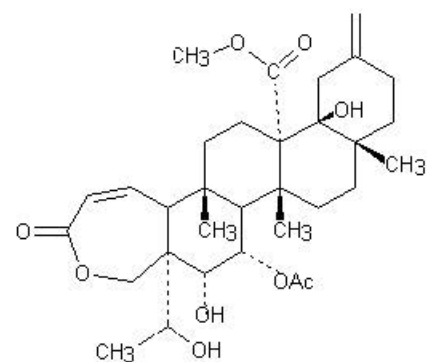
²⁰⁽²⁹⁾
Δ **Galfimina B** R= H

²⁰⁽²⁹⁾
Δ **Galfimina E** R= OAc

²⁰⁽²⁹⁾
Δ **Galfimina A** R= OH



Galfimina C



²⁰⁽²⁹⁾
Δ **Galfimina D**

Fig. 6.10. Estructura elucidada por RMN de los compuestos aislados de las hojas de *Galphimia glauca* Cav.

7. Conclusiones

7.1. Usando técnicas de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAP) y técnicas de argentación en columna abierta, se obtuvieron y caracterizaron siete nor-secofriedelanos, cinco de los cuales resultaron ser compuestos novedosos y dos de estructura molecular conocida, a partir de las hojas de la planta medicinal *Galphimia glauca*.

7.2. Usando técnicas de argentación en cromatografía de capa fina se reveló que las galfiminas B y E se presentan naturalmente como una mezcla isomérica endocíclica y exocíclica para el anillo E del esqueleto de friedelano, así mismo, las pruebas de argentación revelaron que la galfimina A también se presenta naturalmente como una mezcla isomérica, pero debido al bajo rendimiento en que la porción endocíclica se encuentra en las hojas no fue posible su aislamiento y elucidación estructural.

7.3. Se obtuvieron las constantes espectroscópicas de RMN protónicas (^1H) y de carbono-13 (^{13}C) para los compuestos Δ^{20} Galfimina B y Δ^{20} Galfimina E, debido a que la elucidación estructural original de estos compuestos se llevo a cabo usando técnicas de cristalografía.

7.4. Los nor-secofriedelanos obtenidos en el presente estudio mostraron una diferencia estructural significativa con los descritos previamente por Camacho y colaboradores (2002) que estriba en la ausencia del grupo epóxido en las posiciones C-1 y C-2. Estas posiciones se encuentran insaturadas y, evidentemente, constituyen las precursoras de la funcionalidad descrita en los triterpenos aislados en la población de Guerrero. La funcionalización del anillo A de la galfimina B y sus congéneres (la lactona α,β -insaturada) debe constituir una característica estructural necesaria para el amplio espectro de actividades biológicas demostradas para la galfimina B.

8.- Presentación del artículo generado por el presente estudio

Isolation of Nor-secofriedelanes from the Sedative Extracts of *Galphimia glauca*[§]

Alexandre T. Cardoso Taketa,[†] Jorge Lozada-Lechuga,[†] Mabel Fragoso-Serrano,[†] María Luisa Villarreal,^{*,‡} and Rogelio Pereda-Miranda^{*,†}

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico, and Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

Received October 23, 2003

Preparative-scale recycling HPLC was used for the complete resolution of a complex mixture of nor-secofriedelanes into five major peaks (I–V) from the sedative methanolic extracts prepared from the aerial parts of *Galphimia glauca*. Argentation chromatography was used to show peaks I, II, IV, and V to be mixtures of isomers around the E-ring double bond, represented by the endocyclic C-20, C-21 double-bond isomers, galphimines A (3), B (1), D (4), and E (2), and the C-20, C-29 exocyclic forms, galphimines F–I (5–8). Galphimine C (9), isolated from peak III, corresponded to the C-19, C-20 double-bond isomer of the previously known major sedative constituent galphimine B. The characterization of all the new triterpenes (3–9) was performed primarily by high-field NMR spectroscopy. Comparison between experimental and calculated ¹H–¹H vicinal coupling constants and the analysis of molecular mechanics structures revealed that the ring B of these compounds exists in a boatlike conformation. The absolute configuration for the stereogenic carbinol center at C-4 was established by the application of the Mosher ester derivatization technique carried out in NMR tubes.

Galphimine B (1), a nor-secotriterpene and the main sedative component of *Galphimia glauca* (Cav.) Kuntze (Malpighiaceae), was isolated from the aerial parts of this plant, which is traditionally utilized in Mexico for the treatment of central nervous system disorders.^{1,2} The first report on the isolation of this active principle was published about a decade ago when a product was obtained by fractional crystallization from a complex mixture of nor-secofriedelanes. The structure of compound 1 has been resolved by X-ray diffraction studies,³ but no reference to any physical constants (mp and $[\alpha]_D$) nor to spectral data (NMR and MS) has been made. Recently, a second investigation conducted on *G. glauca* tissue cultures led to not only the isolation of the above-mentioned major constituent but also a second related compound, 6-acetoxygalphimine B (2).⁴ The critical factor in achieving total purification of both samples was the development of a suitable HPLC procedure as a simple routine analytical process able to detect and quantify the in vitro production of the sedative galphimines 1 and 2 in cell suspension cultures.⁵

For further biotechnological in vitro studies, a more complete knowledge of the friedelane profile present in the wild plant is necessary, since pure samples of the triterpenes involved are needed for use as chromatographic standards to monitor their biosynthetic production. Therefore, an important prerequisite to accomplish their isolation is the standardization of analytical HPLC procedures, which can be scaled up easily for preparative purposes. This was achieved by using reversed-phase chromatography operating in a recycling mode. The present study describes the isolation of five major HPLC peaks from the original sedative MeOH extract that was prepared from the aerial parts. Four of the eluted peaks represent

diastereomeric mixtures of Δ^{20} and $\Delta^{20(29)}$ isomers. Through the use of argentation chromatography,⁶ for both silica gel TLC and column chromatography, their complete resolution is described. In addition, a fifth peak corresponding to the Δ^{19} isomer of galphimine B is also mentioned in this paper.

Results and Discussion

The mixture of galphimines present in the sedative triterpene fraction of *G. glauca* aerial parts has remained unresolved after a decade of extensive pharmacological investigation in Mexico.^{1,2} Due to our present biotechnological approach focus on the in vitro production of the main active constituent galphimine B (1),^{4,5} the separation and characterization of the additional major components of the mixture has become a high-priority phytochemical issue. These pure samples are needed for use as HPLC standard compounds for the quantification of the in vitro triterpene production by cell and hairy root suspension cultures. In addition, the identification of novel compounds will be the starting point for the elucidation of the complete metabolic pathway, which would allow the future implementation of molecular biology-based methods for manipulation of the friedelane biosynthesis. It is hoped that this approach will lead to an increase in the in vitro production of the sedative principles of *G. glauca*.

The fractionation by reversed-phase HPLC of the nor-secofriedelane mixture present in the MeOH extract of *G. glauca* resulted in the collection of five subfractions (peaks I–V), which were further purified to chromatographic homogeneity by application of preparative-scale recycling HPLC.^{7,8} In each of these analyzed eluates, one individual spot was observed by silica gel TLC. This chromatographic behavior was maintained even after 10 consecutive HPLC cycles (Figure S1, Supporting Information). However, despite the observed TLC homogeneity in all the NMR spectra of the eluted peaks, with the exception of peak III, a group of olefinic signals was recognized, suggesting the presence of a mixture. These signals were representative

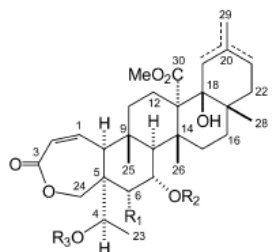
[§] This work was taken in part from the M.Sc. thesis of Jorge Lozada-Lechuga.

^{*} To whom correspondence should be addressed. UNAM, Tel: +52-55-5622-5288, Fax: +52-55-5622-5329, E-mail: pereda@servidor.unam.mx; CEIB, Tel: +52-777-3297057, E-mail: luisav@ciib.uaem.mx.

[†] Universidad Nacional Autónoma de México.

[‡] Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

of an exomethylene vinylic moiety (H₂-29: δ 4.5 and 4.7; δ_C 109) and a trisubstituted endocyclic double bond (H-21: δ 5.1; δ_C 118). The results of the present investigation demonstrated, with the use of silver nitrate-impregnated silica gel plates,⁶ that each of these peaks was a mixture of isomers around the E-ring double bond. The eluates represented different pairs of double-bond isomers, of the C-20, C-21 endocyclic double bond (**1–4**) and of the C-20, C-29 exocyclic forms (**5–8**), which could be completely separated from each other by AgNO₃-impregnated silica gel column chromatography (Figure S1, Supporting Information).



	R ₁	R ₂	R ₃
Δ^{20}			
1	H	H	H
2	OAc	H	H
3	OH	H	H
4	OH	Ac	H
10	OAc	Ac	Ac
12r	H	(<i>R</i>)-MTPA	(<i>R</i>)-MTPA
12s	H	(<i>S</i>)-MTPA	(<i>S</i>)-MTPA
13r	OAc	(<i>R</i>)-MTPA	(<i>R</i>)-MTPA
13s	OAc	(<i>S</i>)-MTPA	(<i>S</i>)-MTPA
$\Delta^{20(29)}$			
5	H	H	H
6	OAc	H	H
7	OH	H	H
8	OH	Ac	H
11	OAc	Ac	Ac
Δ^{19}			
9	H	H	H

Deduction of the basic skeleton as a nor-secofriedelane type for all of the isolated galphimines was achieved through comparative analysis of their NMR data (¹H–¹H COSY, ¹H–¹³C HMBC, and NOESY) with those previously reported for related triterpenes^{9–11} and, in particular, 6-acetoxylgalphimine B or galphimine E (**2**).⁴ The following common structural features for all the compounds were observed: the presence of three tertiary methyl groups (Me-25, Me-26, and Me-28); one secondary methyl group at C-4 (Me-23); a carbomethoxy group (C-30); one tertiary alcohol at C-18; and the seven-membered α,β -unsaturated lactone ring A. The last-mentioned functionality was confirmed through an HMBC-connectivity analysis where the carbonyl lactone resonance (δ 169) showed correlations with the vinylic protons H-1 (δ 6.4) and H-2 (δ 6.0). The latter two were also part of an ABX spin-system with H-10 (δ 2.5–2.7). The oxidation pattern of ring B was likewise deduced by comparison with **2**.⁴ Whereas the methylene signal for C-6 (δ 37) in compounds **1**, **5**, and **9** was missing in the ¹³C NMR spectra of compounds **2–4** and **6–8**, a hydroxylated (δ 65) or acetoxyated (δ 69) methine carbon appeared instead.

The molecular mechanics global minimum of compound **3** ($E_{\text{MMX}} = 97.70$ kcal/mol) displayed a conformation similar

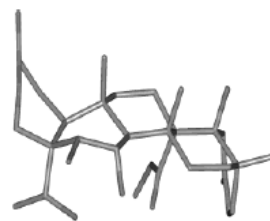


Figure 1. Minimum energy structure of galphimine A (**3**).

Table 1. ¹H NMR Chemical Shift Data for Diagnostic Signals of the (*S*)- and (*R*)-MTPA-Ester Derivatives **12** and **13**

MTPA ester	proton chemical shifts ($\Delta\delta_{\text{H}} = \delta_{\text{S}} - \delta_{\text{R}}$) ^a						C-4 config
	H-23	$\Delta\delta_{\text{H}}$	H-24a	$\Delta\delta_{\text{H}}$	H-24b	$\Delta\delta_{\text{H}}$	
12	1.361	+0.062	3.809	−0.056	4.293	−0.110	<i>R</i>
	1.299		3.865		4.403		
13	1.483	+0.072	4.182	−0.048	4.274	−0.089	<i>R</i>
	1.411		4.230		4.363		

^a Data measured in CDCl₃ at 300 MHz.

to that found in the X-ray structure of galphimine B (**1**)³ in that ring B in both substances adopts a classical boat conformation (Figure 1). The observed vicinal coupling constants ($J_{6,7} \approx 5.5$ Hz and $J_{7,8} \approx 8$ Hz) found in compounds **2–4** and **6–8** were similar to the calculated values generated from the molecular model of **3** ($J_{6,7} = 4.6$ Hz and $J_{7,8} = 8$ Hz). These values were obtained from the corresponding molecular mechanics dihedral angles H-6–C-6–C-7–H-7 = +40° and H-7–C-7–C-8–H-8 = +151° by using the Altona equation,^{12,13} thus defining an α -configuration for the functionalities (hydroxyl or acetoxy groups) on these chiral centers. In addition, a NOESY cross-peak was clearly recorded between H-6 and Me-25, supporting the discussed structural assignment for all the above-mentioned cases. The molecular model for the opposite stereochemistry at C-6 (i.e., β -OH) registered a dihedral angle of −82°, which allowed for the calculation of $J_{6,7} = 1.4$ Hz.

Through acetylation, all members of each isomeric series, i.e., compounds **2–4** and **6–8**, afforded the same peracetylated derivative **10** or **11**, respectively. This chemical correlation, as well as that obtained by application of the Mosher esters methodology,¹⁴ provided conclusive evidence for the same C-4 absolute configuration in all galphimines. This reaction was performed in NMR tubes in deuterated pyridine, which allowed heating the solution to promote the esterification. In the NMR spectra of the (*S*)-MTPA ester of the galphimines B and E (MTPA derivatives **12s** and **13s**, respectively), the H-23 methyl group protons were relatively deshielded compared to those signals in the (*R*)-MTPA derivatives (**12r** and **13r**). The chemical shift difference ($\Delta\delta = \delta_{\text{S}} - \delta_{\text{R}}$) between corresponding Me-23 protons was positive (Table 1), allowing the confirmation of a C-4 (*R*) absolute configuration through the application of the configurational model proposed by Kakisawa and associates.¹⁵

The major HPLC peak II ($t_{\text{R}} = 26$ min; Figure S1, Supporting Information) afforded an isomeric pair of compounds both with the molecular formula C₃₀H₄₄O₇, which was subsequently resolved by argentation chromatography on a silica gel column into pure compounds **1** and **5**. The second most prominent peak, eluate V ($t_{\text{R}} = 33.5$ min), afforded a pair of compounds with the molecular formula C₃₂H₄₆O₉, representing galphimine E (**2**) and its isomer **6**. The molecular formula calculated for peak IV ($t_{\text{R}} = 30$ min) was the same as that of peak V but was resolved

into pure compounds **4** and **8**. The isomerism of peaks IV and V was a consequence of the position interchange of the acetyl group residue between the hydroxylated C-6 and C-7 of the basic skeleton. Peak I ($t_R = 19$ min) yielded **3** and **7**, whose FABMS led to the molecular formula $C_{30}H_{44}O_8$ and indicated that these pure compounds represented the deacetylated form of galphimine D as well as galphimine E. Galphimine C (peak III; $t_R = 27.5$ min) was present in only one isomeric form (**9**) and possessed the same molecular formula as galphimine B ($C_{30}H_{44}O_7$). For compounds in both isomeric series, their structure elucidation was in total agreement with the NMR data included in the Experimental Section.

Galphimine C (**9**) represents the C-19, C-20 endocyclic double-bond isomer of compound **1**. The NMR experiments allowed unambiguously for the identification of all resonances in ring E and the placement of the double bond between C-19 and C-20 (Figure S2, Supporting Information). The line width at half-height for the olefinic proton signal H-19 ($W_{1/2} = 5$ Hz) supported this assignment, since a higher value was measured for compounds in the C-20, C-21 endocyclic series ($W_{1/2} = 9$ Hz). In the $^1H-^1H$ COSY spectrum, the vinylic proton H-19 (δ 5.3) showed allylic couplings with the Me-29 group (δ 1.7) and the H-21 α -proton (δ 1.9). Additionally, mutual $^3J_{H-H}$ correlations were observed between both ring E methylene groups, i.e., CH₂-21 and CH₂-22, both of which were absent in the isomeric Δ^{20} endocyclic series. Also observed were HMBC correlations for the Me-29 group (δ 0.9) and C-19 (δ 127; $^3J_{CH}$), C-20 (δ 133; $^2J_{CH}$), and C-21 (δ 27; $^3J_{CH}$). A long-range coupling between C-18 (δ 77) and H-22 β (δ 1.0) as well as cross-peaks between the Me-28 signal (δ 0.9), C-18 (δ 77), and C-22 (δ 32) were also detected. The hydroxyl group, as an allylic substituent in galphimine C (**9**), through a molecular conformational change, produced a better interaction with the reversed-phase C₁₈ adsorbent in HPLC. This situation favored its separation from the two additional isomers of galphimine B, i.e., the eluted peak II (**1** and **5**) (Figure S1, Supporting Information).

There seems to be a significant geographically based difference between the semiarid highland specimens of *G. glauca* and those of the tropical coastal plains¹¹ of Mexico, in that the galphimines (**1**–**9**) have only been isolated in plant material collected from the former, although the production of nor-secofriedelanes is found in plants from both areas. Finally, the evaluation of galphimines in a panel of four human tumor cell lines (KB, HCT-15, OVCAR, and SQC-1) indicated a lack of significant cytotoxicity ($ED_{50} > 4 \mu g/mL$), despite their potentiality as alkylating agents due to their α,β -unsaturated lactone ring. This lack of toxic cellular effects could also imply the safety in future sedatives developed for human consumption in over-the-counter remedies or phytomedicines containing this type of bioactive principle.

Experimental Section

General Experimental Procedures. Melting points were determined on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. Optical rotations were measured with a Perkin-Elmer model 241 polarimeter. 1H (500 and 300 MHz) and ^{13}C (125.7 and 75.4 MHz) NMR experiments were recorded on a Bruker AMX-500 or a Varian XL-300GS spectrometer in CDCl₃ or pyridine-*d*₅ solution containing TMS as internal standard. Positive-ion LRFABMS and HRFABMS were registered using a glycerol or poly(ethylene glycol) matrix on a JEOL SX102A spectrometer. Cytotoxicity was conducted at UNAM (Facultad de Química) using cultured KB (nasopharyngeal carcinoma), HCT-15 (colon cancer), OVCAR (ovarian adenocarcinoma), and

SQC-1 (squamous cell cervical carcinoma) cells, according to previously described protocols.^{16,17}

Plant Material. Leaves of *Galphimia glauca* were collected at the "Municipio Doctor Mora", Guanajuato, Mexico, in July 2001. The voucher specimens were identified by Abigail Aguilar and deposited at Instituto Mexicano del Seguro Social Herbarium (IMSSM: 11061), Centro Médico Nacional Siglo XXI, Mexico City.

Extraction and Isolation. The dried leaves (800 g) were powdered and defatted by maceration at room temperature with hexane. The residual material was extracted exhaustively with CHCl₃ and MeOH to afford, after removal of the solvent, a dark green syrup (104 g) and a brownish oily residue (69 g), respectively. The crude mixture of galphimines was obtained after fractionation of the MeOH extract by open column chromatography over silica gel eluted with a gradient of MeOH in CHCl₃. A total of 52 fractions (150 mL each) were collected and combined (fractions 11–16) to give a complex pool constituted by compounds **1**–**9** (2.5 g).

Recycling HPLC Separation. The instrumentation used for HPLC analysis consisted of a Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA) 600E multi-solvent delivery system equipped with a Waters W996 diode array detector (232 nm). Control of the equipment, data acquisition, processing, and management of chromatographic information were performed by the Millennium 32 software program (Waters). The analytical HPLC separations were done on a Symmetry C₁₈ column (Waters; 5 μm , 4.6 \times 250 mm) with an isocratic elution of CH₃CN–H₂O (45:55), a flow rate of 0.65 mL/min, and a sample injection of 10 μL (1 mg/mL). The crude galphimine fraction was subjected to preparative HPLC on a reversed-phase C₁₈ column (7 μm , 19 \times 300 mm). The elution was isocratic with CH₃CN–H₂O (45:55) using a flow rate of 10 mL/min. Eluates across the peaks with t_R of 18.9 min (peak I: 28 mg; **3** and **7**), 26.2 min (peak II: 80 mg; **1** and **5**), 27.7 min (peak III: 3 mg; **9**), 29.9 min (peak IV: 20 mg; **4** and **8**), and 33.4 min (peak V: 50 mg; **2** and **6**) were collected by the technique of heart cutting^{7,8} and independently reinjected in the apparatus operated in the recycle mode.¹⁸ The complete separation of HPLC peaks I–V was achieved to homogeneity (HPLC; Figure S1, Supporting Information) after five to ten consecutive cycles employing an isocratic elution with CH₃CN–H₂O (7:3).

Argentation Chromatography. TLC: precoated Si gel 60 F₂₅₄ aluminum sheets (20 \times 20 cm) and HPTLC plates (10 \times 10 cm) were impregnated with silver nitrate by immersion (3 \times) in a solution of 2 g of AgNO₃ in acetone–H₂O (3:2; 50 mL). After each immersion, the plates were dried at 100 °C. Final activation was performed by heating overnight at 90 °C. Plates were appropriately stored to avoid deactivation by moisture and oxidation by exposure to air and light. Argentation TLC, using CHCl₃–EtOAc (1:2), satisfactorily separated the galphimine mixture (TLC; Figure S1, Supporting Information). Spraying the plates with vanillin–sulfuric acid solution (0.1 g in 10 mL of H₂SO₄ 98%) allowed the visualization of compounds.

Column Chromatography. Silica gel 60 (40–60 μm) was prepared by mixing the adsorbent (50 g) in a 2% AgNO₃ solution of acetone–H₂O (3:2; 120 mL). The impregnated adsorbent was dried following the above-described procedures for TLC plates. Complete resolution of all diastereomeric pairs (10 mg) was achieved by normal column chromatography using 5 g of the impregnated adsorbent and CHCl₃–EtOAc (1:1) as elution solvent. These argentation techniques afforded pure compounds **3** (2 mg) and **7** (6 mg) from peak I; **1** (3 mg) and **5** (5 mg) from peak II; **4** (3 mg) and **8** (5 mg) from peak IV; and finally, **2** (3 mg) and **6** (5 mg) from peak V.

Galphimine B (1): white amorphous powder; mp 149–152 °C; $[\alpha]_D^{25} -51^\circ$ (*c* 0.16, CHCl₃); 1H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 6.41 (1H, dd, *J* = 12.0, 9.0 Hz, H-1), 6.05 (1H, d, *J* = 12.0 Hz, H-2), 5.15 (1H, m, H-21), 4.22 (1H, m, H-7 β), 4.22 (1H, d, *J* = 12.0, H-24b), 3.52 (1H, m, H-4), 3.52 (1H, m, H-24a), 3.51 (3H, s, OCH₃), 2.92 (1H, dd, *J* = 13.1, 3.3 Hz, H-15 α), 2.67 (1H, dd, *J* = 15.9, 6.6 Hz, H-6 α), 2.65 (1H, m, H-19b), 2.54

(1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-10 α), 2.59 (1H, m, H-22 α), 2.27 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-8 α), 2.05 (1H, m, H-16 β), 2.03 (2H, m, H-12), 1.80 (1H, m, H-19a), 1.53 (3H, s, CH₃-29), 1.52 (1H, m, H-22 β), 1.47 (1H, m, H-6 β), 1.47 (1H, m, H-11b), 1.36 (3H, s, H-26), 1.22 (1H, m, H-11a), 1.22 (1H, m, H-15 β), 1.22 (1H, m, H-16 α), 1.08 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH₃-23), 0.97 (3H, s, CH₃-28), 0.93 (3H, s, CH₃-25); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.7 MHz) δ 175.1 (C, C-30), 169.9 (C, C-3), 145.7 (CH, C-1), 131.6 (C, C-20), 118.8 (CH, C-21), 123.5 (CH, C-2), 76.6 (C, C-18), 72.4 (CH, C-4), 73.0 (CH₂, C-24), 66.5 (CH, C-7), 57.5 (C, C-13), 53.8 (CH, C-8), 53.3 (CH, C-10), 51.3 (CH₃, OCH₃), 48.3 (C, C-5), 42.1 (C, C-14), 40.5 (C, C-9), 40.3 (CH₂, C-19), 40.0 (CH₂, C-11), 38.6 (CH₂, C-22), 37.3 (CH₂, C-6), 37.1 (C, C-17), 31.8 (CH₂, C-16), 29.7 (CH₂, C-15), 26.6 (CH₃, C-28), 23.4 (CH₂, C-12), 22.9 (CH₃, C-29), 21.6 (CH₃, C-26), 20.4 (CH₃, C-25), 18.1 (CH₃, C-23); positive FABMS m/z 517 [M + H]⁺, 499 [M + H - H₂O]⁺; HRFABMS m/z 517.3148 ([M + H]⁺, calcd for C₃₀H₄₅O₇ - 3.4 ppm error).

Galphimine E (6-acetoxylgalphimine B, 2): white amorphous powder; mp 177–179 °C; [α]_D²⁵ -22.4° (c 2.3, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 6.40 (1H, dd, $J = 12.0, 8.7$ Hz, H-1), 6.07 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-2), 5.53 (1H, d, $J = 5.7$ Hz, H-6 β), 5.15 (1H, brs, H-21), 4.42 (1H, dd, $J = 7.8, 6.0$ Hz, H-7 β), 4.10 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-24b), 3.95 (1H, q, $J = 6.6$ Hz, H-4), 3.72 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-24a), 3.52 (3H, s, OCH₃), 2.89 (1H, td, $J = 13.5, 4.5$ Hz, H-15 α), 2.75 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-10 α), 2.63 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-19b), 2.59 (1H, m, H-22 α), 2.53 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-8 α), 2.15 (3H, s, OAc), 2.04 (2H, m, H-12), 1.97 (1H, m, H-16 β), 1.82 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-19a), 1.53 (3H, s, CH₃-29), 1.51 (1H, m, H-22 β), 1.46 (1H, m, H-11b), 1.36 (1H, s, CH₃-26), 1.23 (1H, m, H-11a), 1.18 (1H, m, H-15 β), 1.18 (1H, m, H-16 α), 1.00 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, CH₃-23), 1.00 (3H, s, CH₃-25), 0.96 (3H, s, CH₃-28); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.7 MHz) δ 175.1 (C, C-30), 169.7 (C, OAc), 169.3 (C, C-3), 144.7 (CH, C-1), 131.6 (C, C-20), 123.9 (CH, C-2), 118.8 (CH, C-21), 76.6 (C, C-18), 69.9 (CH, C-6), 69.4 (CH₂, C-24), 65.3 (CH, C-7), 63.8 (CH, C-4), 57.6 (C, C-13), 52.7 (CH, C-8), 52.0 (CH, C-10), 51.5 (C, C-5), 51.3 (OCH₃), 42.1 (C, C-14), 40.4 (CH₂, C-11), 40.2 (CH₂, C-19), 39.3 (C, C-9), 38.7 (CH₂, C-22), 37.1 (C, C-17), 31.9 (CH₂, C-16), 29.2 (CH₃, C-15), 26.6 (CH₃, C-28), 23.4 (CH₂, C-12), 22.9 (CH₃, C-29), 21.7 (CH₃, C-26), 21.4 (CH₃, C-25), 20.9 (CH₃, OAc), 18.0 (CH₃, C-23); positive FABMS m/z 597 [M + Na]⁺, 557 [M + H - H₂O]⁺; HRFABMS m/z 557.3117 ([M + H - H₂O]⁺, calcd for C₃₂H₄₅O₈ + 0.5 ppm error).

Galphimine A (3): white amorphous powder; mp 117–119 °C; [α]_D²⁵ -37° (c 0.5, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 6.37 (1H, dd, $J = 12.2, 9.0$ Hz, H-1), 6.05 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-2), 5.27 (1H, brs, H-21), 4.35 (1H, m, H-6 β), 4.17 (1H, m, H-7 β), 4.03 (2H, m, H-24), 3.92 (1H, q, $J = 6.3$ Hz, H-4), 3.54 (3H, s, OCH₃), 2.96 (1H, td, $J = 14.4, 4.9$ Hz, H-15 α), 2.90 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-19b), 2.59 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-10 α), 2.59 (1H, m, H-22 α), 2.40 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-8 α), 2.03 (2H, m, H-12), 2.00 (1H, m, H-16 β), 1.81 (1H, d, $J = 15.3$ Hz, H-19a), 1.54 (3H, s, CH₃-29), 1.51 (1H, m, H-22 β), 1.46 (1H, m, H-11b), 1.37 (1H, m, H-11a), 1.33 (3H, s, CH₃-26), 1.32 (1H, m, H-15 β), 1.20 (1H, m, H-16 α), 1.09 (3H, s, CH₃-28), 0.98 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, CH₃-23), 0.92 (3H, s, CH₃-25); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.7 MHz) δ 175.6 (C, C-30), 169.7 (C, C-3), 144.8 (CH, C-1), 132.0 (C, C-20), 123.8 (CH, C-2), 118.5 (CH, C-21), 77.5 (C, C-18), 70.0 (CH₂, C-24), 67.4 (CH, C-7), 66.2 (CH, C-6), 62.9 (CH, C-4), 57.5 (C, C-13), 52.8 (CH, C-8), 52.5 (C, C-5), 52.4 (CH, C-10), 51.6 (OCH₃), 42.1 (C, C-14), 40.5 (CH₂, C-11), 40.1 (CH₂, C-19), 38.8 (C, C-9), 38.5 (CH₂, C-22), 38.1 (C, C-17), 32.3 (CH₂, C-16), 29.1 (CH₂, C-15), 26.6 (CH₃, C-28), 23.3 (CH₂, C-12), 22.8 (CH₃, C-29), 21.4 (CH₃, C-26), 21.2 (CH₃, C-25), 17.6 (CH₃, C-23); positive FABMS m/z 533 [M + H]⁺; HRFABMS m/z 533.3137 ([M + H]⁺, calcd for C₃₀H₄₅O₈ + 4.3 ppm error).

Galphimine D (4): white amorphous powder; mp 247–248 °C; [α]_D²⁵ -8° (c 0.3, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 6.40 (1H, dd, $J = 12.2, 8.7$ Hz, H-1), 6.07 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-2), 5.48 (1H, dd, $J = 8.4, 6.3$ Hz, H-7 β), 5.16 (1H, m, H-21), 4.57 (1H, m, H-6 β), 4.14 (2H, m, H-24), 4.03 (1H, q, $J = 6.6$ Hz, H-4), 3.52 (3H, s, OCH₃), 2.82 (1H, td, $J = 13.6, 4.9$ Hz, H-15 α), 2.75 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-10 α), 2.64 (1H, d, $J = 17.5$ Hz, H-19b), 2.59 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-8 α), 2.59 (1H, m,

H-22 α), 2.17 (3H, s, OAc), 2.03 (2H, m, H-12), 1.98 (1H, m, H-16 β), 1.83 (1H, m, H-19a), 1.55 (1H, m, H-22 β), 1.54 (3H, s, CH₃-29), 1.47 (2H, m, H-11), 1.37 (3H, s, CH₃-26), 1.20 (1H, m, H-16 α), 1.05 (3H, CH₃-23), 0.98 (3H, s, CH₃-25), 0.95 (3H, s, CH₃-28), 0.83 (1H, ddd, $J = 13.6, 4.9, 2.3$ Hz, H-15 β); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.7 MHz) δ 175.0 (C, C-30), 171.8 (C, OAc), 169.2 (C, C-3), 144.2 (CH, C-1), 131.6 (C, C-20), 123.7 (CH, C-2), 118.8 (CH, C-21), 77.1 (C, C-18), 70.8 (CH, C-7), 69.3 (CH₂, C-24), 65.3 (CH, C-6), 64.3 (CH, C-4), 57.4 (C, C-13), 53.3 (CH, C-10), 53.2 (C, C-5), 51.3 (OCH₃), 49.4 (CH, C-8), 42.2 (C, C-14), 40.5 (CH₂, C-11), 40.2 (CH₂, C-19), 39.0 (C, C-17), 38.6 (CH₂, C-22), 38.5 (C, C-9), 31.8 (CH₂, C-16), 27.4 (CH₂, C-15), 26.5 (CH₃, C-28), 23.2 (CH₂, C-12), 22.9 (CH₃, C-29), 22.0 (CH₃, C-25), 21.5 (CH₃, OAc), 20.9 (CH₃, C-26), 18.2 (CH₃, C-23); positive FABMS m/z 575 [M + H]⁺, 557 [M + H - H₂O]⁺; HRFABMS m/z 575.3203 ([M + H]⁺, calcd for C₃₂H₄₇O₉ - 2.9 ppm error).

Galphimine F (5): white amorphous powder; mp 148–150 °C; [α]_D²⁵ -38° (c 0.4, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 6.43 (1H, dd, $J = 12.4, 8.6$ Hz, H-1), 6.04 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-2), 4.68 (1H, q, $J = 2.4$ Hz, H-29b), 4.46 (1H, q, $J = 2.4$ Hz, H-29a), 4.23 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, Hb-24), 4.20 (1H, m, H β -7), 3.52 (1H, q, $J = 6.3$ Hz, H-4), 3.52 (1H, m, H-24a), 3.50 (3H, s, OCH₃), 3.01 (1H, td, $J = 12.0, 4.5$ Hz, H-15 α), 2.92 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-19b), 2.67 (1H, dd, $J = 15.9, 6.6$ Hz, H-6 α), 2.54 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-10 α), 2.27 (1H, m, H-21 β), 2.14 (1H, m, H-22 α), 2.10 (1H, m, H-8 α), 2.05 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-19a), 2.02 (2H, m, H-12), 2.01 (1H, m, H-16 β), 1.98 (1H, m, H-21 α), 1.46 (1H, m, H-6 β), 1.44 (1H, m, H-11b), 1.35 (3H, s, CH₃-26), 1.28 (1H, m, H-16 α), 1.24 (1H, m, H-11a), 1.20 (1H, ddd, $J = 12.0, 4.5, 2.4$ Hz, H-15 β), 1.10 (3H, s, CH₃-28), 1.05 (1H, m, H-22 β), 1.04 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, CH₃-23), 0.95 (3H, s, CH₃-25); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.4 MHz) δ 175.0 (C, C-30), 169.9 (C, C-3), 145.8 (CH, C-1), 144.3 (C, C-20), 123.6 (CH, C-2), 109.5 (CH₂, C-29), 77.3 (C, C-18), 73.0 (CH₂, C-24), 72.4 (CH, C-4), 66.5 (CH, C-7), 57.5 (C, C-13), 54.4 (CH, C-8), 53.6 (CH, C-10), 51.4 (OCH₃), 48.3 (C, C-5), 42.5 (CH₂, C-19), 42.1 (C, C-14), 40.3 (C, C-9), 39.9 (CH₂, C-11), 38.2 (C, C-17), 37.3 (CH₂, C-6), 36.0 (CH₂, C-22), 34.0 (CH₂, C-16), 29.3 (CH₂, C-21), 29.0 (CH₂, C-15), 25.6 (CH₃, C-28), 23.4 (CH₂, C-12), 21.0 (CH₃, C-25), 21.0 (CH₃, C-26), 18.0 (CH₃, C-23); positive FABMS m/z 517 [M + H]⁺, 499 [M + H - H₂O]⁺; HRFABMS m/z 517.3148 ([M + H]⁺, calcd for C₃₀H₄₅O₈ - 3.4 ppm error).

Galphimine G (6): white amorphous powder; mp 176–178 °C; [α]_D²⁵ -21° (c 0.7, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 6.41 (1H, dd, $J = 12.2, 8.8$ Hz, H-1), 6.07 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-2), 5.51 (1H, d, $J = 5.9$ Hz, H-6 β), 4.67 (1H, q, $J = 2.4$ Hz, H-29b), 4.46 (1H, q, $J = 2.4$ Hz, H-29a), 4.42 (1H, dd, $J = 7.8, 5.9$ Hz, H-7 β), 4.11 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-24b), 3.95 (1H, q, $J = 6.4$ Hz, H-4), 3.71 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-24a), 3.49 (3H, s, OCH₃), 2.94 (1H, td, $J = 13.2, 3.9$ Hz, H-15 α), 2.89 (1H, d, $J = 14.7$ Hz, H-19b), 2.75 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-10 α), 2.33 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-8 α), 2.25 (1H, m, H-21 β), 2.16 (1H, m, H-22 α), 2.13 (3H, s, OAc), 2.09 (1H, m, H-19a), 2.02 (2H, m, H-12), 2.00 (1H, m, H-16 β), 1.97 (1H, m, H-21 α), 1.43 (2H, m, H-11), 1.35 (3H, s, CH₃-26), 1.27 (1H, m, H-16 α), 1.14 (1H, m, H-15 β), 1.07 (3H, s, CH₃-28), 1.03 (1H, m, H-22 β), 1.01 (3H, s, CH₃-25), 0.98 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, CH₃-23); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.4 MHz) δ 174.8 (C, C-30), 169.6 (C, OAc), 169.3 (C, C-3), 144.8 (C, C-20), 144.4 (CH, C-1), 124.0 (CH, C-2), 109.4 (CH₂, C-29), 76.6 (C, C-18), 69.8 (CH, C-6), 69.4 (CH₂, C-24), 65.4 (CH, C-7), 63.8 (CH, C-4), 57.6 (C, C-13), 53.2 (CH, C-8), 52.3 (CH, C-10), 51.5 (C, C-5), 51.4 (OCH₃), 42.5 (CH₂, C-19), 42.0 (C, C-14), 40.4 (CH₂, C-11), 39.0 (C, C-9), 38.2 (C, C-17), 36.1 (CH₂, C-22), 34.1 (CH₂, C-16), 29.0 (CH₂, C-21), 28.8 (CH₂, C-15), 25.6 (CH₃, C-28), 23.4 (CH₂, C-12), 22.0 (CH₃, C-25), 21.1 (CH₃, C-26), 20.9 (CH₃, OAc), 18.0 (CH₃, C-23); positive FABMS m/z 575 [M + H]⁺, 557 [M + H - H₂O]⁺; HRFABMS m/z 575.3243 ([M + H]⁺, calcd for C₃₂H₄₇O₉ + 3.9 ppm error).

Galphimine H (7): white amorphous powder; mp 116–118 °C; [α]_D²⁵ -35° (c 1.0, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 6.40 (1H, dd, $J = 12.2, 9.0$ Hz, H-1), 6.07 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-2), 4.71 (1H, q, $J = 2.2$ Hz, H-29b), 4.47 (1H, q, $J = 2.2$ Hz, H-29a), 4.38 (1H, m, H-6 β), 4.16 (1H, m, H-7 β), 4.04 (2H, m, H-24), 3.94 (1H, q, $J = 6.4$ Hz, H-4), 3.54 (3H, s, OCH₃), 2.96

(1H, td, $J = 14.2, 4.7$ Hz, H-15 α), 2.92 (1H, d, $J = 15.0$ Hz, H-19b), 2.60 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-10 α), 2.24 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-8 α), 2.30 (1H, m, H-21 β), 2.16 (1H, m, H-22 α), 2.12 (1H, m, H-19a), 2.03 (2H, m, H-12), 2.00 (1H, m, H-16 β), 1.98 (1H, m, H-21 α), 1.45 (1H, m, H-11b), 1.39 (1H, m, H-11a), 1.35 (3H, s, CH₃-26), 1.30 (1H, m, H-15 β), 1.27 (1H, m, H-16 α), 1.10 (3H, s, CH₃-28), 1.05 (1H, m, H-22 β), 1.00 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, CH₃-23), 0.95 (3H, s, CH₃-25); ¹³C NMR (CDCl₃, 125.7 MHz) δ 175.5 (C, C-30), 169.7 (C, C-3), 144.8 (CH, C-1), 144.2 (C, C-20), 123.8 (CH, C-2), 109.3 (CH₂, C-29), 77.5 (C, C-18), 70.0 (CH₂, C-24), 67.3 (CH, C-7), 65.9 (CH, C-6), 62.9 (CH, C-4), 57.5 (C, C-13), 52.8 (CH, C-8), 52.4 (C, C-5), 52.4 (CH, C-10), 51.5 (OCH₃), 42.3 (CH₂, C-19), 42.0 (C, C-14), 40.5 (CH₂, C-11), 38.8 (C, C-9), 38.1 (C, C-17), 35.9 (CH₂, C-22), 34.4 (CH₂, C-16), 28.9 (CH₂, C-21), 28.7 (CH₂, C-15), 25.5 (CH₃, C-28), 23.2 (CH₂, C-12), 21.7 (CH₃, C-25), 20.7 (CH₃, C-26), 17.8 (CH₃, C-23); positive FABMS m/z 533 [M + H]⁺, 515 [M + H - H₂O]⁺; HRFABMS m/z 533.3114 ([M + H]⁺, calcd for C₃₀H₄₅O₈).

Galphimine I (8): white amorphous powder; mp 246–247 °C; [α]_D²⁵ -9° (c 2.3, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 6.41 (1H, dd, $J = 12.2, 8.8$ Hz, H-1), 6.07 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-2), 5.46 (1H, m, H-7 β), 4.69 (1H, q, $J = 2.4$ Hz, H-29b), 4.56 (1H, m, H-6 β), 4.46 (1H, q, $J = 2.4$ Hz, H-29a), 4.12 (2H, m, H-24), 4.02 (1H, m, H-4), 3.52 (3H, s, OCH₃), 2.91 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-19b), 2.82 (1H, td, $J = 13.2, 4.9$ Hz, H-15 α), 2.76 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-10 α), 2.59 (1H, m, H-8 α), 2.28 (1H, m, H-21 β), 2.16 (3H, s, OAc), 2.12 (1H, m, H-22 α), 2.12 (1H, m, H-19a), 2.04 (2H, m, H-12), 1.99 (1H, m, H-21 α), 1.99 (1H, m, H-16 β), 1.46 (2H, m, H-11), 1.36 (3H, s, CH₃-26), 1.20 (1H, m, H-16 α), 1.08 (3H, s, CH₃-28), 1.03 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, CH₃-23), 1.03 (1H, m, H-22 β), 0.98 (3H, s, CH₃-25), 0.81 (1H, ddd, $J = 13.2, 4.9, 2.9$ Hz, H-15 β); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.4 MHz) δ 175.0 (C, C-30), 171.7 (OAc), 169.6 (C, C-3), 144.8 (C, C-20), 144.4 (CH, C-1), 123.8 (CH, C-2), 109.4 (CH₂, C-29), 76.6 (C, C-18), 70.9 (CH, C-7), 69.4 (CH₂, C-24), 65.4 (CH, C-6), 64.4 (CH, C-4), 57.4 (C, C-13), 53.5 (CH, C-10), 52.1 (C, C-5), 51.4 (OCH₃), 50.1 (CH, C-8), 42.5 (CH₂, C-19), 42.2 (C, C-14), 40.6 (CH₂, C-11), 38.8 (C, C-9), 38.1 (C, C-17), 36.0 (CH₂, C-22), 34.1 (CH₂, C-16), 28.9 (CH₂, C-21), 27.4 (CH₂, C-15), 25.5 (CH₃, C-28), 23.3 (CH₂, C-12), 22.0 (CH₃, C-25), 21.6 (CH₃, OAc), 20.9 (CH₃, C-26), 18.2 (CH₃, C-23); positive FABMS m/z 575 [M + H]⁺, 557 [M + H - H₂O]⁺; HRFABMS m/z 575.3220 ([M + H]⁺, calcd for C₃₂H₄₇O₉ -0.1 ppm error).

Galphimine C (9): white amorphous powder; mp 119–121 °C; [α]_D²⁵ -55° (c 2.4, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 6.42 (1H, dd, $J = 12.2, 8.8$ Hz, H-1), 6.02 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-2), 5.29 (1H, br, s, H-19), 4.22 (1H, m, H-7 β), 4.22 (1H, d, $J = 11.7$ Hz, H-24b), 3.53 (1H, m, H-4), 3.53 (3H, s, OCH₃), 3.51 (1H, m, H-24a), 2.98 (1H, td, $J = 13.2, 4.4$ Hz, H-15 α), 2.68 (1H, dd, $J = 16.1, 6.4$ Hz, H-6 α), 2.58 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-10 α), 2.25 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-8 α), 2.16 (1H, m, H-22 α), 2.10 (1H, dd, $J = 13.7, 4.4$ Hz, H-12 α), 2.05 (1H, m, H-16 β), 1.98 (1H, m, H-21 β), 1.97 (1H, m, H-12 β), 1.72 (1H, m, H-21 α), 1.68 (3H, s, CH₃-29), 1.47 (1H, m, H-6 β), 1.42 (1H, m, H-11b), 1.36 (3H, s, CH₃-26), 1.36 (1H, m, H-16 α), 1.21 (1H, m, H-15 β), 1.18 (1H, m, H-11a), 1.09 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, CH₃-23), 1.02 (1H, m, H-22 β), 0.94 (3H, s, CH₃-25), 0.93 (1H, s, CH₃-28); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.4 MHz) δ 176.2 (C, C-30), 169.9 (C, C-3), 145.9 (CH, C-1), 133.4 (C, C-20), 126.8 (CH, C-19), 123.5 (CH, C-2), 76.6 (C, C-18), 73.0 (CH₂, C-24), 72.4 (CH, C-4), 66.6 (CH, C-7), 60.2 (C, C-13), 54.2 (CH, C-8), 53.2 (CH, C-10), 51.2 (OCH₃), 48.3 (C, C-5), 41.5 (C, C-14), 40.6 (C, C-9), 40.1 (CH₂, C-11), 37.3 (CH₂, C-6), 36.7 (C, C-17), 33.6 (CH₂, C-16), 32.5 (CH₂, C-22), 29.6 (CH₂, C-15), 27.0 (CH₂, C-21), 25.5 (CH₃, C-28), 23.6 (CH₂, C-12), 23.1 (CH₃, C-29), 20.3 (CH₃, C-25), 20.2 (CH₃, C-26), 18.1 (CH₃, C-23); positive FABMS m/z 517 [M + H]⁺, 499 [M + H - H₂O]⁺; HRFABMS m/z 517.3165 ([M + H]⁺, calcd for C₃₀H₄₅O₇ -0.1 ppm error).

Acetylation of Galphimines 2–4 and 6–7. Each individual compound (1–2 mg) was dissolved in Ac₂O–pyridine (1:4) (2.5 mL) and stood at room temperature for 24 h. The derivatives were precipitated by addition of cold water, and their purification was performed by semipreparative HPLC on a reversed-phase C₁₈ column (300 × 7.8 mm, 6 μ m), using

CH₃CN–H₂O (7:3, flow rate = 3 mL/min), to give derivatives **10** (1.5 mg) and **11** (2 mg).

Peracetylated derivative 10: white amorphous powder; [α]_D²⁵ -14° (c 0.2, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 6.30 (1H, dd, $J = 12.6, 8.4$ Hz, H-1), 6.06 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-2), 5.66 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-6), 5.53 (1H, m, H-7), 5.46 (1H, m, H-4), 5.15 (1H, brs, H-21), 4.40 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-24b), 4.08 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-24a), 3.52 (3H, s, OCH₃), 2.50 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-8), 2.42 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-10), 2.10 (3H, s, OAc), 2.08 (3H, s, OAc), 2.00 (3H, s, OAc), 1.56 (3H, s, CH₃-29), 1.36 (3H, s, CH₃-26), 1.23 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, CH₃-23), 1.07 (6H, s, CH₃-25, 28).

Peracetylated derivative 11: white amorphous powder; [α]_D²⁵ -9° (c 0.2, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 6.30 (1H, dd, $J = 12.6, 8.4$ Hz, H-1), 6.06 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-2), 5.66 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-6), 5.53 (1H, m, H-7), 5.46 (1H, m, H-4), 4.69 (1H, q, $J = 2.3$ Hz, H-29b), 4.44 (1H, q, $J = 2.3$ Hz, H-29a), 4.40 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-24b), 4.08 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-24a), 3.52 (3H, s, OCH₃), 2.50 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-8), 2.42 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-10), 2.10 (3H, s, OAc), 2.08 (3H, s, OAc), 2.00 (3H, s, OAc), 1.34 (3H, s, CH₃-26), 1.23 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, CH₃-23), 1.08 (6H, s, CH₃-25, 28).

Determination of the Absolute Configuration. Each individual solution (2.0 mg) of galphimines **B** (**1**) and **E** (**2**) was treated with 4-(dimethylamino)pyridine (3 mg, previously heated at 70 °C for 3 h) and dry pyridine-*d*₅ (0.75 mL) in NMR tubes. (S)-(–)- α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetyl (MTPA) chloride was added (20 μ L). The reactions were allowed to stand at 70–75 °C for 5 h under an atmosphere of N₂. NMR spectra were then recorded at 300 MHz by acquiring the reaction mixtures. Further purification was performed as follows.¹⁸ The mixtures were transferred from the NMR tubes into vials. Saturated aqueous NaHCO₃ and Et₂O were added to the mixtures and stirred vigorously for 5 min. Water (5 mL × 2) was added and extracted with CHCl₃. The organic phases were washed with 0.5 N HCl, dried with anhydrous Na₂SO₄, and concentrated. Each crude residue was purified by column chromatography over silica gel using CHCl₃–EtOAc (4:1) as eluent to give the (*R*)-MTPA ester (1.5–2.0 mg). NMR spectra in CDCl₃ were recorded after purification. Treatment of the same galphimines with (*R*)-(+)-MTPA chloride as described above yielded the (*S*)-MTPA esters.

(R)-MTPA ester of galphimine B (12r): white amorphous powder; [α]_D²⁵ +18° (c 0.2, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.52 (2H, m, phenyl-MTPA), 7.44 (3H, m, phenyl-MTPA), 5.60 (1H, q, $J = 6.6$ Hz, H-4), 5.17 (1H, brs, H-21), 4.40 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-24b), 3.86 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-24a), 1.30 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH₃-23); ¹H NMR (C₆D₆N, 300 MHz) δ 6.15 (1H, q, $J = 6.6$ Hz, H-4), 4.55 (1H, d, $J = 11.7$ Hz, H-24b), 4.02 (1H, d, $J = 11.7$ Hz, H-24a), 1.44 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH₃-23).

(S)-MTPA ester of galphimine B (12s): white amorphous powder; [α]_D²⁵ -24° (c 0.3, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.52 (2H, m, phenyl-MTPA), 7.44 (3H, m, phenyl-MTPA), 5.53 (1H, q, $J = 6.6$ Hz, H-4), 5.19 (1H, brs, H-21), 4.29 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-24b), 3.81 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-24a), 1.36 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH₃-23); ¹H NMR (C₆D₆N, 300 MHz) δ 6.07 (1H, m, H-4), 4.44 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-24b), 3.98 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-24a), 1.51 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, CH₃-23).

(R)-MTPA ester of galphimine E (13r): white amorphous powder; [α]_D²⁵ +12° (c 0.2, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.52 (2H, m, phenyl-MTPA), 7.44 (3H, m, phenyl-MTPA), 5.81 (1H, q, $J = 6.6$ Hz, H-4), 5.16 (1H, brs, H-21), 4.36 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-24b), 4.23 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-24a), 1.41 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH₃-23); ¹H NMR (C₆D₆N, 300 MHz) δ 6.38 (1H, q, $J = 6.6$ Hz, H-4), 4.64 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-24b), 4.48 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-24a), 1.70 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH₃-23).

(S)-MTPA ester of galphimine E (13s): white amorphous powder; [α]_D²⁵ -14° (c 0.3, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.52 (2H, m, phenyl-MTPA), 7.44 (3H, m, phenyl-MTPA), 5.71 (1H, q, $J = 6.3$ Hz, H-4), 4.27 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-24b), 4.18 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-24a), 1.48 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, CH₃-23); ¹H NMR (C₆D₆N, 300 MHz) δ 6.27 (1H, q, $J = 6.0$ Hz,

H-4), 4.55 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-24b), 4.44 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-24a), 1.77 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH₃-23).

Molecular Modeling Calculations. The molecular mechanics minimum energy structure of galphimine A (**3**) was generated using the MMX force field as implemented in the PCMODEL molecular modeling program V 6.00 (Serena Software, Box 3076, Bloomington, IN 47402-3076). The X-ray Cartesian coordinates of galphimine B (**1**)⁹ were used as the starting point for the molecular modeling calculations. A systematic conformational search for all the rings of **3**, according to Dreiding models, was achieved considering dihedral angle rotations of ca. 20° for those bonds that allowed such a movement. The E_{MMX} values were monitored throughout the calculation process.

Acknowledgment. This research was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (35459-B and 39951-Q) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN200902-2). Thanks are also due to "Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación" (Facultad de Química, UNAM) and especially to M. Gutiérrez, O. Yáñez, R. Isela Del Villar Morales, and G. Duarte for the recording of optical rotations, NMR, and mass spectra. We also thank Dr. C. Cerda-García-Rojas (CINVESTAV, Instituto Politécnico Nacional, Mexico) for critical discussions. A.T.C.T. acknowledges a research fellowship awarded by CONACyT to carry out postdoctoral studies ("Cátedra Patrimonial de Excelencia: Nivel II") at UNAM.

Supporting Information Available: Chromatographic profiles (HPLC and TLC) of the galphimine mixture investigated and NMR spectra for galphimine ring E double-bond isomers. This information is available free of charge via the Internet at <http://www.pubs.acs.org>.

References and Notes

- (1) Tortoriello, J.; Ortega, A. *Planta Med.* 1993, 59, 398–400.
- (2) Tortoriello, J.; Ortega, A.; Herrera-Ruiz, M.; Trujillo, J.; Reyes-Vazquez, C. *Planta Med.* 1998, 64, 309–313.

- (3) Toscano, R. A.; Ortega, A.; Maldonado, E.; Gabiño, R.; Lozoya, X.; Tortoriello, J. *Acta Crystallogr.* 1993, C49, 774–776.
- (4) Osuna, L.; Pereda-Miranda, R.; Tortoriello, J.; Villarreal, M. L. *Planta Med.* 1999, 65, 149–152.
- (5) Osuna, L.; Pereda-Miranda, R.; Villarreal, M. L. *Biotechnol. Lett.* 2002, 24, 257–261.
- (6) Stahl, E. *Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook*; Springer-Verlag: Berlin, 1969; pp 394–402.
- (7) Kubo, I.; Nakatsu, T. *LC-GC* 1990, 8, 933–939.
- (8) Hostettmann, K.; Marston, A.; Hostettmann, M. *Preparative Chromatography Techniques. Applications in Natural Product Isolation*; Springer-Verlag: Berlin, 1998; pp 67–69.
- (9) Abreu, H. S.; Braz, R.; Gottlieb, H. O.; Shoolery, J. *Phytochemistry* 1990, 29, 2257–2261.
- (10) Goetz, M. A.; Hensens, O. D.; Zink, D. L.; Borris, R. P.; Morales, F.; Tamayo-Castillo, G.; Slaughter, R. S.; Felix, J.; Ball, R. G. *Tetrahedron Lett.* 1998, 39, 2895–2898.
- (11) Camacho, M. R.; Phillipson, J. D.; Croft, S. L.; Marley, D.; Kirby, G. C.; Warhurst, D. C. *J. Nat. Prod.* 2002, 65, 1457–1461.
- (12) Haasnoot, C. A. G.; de Leeuw, F. A. A. M.; Altona, C. *Tetrahedron* 1980, 36, 2783–2792.
- (13) Cerda-García-Rojas, C. M.; Zepeda, L. G.; Joseph-Nathan, P. *Tetrahedron Comput. Methodol.* 1990, 3, 113–118.
- (14) (a) Rieser, M. J.; Hui, Y.-H.; Rupprecht, J. K.; Kozłowski, J. F.; Wood, K. V.; McLaughlin, J. L.; Hanson, P. R.; Zhuang, Z.; Hoye, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 10203–10213. (b) Fragoso-Serrano, M.; González-Chimeo, E.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* 1999, 62, 45–50. (c) Su, B.-N.; Park, E. J.; Mbwambo, H.; Santarsiero, B. D.; Mesecar, A.; Fong, H. H.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. *J. Nat. Prod.* 2002, 65, 1278–1282.
- (15) Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 4092–4096.
- (16) Angerhofer, C. K.; Guinaudeau, H.; Wongpanich, V.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. *J. Nat. Prod.* 1999, 62, 59–66.
- (17) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990, 82, 1107–1112.
- (18) Pereda-Miranda, R.; Hernández-Carlos, B. *Tetrahedron* 2002, 58, 3145–3154.

NP0304666

9. Apéndice

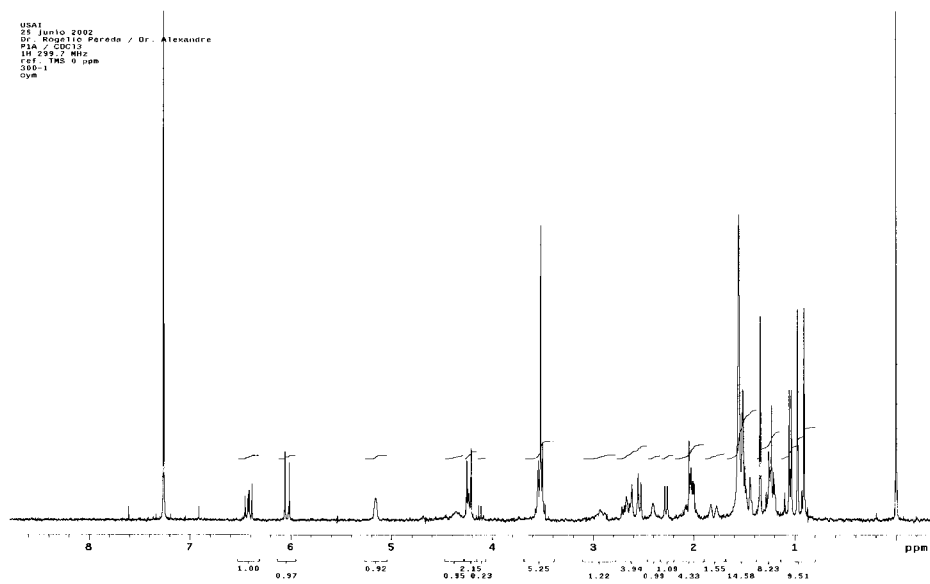


Fig. 9.1. Espectro de protones (^1H) del compuesto Δ^{20} Galfimina B.

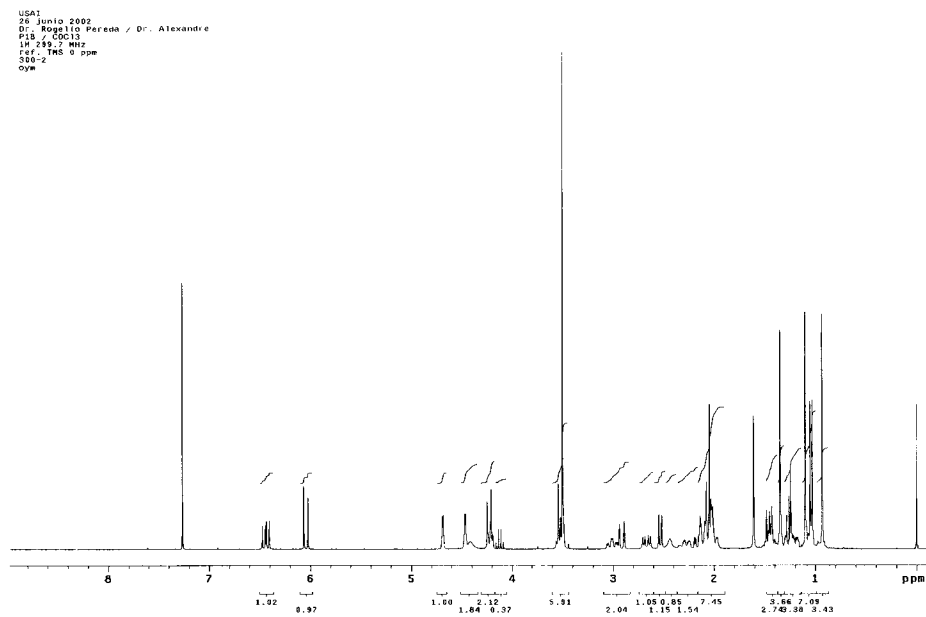


Fig. 9.2. Espectro de protones (^1H) del compuesto $\Delta^{20(29)}$ Galfimina B.

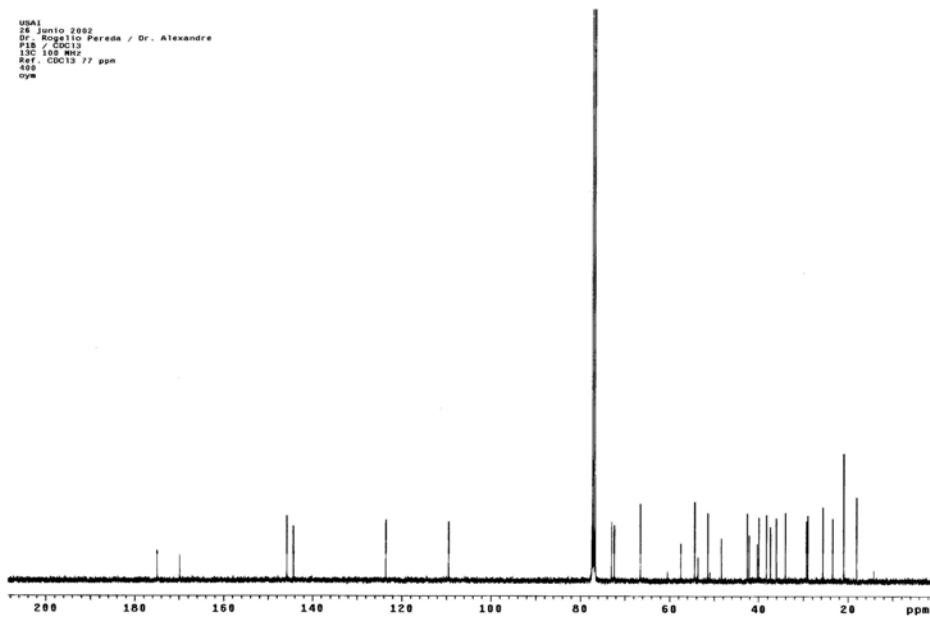


Fig. 9.3. Espectro ^{13}C del compuesto $\Delta^{20(29)}$ Galfimina B.

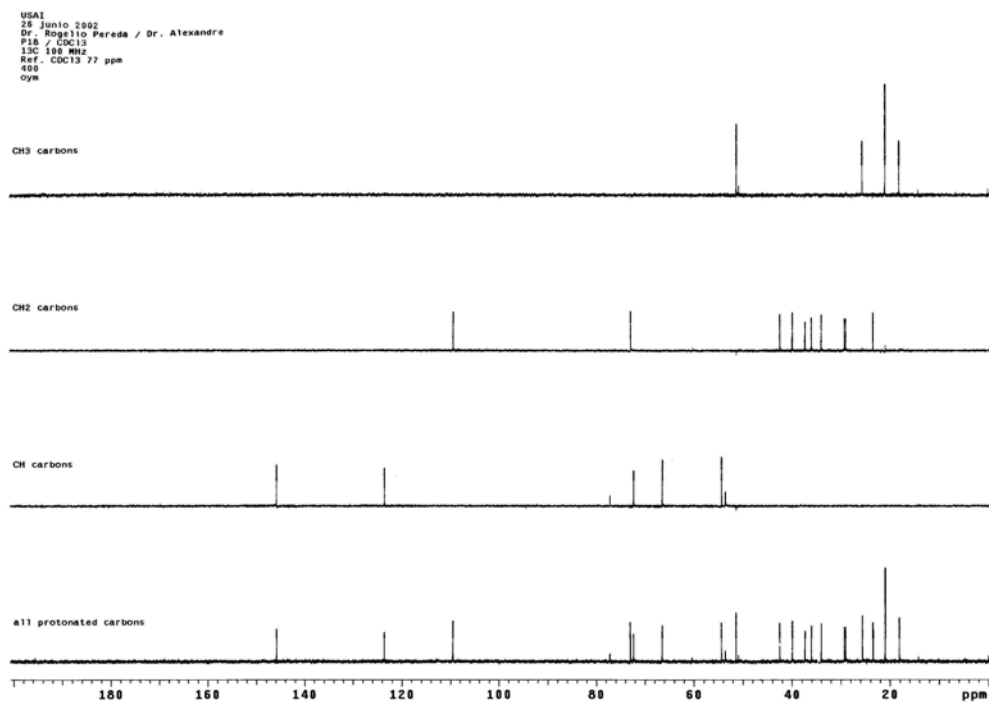


Fig. 9.4. Experimento DEPT de ^{13}C del compuesto $\Delta^{20(29)}$ Galfimina B.

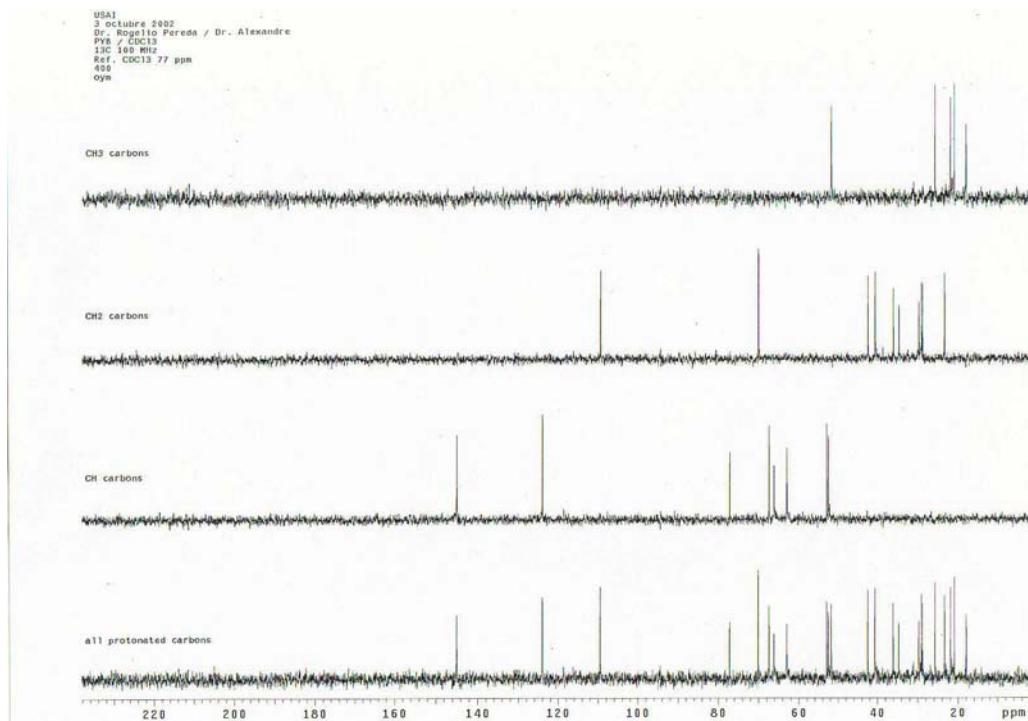


Fig. 9.5. Experimento DEPT de ^{13}C del compuesto Galfimina A.

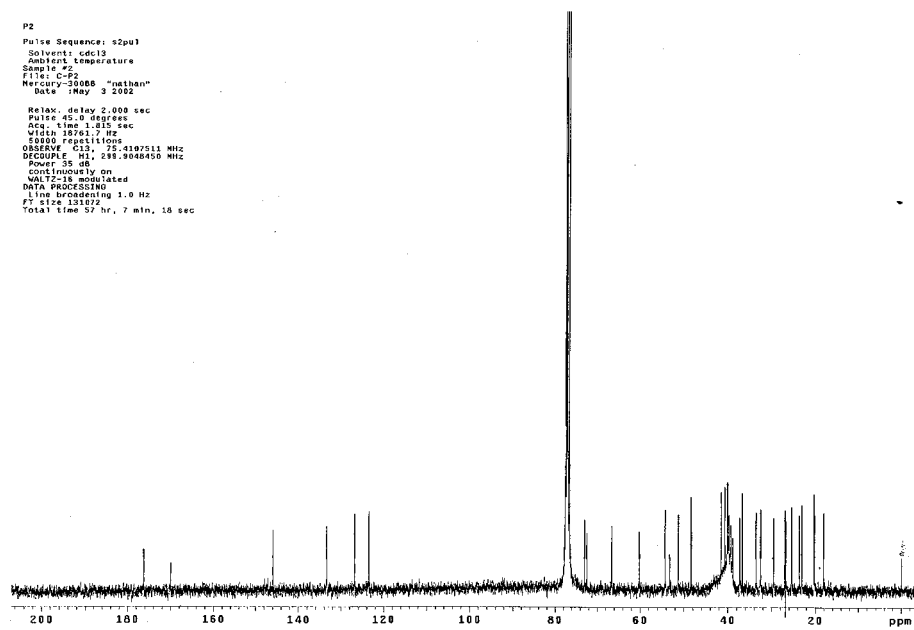


Fig. 9.6. Espectro de ^{13}C del compuesto Galfimina C.

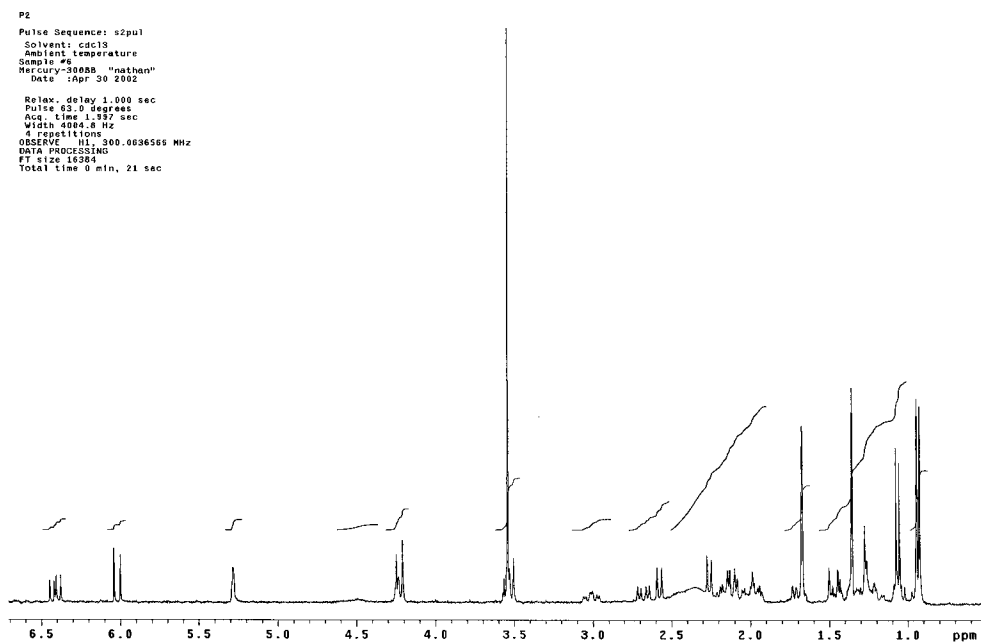


Fig. 9.7. Espectro de ^1H del compuesto Galfimina C.

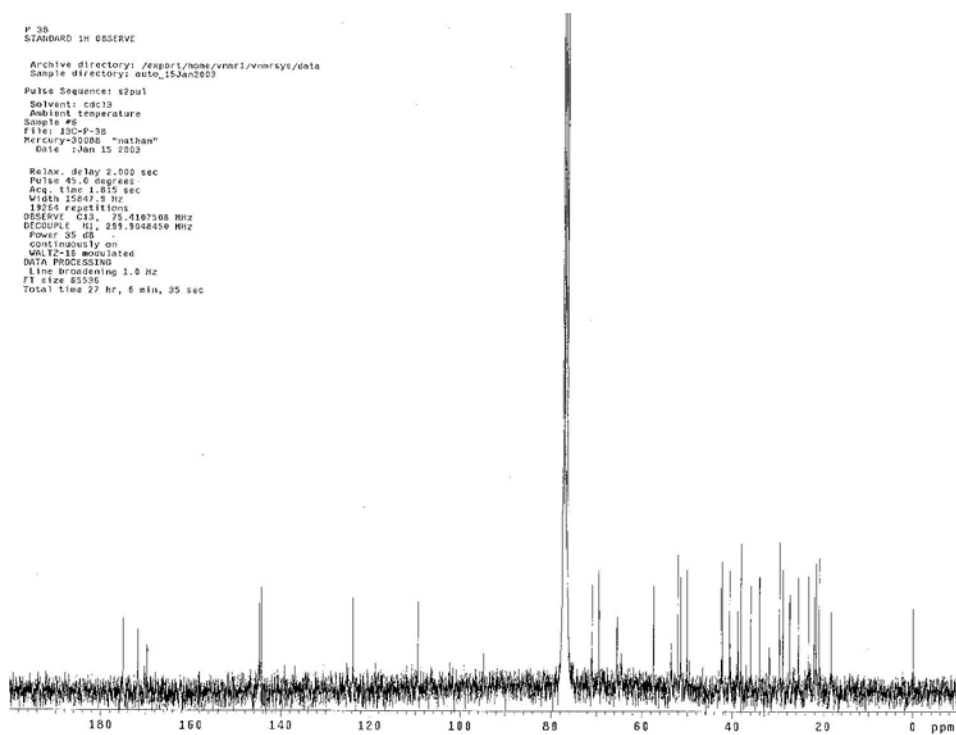


Fig. 9.8. Espectro de ^{13}C del compuesto Galfimina D.

USA1
31 Julio 2002
Dr. Rogelio Pereda / Alexandre
P48 / CDC13
1H 200.7 MHz
Ref.: TMS 0 ppm
200-2
cyn

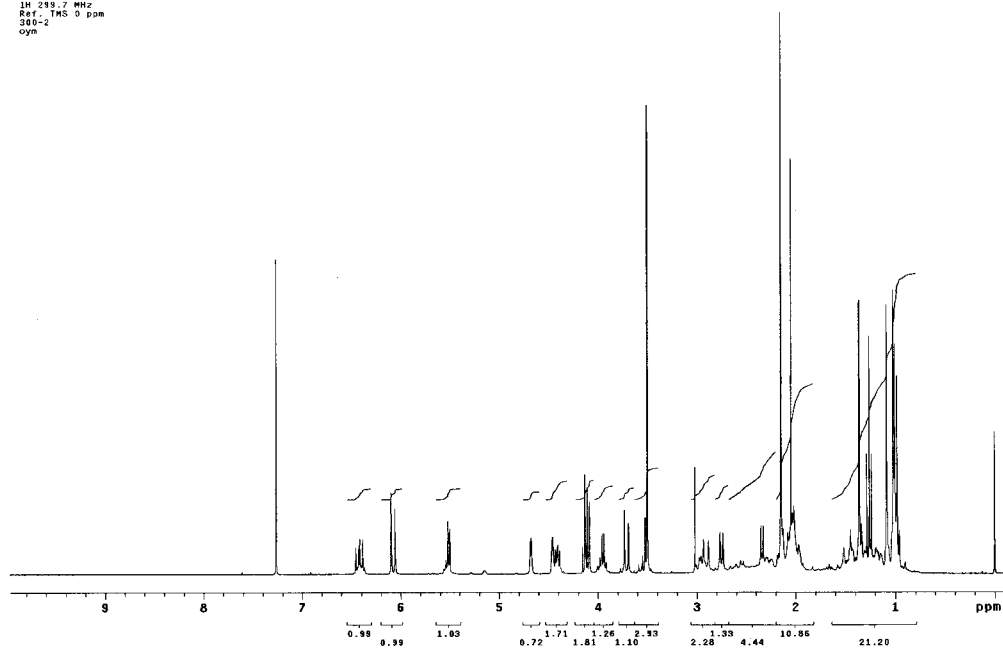


Fig. 9.9. Espectro de ^1H del compuesto $\Delta^{20(29)}$ Galfimina E.

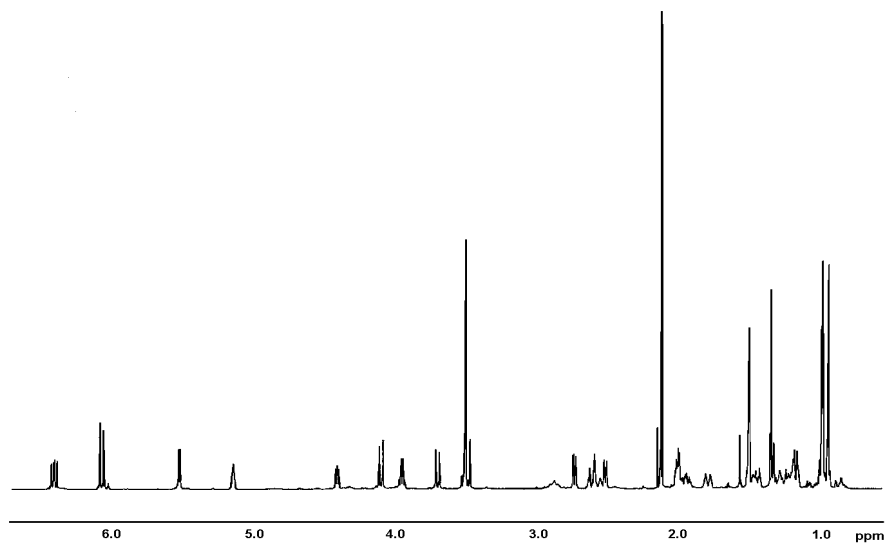


Fig. 9.10. Espectro de ^1H del compuesto Δ^{20} Galfimina E.

10. REFERENCIAS

- Breitmaier, E., Terpene-arome Dunfte Pharmaka. *Nat. Prods Chemistry*, Vol 3, University Science Book, 1983, (185-187).
- Camacho, M.R., Phillipson, J.D., Croft, S.L., Marley, D., Kirby, C., Warhust, D.C. *J. Nat Prod* **65** 1457 1561) 2002.
- Campos, M.G., Toxqui, E., Tortoriello, J., Oropeza, M., Ponce, H., Vargas, M. Montaña, L.M. *J. Ethnopath.* **74**, (7-15), 2001.
- Chen, D.F., Zhang, S.X., Wang, H., Zhang, S.Y., Sun, J. *Nat. Prod.* **62** (94-97) 1999
- Cragg, G.M., Newman, D.J., Snader .M. *J. Nat. Prod.* **60** (52-60) 1997
- Dai, J., Zhao, C., Zhang, Q., Li-Liu, Z., Zheng, R., Yang, L., *Phytochem.* **58** (1107-1111), 2001
- Dixon, R.A., *Nature*, **411**, (843-847), 2001.
- Haridas, V., Arntzen, C.J., Gutterman, J.U. *PNAS*, **98:20** (11557-11562) 2001
- Hostettmann, K., Marston, A., *Saponins*. Cambridge University Press. Cambridge, 1995
- Lee, M.K. Kim, Y.C. *J. Nat. Prod.* **64** (32-331) 2001.
- Ma, C.M., Naamura, N., Hattor auda H., Quao J.C., Yu. *J. Nat Prod.* **63** (23-242)
- Marciani, D.J., Press, J.B., Reynolds, R.C., Pathak, A.K., Pathak, V., Gundy, L.E., Farmer, J.T., Koratic, M.S., May, R.D. *Vaccine*, **18** (3141-3151), 2000.
- Mc Kee, T.C., Bokesh, H.R., Mc McCormick, J.L., Rashid, M.A., Spielvogel, D., Gustafson, K.R., Alavanja, M.M., Cardellina, J.H., Boyd, M.C., *J. Nat. Prod.* **60:5** (431-438) 1997.
- Morita, M., Shibuya, M., Kushiro, T., Masuda, K., Ebizuka, Y., *Eur. J. Biochem.* **267** (3453-3460), 2000.
- Nugroho L.H. Verpoorte. , *Plant cell tyss. Org. Cult.* **68** (105 –125) 2002.
- Osuna, L., Pereda, R., Tortoriello, J., Villarreal, M.L. *Planta Med.* **65**, (149-152), 1999
- Osuna, L., Pereda-Miranda, R., Villarreal, M.L., *Biotech. Lett.* **24**, (257-261) 2002
- Paré, P.W., Thumlinson, J.H. *Phytochem.* **47:4** (521-526), 1998.
- Quééré, L. Wenger, T. Schramn, J. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* **227** (44-48) 1996.
- Ruan, B., Shey, J., Gerst, N., Wilson, W., Shroepfer, G.J. Jr., *Proc. Nat. Acad. Sci.* **93** (11603-11609), 1995.
- Segura, M.J.R., Meyer, M.M., Matsuda, S.P.T., *Org. Lett.* **2:15** (2257-2259)
- Seidl, P.R., *Ann. Braz. Acad. Sci.* **74:1** (145-150) 2002
- Shibuya, M., Zhang, H., Endo, A., Shishikura, K., Kushiro, T. Ebizuka, Y., *Eur. J. Biochem.* **266** (302-307), 1999.
- Shu Y.Z., *J. Nat. Prod.* **61** (1053-1071) 1998.
- Stryer L. *Biochemistry*. Freeman W.H. & Co. (66 712) 1998.
- Tortoriello, J, Lozoya, X., *Planta Med.* **58**, (232-236), 1992.

- Trapp, S.C., Croteau, R.B., *Genetics*. **158**, (811-832), 2001
- Wang, H.B., Mayer, R., Rucker, G., Yang, J.J., Matteson, D.S., *Phytochem.* **47:3** (467-470)
1998