

NUEVAS SAPOGENIAS ESPIROSTANICAS

POR

RICARDO DIAZ FERNANDEZ DE MISA



## INTRODUCCION GENERAL

El gigantesco incremento experimentado por la química de los esteroides y los avances espectaculares en el campo de la Medicina, han puesto de manifiesto la existencia de grandes analogías entre algunas de las complicadas moléculas que se encuentran en el mundo vegetal y otras que desempeñan un papel esencial en el organismo humano. Igualmente, se ha comprobado que una variación en la cantidad en que dichas sustancias deben encontrarse en el organismo o en su naturaleza pueden causar alteraciones físicas y psíquicas que se pueden combatir restableciendo el equilibrio desde el exterior.

Estos compuestos tienen de común la posesión de un esqueleto formado por el ciclopentanofenantreno, distinguiéndose unos de otros en determinadas características estructurales.

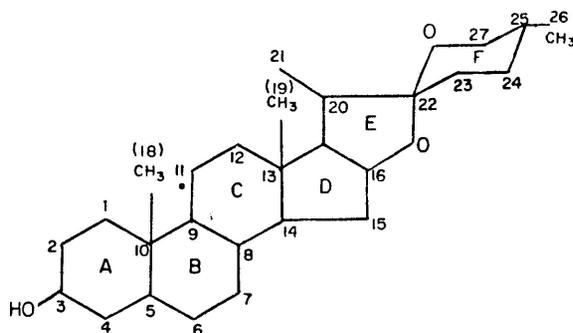
En algunas familias botánicas se observa la presencia de agrupamientos muy parecidos formando parte de moléculas más complejas. Por ello, el hombre se ha valido de éstas para obtener aquéllos. Un caso común es el de los glucósidos, que se componen de una o varias moléculas de azúcar y de una sustancia diferente, aglucona o genina, de estructura y magnitud molecular muy variable.

Algunos glucósidos vegetales poseen la propiedad específica de formar espumas jabonosas en agua y son conocidos como saponinas; entre ellos se encuentran los glucósidos cardioactivos, que debido a su acción fisiológica se estudian bajo la denominación específica de cardenólidos.

Las saponinas vegetales, no cardioactivas, procedentes de algunas plantas, han encontrado uso como detergentes, medicamentos, agentes espumantes en extintores de incendios y, en virtud de su poder hemolítico, como veneno para los peces. Este poder se debe a que modifican la tensión superficial de los eritrocitos con destrucción de su estructura y liberación de hemoglobina. Las saponinas, que no son tóxicas para el hombre por vía oral, debido probablemente a que el intestino no es capaz de absorverlas, están constituidas por azúcares y por un núcleo de naturaleza esteroideal o triterpénica.

Para comprobar la presencia de las saponinas se utiliza su facultad de hemólisis (1), lo que no aporta nada sobre su naturaleza, pues es una propiedad común a las esteroidales y triterpénicas.

Han aparecido y aparecen muchos trabajos en los que se prescinde de la separación de las saponinas y se atiende al estudio de sus productos de hidrólisis ácida, las sapogeninas.



Las geninas esteroidales producen, por deshidrogenación con selenio, el 3'metil-1,2-ciclopentano fenantreno o hidrocarburo de Diels, mientras las segundas producen naftaleno y piceno (2), (3), reciben el nombre específico de sapogeninas, y su esqueleto contiene 27 átomos de carbono en las de carácter esteroestánico y 30 en las triterpénicas. La estructura general de una sapogenina esteroestánica se representa en la figura 1. Su característica más importante es la presencia de dos átomos de oxígeno etéreos, que forman parte de dos ciclos distintos, uno pentagonal y otro hexagonal, agrupamientos que se denominan «esteroestanos». Todas las geninas de esta serie descritas en la bibliografía, presentaban un grupo alcohólico sobre  $C_3$ , hasta que C. P. Maiti y Sipra Mookherjea (4) descubrieron en el *Solanum hispidum Pers* la «hispidogenina», que posee un grupo cetónico en  $C_3$ . Esta genina parece idéntica a una aislada por nosotros de *A. umbellatus Link*. Pueden presentarse, además, funciones alcohólicas sobre los  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_{11}$ ,  $C_{12}$ ,  $C_{13}$ ,  $C_{16}$  y  $C_{17}$ , así como funciones cetónicas en  $C_3$ ,  $C_{11}$  y  $C_{12}$ . En los compuestos de este tipo aparecen problemas estereoquímicos sobre los carbonos  $C_{20}$ ,  $C_{22}$  y  $C_{25}$ . Particularmente interesantes son los isómeros en  $C_{25}$ , pues dan lugar a dos series denominadas «cis» y «trans», utilizándose la designación «neo», normal, 25 B o 25 L para las geninas de la serie «cis» y las de «iso» o 25 D para las geninas de la serie «trans».

El origen de las sapogeninas es esencialmente vegetal. Se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes especies de Agaves (5), Dioscóreas (6), Yucas (7), Digitalis (8), (9), Asparagus (10), Smilax (11) y otras, y su presencia en preparados comerciales fue señalada por Schmie-

deberg en 1875. En los últimos años las sapogeninas han recibido una atención creciente debido a la síntesis de hormonas sexuales (12), (13), (14) y cortisona. La síntesis que ha servido para la obtención de hormonas tuvo su punto de partida en la reacción descubierta por Marker, de formación de pseudosapogenina por apertura del anillo F.

Debido en gran parte a los trabajos de Marker y cols. (15) ha sido establecida correctamente la mayoría de las estructuras de estos compuestos. Desafortunadamente, los datos sobre el aislamiento e identificación de estos compuestos son escasos, los procedimientos seguidos omiten detalles, son difíciles de reproducir y hacen poco uso de las técnicas modernas.

Una descripción típica de aislamiento e identificación de sapogeninas ha sido hecho por E. Wall y col., del Eastern Regional Laboratory (16).

El mejor método para la separación de geninas, o de sus acetatos, es la cromatografía en columna.

R. Tachesche y Wulf (17) indican haber logrado la separación de las formas «neo» e «iso» de acetatos de dihidroxisapogeninas por cromatografías sobre alúmina neutra.

Las cromatografías sobre papel se han utilizado con éxito variable para la separación rápida e identificación de sapogeninas. En las primeras, Sannié y Lapin (18) utilizaron mezclas de éter de petróleo, cloroformo y ácido acético como eluyentes, E. Wall y otros autores han empleado fases estacionarias no acuosas. Sin embargo, aun en condiciones experimentales muy estrictas no se obtienen buenas separaciones de los isómeros «neo» e «iso», ni una reproductibilidad aceptable de los resultados.

La cromatografía en capa fina se ha empleado también en la separación e identificación de sapogeninas (19), en sus variantes de absorción y partición. Un trabajo reciente (20) recomienda el uso del agua como fase estacionaria y diferentes mezclas de eluyentes, según las separaciones que se persigan.

Horning y Van den Huevel (21) han publicado la cromatografía en fase gaseosa para la separación de sapogeninas, pero este método no es capaz de resolver mezclas de isómeros en  $C_{25}$ .

Para una investigación rápida de estas sustancias, Djerassi y cols. (22) y E. Wall y col. (23) han propuesto un método basado en las características del espectro ultravioleta del cromóforo que se forma al tratar la genina con solución de ácido sulfúrico al 90%, durante 16 horas a 40 °C, cuyos máximos y coeficientes de extinción son característicos de cada genina y proponen una marcha analítica para la identificación de las sapogeninas más corrientes.

La espectrografía I.R. se muestra particularmente útil en este campo, ya que la presencia de un agrupamiento espirostánico se refleja notable-

mente en la región situada entre los  $800\text{ cm}^{-1}$  y los  $1000\text{ cm}^{-1}$ , presentando una serie de bandas características situadas a los  $982$ ,  $920$ - $915$ ,  $899$ - $894$  y  $863$ - $857\text{ cm}^{-1}$ ; el espectro del acetato de la genina debe determinarse en solución de  $\text{S}_2\text{C}$  o  $\text{Cl}_3\text{CH}$ , pues así se consigue mejor resolución. Como el espectro de los glucósidos muestra la presencia de las bandas citadas (24), éstas demuestran inequívocamente la presencia de una sapogenia esteroideal.

En las sapogeninas de la serie «neo», la banda a  $920\text{ cm}^{-1}$  es tres o cuatro veces más intensa que la situada a  $900\text{ cm}^{-1}$ . En la serie «iso», la banda a  $900\text{ cm}^{-1}$  es, aproximadamente, dos veces más intensa que la situada a  $920\text{ cm}^{-1}$ . La existencia de una banda a  $857\text{ cm}^{-1}$  en el primer caso, a  $863\text{ cm}^{-1}$  en el segundo, contribuyen a esclarecer la situación.

En los derivados acetilados de las monohidroxisapogeninas la isomería en el  $\text{C}_5$  puede ser estudiada por esta técnica. Una banda sencilla a  $1242$ - $1244\text{ cm}^{-1}$  indica la presencia de una configuración «trans» en los anillos A/B, o de una insaturación; varias indican configuración «cis».

Jones y col. (25) han realizado un estudio muy extenso de los espectros I.R. de las sapogeninas. E. Wall y col. (26) publicaron un estudio muy completo de la zona comprendida entre los  $700\text{ cm}^{-1}$  y los  $1400\text{ cm}^{-1}$  de los espectros infrarrojos de los acetatos de doce de las sapogeninas más usuales, y la comprendida entre los  $3100$  y los  $2750\text{ cm}^{-1}$ , y en una publicación posterior (27) se exponen los resultados obtenidos del estudio de los espectros I.R. empleando un doble monocromador con prismas de fluoruro de litio, de unas cuarenta sapogeninas esteroideales y de sus derivados acetilados. El objetivo principal de esta investigación fue relacionar la absorción de tensión en la región C—H con las características estructurales de la molécula. Estos autores encontraron, además de las bandas que pueden ser atribuidas a vibraciones de «tensión» de los grupos  $=\text{C—H}$ ,  $-\text{CH}_2$  y  $-\text{CH}_3$ , otros máximos de absorción u hombros que no pueden ser asignados a vibraciones normales de los grupos aislados. La mayoría de estas bandas eran, por añadidura, muy sensibles a cambios en el esqueleto carbonado. En muchas ocasiones se observa una marcada diferencia entre las configuraciones 25 D y 25 L, detectándose incluso las aberturas de los anillos E y F.

En el curso del estudio de innumerables plantas en busca de sapogeninas esteroideales era imperativo encontrar un método que permitiera detectar y estimar rápidamente dichos compuestos, problema resuelto con éxito por E. Wall y col. (1), quienes llegaron a la conclusión de que las sapogeninas esteroideales pueden ser detectadas y su cantidad estimada a partir de determinadas bandas de los espectros I.R., altamente específicas de estos compuestos.

En una mezcla de sapogeninas «iso» y «neo» se puede conocer la proporción relativa de ambas a partir de las relaciones entre las superficies de las bandas de  $920$  y  $900\text{ cm}^{-1}$  (28), (29); esta relación tiene un

valor de 0,60 para los acetatos de la serie «iso» y de 2,8 a 2,9 para los de la serie «neo» (*loc. cit.*).

Para la determinación de la cantidad de sapogeninas presentes en una muestra se hace uso de la adsorptividad específica correspondiente a la banda situada a los  $982\text{ cm}^{-1}$ . Esta constante tiene un valor de 0,53 litro/g para el acetato de diosgenina, de 0,63 para el acetato de sarsasapogenina y de 0,58 para acetatos de mezclas de ambas series. Tschesche y col. (*loc. cit.*) han construido curvas de calibrado, determinando las superficies correspondientes por pesada de una hoja de aluminio recortada según el contorno de la superficie, introduciendo una corrección en caso de solapamiento.

Ordinariamente las monohidroxisapogeninas funden por debajo de los  $210\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Un valor más alto indica la presencia de grupos cetónicos o polihidroxiolos. Sin embargo, la presencia de impurezas en muy pequeñas cantidades hace variar grandemente el punto de fusión. Por ello, la medida de la rotación específica es muy importante. Una rotación fuertemente negativa indica la presencia de insaturación en el  $\text{C}_5$ .



## PARTE EXPERIMENTAL GENERAL

Los puntos de fusión no están corregidos. Las actividades ópticas han sido determinadas en cloroformo, salvo las que se indican en el texto, usando un polarímetro Bellingham & Standley o Perkin-Elmer modelo 141, los espectros ultravioleta han sido realizados en un espectrógrafo Perkin-Elmer 137 U.V., los infrarrojos en los modelos 137 I.R. y 237 I.R. y las cromatografías en fase gaseosa en un aparato «PYE-Chromatography». Donde se informa «el precipitado y los filtrados procedentes de la hidrólisis fueron extraídos del modo habitual» debe entenderse que las extracciones con los disolventes fueron realizadas del precipitado por ebullición a reflujo sobre baño de agua y del filtrado por agitación.

Cuando se indica «los extractos fueron lavados y concentrados de la manera acostumbrada» debe entenderse que fueron agitados repetidas veces con agua, solución de carbonato sódico aproximadamente 2N (o solución de hidróxido sódico aproximadamente al 3%) y agua nuevamente, secados sobre sulfato sódico anhidro, filtrados y la mayor parte del disolvente destilado a vacío sobre baño de agua y a unos 40-45 °C.

Los análisis fueron hechos en el Departamento de Microanálisis del Instituto «Alonso Barba», que dirige el Dr. Calderón, a quien expresamos nuestro agradecimiento.

En las cromatografías en columna se empleó como absorbente alúmina estandarizada según Brockmann, exceptuándose los casos que se indican, y en las capas finas, siempre que no se diga otra cosa, cloroformo como eluyente, ácido clorosulfónico al 20% en ácido acético glacial como revelador, Kiesselgel G. como absorbente y exposición a la luz U.V. Los eluyentes se designan de acuerdo con el cuadro siguiente:

Eluyente	Denominación
Cloroformo + 20% acetona ... ..	A
Cloroformo + 5% acetona ... ..	B
Cloroformo : benceno (1 : 1) ... ..	C
Cloroformo ... ..	D
Cloroformo + 1% acetona ... ..	E
Cloroformo + 5% metanol ... ..	F
Benceno : acetona (5 : 1) ... ..	G
Acetato de etilo ... ..	H



## CAPITULO I

# ASPARAGUS ALBUS LINKS

Marker (11), Rao (30), (31), (32), (33), Stevenson (34), Candela y Villar Palasí (35), Rabassa (36) y Dávila (37) estudiaron diversos *Asparagus*. R. Laoarga y M. Pinar (38) han publicado recientemente un estudio sobre esta planta, aislando únicamente sarsasapogenina con un rendimiento de 9,2 g/kg de raíces y 0,22 g/kg de tallos y hojas, dejando los frutos sin investigar.

Nosotros iniciamos el estudio de las geninas contenidas en los frutos e investigamos nuevamente raíces recolectadas en invierno en Candelaria.

Los frutos fueron extraídos y los extractos concentrados del modo habitual. Por hidrólisis y posteriores extracciones se aislaron pequeñas cantidades de productos que sólo permitieron análisis comparativos por TLC.

Las raíces frescas fueron trituradas, separándose un jugo que fue investigado independientemente de la masa restante, hidrolizándolo directamente y aislándose, de la extracción bencénica, 2,4 g de una sapogenina que dio coloración con los reactivos de Liebermann-Burchard y Salkowsky (39), de P.F. 199-200 °C y cuyas características, las de su derivado acetilado y benzoilado y su reacción de isomerización la identifican como sarsasapogenina (40), (41), (42), (43), (44), (45), determinándose su tiempo de retención en GLC (46).

De la extracción bencénica del precipitado obtenido por la hidrólisis de los extractos obtenidos de las raíces trituradas se aislaron 0,35 g de una sapogenina identificada como sarsasapogenina.

Finalmente, se intentó resolver por medio de GLC una mezcla de la genina aislada y smilagenina enviada por el Dr. Giral. Se observó que cuando la smilagenina se cromatografía sola se obtiene un tiempo de retención determinado (46) y cuando se la cromatografía junto con sarsasapogenina se obtiene un solo pico, con el tiempo de retención de esta última, separándose ambas de la tigogenina.



## CONCLUSIONES

1. Se repiten los trabajos realizados por varios investigadores sobre las sapogeninas espirostánicas contenidas en las raíces de *Asparagus albus Links* y se estudia por vez primera el contenido en sapogeninas de sus frutos.

2. Se aísla y se caracteriza, en todos los ensayos realizados, exclusivamente *sarsasapogenina*, de acuerdo con la literatura, con un rendimiento de 0,5 g por kg de raíces secas y de 1 g por litro de jugo obtenido por trituración de las raíces frescas. En los frutos sólo se encontraron trazas de *sarsasapogenina*.

3. Por primera vez se estudian las geninas del insaponificable del *Asparagus umbellatus Links*, especie exclusiva de Canarias. Se obtuvo una mezcla de esteroides con un rendimiento de 5,5 g por kg de raíces frescas.

4. Del insaponificable del *Asparagus umbellatus Links* se aisló y caracterizó  $\beta$ -sitosterol, y las sapogeninas espirostánicas *tigogenina* y *hecogenina* obtenidas por vez primera de la familia de los *Asparagus*.

5. De un estudio comparativo hecho con los insaponificables de ejemplares silvestres de *Asparagus umbellatus Links* recolectados en época de verano e invierno se concluyó que esta especie contiene en invierno exclusivamente *tigogenina* y *hecogenina*, mientras que en la temporada de verano estas dos geninas van acompañadas de pequeñas proporciones de otras, que podemos considerar como sapogeninas secundarias.

6. Dos de las sapogeninas secundarias del *Asparagus umbellatus Links* presentan en cromatografías en capa fina un desplazamiento intermedio entre la *tigogenina* y la *hecogenina*. Otras sapogeninas secundarias presentan un desplazamiento ligeramente superior al de la *tigogenina* y las restantes inferior al de la *hecogenina*.

7. De las dos sapogeninas secundarias del *Asparagus umbellatus Links* que tienen un desplazamiento intermedio entre la *tigogenina* y *hecogenina* se aisló y estudió una de ellas, que fue identificada como *hispidogenina*, obtenida por primera vez por C. P. Maiti y S. Mookherjea del *Solanum hispidum Pers.*, en 1965.

8. Por primera vez se estudian las sapogeninas del *Asparagus falcatus* Links, especie exótica cultivada en Canarias como ornamental. Esta especie contiene una sola sapogenina espirostánica, la *sarsasapogenina*.

9. Por primera vez se estudian las sapogeninas espirostánicas del *Asparagus scoparius* Links endemismo del archipiélago canario. Recolectado en verano se obtiene un insaponificable que, en cromatografías en capa fina, muestra mayor número de esteroides que cuando se obtiene de ejemplares recogidos en invierno.

10. Del insaponificable del *Asparagus scoparius* Links se han aislado y estudiado las sapogeninas *tigogenina* y *hecogenina*.

11. Partiendo de ejemplares cultivados en el Jardín Botánico de la Orotava, se inicia por vez primera el estudio de las sapogeninas de las raíces del *Asparagus sprengeri* Links, obteniéndose una mezcla de esteroides que se comporta en cromatografías en capa fina de forma diferente a la de las sapogeninas que se han aislado de otras especies.

12. Se estudia el comportamiento de las sapogeninas espirostánicas en cromatografía gas-líquido, hallándose una fase capaz de separar sapogeninas de punto de fusión muy próximos y diferente serie.

13. Por primera vez se ensaya el efecto emulsionante de las sapogeninas espirostánicas en aceites minerales. Se halla que la *sarsasapogenina*, en pequeñas cantidades, provoca una gran mejoría en la capacidad de expulsión del aire disperso en aceites minerales ligeros de base parafínica.

## PARTE EXPERIMENTAL

**Material de partida.** Frutos y raíces silvestres recolectados en noviembre y diciembre de 1959.

**Extracción de los frutos.** 2,4 kg de frutos frescos, humedad 79%, fueron divididos en lotes de 600 g molidos y extraídos dos veces cada uno con 2 litros del alcohol de 85-90% calentando a reflujo 2 horas; después fueron extraídos nuevamente con 2 litros de alcohol al 80%. Los extractos fueron filtrados, para separar el sedimento formado, que fue desechado, y, reunidos, se concentraron a vacío y a unos 40 °C, hasta que la espumación lo impidió. El concentrado frío se agitó con gel de sílice y se filtró, lavándose la torta de filtración varias veces con pequeños volúmenes de alcohol al 50% que se unieron al concentrado, obteniéndose 2 200 cc. de extracto.

**Desengrase e hidrólisis de una parte de los extractos alcohólicos concentrados de los frutos e identificación de la genina aislada.** 900 cc fueron desengrasados en un extractor líquido-líquido durante 18-20 horas con benceno saturado de alcohol al 50%. Los extractos bencénicos fueron lavados dos veces con la mitad de su volumen de alcohol al 50% y las capas alcohólicas unidas al concentrado desengrasado.

Se hidrolizó el extracto calentando a reflujo durante 3 horas con 200 cc de ácido sulfúrico al 5%, y filtrando y diluyendo con agua hasta el doble aproximadamente de su volumen; se le dejó en reposo 24 horas.

El precipitado obtenido se extrajo en un soxhlet con éter de petróleo, benceno y cloroformo, sucesivamente. Los extractos se lavaron, secaron y destilaron de la manera acostumbrada, los residuos se disolvieron en metanol, se filtraron y cristalizaron.

El filtrado hidrolizado se extrajo con los mismos disolventes y orden, lavándolos, secándolos, destilándolos, disolviendo los residuos en metanol y filtrándolos.

Se llegó, en ambos casos, a cantidades muy pequeñas de productos, cuyo comportamiento en TLC es análogo al del producto aislado a partir de la extracción bencénica del jugo de las raíces hidrolizadas.

**TLC.** Los productos aislados fueron cromatografiados separadamente empleando como eluyente el sistema D, obteniéndose, a la misma altura, manchas amarillas poco definidas, con intensa fluorescencia a la luz U.V. Eluyendo con el sistema F se obtuvo un solo punto para cada producto, situados todos a la misma altura que la sarsasapogenina empleada como referencia. Mezclas de estos productos con sarsasapogenina producen un solo punto.

**Investigación de las raíces. Extracciones.** Los tres litros de líquido obtenido al triturar las raíces fueron hidrolizados por adición de 100 cc de ácido clorhídrico conc. y ebullición durante 4 horas, después de haber sido agitados con Kiesselgur y filtrados. Los extractos hidrolizados fueron diluidos al doble de su volumen con agua, dejados en reposo un día y filtrados.

El precipitado separado, extraído con benceno y cloroformo, en un soxhlet, el filtrado por agitación con estos mismos disolventes. Los extractos obtenidos fueron lavados y concentrados de la manera acostumbrada después que las aguas de lavado fueron extraídas con pequeñas cantidades de benceno y cloroformo y añadidos a los extractos correspondientes.

**Investigación del producto extraído por el benceno.** Se obtuvieron 2,4 g de producto que por sucesivas cristalizaciones en acetona forma largas agujas prismáticas de P.F. 198-200 °C, ligeramente soluble en benceno, cloroformo y metanol, muestra una actividad óptica  $[\alpha]_D^{20} = -75,3^\circ$  ( $c=1,437$ ).

Se obtuvo 1 g de genina por litro de jugo.

**Reacciones coloreadas.** Liebermann-Burchard: coloración rojiza en la capa sulfúrica y amarillo-verdosa en la del anhídrido acético con fluorescencia intensa a la luz ultravioleta.

Salkowsky: coloración amarilla de la capa clorofórmica; la capa sulfúrica toma el mismo color, pero a las 2-4 horas adquiere una coloración roja. Con ácido sulfúrico concentrado toma color amarillo intenso.

#### **Análisis:**

Calculado para  $C_{27}H_{44}O_3 \cdot H_2O$ : C, 74,65; H, 10,59%.

Hallado: C, 74,59; H, 10,55%.

**GLC.** Se muestra pura con un tiempo de retención de 23,6 min a 240 °C en las condiciones siguientes: columna 3-4% silicona; flujo de gas argón: 27 cc por minuto; tiempo de carta: seis pulgadas hora; presión: 16,5 psi; voltaje: 1500; sensibilidad: X 10.

**Espectro I.R.** Efectuado en nujol presenta varias bandas fuertes entre los 1350  $\text{cm}^{-1}$  y los 875  $\text{cm}^{-1}$ , características de las cadenas laterales espirostánicas, una banda a los 915  $\text{cm}^{-1}$  cuatro o cinco veces más intensa que la de 895  $\text{cm}^{-1}$  y la correspondiente al grupo alcohólico libre a 3900  $\text{cm}^{-1}$ .

**Espectro U.V.** No presenta absorción.

**Derivado acetilado.** 1,0 g tratado con un exceso de anhídrido acético (5 cc), y de acetato sódico anhidro (0,2 g), fue hervido a reflujo durante 3 horas. La solución fría fue vertida sobre otra de bicarbonato sódico e hidrolizado el exceso de anhídrido acético, se separó el producto precipitado y se le lavó con solución de bicarbonato sódico. El derivado cristalizó en acetona en forma de agujas planas de P.F. 144-145 °C, mostrando una actividad  $[\alpha]_D^{20} = -63,0$  ( $c = 2,054\%$ ).

**Análisis:**

Calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : C, 73,10; H, 10,08%.

Hallado: C, 73,32; H, 10,06%.

**Espectro I.R.** Además de las absorciones ya indicadas, presenta las correspondientes al acetilo introducido.

**Derivado benzoilado.** A una solución de 100 mg en 7 cc de piridina anhidra le fue añadido un exceso de cloruro de benzoilo, la disolución resultante, calentada sobre baño de vapor durante 2 horas, vertida sobre agua fría y la mezcla extraída con éter sulfúrico. La solución etérea fue lavada sucesivamente con ácido clorhídrico diluido, solución de carbonato de sodio y agua, el éter destilado sobre baño de vapor y el residuo cristalizó en metanol en forma de varillas, de P.F. 170-171 °C.

**Reacción de isomerización.** A una disolución hirviente de 0,9 g del producto aislado en 90 cc de etanol al 95% le fue añadida una mezcla de 60 cc de etanol al 95% y 27 cc de  $\text{ClH}$  concentrado. Después de cinco días de reflujo sobre baño de vapor, se añadieron 17 cc de ácido clorhídrico concentrado y se continuó la ebullición durante un día más. La solución fue vertida sobre agua, la mezcla resultante extraída con éter sulfúrico y el extracto etéreo lavado con agua, secado sobre sul-

fato sódico anhidro y evaporado sobre baño de vapor. El residuo, cristalizado en acetona, formó agujas sedosas de P.F. 184-185 °C.

Un P.F. mixto con sarsasapogenina mostró una depresión de unos 15 °C.

**Análisis:**

Calculado para  $C_{27}H_{44}O_3 \cdot H_2O$ : C, 77,8; H, 10,6%.

Hallado: C, 77,7; H, 10,6.

**Espectro I.R. del producto isomerizado.** Muestra las absorciones típicas de las isosapogeninas.

**Extracción clorofórmica del precipitado obtenido por hidrólisis del jugo.** Se procedió de manera análoga obteniéndose 0,6 g de producto de P.F. 198-200 °C, cristalizado en acetona, cuyo P.F., mixto con el obtenido de la extracción bencénica, no experimentó depresión. Sus espectros I.R. son superponibles.

**Extracción e hidrólisis de las saponinas de las raíces secas. Identificación de la genina.** 750 g de raíces secas fueron extraídas por ebullición a reflujo con 10 litros de alcohol, concentrándose después los extractos, sobre baño de vapor a vacío y a unos 45 °C, hasta 900 cc. Estos extractos fueron agitados con tierra decolorante, filtrados e hidrolizados como se ha indicado anteriormente, siendo extraídos, precipitados y filtrados con benceno y cloroformo.

Los extractos fueron lavados, secados, destilados y evaporados de igual forma. De la extracción bencénica se obtuvieron 0,35 g de producto, identificado también como sarsasapogenina, lo que representó un rendimiento de 0,46 g/kg de raíces secas.

**Cromatografía en fase de vapor del producto aislado a partir del *Asparagus Albus Links*.** Se describen las cromatografías del producto de P.F. 198-200 °C aislado del *Asparagus Albus Links*, del producto obtenido en la isomerización de éste, de la smilagenina enviada por el Dr. Giral, de Laboratorios Farquinal, México D.F., y de tigogenina, de L. Light & Co. Ltd.

a) El cromatograma mostró para el producto aislado un tiempo de retención de 23,6 min a 240 °C referidos al colestano.

b) El del producto obtenido por isomerización muestra una mezcla de tres componentes, dos de ellos en muy pequeña cantidad y en proporciones análogas, cuyos tiempos de retención son 10,0 y 10,2 min, y un tercero en mayor proporción que muestra un tiempo de retención de 18,6 min a 244 °C.

c) La cromatografía de la tigogenina, la muestra pura con un tiempo de retención de 27,0 min a 239 °C.

d) La smilagenina muestra un tiempo de retención de 16,5 min a 248 °C.

e) Cromatografía hecha a una mezcla del producto identificado como sarsasapogenina y del obtenido por isomerización de ésta:

El cromatograma muestra dos picos con un tiempo de retención de 13,2 y 13,4 min a 242 °C, que son comparables con los que en b) muestran un tiempo de retención de 10,0 min y 10,2 min a 244 °C. Además, muestra un pico más con un tiempo de retención de 25,1 min.

f) En el cromatograma de una mezcla de tigogenina, del producto aislado y de smilagenina, sólo se observaron dos picos. El primero con un tiempo de retención de 17 min y el segundo con uno de 20 min a 244 °C.

g) El cromatograma de una mezcla del producto aislado y de smilagenina muestra un solo pico, con un tiempo de retención de 17 min a 244 °C, idéntico al primero de los indicados en el apartado f).



## CAPITULO II

### ASPARAGUS UMBELLATUS LINKS

Iniciamos el estudio de los triterpenos, esteroides y sapogeninas de las raíces silvestres viejas de *Asparagus Umbellatus Links* recolectadas en el Sur de Tenerife en verano e invierno.

Un ensayo previo efectuado con raíces recolectadas en verano, entre «La Zarza» y «Arico», indicó la existencia de productos esteroidales.

Las raíces recolectadas fueron troceadas y extraídas con etanol, el extracto concentrado a vacío, enfriado, separado del sedimento formado, hidrolizado por adición de ácido sulfúrico y ebullición de la disolución resultante, diluido con agua hasta el doble de su volumen y el precipitado separado de la solución hidroalcohólica. Ambas fases fueron investigadas separadamente.

El precipitado hidrolizado fue extraído sucesivamente, por ebullición a reflujo sobre baño de agua con benceno y acetato de etilo y los extractos obtenidos con cada disolvente reunidos, lavados, filtrados y concentrados de la manera habitual.

Se realizaron ocho extracciones con benceno, empleándose 2 litros cada vez. Los extractos bencénicos fueron lavados y concentrados del modo habitual.

De las tres primeras extracciones se obtuvieron 26 g de geninas, que se estudian por una parte y designamos fracción A, y de las últimas 49 g, que se estudian por otra y designamos fracción B. Se obtuvieron 75 g, lo que representa un rendimiento de 4,8 g/kg de raíces frescas y 9,4 g/kg de raíces deshidratadas.

Fracción A: fue agitado con 1000 cc de benceno frío, quedando una parte insoluble, que fue separada y lavada con el benceno empleado en eluir las primeras fracciones, y cuyas cromatografías en capa fina eluidas con el sistema F lo muestran como una mezcla binaria, eliminándose el más escaso en las aguas madres de las cristalizaciones.

Cuando las cromatografías mostraron la presencia de uno solo, los cristales obtenidos de acetona mostraron un P.F. 213-214 °C una actividad  $[\alpha]_D^{20} = -65^\circ$  y fórmula empírica  $C_{27}H_{44}O_3$ .

En la reacción de Liebermann-Burchard el anhídrido acético tomó una coloración y fluorescencia amarillo-verdosa ligera a la luz visible e intensa a la U.V. En la de Salkowsky se formó en la interfase un anillo amarillo definido.

Cromatografías gas-líquido del producto aislado lo mostraron como una especie química pura con un tiempo de retención, referido al colesano, de 32,6 min.

El espectro I.R. en nujol presentó absorciones a los 850, 900, 981 y 920  $\text{cm}^{-1}$  típicas de las isosapogeninas (47). Presenta, además, una banda simple a los 1240  $\text{cm}^{-1}$ , que al no dar reacción, el producto aislado, con el tetranitrometano (48) indica unión trans en los anillos A/B.

Para su identificación se formaron el acetato, benzoato y la cetona. Este último fue obtenido de acuerdo con G. I. Poos (49), y produjo en la reacción de Zimmermann (39) intensa coloración violeta, por lo que el grupo cetónico está en posición 3 y no en 6, 7 ó 12.

La formación del cromóforo, según Djerassi y E. Wall (22), (50), y el estudio del espectro ultravioleta, conducen al grupo smilagenina-sarsasapogenina-tigogenina, de las cuales la primera es descartada por su P.F. y la segunda por pertenecer a la serie neo, quedando, por tanto, la tigogenina.

Consultada la bibliografía (51) las constantes de la genina y de sus derivados coinciden con las de la tigogenina y los suyos y el espectro I.R. coincide en todos sus puntos con el de la tigogenina (26), (27).

Los 17,7 g restantes de la fracción A se cromatografiaron a través de 400 g de gel de sílice de 150-200 mesh, activada y desecada, y los eluatos fueron investigados por cromatografías en capa fina y agrupados.

Las fracciones 1 a 6 están formadas por productos céreos; las 7 a 13 por productos aceitosos que, como las fracciones anteriores, no dieron positiva la reacción de Liebermann-Burchard.

Por cromatografías de las fracciones 14 a 27 se obtuvieron algunas manchas distintas a las observadas hasta ahora, una de las cuales muestra el mismo desplazamiento y aspecto que la de  $\beta$ -sitosterol auténtico.

En la fracción 28 se obtuvieron 11 g de producto impurificado, que fue recristalizado varias veces en metanol, separándose una parte insoluble que cristalizó en cloroformo. Cromatografías realizadas empleando como eluyentes cloroformo:benceno 1:1 y cloroformo+1% acetona mostraron la presencia de dos manchas que se alinearon con las de tigogenina y hecogenina auténticas. Con el segundo eluyente la mancha de menor desplazamiento se desdobló en dos, siendo la intensidad de una de ellas tan inferior a la de la otra que se consideró como una impureza.

El producto recristalizado en metanol se comportó en GLC como mezcla de dos productos, uno de ellos en una proporción muy superior a la del otro, mostrando la mezcla absorciones en el I.R. y reacciones coloreadas características de las sapogeninas (52), (47), pero cromatografías en capa fina mostraron que la mezcla era más compleja y que la tigenina y hecogenina eran componentes de la misma.

Se acetiló la mezcla, cristalizando el derivado en metanol:cloroformo, y se realizaron diversas cromatografías en capa fina, utilizando el sistema F y acetatos de gentrogenina, tigenina y hecogenina como referencias, mostrando dos manchas de gran similitud con las dos últimas geninas acetiladas.

Al tratar los 49 g de la fracción B con un litro de benceno frío quedaron 13 g insolubles, que fueron recristalizados en metanol y extraídos dos veces en un Soxhlet con heptano, de acuerdo con E. Wall (16), para extraer las monohidroxisapogeninas, y con benceno:metanol 1:1, con objeto de extraer las di- y polihidroxisapogeninas. El extracto bencénico fue alcalinizado por adición de hidróxido sódico, la solución resultante hervida a reflujo y la capa bencénica separada de la alcohólica, que fue desechada. La solución bencénica evaporada a sequedad no dejó residuo.

El producto procedente de las extracciones con heptano fue estudiado por cromatografías en capa fina, indicando éstas que las mezclas procedentes de las dos extracciones eran similares. Reunidas y recristalizadas en metanol, se obtuvieron cristales en forma de pequeñas escamas incoloras.

Cromatografías con el sistema A del producto cristalizado produjeron dos manchas definidas, de las cuales la de menor desplazamiento muestra una fluorescencia amarilla intensa a la luz ultravioleta y la de mayor se alinea con la obtenida de tigenina auténtica; con cloroformo, la mancha de menor desplazamiento se desdobra en dos, si bien la intensidad de una de ellas es tan inferior a la otra que puede considerársela como impureza, no existiendo analogía entre los desplazamientos y aspectos de las manchas obtenidas del producto en estudio y las de sarsasapogenina y smilagenina auténticas y confirmándose la identidad del desplazamiento de la mancha de menor  $R_f$  con la de tigenina auténtica.

En capas finas hechas añadiendo al producto en estudio tigenina auténtica no se observan manchas nuevas y sí una intensificación de la mancha de mayor desplazamiento, y en las aguas madres se observa la presencia de dos nuevos productos que, probablemente por estar en muy pequeña concentración, no se observaron en las cromatografías iniciales.

Debido a que en las cromatografías descritas se logró una buena separación de los componentes insolubles en benceno de la fracción B empleando cloroformo, fueron cromatografiados a través de gel de sílice.

Las fracciones 1 a 3, según los I.R. realizados, estaban constituidas por productos céreos.

A partir de la fracción 4 todas dieron positivas la reacción de Liebermann-Burchard.

Con objeto de conocer si se había logrado la separación de los componentes de la mezcla se realizaron cromatografías en capa fina empleando cloroformo + 5% acetona como eluyente, demostrándose que las fracciones 4 y 5 se encuentran notablemente enriquecidas en el componente de mayor desplazamiento, que las 6 y 7 son mezclas de ambos productos en cantidades aproximadamente iguales y que las 8 y 9 están enriquecidas en el menor desplazamiento.

Las fracciones 4 y 5, reunidas y recristalizadas en acetona, estaban formadas exclusivamente por la genina de mayor desplazamiento, según cromatografías en capa fina, cuyos cristales mostraron un P.F. de 205-207 °C, una actividad  $[\alpha]_D^{20} = -64$  y un  $R_f$  idéntico al de tigogenina auténtica.

Las 6 y 7 están formadas por una mezcla de tigogenina y del producto que se investiga, que aparece más puro a partir de las fracciones 8 y 9, que después de una serie de recristalizaciones muestra una sola mancha en cromatografías en capa fina y un P.F. de 246 °C; recristalizadas de nuevo, los cristales fundieron a 252-253 °C; una segunda determinación del P.F. repitió el valor de 246 °C y un tercero dio 267 °C, que se repite en nuevas cristalizaciones.

La determinación de las rotaciones ópticas condujeron a valores de +7 y +6, con concentraciones de 1,54 y 1,71%, respectivamente, y la determinación de su composición centesimal a la fórmula  $C_{27}H_{42}O_4$ .

Su espectro I.R. la clasifica en la serie «iso» (47). También aparece una banda muy marcada hacia los  $1650\text{ cm}^{-1}$ . El espectro ultravioleta acusó la presencia de dobles enlaces y confirmó la existencia de un grupo cetónico.

Se formaron los derivados acetilados y la 2,4-dinitrofenilhidrazona, coincidiendo las constantes determinadas con la hecogenina (53), (54).

Su espectro I.R. confirmó que la acetilación fue completa y que es posible que la cetona se encuentre sobre un ciclo hexagonal (banda de absorción máxima a los  $1705\text{ cm}^{-1}$ ), coincidiendo en todos sus puntos con las que da la bibliografía para la hecogenina (55), (27).

Los 49 g de insaponificables obtenidos de las últimas extracciones con benceno en caliente se trataron con un litro de benceno frío, se disolvieron 36 g y quedaron 13 insolubles. Entonces de la solución benecénica obtenida se tomaron 555 cc, que contenían 20 g de producto y se cromatografiaron a través de 400 g de gel de sílice, eluyendo con benceno, mezclas de benceno-cloroformo, benceno-etanol y etanol.

Las fracciones A y 1 eluyeron sustancias que no produjeron colora-

ción con el reactivo de Liebermann-Burchard y cuyos espectros I.R. indicaron estar formados por hidrocarburos parafínicos.

De las fracciones 2 y 3 se obtuvieron productos que por cromatografía en capa fina mostraron una mancha única, de desplazamiento y aspecto semejante a las de los triterpenos, y a la mancha de mayor desplazamiento de la fracción 3, y que produjeron la coloración típica de los triterpenos con el reactivo de Liebermann-Burchard. Ambas fracciones fueron acetiladas mostrando el derivado un P.F. de 185-191 °C y una actividad  $[\alpha]_D^{20} = +70,4^\circ$ .

La fracción 4, cristalizada, se comporta como una sustancia pura, dando una sola mancha al ser cromatografiada en capa fina con diferentes eluyentes. Con el reactivo de Liebermann-Burchard da los cambios de color violeta  $\rightarrow$  azul  $\rightarrow$  verde esmeralda típico de los esteroides. Fijaron su P.F. en 134-136 °C, mostrando una actividad  $[\alpha]_D^{20} = -36^\circ$  y el mismo tiempo de retención en GLC que el  $\beta$ -sitosterol auténtico.

De las aguas madres cristalizó un producto de P.F. 125-128 °C y actividad  $[\alpha]_D^{20} = +41^\circ$ , que dió las mismas coloraciones con el reactivo de Liebermann-Burchard. Por GLC, realizada en las mismas condiciones que la anterior, pero a 204 °C, se obtuvieron tres bandas de 68,4, 72,4 y 80 min de tiempo de retención referido al colestano, siendo citado en último lugar el del  $\beta$ -sitosterol auténtico. Los tres componentes están aproximadamente en las mismas cantidades. La fracción está constituida por  $\beta$ -sitosterol.

Las fracciones 6, 7 y 8 mostraron dos manchas de distinta coloración y fluorescencia en capa fina. Una se corresponde con la de la fracción anterior y la que muestra menor desplazamiento se alinea correctamente con la que se obtiene de las fracciones 9 a 39, de las que se obtuvo un único esteroide que se comportó en sus reacciones coloreadas, cromatografías en capa fina, espectros U.R. e I.R., como una sapogenina. Cristalizado en metanol fijó su P.F. a 211 °C, tomando su actividad óptica el valor de  $-56^\circ$  en solución clorofórmica y  $-23,5^\circ$  en acetona, formó un acetato de P.F. 206-208 °C y actividad  $[\alpha]_D^{20} = -63$  y una cetona de P.F. 206 °C.

Las fracciones 40 a 42 estaban constituidas por una mezcla del producto indicado en el párrafo anterior y otro, de menor desplazamiento y de intensa fluorescencia amarilla a la luz ultravioleta y la fracción 44 y 45, por este segundo producto exclusivamente, que fue identificado como hecogenina por cromatografías en capa fina.

Las fracciones 45 a 51 aportaron productos resinosos coloreados y trazas de geninas secundarias.

Los filtrados hidrolizados y diluidos procedentes de la hidrólisis fueron extraídos con benceno de nuevo en un extractor líquido-líquido, los extractos reunidos, lavados y concentrados siguiendo las normas

usuales y el residuo purificado por ebullición con carbón activo y repetidas cristalizaciones con metanol.

La pequeña cantidad obtenida sólo permitió realizar algunas cromatografías en capa fina con distintos eluyentes y referencias, llegándose a la conclusión de que la mezcla está formada por tres esteroides y cuatro geninas, por lo menos. Uno de los esteroides puede ser el  $\beta$ -sitosterol. De las geninas, una puede ser tigogenina y otra hecogenina. De las otras dos, una produjo fluorescencia verde y otra fluorescencia azul a la luz ultravioleta.

Los productos recuperados de las aguas madres de las diferentes partes en que se dividieron las fracciones A y B mostraron por TLC que son mezclas de esteroides y sapogeninas. De éstas, dos se alinean con tigogenina y hecogenina auténticas, otra tiene un desplazamiento intermedio y una cuarta en muy pequeña proporción, un desplazamiento menor que la hecogenina, cuya cromatografía en columna y estudio por medio de capas finas de los eluatos, lleva a las siguientes conclusiones:

Las fracciones 1 a 4 mostraron una mancha de límites poco precisos, cuyo I.R. no mostró las bandas de absorción típicas de la cadena lateral espiroestérica; no fueron investigadas.

La fracción 5 mostró dos manchas; la de menor desplazamiento se alinea, no muy correctamente, con la de  $\beta$ -sitosterol auténtico.

La fracción 6 parece estar formada por cuatro componentes, una de las manchas se alineó con la de  $\beta$ -sitosterol auténtico. Otras dos fueron idénticas en aspecto y desplazamiento a las de tigogenina y hecogenina. La cuarta, de típico color verde a la luz ultravioleta, mostró un desplazamiento intermedio entre los de tigogenina y hecogenina.

Las fracciones 7 a 16 y 23 a 27 se comportaron de modo análogo, con un enriquecimiento en la mancha que suponemos hecogenina y un empobrecimiento en tigogenina y en la genina de desplazamiento intermedio.

En las cromatografías de las fracciones siguientes se observó la presencia de un nuevo producto, siempre acompañado de impurezas en menor o mayor cantidad, que adoptó una típica forma rectangular y mostró una intensa fluorescencia amarilla.

El derivado acetilado de la fracción 6 a 27 fue obtenido del modo habitual y cristalizado en metanol y cromatografiado a través de 113 g de alúmina neutra, desactivada según Tschesche y cols. (17), y los eluatos obtenidos estudiados por medio de cromatografías en capa fina.

Fracciones 1 y A formadas por productos cerosos no fueron investigadas, fracciones 2 a 17 constituidas por  $\beta$ -sitosterol, fracciones 18 a 29 por tigogenina, fracciones 30 a 35 impurificadas por colorantes, pero acusando la presencia de tigogenina y el producto de desplazamiento intermedio entre la tigogenina y la hecogenina, y las 36, 37 y 38, que mostraron la presencia exclusiva del producto de desplazamiento inter-

medio, fueron reunidas y recristalizadas en acetona. Los cristales mostraron un P.F. de 206-210 °C y una actividad de  $[\alpha]_D^{20} = -47,3$ . El espectro I.R., realizado en sulfuro de carbono (1,2%), corresponde a una isosapogenina (47), (52), mostrando una banda de  $1720 \text{ cm}^{-1}$  característica del agrupamiento cetónico.

Con el reactivo de Zimmermann (56) produjo una intensa coloración violeta, lo que indica que el grupo cetónico está en la posición C<sub>3</sub>.

Las características del derivado acetilado coinciden con las de la hispidogenina, aislada recientemente por vez primera (4).

A continuación, el insaponificable fue sometido a extracciones con acetato de etilo en caliente, que condujeron a una pequeña cantidad de producto, que produjo una reacción coloreada con el reactivo de Liebermann-Burchard, y que estaba constituida, según las cromatografías en capa fina realizadas, por  $\beta$ -sitosterol, tigogenina y hecogenina.

Un segundo estudio de las sapogeninas contenidas en las raíces de *Asparagus Umbellatus Links* se realizó de una recolección hecha en invierno en Güimar, siguiendo la marcha indicada por E. Wall y cols. (16).

Las raíces frescas troceadas fueron extraídas del modo habitual, el extracto alcohólico concentrado de la forma acostumbrada, hasta reducir su volumen a unos 2 litros, separando por filtración el sedimento formado y desengrasando con benceno saturado de alcohol acuoso en un extractor líquido-líquido. Al extracto desengrasado se le añadió cloruro sódico (5 g por cada 100 cc) y ácido clorhídrico diluido hasta llevar el pH entre 4 y 5.

Las geninas fueron extraídas por agitaciones repetidas con butanol acuoso en un embudo de decantación, empleándose mitad de volumen de butanol y las capas butanólicas reunidas, lavadas con solución acuosa de ClNa, mezcladas con la mitad de su volumen de agua y la totalidad del butanol separado por destilación azeotrópica.

El concentrado acuoso de geninas fue diluido con etanol hasta que aquél alcanzó una riqueza del 25% en volumen, e hidrolizado por adición de suficiente cantidad de ClH para hacer la solución 4N y reflujo durante 4 horas.

La solución fría fue filtrada, el precipitado lavado con alcohol acuoso y los filtrados y lavados descartados.

El precipitado fue reflujo durante 1 hora con una mezcla de benceno:metanol 4:1, en la que se había disuelto hidróxido potásico, y la mezcla de geninas obtenida de la capa bencénica por destilación del disolvente, según las normas usuales, después de filtrarlo, lavarlo con agua y secarlo sobre sulfato sódico anhidro. El residuo fue acetilado en las condiciones habituales y el derivado investigado mediante cromatografías en capa fina, empleando como referencias acetatos de tigogenina y hecogenina y distintos eluyentes mostraron dos únicas manchas que se alinearon con las de referencias.

A partir de una cantidad conocida de mezcla y por medio de una cromatografía en capa gruesa, separación de las zonas ocupadas por cada uno de los derivados acetilados, extracción del soporte con disolvente y pesada del residuo, se determinó la composición relativa de la misma: 86% de acetato de tigogenina y 14% de acetato de hecogenina.

**Material de partida. Extracción e hidrólisis.** 14 kg de raíces silvestres viejas de *Asparagus Umbellatus Links*, recogidos en mayo de 1962 entre «La Zarza» y «Arico», humedad 51%, fueron troceadas y extraídas dos veces por ebullición a reflujo durante 5 horas con unos 20 litros de etanol del 90% cada vez. El extracto frío fue filtrado, concentrado a vacío y a unos 45°, hasta reducir su volumen a 6 litros, enfriado, filtrado de nuevo y el sedimento descartado. El extracto fue hidrolizado por ebullición a reflujo durante 8 horas con 0,5 litros de solución alcohólica 4N de ácido sulfúrico y el extracto hidrolizado vertido sobre igual volumen de agua. El extracto diluido fue concentrado a vacío a unos 45° sobre baño de vapor hasta la mitad de su volumen y el precipitado formado separado.

Los precipitados procedentes de la hidrólisis fueron extraídos por ebullición a reflujo con benceno. Se hicieron ocho extracciones empleando 2 litros cada vez. Los extractos bencénicos fueron reunidos, lavados y el disolvente destilado en su mayor parte a vacío.

De las tres primeras fracciones se obtienen 26 g, que se estudian por una parte y designamos como fracción A, y de los restantes 49 g de producto, que se estudian por otra parte y designamos fracción B.

Se obtuvieron, en total, 75 g de producto, lo que representa un rendimiento mínimo de 4,8 g/kg de raíces frescas y de 9,4 g/kg de raíces deshidratadas.

**Producto extraído con benceno, fracción A. Investigación de la parte insoluble en benceno frío a una concentración del 2 al 3% y la soluble en estas condiciones. Cromatografía.** Los 26 g de la fracción A fueron agitados con 1000 cc de benceno, la parte insoluble separada por filtración y lavada con el benceno que se empleó para eluir las primeras fracciones.

**Investigación del producto insoluble en benceno de la fracción A. Cromatografías en capa fina, P.F. y actividad óptica.** Según las cromatografías realizadas con el sistema F, estaba formado por dos compuestos, concentrándose en las aguas madres el que aparecía en menor cantidad.

Después de varias recrystalizaciones, cromatografías comparativas realizadas empleando los sistemas A, B, D y F con tigogenina auténtica,

produjeron en todos los casos una mancha única a la misma altura y del mismo aspecto. Los cristales fijaron su P.F. a 213-214 °C y mostraron una actividad  $[\alpha]_D^{20} = -65$  ( $c=1,04\%$ ).

**Reacciones coloreadas.** Los cristales se disuelven en ácido sulfúrico concentrado, tomando color amarillo canario que pasa a naranja.

En la reacción de Liebermann-Burchard, la capa del anhídrido acético tomó coloración y fluorescencia amarillo-verdosa, ligera a la luz visible e intensa a la ultravioleta.

En la reacción de Salkowsky se formó en la interfase un anillo amarillo perfectamente definido.

**Cromatografía en fase gaseosa.** Se realizó en las condiciones siguientes: columna, silicona al 0,75% sobre celita 85-100 mesh; temperatura, 125°; flujo de gas argón, 37 cc/min; tiempo de carta, 6 pulgadas/hora; presión, 14 psi; voltaje, 1500; sensibilidad, X 10. Se obtuvo una sola banda con un tiempo de retención de 32,6 min referido al colestano.

**Espectro I.R.** Realizado en nujol, presenta absorciones a los 865, 900, 981 y 920  $\text{cm}^{-1}$ , típicas de las isosapogeninas, y una banda de absorción simple a los 1240  $\text{cm}^{-1}$ , por lo que la unión de los anillos A/B es trans o existe insaturación.

**Análisis:**

Calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : C, 74,65; H, 10,59%.

Hallado: C, 74,80; H, 9,90%.

**Formación del derivado acetilado, punto de fusión y actividad óptica.** 0,9 g fueron disueltos en 40 cc de anhídrido acético y calentados a reflujo durante una hora. La solución fría fue vertida sobre otra de bicarbonato sódico también fría, dejando la mezcla en reposo durante 24 horas, el precipitado separado por filtración y lavado repetidamente con solución acuosa de bicarbonato de sodio y metanol frío.

Cristalizado en cloroformo-metanol, los cristales fijaron su P.F. a 206-212 °C y mostraron una actividad  $[\alpha]_D^{20} = -65,4^\circ$  ( $c=1,795\%$ ).

**Espectro I.R.** Presenta las absorciones típicas de un acetato de isosapogenina.

**Análisis:**

Calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_4$ : C, 75,98; H, 10,04%.

Hallado: C, 75,98; H, 9,84%.

**Oxidación con  $\text{CrO}_2\text{O}_3$  y piridina.** A 5 cc de piridina reactiva se le añadieron 0,51 g de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  en pequeñas porciones y bajo agitación. A la jalea obtenida se le añadió 0,51 g de genina disuelta en 5 cc de piridina. El frasco de reacción fue tapado y dejado 24 horas a temperatura ambiente. Luego la disolución fue vertida en agua y filtrada para separar el exceso de complejo en suspensión.

De la solución acuosa obtenida se hicieron cuatro extracciones con 200 cc de éter sulfúrico. Los extractos etéreos reunidos fueron lavados por agitación con solución de ácido clorhídrico al 10%, agua, solución saturada de bicarbonato sódico, agua nuevamente y secados sobre sulfato sódico anhidro. La totalidad del éter fue destilado a vacío sobre baño de vapor y presión reducida.

El producto obtenido fue cristalizado en metanol, mostró un P.F. 202-205 °C y una actividad  $[\alpha]_D^{20} = -52^\circ$  ( $c=2,39\%$ ).

**Análisis:**

Calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_3$ : C, 78,50; H, 10,01%.

Hallado: C, 78,40; H, 10,10%.

**Reacción de Zimmermann.** Intensa coloración violeta, por lo que tiene el grupo cetónico en posición 3 y no en 6, 7 ó 12.

**Formación del derivado benzoilado, P.F., actividad óptica y análisis.** Se disolvieron 0,5 g en 7 cc de piridina y se añadió lentamente 6 cc de cloruro de benzoilo, manteniendo la disolución a temperatura ambiente. A continuación se dejó la disolución en reposo durante una hora, se le adicionó agua y se la dejó en reposo durante 24 horas más.

El precipitado fue separado por filtración y lavado repetidamente con solución de bicarbonato sódico y agua caliente. Los cristales obtenidos de cloroformo fijaron su P.F. a 224-226 °C. Mostró una actividad  $[\alpha]_D^{20} = -51^\circ$  ( $c=1,79\%$ ).

**Análisis:**

Calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_4$ : C, 78,46; H, 9,23%.

Hallado: C, 78,25; H, 9,05%.

**Formación del cromóforo.** 0,0034 g de la genina en 10 cc de ácido sulfúrico del 94% se calentaron durante 16 horas a 40 °C. Se determinaron las absorciones a la luz ultravioleta del cromóforo que presentó máximos a los 415 y 350  $\mu$ .

**Espectro I.R.** Presenta, además de las citadas, bandas a los 868, 901, 935, 963, 986, 997, 1010, 1030, 1059, 1079, 1100, 1138, 1160, 1180, 1243, 1370, 1380, 1740 y 1745  $\text{cm}^{-1}$ , que coinciden con los valores que

da la bibliografía para la tigogenina. Se observan bandas a los  $2850\text{ cm}^{-1}$  y un hombro a los  $2990\text{ cm}^{-1}$ , característicos de este compuesto, así como a  $2950\text{ cm}^{-1}$  y  $2870\text{ cm}^{-1}$  debidas a las vibraciones asimétricas y simétricas, respectivamente, del grupo  $-\text{CH}_2-$ .

Espectro I.R. del producto aislado y de tigogenina auténtica, ambos en sulfuro de carbono a la concentración de  $10\text{ g/l}$  en células calibradas, son perfectamente superponibles.

**Investigación del producto soluble en benceno de la fracción A.**  $17,7\text{ g}$  se cromatografiaron a través de  $400\text{ g}$  de sílice de  $150-200\text{ mesh}$ , activada y desecada.

Se empleó una columna de vidrio Pyrex de  $5\text{ cm}$  de diámetro, donde la gel de sílice depositada en heptano alcanzó unos  $30\text{ cm}$ . Se hicieron eluciones con benceno, benceno +  $20\%$  de etanol y etanol, se recogieron fracciones de  $500\text{ cc}$  y se eluyeron las cantidades que se indican a continuación:

**Fracciones 14 a 27.** Por cromatografías en capa fina se obtuvieron manchas distintas de las observadas hasta ahora (smilagenina, sarsasapogenina, tigogenina, gentrogenina, hecogenina).

Cromatografías realizadas empleando el sistema B mostraron la presencia de una mancha del mismo desplazamiento y aspecto que la de  $\beta$ -sitosterol auténtico.

**Fracción 28.** Se obtuvieron  $11\text{ g}$  fuertemente coloreados que fueron recristalizados en metanol, una vez separada la parte insoluble en éste que cristalizó en cloroformo y cuyas cromatografías en capa fina, empleando el sistema C, mostraron la presencia de dos componentes que se alinearon perfectamente con las manchas obtenidas de acetatos de tigogenina y hecogenina. Cuando este ensayo se repitió empleando el sistema E, la mancha de menor desplazamiento se desdobló en dos, siendo una de intensidad mucho menor que la otra.

**Investigación del producto cristalizado en metanol procedente de la fracción 28. G.L.C.** Se realizó en las condiciones siguientes: columna, sílica al  $0,75\%$  sobre celita de  $85-100\text{ mesh}$ ; temperatura,  $220\text{ }^\circ\text{C}$ ; tiempo de carta,  $6\text{ pulgadas/hora}$ ; presión,  $14\text{ psi}$ ; voltaje,  $1500$ ; sensibilidad, X  $10$ . Mostró la presencia de un solo componente, con un tiempo de retención de  $38\text{ min}$ , acompañado de una pequeña impureza.

**P.F. y actividad óptica.** Cristalizó en forma de agujas a partir de metanol, fundiendo a  $209-211\text{ }^\circ\text{C}$ , y mostró una actividad  $[\alpha]_D^{20} = -63^\circ$  ( $c = 1,01\%$ ).

## CROMATOGRAFIA I

F	mg	Eluyente	R. L-B	Observaciones	
A	357,6	Heptano <i>n</i>	—		
1	161,2	Benceno	—	Las fracciones 1 a 6 están constituidas por productos céreos.	
3	42,1	Benceno	—		
4	2,0	Benceno	—		
5	9,0	Benceno	—		
6	17,0	Benceno	—		
7	26,3	Be-Clf. 2%	—		Las fracciones 7 a 13 están constituidas por productos aceitosos.
8	16,7	Be-Clf. 2%	—		
9	39,1	Be-Clf. 2%	—		
10	20,2	Be-Clf. 2%	—		
11	54,2	Be-Clf. 2%	—		
12	36,4	Be-Clf. 2%	—		
13	18,2	Be-Clf. 2%	—		
14	—	Be-Clf. 2%	+	$\beta$ -sitosterol y mezclas de geninas en muy pequeñas cantidades.	
15	26,4	Be-Clf. 20%	+		
16	43,0	Be-Clf. 20%	+		
17	46,4	Be-Clf. 20%	+		
18	42,3	Be-Clf. 20%	+		
19	50,5	Be-Clf. 20%	+		
20	26,8	Be-Clf. 20%	+		
21	36,4	Be-Clf. 20%	+		
22	8,6	Be-Clf. 20%	+		
23	9,3	Be-Clf. 20%	+		
24	42,1	Be-Clf. 20%	+	Acetilada y cromatografiada. Productos impurificados por aceites y colorantes.	
25	32,8	Be-Clf. 20%	+		
26	25,6	Be-Clf. 20%	+		
27	19,7	Be-Clf. 20%	+		
28	11755,5	Be-EtOH 20%	+		
29	646,9	Be-EtOH 20%	+		
30	37,1	Be-EtOH 20%	+		
31	23,1	Be-EtOH 20%	+		
32	22,2	Be-EtOH 20%	+		
33	20,5	Be-EtOH 20%	+		
34	18,3	Be-EtOH 1:1	+		
35	18,5	Be-EtOH 1:1	+		
36	19,5	Be-EtOH 1:1	+		
37	11,3	EtOH	+		
38	17,6	EtOH	+		
39	131,8	EtOH	+		
40	93,9	EtOH	+		
41	64,9	EtOH	+		
42	34,4	EtOH	+		
43	33,4	EtOH	+		
44-45	—	EtOH	+		

**Espectro I.R.** Realizado a la concentración de 2,5%, presenta absorciones a los 865, 900, 920 y 980  $\text{cm}^{-1}$ , características de las isosapogeninas, pues la banda a 900  $\text{cm}^{-1}$  es aproximadamente el doble que a 920  $\text{cm}^{-1}$ .

**Reacciones coloreadas.** Reacción de Liebermann-Burchard: coloración amarilla intensa en la interfase con fluorescencia a la luz ultravioleta. La de Salkowsky transcurrió de modo análogo. Por adición de ácido sulfúrico concentrado tomó un intenso color amarillo naranja.

**Cromatografías en capa fina.** Cromatografías realizadas colocando simultáneamente tigogenina y hecogenina mostraron que en esta fracción están contenidas estas dos sapogeninas, entre otras.

**Formación del derivado acetilado de la fracción 28.** 1,8 g se disolvieron en 40 cc de anhídrido acético y la disolución fue calentada a reflujo una hora. El acetato obtenido fue separado por filtración de la solución hidrolizada del modo habitual lavado repetidamente con solución de bicarbonato sódico frío y agua, y cristalizado en una mezcla metanol-cloroformo, de donde forma plaquitas alargadas de P.F. 207-208 °C y actividad óptica  $[\alpha]_D^{20} = -65,4^\circ$  ( $c = 0,98\%$ ).

**Cromatografías en capa fina del derivado acetilado.** Se realizaron múltiples cromatografías, empleando el sistema F y acetatos de geninas aisladas e identificadas en este laboratorio, obteniéndose tres manchas de la misma intensidad aproximadamente.

Los acetatos de tigogenina y hecogenina mostraron una gran similitud en desplazamiento y aspecto con dos de las manchas, mientras la tercera no se alineó con el acetato de gentrogenina.

**Estudio de la parte de insaponificables de la fracción B insolubles en benceno frío.** Al tratar los 49 g con un litro de benceno frío quedaron 13 g sin disolver. Este producto fue recrystalizado varias veces con metanol y extraído en un soxhlet con heptano, durante 10-12 horas cada vez. El producto extraído fue cristalizado en metanol.

Cromatografías del producto extraído realizadas empleando el sistema A como eluyente, mostraron dos únicas manchas.

Cromatografías empleando el sistema D, lograron el desdoblamiento de la mancha de menor desplazamiento en dos. Siendo la intensidad de una de ellas notablemente inferior a la de la otra y alineándose correctamente la mancha de mayor desplazamiento con la de tigogenina auténtica, no obteniéndose ninguna mancha nueva al cromatografiar una mezcla del producto en estudio y tigogenina auténtica.

**Cromatografía en columna. Material empleado, disolventes y cantidades eluidas.** 1,889 g de producto cristalizado fueron disueltos en 118 cc de cloroformo y cromatografiados a través de 95 g de gel de sílice de 0,2-0,5 mm; se recogieron fracciones de 150 cc y se empleó cloroformo como eluyente, obteniéndose los resultados que se indican en el cuadro siguiente:

### CROMATOGRAFIA

Fracción	mg	Aspecto	Reacción L-B
A	—	—	—
1	40	Céreo	—
2	45	Céreo	—
3	88	Céreo	—
4	30	Cristalino	+
5	162	Cristalino	+
6	146	Cristalino	+
7	77	Cristalino	+
8	1162	Cristalino	+
9	161	Cristalino	+
10	7	Cristalino	+
11-13	—	—	—

**Reunión de las fracciones según las cromatografías en capa fina.** Cromatografías realizadas empleando como eluyente el sistema B mostraron a las fracciones 4 y 5 muy enriquecidas en el producto de mayor desplazamiento, con una pequeña impureza del producto de menor desplazamiento; unidas y recrystalizadas produjeron una mancha única que se alinea con la de la tigogenina.

Las fracciones 6 y 7 se mostraron como mezclas de ambos productos en cantidades aproximadas. Las 8 y 9 se mostraron muy enriquecidas en el producto de menor desplazamiento, con una pequeña impureza del de mayor desplazamiento.

**Fracciones 4 y 5. Identificación de la tigogenina.** Cristales obtenidos de acetona mostraron un P.F. de 205-207 °C, una actividad óptica  $[\alpha]_D^{20} = -64^\circ$  ( $c=1,21$ ) y un  $R_f$  igual al de la tigogenina. Fueron identificadas como tigogenina.

**Fracciones 8 y 9. Puntos de fusión, cromatografías en capa delgada, actividad óptica, espectros I.R. y U.V. y análisis.** Mostraron un P.F. de 246 °C, crystalizadas se obtuvo un P.F. de 252-253 °C; en la

siguiente cristalización los cristales fundieron a 246 °C. Un nuevo P.F. dio 267 °C. Cromatografías con los sistemas A, B y F mostraron una sola mancha.

Se realizaron determinaciones de la actividad óptica, con 15,4 mg y con 17,1 mg y se obtuvieron los valores  $[\alpha]_D^{20} = +7$  y  $[\alpha]_D^{20} = +6$  (1,54% y 1,71%).

El espectro I.R., hecho en nujol, es típico de una isosapogenina, pues presenta los máximos característicos a los 980, 920, 900 y 860  $\text{cm}^{-1}$ , siendo la mancha a 900  $\text{cm}^{-1}$  dos veces más intensa que a 920  $\text{cm}^{-1}$ , además de una absorción marcada hacia los 1650  $\text{cm}^{-1}$ . El espectro ultravioleta acusó la presencia de doble enlace y confirmó la existencia de un grupo cetónico.

#### **Análisis:**

Calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_4$ ,  $\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ : C, 73,63; H, 9,77%.

Hallado: C, 73,11; H, 9,90%.

**Formación del derivado acetilado, P.F. y actividad óptica. Identificación con la hecogenina.** 376 mg fueron disueltos en 8 cc de piridina, añadiéndose a continuación el mismo volumen de anhídrido acético. La solución resultante fue dejada en reposo durante 24 horas e hidrolizada por adición de solución concentrada de bicarbonato de sodio. La solución neutralizada fue dejada en reposo otras 24 horas y el derivado acetilado separado de la solución acuosa por extracciones sucesivas con éter sulfúrico. Los extractos etéreos reunidos fueron lavados por agitación con solución de ácido clorhídrico al 5% y agua, secados sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, filtrados y el éter evaporado en su totalidad a presión reducida. El derivado acetilado cristalizado en metanol, fundió entre 234 y 237 °C.

Se realizaron dos determinaciones de la actividad óptica con disolventes diferentes: en dioxano (1,26%), dio un valor  $[\alpha]_D^{19} = 0$ , en clorofórmico (1,60%),  $[\alpha]_D^{20} = -3,7$ .

**El espectro I.R.** Hecho en solución de  $\text{S}_2\text{C}$  (1,1%), confirmó la naturaleza de isosapogenina e indicó que la acetilación fue completa y que es posible que la cetona se encuentre sobre un ciclo hexagonal (banda de absorción máxima a los 1705  $\text{cm}^{-1}$ ).

#### **Análisis:**

Calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_5$ : C, 73,73; H, 9,36%.

Hallado: C, 73,10; H, 9,44%.

**Formación de la 2,4-dinitrofenilhidrazona.** A 0,2 g de producto en 30 cc de alcohol caliente le fue añadida una solución de 0,2 g de

2,4-dinitrofenilhidrazina en 50 cc de etanol conteniendo 1 cc de ácido clorhídrico concentrado. Después de unos minutos se formaron agujas del derivado. Al cabo de 3 horas a temperatura ambiente los cristales fueron separados y lavados con etanol frío. Mostraron un P.F. a partir de etanol, de 246-247 °C con descomposición. Recristalizados en el mismo disolvente, el P.F. fue fijado a 249-250 °C.

Las constantes halladas para la sapogenina, su acetato y su 2,4-dinitrofenilhidrazona coinciden con las de la *hecogenina*.

**Estudio de la parte insaponificable de la fracción B soluble en benceno frío.** Del litro de benceno conteniendo los 36 g solubles se tomaron 555 cc y se cromatografiaron a través de una columna de 400 g de gel de sílice de 150-200 mesh, activada y desecada, depositada en éter de petróleo de P. Eb. 60-80 °C, quedando una relación producto:gel de sílice 1:20. Se inició la elución con benceno, pasando a benceno+2% cloroformo, benceno+20% cloroformo y benceno+20% etanol. Se recogieron fracciones de 500 y se eluyeron las cantidades que se indican a continuación:

**Estudio de las fracciones obtenidas en cromatografía en capa fina.** Siempre que no se indique otra cosa, se empleó el sistema E.

La fracción primera produjo una mancha única amarillenta. La segunda presentó una mancha única que se alinea con la de mayor desplazamiento de las dos que se obtienen de la fracción 3.

Con el sistema Clf:Be: 1:9 la mancha obtenida de la fracción 4, la de la fracción 5 y la de menor desplazamiento de las obtenidas de la fracción 3 alcanzaron la misma altura y presentaron la coloración típica de los esteroides, alineándose perfectamente con la obtenida de  $\beta$ -sitosterol auténtico.

Las fracciones 6, 7 y 8 mostraron dos manchas de distinta coloración y fluorescencia. Corresponden, probablemente, a esteroides (la de mayor desplazamiento) y a sapogeninas (fluorescencia análoga a la de la tigogenina) la de menor desplazamiento.

En cromatografías comparativas realizadas empleando  $\beta$ -sitosterol auténtico, la mancha de mayor desplazamiento de estas tres fracciones se alinearon con la de referencia.

Los desarrollos de las fracciones 9 a 39 mostraron una única mancha del mismo desplazamiento y aspecto, que se alineó correctamente con la obtenida de tigogenina auténtica.

#### **Fracción 1. Ceras.**

**Fracciones 2 y 3.** Por el resultado de las cromatografías en capa fina, color violeta intenso en la reacción de Liebermann-Burchard modi-

## CROMATOGRAFIA

Fracción	Gramos	Eluyente	Reacción L-B	P. F.
A	0,3356	Benceno	—	
1	3,3924	Benceno	—	
2	3,8178	Benceno	+	
3	1,0563	Benceno	+	78-82
4	0,4375	Benceno	+	134-136 (Cte.)
5	0,2600	Benceno	+	134-135 (Cte.)
6	0,2389	Benceno	+	135-137 (Cte.)
7	0,2012	Benceno	+	123-127
8	0,1431	Benceno	+	182-186
9	0,1299	Benceno	+	204-207
10	0,1069	Benceno	+	204-207
11	0,0402	Benceno	+	204-207
12	0,0273	Benceno	+	208-210
13	0,0492	Benceno	+	212-213 (Cte.)
14	0,0508	Be + 2% Clf.	+	208-209
15	0,1179	Be + 2% Clf.	+	209-211
16	0,0229	Be + 2% Clf.	+	198-211
17	0,0611	Be + 2% Clf.	+	208-211
18	0,0722	Be + 2% Clf.	+	206-208
19	0,0593	Be + 2% Clf.		
20	0,0698	Be + 2% Clf.	+	
21	0,0680	Be + 2% Clf.	+	
22	0,0670	Be + 2% Clf.	+	
23	0,0755	Be + 2% Clf.	+	
24	0,0684	Be + 2% Clf.	+	
25	0,0916	Be + 2% Clf.	+	
26	0,0787	Be + 2% Clf.	+	
27	0,1120	Be + 2% Clf.	+	200-211
28	0,0224	Be + 2% Clf.	+	198-208
29	0,1153	Be + 2% Clf.	+	210-215
30	0,1216	Be + 2% Clf.	+	210-214
31	0,1716	Be + 2% Clf.	+	205-208
32	0,4909	Be + 2% Clf.	+	
33	0,2501	Be + 2% Clf.	+	205-209
34	0,0764	Be + 2% Clf.	+	203-207
35	0,0390	Be + 2% Clf.	+	195-200
36	0,0367	Be + 2% Clf.	+	
37	0,0184	Be + 2% Clf.	+	
38	0,0275	Be + 2% Clf.	+	
39	0,0205	Be + 20% Clf.	+	
40	0,0260	Be + 20% Clf.		
41	0,0151	Be + 20% Clf.		
42	0,0385	Be + 20% Clf.		
43	0,0234	Be + 20% Clf.	+	
44	0,0168	Be + 20% EtOH		
45	7,2513	Be + 20% EtOH		
46	0,2995	Be + 20% EtOH		
47	0,0573	Be + 20% EtOH		
48	0,0378	Be + 20% EtOH		
49	0,0513	Be + 20% EtOH		
50	0,0393	Be + 20% EtOH		
51	—	EtOH		
52	0,0820			

ficada y espectro I.R. se suponen de naturaleza triterpenoide. Disueltas en piridina, se les adicionó un exceso de anhídrido acético. La solución fue calentada durante media hora sobre baño de vapor, dejada en reposo 20 horas y vertida sobre 200 cc de solución saturada de bicarbonato sódico. El precipitado fue separado, disuelto en éter sulfúrico y lavado varias veces con porciones sucesivas de solución al 10% de ácido clorhídrico, para eliminar la piridina. Finalmente, se evaporó el éter y se cristalizó en metanol. Mostró un P.F. 185-191° y una actividad  $[\alpha]_D^{20} = +70,4$  ( $c=1,42\%$ ).

**Fracción 4.** En la reacción de Liebermann-Burchard se obtuvo coloración violeta en la capa del anhídrido acético, que pasó a azul y verde esmeralda. Varias cristalizaciones en MeOH fijaron el P.F. en 134-136°C, mostró una actividad óptica  $[\alpha]_D^{20} = -36^\circ$  ( $c=0,500$ ), constantes que coinciden con las del  $\beta$ -sitosterol.

La GLC se realizó a través de una columna de silicona sobre celita al 0,75%, con una presión de 15 psi y temperatura de 212°C. Se obtuvo un pico con un tiempo de retención, referido al colestano, de 54 min. Este mismo valor se produjo en idénticas condiciones con  $\beta$ -sitosterol auténtico.

Las aguas madres de esta fracción fueron concentradas, y el producto obtenido cristalizado en MeOH, estabilizó su P.F. a 125-128°C y mostró una actividad óptica  $[\alpha]_D^{20} = +41^\circ$  ( $c=0,666$ ).

Además, por GLC, realizada en las mismas condiciones que la anterior, pero con 204°C de temperatura en la cabeza de la columna, se obtuvieron tres bandas de 68,4, 72,4 y 80 min de tiempo de retención referido a colestano. El tiempo de retención citado en último lugar es el que corresponde al  $\beta$ -sitosterol auténtico en estas condiciones.

**Fracción 5.** Cristalizada hasta obtener un P.F. de 134-135°C, su actividad fue  $[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$  ( $c=1,200$ ).

Cromatografías en capa fina realizadas empleando  $\beta$ -sitosterol y el sistema Be:Clf 9:1 mostraron una única mancha, idéntica a la misma altura.

**Fracción 6.** Comportamiento análogo.

**Fracciones 9-39.** Unidas y recristalizadas, su espectro I.R. mostró absorciones a los 865, 900, 920 y 980  $\text{cm}^{-1}$ , características de una isosapogenina. Presentó banda a los 1240  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a insaturación o a unión «trans» de los anillos A/B.

Se obtuvo un P.F. de 211-214°C y una actividad  $[\alpha]_D^{20} = -57,5^\circ$  ( $c=1,462$ ) y  $[\alpha]_D^{20} = -23,5^\circ$  ( $c=0,298$ ), en cloroformo y acetona, respectivamente.

El producto obtenido a partir de las aguas madres de estas fracciones está constituido exclusivamente por tigogenina, según cromatografías realizadas en distintos eluyentes.

**Fracciones 40 a 42.** Se realizaron cromatografías empleando distintos eluyentes y utilizando como referencias tigogenina y hecogenina auténticas. Se obtuvieron dos manchas, la de mayor desplazamiento, cuya concentración disminuyó de fracción en fracción, se alineó perfectamente con la obtenida de tigogenina auténtica. La de menor, cuya concentración aumentó de fracción en fracción, mostró el mismo desplazamiento que la hecogenina.

**Fracción 43.** Se mostró libre de tigogenina.

**Fracción 44.** Se mostró en las cromatografías realizadas como una sustancia pura, que produjo una única mancha, idéntica en aspecto y desplazamiento a la hecogenina.

**Fracciones 45 a 51.** Del producto resinoso eluido se obtuvo, por repetidas cristalizaciones, una pequeña cantidad de producto incoloro, cuyas cromatografías lo mostraron como una mezcla de hecogenina y geninas secundarias en muy pequeña concentración.

**Investigación de los extractos hidrolizados, diluidos y filtrados. Extracción con benceno.** Los filtrados hidrolizados y diluidos procedentes de ambas hidrólisis fueron extraídos con benceno en un extractor líquido-líquido, lavados y concentrados siguiendo las normas usuales. El residuo obtenido, muy coloreado, fue disuelto en metanol y decolorado varias veces por ebullición con carbón activo. Repetidas cristalizaciones en MeOH condujeron a 0,2 g de producto incoloro, que produjo una intensa coloración rosa en la interfase en la reacción de Liebermann-Burchard y de Salkowsky.

La pequeña cantidad obtenida permitió realizar algunas cromatografías en capa fina con distintos eluyentes y referencias, llegándose a la conclusión de que la mezcla está formada por tres esteroides y por cuatro geninas, por lo menos. Uno de los esteroides puede ser el  $\beta$ -sitosterol. De las geninas, dos pueden ser tigogenina y hecogenina. De las otras dos, una produjo fluorescencia verde y la otra fluorescencia azul a la luz ultravioleta.

**Estudio de las sapogeninas de las aguas madres de las cristalizaciones de diversas fracciones.** Los productos recuperados de las aguas madres de las diferentes partes en que se disolvieron las fracciones A y B se reunieron. Cromatografías en capa fina del producto obtenido muestran que se trata de una mezcla de esteroides y sapogeninas; de

éstas, dos se alinean con tigogenina y hecogenina auténticas, otra tiene un desplazamiento intermedio y una cuarta, en muy pequeña proporción, un desplazamiento menor que la hecogenina. Disuelta en la cantidad mínima de cloroformo fue cromatografiada a través de 400 g de gel de sílice de 0,2 a 0,8 mm. Se hicieron eluciones con cloroformo y con cloroformo + 2% acetona. Se recogieron fracciones de 400 cc y se eluyeron las cantidades que se indican a continuación:

### CROMATOGRAFIA

Fracción	mg	Eluyente	R. L-B
A	—	Clf.	—
1	432,7	Clf.	—
2	787,5	Clf.	—
3	510,5	Clf.	—
4	192,0	Clf.	—
5	698,0	Clf.	+
6	1622,0	Clf.	+
7	500,0	Clf.	
8	185,5	Clf.	
9	143,8	Clf.	
10	79,1	Clf.	
11	63,0	Clf.	
12	28,0	Clf.	
13	23,0	Clf.	
14	17	Clf.	
15	15	Clf.	
16	11	Clf.	
17	10	Clf.	
18	10	Clf.	
19	5	Clf. + 2% acetona	
20	39	Clf. + 2% acetona	
21	36	Clf. + 2% acetona	
22	99	Clf. + 2% acetona	
23	231	Clf. + 2% acetona	
24	255	Clf. + 2% acetona	
25	165	Clf. + 2% acetona	
26	175	Clf. + 2% acetona	
27	1145	Clf. + 2% acetona	
28	255	Clf. + 2% acetona	
29	94	Clf. + 2% acetona	
30	62	Clf. + 2% acetona	
31	62	Clf. + 2% acetona	
32	47	Clf. + 2% acetona	
33	47	Clf. + 2% acetona	
34	53	Clf. + 2% acetona	
35	22	Clf. + 2% acetona	
36-40	—	Clf. + 2% acetona	

**Estudio de las fracciones por medio de cromatografías en capa fina.** Empleando el sistema B, las fracciones 1, 2, 3 y 4 mostraron una mancha única que se desplazó con el frente.

La fracción 5, que en la reacción de Liebermann-Burchard produjo los cambios de color rojo, azul, violeta, verde, típico de los esteroides, mostró dos manchas. La de menor desplazamiento se alinea con la de  $\beta$ -sitosterol auténtico.

La 6 pareció estar formada por cuatro componentes. Numerando las manchas de 1 a 4, se observa que la de mayor desplazamiento se alinea con la de  $\beta$ -sitosterol auténtico, las dos siguientes fueron idénticas en desplazamiento y aspecto a las de tigogenina y hecogenina auténticas. Apareció un nuevo producto que no se alineó con ninguna de las geninas estudiadas.

Las 7 a 16, ambas inclusive, se comportaron de un modo análogo en las cromatografías realizadas. La mancha central, que se alineó perfectamente con la mancha nueva de la fracción 6, confirmó la existencia de otra genina, cuyo desplazamiento es intermedio entre la tigogenina y hecogenina.

La cromatografía de la fracción 23 mostró también la presencia de este nuevo producto, acompañado por algunas impurezas. Lo mismo sucedió para las fracciones 23 a 27.

Las cromatografías de las fracciones siguientes se observó la presencia de un nuevo producto, siempre acompañado de impurezas. Su mancha adoptó una típica forma rectangular y mostró una intensa fluorescencia amarilla.

**Formación del derivado acetilado de las fracciones 6 a 27.** El derivado 6 fue obtenido del modo habitual y cristalizado en metanol.

**Cromatografías en capa fina y columna del derivado acetilado.** Empleando el sistema E, mostró estar constituido por una mezcla de cuatro componentes: acetatos de tigogenina, hecogenina, de una tercera genina de desplazamiento intermedio entre las anteriores y de intensa fluorescencia a la luz ultravioleta, y de un cuarto componente, en cantidad muy pequeña, de desplazamiento un poco mayor que el acetato de tigogenina.

1,126 g fueron disueltos en la mínima cantidad de éter de petróleo 50-80° y cromatografiados a través de 113 g de alúmina neutra, desactivada por agitación con 10 cc de ácido acético al 10%. Se recogieron fracciones de 100 cc, se hicieron eluciones con éter de petróleo y mezclas de este disolvente y benceno. Las cantidades eluidas se indican en el cuadro siguiente:

## CROMATOGRAFIA

Fracción	mg	Eluyente	R. L-B	Observaciones
A	17	Pe	—	P. céreos
1	18	Pe	—	P. céreos
2	138	Pe	+	
3	64	Pe	+	
4	24	Pe		
5	4	Pe		
6	11	Pe		
7	3	Pe		
8	6	Pe		
9	10	Pe+2% Be		
10	6	Pe+2% Be		
11	4	Pe+2% Be		
12	10	Pe+2% Be		
13	10	Pe+2% Be		
14	10	Pe+5% Be		
15	15	Pe+5% Be		
16	12	Pe+5% Be		
17	20	Pe+20% Be		
18	59	Pe+20% Be	+	
19	86	Pe+20% Be	+	
20	77	Pe+20% Be	+	
21	52	Pe+20% Be	+	
22	42	Pe+20% Be	+	
23	39	Pe+20% Be	+	
24	21	Pe+20% Be	+	
25	21	Pe+20% Be	+	
26	13	Pe+20% Be	+	
27	18	Pe+20% Be	+	
28	10	Pe+20% Be	+	
29	10	Pe+20% Be	+	
30	6	Pe+20% Be	+	
31	15	Pe+20% Be	+	
32	9	Pe+20% Be	+	
33	10	Pe:Be (1:1)	+	
34	10	Pe:Be (1:1)	+	
35	35	Pe:Be (1:1)		
36	27	Pe:Be (1:1)		
37	22	Pe:Be (1:1)		
38	67	Pe:Be (1:1)		
39	55	Pe:Be (1:1)		
40	40	Pe:Be (1:1)		
41	20	Pe:Be (1:1)		

**Fraciones 2 a 17.** Cromatografías eluidas con distintos disolventes mostraron distintas manchas. La principal se alineó siempre con la de  $\beta$ -sitosterol auténtico.

**Fraciones 18 a 29.** Presentaron aspecto cristalino. Cromatografías empleando el sistema C muestran una mancha única, que se alineó con la del acetato de tigogenina auténtico.

**Fraciones 30 a 35.** Bastante impurificadas por colorantes, son una mezcla de acetato de tigogenina y del acetato del producto de desplazamiento intermedio.

**Fraciones 36, 37 y 38.** Mostraron la presencia exclusiva del producto de desplazamiento intermedio. Reunidas y cristalizadas en acetona, presentaron un P.F. de 206-210 °C.

El espectro I.R. en sulfuro de carbono (1,2%) es el de una isosapogenina; muestra una banda a los  $1720\text{ cm}^{-1}$  característica de un agrupamiento cetónico y  $[\alpha]_D^{20} = -47,3^\circ$  ( $c=0,38\%$ ), produciendo en la reacción de Zimmermann coloración violeta intensa, por lo que tiene el grupo cetónico en posición 3.

**Extracción con acetato de etilo e investigación del producto aislado.** El precipitado obtenido por hidrólisis fue extraído por ebullición a reflujo, con acetato de etilo. El extracto obtenido fue secado, lavado y concentrado como en los casos anteriores.

El producto cristalizado en metanol produjo en la reacción de Liebermann-Burchard fuerte coloración roja en la capa del anhídrido acético con fluorescencia amarillo-verdosa a la luz visible y ultravioleta.

Cromatografías realizadas empleando distintos eluyentes mostraron dos únicas manchas, idénticas en aspecto y desplazamiento a las de tigogenina y hecogenina auténticas.

**Nueva investigación de las raíces de *Asparagus Umbellatus*. Material de partida.** 11 kg de raíces frescas recolectadas en Güimar, en noviembre y diciembre de 1964, fueron troceadas y extraídas en un soxhlet con etanol y los extractos concentrados de la manera acostumbrada hasta reducir su volumen a dos litros; siguiendo la marcha indicada por E. Wall y col. (*loc. cit.*). El extracto alcohólico caliente fue filtrado y el sedimento separado fue disuelto en etanol al 50% caliente y filtrado de nuevo. Los filtrados fueron reunidos y extraídos en un extractor líquido-líquido con benceno saturado de alcohol acuoso y la fase bencénica extraída a su vez con un litro de alcohol al 50% por agitación en un embudo de decantación. La capa alcohólica fue unida a la solución desengrasada y la capa bencénica descartada. Los extractos

alcohólicos fueron concentrados del modo acostumbrado, obteniéndose una solución turbia a la que se añadió 5 g de cloruro sódico por cada 100 cc, llevándola a pH 4,5 por adición de ácido clorhídrico diluido. La solución fue extraída cuatro veces en un embudo de decantación con butanol acuoso, empleándose cada vez la mitad de butanol que de extracto. Las capas butánolicas fueron reunidas y lavadas con un litro de solución acuosa al 5% de cloruro sódico y las capas acuosas fueron lavadas, a su vez, con 500 cc de butanol que fueron añadidos a los otros extractos butanólicos.

Los extractos butanólicos reunidos fueron mezclados con la mitad de su volumen de agua y la totalidad del butanol destilado, quedando 1,5 litros de extracto.

El concentrado fue diluido con etanol del 95% hasta que la solución alcanzó una riqueza del 25% de etanol en volumen. La hidrólisis se realizó por adición de ácido clorhídrico concentrado hasta hacer la solución 4*N* y ebullición a reflujo durante 5 horas. La solución fue filtrada y el precipitado obtenido lavado con etanol al 50%. Filtrados y lavados fueron descartados.

**Aislamiento de las geninas.** El filtrado fue refluado durante una hora con una mezcla formada por 3 litros de benceno, 1 litro de metanol y 200 g de hidróxido potásico. La solución fría fue filtrada y el precipitado obtenido lavado con solución de benceno+10% etanol caliente y el residuo descartado.

El filtrado fue lavado por agitación con 1 litro de agua. La capa acuosa fue a su vez extraída con pequeñas porciones de benceno y las capas bencénicas reunidas y evaporadas a sequedad, por destilación según las normas acostumbradas.

**Formación del derivado acetilado.** Del modo usual con piridina y anhídrido acético y el derivado 38,5 g cristalizado en acetona.

**Investigación cualitativa y cuantitativa de las geninas aisladas.** Cromatografías en capa fina, realizadas empleando benceno-cloroformo 1:1 y acetatos de tigogenina y hecogenina auténticas, demostraron que el derivado estaba constituido fundamentalmente por acetatos de tigogenina y hecogenina, acompañados por un tercer acetato de sapogenina de desplazamiento intermedio entre los de las dos citadas, como pequeña impureza.

Las cantidades relativas fueron determinadas por disolución y pesada de las zonas obtenidas a partir de una capa gruesa realizada con una cantidad conocida de mezcla. Los colorantes y la genina de desplazamiento intermedio no dieron cantidades ponderables. La mezcla estaba formada por 86% de acetato de tigogenina y 14% de acetato de hecogenina.

### CAPITULO III

## ASPARAGUS FALCATUS LINKS, ESCOPARIUS L. Y A. SPRENGERI L.

Exponemos las investigaciones de tres variedades de la especie *Asparagus*, de las cuales la denominada *Asparagus escoparius Links* es endémica de las Islas Canarias, y las otras se cultivan en el Jardín Botánico del Puerto de la Cruz.

En todos los casos hemos seguido la marcha descrita por E. Wall y cols. (16) para el aislamiento de las saponinas, su hidrólisis y obtención de las mezclas de geninas que han sido estudiadas por medio de cromatografías en capa fina (19) y espectroscopia I.R.

Las cromatografías se han eluido con distintos disolventes, utilizando como referencia geninas aisladas e identificadas en estos laboratorios; los espectros I.R. obtenidos han aportado pruebas concluyentes de la naturaleza y pureza de las sapogeninas aisladas (27), (55), (47), y la formación y determinación de las constantes de los derivados usuales han permitido su identificación.

Las sapogeninas contenidas en el *Asparagus falcatus Links*, aisladas de raíces recolectadas en marzo, fueron cromatografiadas mostrando una mancha única que se alineó siempre con la de sarsasapogenina auténtica.

El espectro I.R. indica que la genina es un compuesto A/B «cis», «neo» o de la serie B.

El producto cristalizado (acetona) mostró P.F. 196-200 °C y  $[\alpha]_D^{20} = -70,9^\circ$ , coincidiendo estas constantes con las de la sarsasapogenina (*loc. cit.*).

Las geninas contenidas en el *Asparagus escoparius Links* fueron aisladas de raíces recolectadas en verano e invierno en Los Realejos y Garachico. Dos de las manchas obtenidas de las mezclas aisladas, más compleja la procedente de la recolección estival, se alinearon perfectamente con las de tigogenina y hecogenina auténtica.

De la mezcla de menor número de componentes, se separó por cristalización un producto, de desplazamiento idéntico al de la tigogenina en forma de pequeñas agujas incoloras (cloroformo-etanol) de P.F. 202-204 °C y  $[\alpha]_D^{20} = -70^\circ$  cuyos P.F. mixtos con tigogenina no mostraron de-

presión. Con el reactivo de Liebermann-Burchard (38) produjo una coloración amarillo-verdosa en la capa del anhídrido acético con fuerte fluorescencia a la luz ultravioleta.

El espectro I.R. presenta las absorciones a  $865\text{ cm}^{-1}$ ,  $900$ ,  $891$  y  $920\text{ cm}^{-1}$  de las isosapogeninas.

El derivado acetilado, cristalizado (cloroformo-metanol) mostró un P.F.  $204\text{-}205\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los máximos de absorción de su espectro I.R. coinciden con los que se indican para el derivado acetilado de la tigogenina (27), (55), coincidiendo, además, las constantes determinadas de la genina con las de la tigogenina (16), (59).

La investigación del *Asparagus Sprengeri Links* condujo a la obtención de una cantidad mínima de producto cuyo espectro I.R. presenta en la zona comprendida entre los  $1350$  y  $850\text{ cm}^{-1}$  las bandas características de los espirostanos y cuyas cromatografías indican que contiene por lo menos cinco geninas de desplazamiento diferente al de las aisladas e identificadas en estos laboratorios.

## PARTE EXPERIMENTAL

**Material de partida.** Lo constituyeron las raíces de ejemplares viejos de *Asparagus falcatus*, recolectados en marzo de 1963, que se presentan en forma de hilos gruesos con ensanchamiento a intervalos irregulares en forma de pequeños bulbos, que fueron separados del resto de las raíces y estudiados.

**Extracción y concentración de los extractos.** 550 g, 57% de humedad, fueron troceados y extraídos cinco veces por ebullición a reflujo durante 2 horas con 1,5 litros de etanol de 85-90% cada vez, los extractos concentrados por destilación a vacío hasta reducir su volumen a 200 cc, filtrados, después de enfriamiento y reposo y desengrasados durante 12-14 horas en un extractor líquido-líquido con éter de petróleo saturado de alcohol acuoso. El sedimento fue desechado.

**Extracción de las saponinas e hidrólisis.** Al extracto se añadió 10 g de ClNa y ClH diluidos hasta pH 4, aproximadamente, y se extrajo durante 12 horas con butanol saturado de agua, que fue desengrasado con benceno saturado con alcohol acuoso. A continuación el butanol fue vertido sobre la mitad de su volumen de agua y la solución resultante evaporada en su totalidad sobre baño de vapor.

El residuo disuelto en etanol-agua fue hidrolizado por ebullición con HCl y diluido. El residuo terroso fue extraído con benceno, éste evaporado a presión reducida y el residuo cristalizado en metanol hasta que se obtuvieron largas agujas incoloras.

**Investigación de las geninas obtenidas.** Cromatografías comparativas empleando como referencia distintas geninas y eluyentes, mostraron una mancha única idéntica a la de sarsasapogenina auténtica.

**Investigación de las geninas obtenidas.** Cromatografías comparativas, empleando como referencia distintas geninas y eluyentes, mostraron una mancha única idéntica a la de sarsasapogenina auténtica.

**Determinación de las constantes físicas.** P.F. 196-200 °C (acetona),  $[\alpha]_D^{20} = -70,9^\circ$  ( $c=2,10$ ).

**Análisis:**

Calculado para  $C_{27}H_{44}O_3$ : C, 77,62; H, 10,63%.

Hallado: C, 77,57; H, 10,74%.

**Espectro I.R.** Realizado en sulfuro de carbono (11,7 g/litro) muestra varias bandas fuertes entre los 1350 y los 875  $cm^{-1}$ , características de los espirostanos. Una banda a los 915  $cm^{-1}$  cuatro o cinco veces más intensa que a 895  $cm^{-1}$  y otra a los 857  $cm^{-1}$ . Esto y la ausencia de bandas a 860  $cm^{-1}$  y a 1240  $cm^{-1}$  indica que es un compuesto *A/B cis, neo*, o de la serie B. Presenta la banda correspondiente al grupo alcohólico libre a los 3900  $cm^{-1}$ .

**Material de partida.** Lo constituyeron las raíces de ejemplares silvestres viejos de *Asparagus scoparius* recolectados en noviembre de 1963.

**Extracción y concentración de los extractos.** 2 kg de raíces frescas fueron puestas en maceración primero y extraídas después varias veces con alcohol del 85-90%, los extractos reunidos y filtrados y el precipitado desechado.

**Desengrase, extracción con butanol, concentración del extracto e hidrólisis de las saponinas.** Al extracto, unos 400 cc, desengrasado por adición de ClH mostró un pH entre 4 y 5, realizándose cuatro extracciones con butanol saturado de agua y empleándose volumen de butanol igual a la mitad del extracto.

Las extracciones butanólicas fueron reunidas y lavadas con solución acuosa al 5% de ClNa. Los lavados reunidos fueron agitados a su vez con 250 cc de butanol saturado, la capa butanólica unida a la anterior y la fase acuosa desechada.

El extracto fue mezclado con la mitad de su volumen de agua y la solución resultante azeotrópica a presión normal, obteniéndose una suspensión acuosa de saponinas a la que se añadió etanol y ClH en cantidad suficiente para alcanzar un contenido del 25% en volumen de etanol, y una normalidad de 4. La hidrólisis fue realizada por ebullición a reflujo durante 3 horas sobre baño de vapor.

El precipitado resinoso obtenido fue lavado con alcohol acuoso al 50% y reflujo durante una hora con una mezcla alcalina de benceno-metanol 3:1.

La disolución fría fue filtrada, el precipitado separado, lavado con solución benceno-alcohol 9:1 y los lavados unidos al filtrado. La fase bencénica fue concentrada a vacío y sobre baño de vapor hasta sequedad y el residuo cristalizó en metanol en forma de agujas.

**Investigación de las sapogeninas aisladas.** Se realizaron cromatografías comparativas empleando como eluyente el sistema B y se obtuvieron los siguientes resultados:

1. Las aguas madres contienen fundamentalmente tres productos, dos se comportaron como tigogenina y hecogenina auténticas, el tercero de desplazamiento intermedio, entre aquéllas no se alineó con ninguna de las geninas testigos.

2. El producto cristalizado mostró estar formado por un producto, cuya mancha se alineó con la tigogenina auténtica.

**Investigación del producto cristalizado.** Con el reactivo de Liebermann-Burchard produjo coloración verde-amarillenta intensa en la capa del anhídrido acético, con fluorescencia, ligera a la luz natural e intensa a la ultravioleta.

**P.F. y actividad óptica.** 202-204 °C y  $[\alpha]_D^{20} = -70^\circ$  ( $c=1,52$ ).

**Espectro I.R.** Presenta una banda a 900  $\text{cm}^{-1}$  algo más intensa que el duplo de la de 920  $\text{cm}^{-1}$ . Igualmente presenta la banda a los 860  $\text{cm}^{-1}$  características de una isosapogenina.

**Formación del derivado acetilado. P.F. y actividad óptica.** A una pequeña cantidad de producto disuelto en piridina se le añadió un exceso de anhídrido acético y se le dejó en reposo 24 horas. La disolución fue hidrolizada mediante la adición de un exceso de solución de bicarbonato sódico. El derivado fue extraído con éter sulfúrico, los extractos etéreos reunidos y secados sobre  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  y evaporados en su totalidad sobre baño de vapor a presión reducida. El residuo se cristalizó en metanol. Los cristales obtenidos mostraron un P.F. de 204-205 °C; después de reblandecer hacia los 200 °C.

**Espectro I.R.** Presenta, además de las citadas bandas, a los 868, 901, 935, 963, 986, 997, 1010, 1030, 1059, 1079, 1100, 1138, 1160, 1180, 1243, 1370, 1380, 1740 y 1745  $\text{cm}^{-1}$ , que coinciden con los valores de la tigogenina. Se observan, además, bandas a los 2850  $\text{cm}^{-1}$  y un hombro a los 2990  $\text{cm}^{-1}$ , característicos de esta genina, así como a 2950 y 2870  $\text{cm}^{-1}$  debidas a las vibraciones asimétricas y simétricas, respectivamente, del grupo  $-\text{CH}_3$ , y a los 2930 y 2860  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a las vibraciones asimétricas y simétricas, respectivamente, del grupo  $-\text{CH}_2-$ .

**Investigación de las raíces de *Asparagus scoparius* Link. Material de partida.** Lo constituyeron las raíces de ejemplares viejos, recolectados en mayo y junio de 1965 entre Los Realejos y Garachico.

**Extracción y concentración de los extractos obtenidos.** 7,5 kg de raíces troceadas parcialmente secas, fueron extraídas en un soxhlet con etanol al 95%, los extractos obtenidos filtrados, el filtrado concentrado por destilación a presión reducida hasta reducir su volumen a 1 litro, y el precipitado desechado.

**Desengrase del extracto obtenido y extracción de las saponinas.** El extracto fue desengrasado con benceno saturado con alcohol acuoso, el benceno lavado con 1 litro de etanol al 50% y la capa alcohólica añadida a la solución desengrasada.

El extracto desengrasado, concentrado por destilación a presión reducida sobre baño de vapor hasta unos 2.800 cc, se le añadió 150 g de ClNa, llevando el pH a un valor entre 4 y 5 por adición de ClH diluido, realizando, por agitación, cuatro extracciones con butanol saturado de agua y empleando un volumen de butanol saturado igual a la mitad del extracto.

Las capas butanólicas fueron reunidas y lavadas con solución acuosa al 5% de ClNa. Los lavados reunidos fueron agitados con 0,5 litros de butanol saturado con agua, la capa butanólica unida a la anterior y la acuosa desechada.

El extracto fue mezclado con la mitad de su volumen de agua liberada de la mayor parte del butanol por destilación azeotrópica a presión ambiente.

**Hidrólisis de las saponinas y extracción de las geninas.** Los 1200 cc de extracto fueron mezclados con 450 cc de etanol al 95% obteniéndose una solución con un 25% en volumen de etanol aproximadamente, y la hidrólisis realizada mediante la adición de 850 cc de ClH concentrado y ebullición a reflujo durante unas 5 horas. El escaso precipitado obtenido fue secado, triturado y disuelto en 3 litros de benceno, la disolución mezclada con 1 litro de metanol en el que estaban disueltos 200 g de hidróxido potásico, hervida a reflujo 1 hora y vertida sobre 1 litro de agua fría. La capa bencénica fue separada y evaporada sobre baño de vapor y presión reducida.

**Investigación de las geninas aisladas.** El espectro I.R. mostró las bandas típicas de sapogeninas, deduciéndose, además, que en caso de haber mezcla, las sapogeninas de la serie «iso» se encuentran en mayor cantidad que las de la serie «neo», puesto que las bandas a  $900\text{ cm}^{-1}$  es mayor que la de  $920\text{ cm}^{-1}$ .

A partir de diferentes cromatografías realizadas empleando como eluyente el sistema B, se obtuvieron los siguientes resultados:

1. Dos de las manchas se alinearon siempre con las obtenidas de tigenina y hecogenina auténticas.

2. Mezclas del producto en estudio, tigogenina y hecogenina, no produjeron nuevas manchas y sí una intensificación respecto a las obtenidas de las geninas aisladas exclusivamente.

3. Aparecen una serie de manchas, de intensidad notablemente inferior, que no se alinean con las geninas de referencia.

Utilizando como eluyentes, A, B, D, F se realizaron nuevas cromatografías del producto en estudio y de la mezcla obtenida al añadirle pequeñas cantidades de tigogenina y hecogenina auténticas, confirmando los resultados indicados en 1 y 2.

**Material de partida.** Las raíces de ejemplares viejos de la variedad *Asparagus sprengeri* recolectados en marzo y junio de 1963, que se presentan en forma de hilos gruesos a cuyos lados, y de un modo simétrico, penden bulbos de dimensiones aproximadas a las de una uva mediada, que fueron separados e investigados.

**Extracción e hidrólisis.** 480 g de bulbos frescos, humedad 97%, fueron puestos en maceración con 800 cc de etanol durante dos meses. Al cabo de este tiempo el alcohol fue separado y los bulbos molidos junto con 900 g más recogidos a mediados del mes de junio. Se hicieron tres extracciones con etanol del 90% y los extractos obtenidos fueron reunidos, desengrasados por agitación con tetracloruro de carbono y concentrados por destilación a presión reducida sobre baño de vapor.

Al extracto, unos 300 cc, se le añadió CIH en cantidad suficiente para hacer la solución 4N, hidrolizándolo por ebullición a reflujo durante 4 horas, diluyéndolos con agua hasta el doble de su volumen y separando el precipitado por filtración.

**Investigación del producto aislado.** Se llegó a una cantidad muy pequeña, pero suficiente para hacer un espectro I.R. y algunas cromatografías.

**Espectro I.R.** Presentó, en la zona comprendida entre los  $1350\text{ cm}^{-1}$  y los  $850\text{ cm}^{-1}$ , las bandas típicas de los compuestos espirostánicos.

**Cromatografías en capa fina.** Empleando el sistema B como eluyente y como referencias tigogenina, hecogenina, gentrogenina, smilagenina y sarsapogenina se obtienen una serie de manchas, visibles sin necesidad de calentar la placa, una de las cuales parece alinearse con la tigogenina.



## CAPITULO IV

# INFLUENCIA DE PEQUEÑAS CONCENTRACIONES DE SARSASAPOGENINA EN ACEITES MINERALES PARAFINICOS LIGEROS Y NUEVOS

Es sabido (61) que las sapogeninas esteroidales emulsionan los aceites vegetales, ocasionando dificultades que se soslayan de diferentes maneras (16).

Igualmente, es conocido que las propiedades inherentes a la constitución molecular de los lubricantes sufren variaciones en presencia de pequeñas cantidades de determinados productos químicos, siendo muy frecuente la utilización de esta propiedad en la preparación de lubricantes especiales.

Nosotros intentamos por vez primera comprobar si esta propiedad la manifiestan las sapogeninas en relación con los aceites minerales, iniciando el estudio de la emulsión aceite-aire, y hemos verificado que la presencia de pequeñas cantidades de una sapogenina disminuye notablemente el tiempo requerido para romper la emulsión indicada, valorando esta influencia mediante el ensayo «Determinación de la capacidad de expulsión de aire de aceites de turbina» (62).

**Norma de ensayo. Objeto de la determinación.** Aceites lubricantes que desprenden lentamente el aire finamente disperso pueden producir molestias en el suministro de aceite, en la lubricación y en el mecanismo de dirección hidráulica.

Se ha desarrollado este método, ya que dicho comportamiento no puede ser investigado de modo inequívoco mediante la norma DIN 51.566.

**Aclaración del concepto.** La capacidad de expulsión de aire de un aceite de turbina viene expresada por el número de mililitros de aceite libre de aire disperso, medidos bajo condiciones dadas.

**Descripción abreviada.** El aceite, a 50 °C, se lleva a un contenido elevado de aire disperso, mediante intensa agitación. Después de un tiempo fijado se lee el volumen de la columna de aceite clarificado.

**Realización.** 700 ml de aceite, a 50 °C, se agitan en un recipiente adecuado durante 20 segundos, empleando una hélice que alcance de 15.000 a 20.000 r.p.m., se lee el volumen de la columna de aceite libre de burbujas a los 3,5 y a los 7 minutos.

**Requisitos mínimos.** El aceite de turbina estará libre de aire disperso después de 7 minutos de reposo, despreciándose las burbujas aisladas y adheridas a las paredes. Si la expulsión del aire se ha efectuado en este tiempo, se supone que el aceite almacenado en el depósito ha perdido el aire disperso admitido durante su recorrido, de modo que la bomba no absorberá ninguna mezcla crítica aceite-aire.

Realizados los ensayos siguiendo la norma indicada se comprobó que la presencia de sarsapogenina en cantidades de 8, 16 y 32 partes por millón en el aceite mineral estudiado disminuyó notablemente el tiempo necesario para romper una emulsión aceite-aire, siendo la concentración indicada en primer lugar la de mayor efectividad.

No hemos encontrado antecedentes bibliográficos.

## PARTE EXPERIMENTAL

Los ensayos han sido realizados en el laboratorio de la Refinería de C.E.P.S.A en Tenerife, utilizándose aceites elaborados en las unidades de lubricantes de dicha Refinería, a cuya Dirección expresamos nuestro agradecimiento.

**Descripción de los ensayos.** Se efectuaron simultáneamente y en idénticas condiciones con varias muestras de aceite parafínico con viscosidad entre 3 y 5° Engler a 50 °C de las cuales, una estaba formada por el aceite mineral puro, tres por este aceite con concentraciones de sarsasapogenina de 8, 16 y 32 partes por millón, y una quinta que contenía una cantidad de eluyente puro igual a la que se empleó para lograr la concentración de 16 partes por millón.

Las muestras de aceite con pequeñas concentraciones de genina quedaron libres de burbujas de aire con más rapidez que la de aceite mineral puro y que la que sólo contenía el disolvente empleado para la adición de sarsasapogenina. Estas dos muestras se comportaron de modo análogo.

**Preparación del aditivo.** 0,6 g de sarsasapogenina disueltos en 3-4 cc de alcohol amílico, y diluidos con keroseno hasta 100 cc.

## BIBLIOGRAFIA

1. WALL, M. E., EDDY, C. R., MC CLENNAN, M. L., y KLUMPP, M. E.: *Anal. Chem.*, **24**, 1337 (1952).
2. JACOBS, W. A., y SIMPSON, J. C. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 1424 (1934).
3. JACOBS, W. A., y SIMPSON, J. C. E.: *J. Biol. Chem.*, **105**, 501 (1934).
4. MAITI, C. P., y SIPRA MOOKHERJEA: *Chem. & Ind.*, 1653 (1965).
5. MARKER, R. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1199 (1943).
6. TSUKAMOTO y UENO: *J. Pharm. Soc., Japan*, **56**, 135 (1936).
7. MARKER y col.: *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2399 (1947).
8. WINDAUS y SCHEKENBERGEN: *Bern.*, **46**, 2628 (1913).
9. JACOBS, W. A., y FLECK, U. E. P.: *J. Biol. Chem.*, **88**, 545 (1930).
10. MARKER, R. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 3620 (1940).
11. MARKER, R. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 2620 (1940) y posteriores publicaciones de este autor.
12. MARKER, Russell E., WAGNER, R. B., ULSHAFFER, Paul R., WITTBECKER, Emerson L., GOLDSMITH, Dale P. J., y RUOF, Clarence H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2167 (1947).
13. MARKER y APPLEZWEIG: *Chem. Enc. News*, **27**, 3348 (1949).
14. ROSENKRANZ, G., PATAKY, J., y DJERASSI: *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 4055 (1951).
15. MARKER, R. E., WAGNER, R. B., ULSHAFFER, P. R., WITTBECKER, E. L., GOLDSMITH, D. P. J., y RUDOF, C. H.: *J. Am. Soc.*, **69**, 2167 (1947).
16. WALL, M. E., KRIDER, M. M., ROTHMAN, E. S., y EDDY, C. R.: *J. Biol. Chem.*, **198**, 533 (1952).
17. TSCHESCHE, R., WULFF, G., y BALLE, G.: *Tetrahedron*, **18**, 959 (1962).
18. SANNIÉ, C., y LAPIN, H.: *Bull. Soc. Chim. France*, nov.-dic., 1080 (1952).
19. TSCHESCHE, FREYTAG y SATZKE: *Bern.*, **92**, 3053 (1959).
20. BENNETT y HEFTMANN: *J. Chrom.*, **9**, 353 (1962).
21. HORNING y VAN DEN HUEVEL: *J. Org. Chem.*, **26**, 634 (1961).
22. DÍAZ, ZAFFARONI, ROSENKRANZ y DJERASSI: *J. Org. Chem.*, **15**, 748 (1952).
23. WALL, E., y col.: *J. Anal. Chem.*, **26**, 325 (1954).
24. ROTHMAN, WALL y EDDY: *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 4013 (1952).
25. JONES, RATZENELBOGEN y DOBRINER: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 158 (1953).
26. EDDY, C. Roland, WALL, M. E., y SCOTT, M. K.: *Anal. Chem. Soc.*, **25**, 267 (1953).
27. SMITH, A. M., y EDDY, C. R.: *Anal. Chem.*, **31**, 1359 (1959).
28. RAMSAY: *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 72 (1952).
29. TSCHESCHE y WULFF, **18**, 959 (1962).
30. RAO, P. S., ROZDON, D. N., y BUDHIRAJA, R. P.: *Proc. Indian Acad. Sci.*, **32A**, 264 (1950).

31. RAO, P. S., y ROZDON, O. N.: *Proc. Indian Acad. Sci.*, **31A**, 441 (1950).
32. RAO, P. S., BERI, R. M., y BUDHIRAJA, R. P.: *J. Sci. Ind. Research*, **10B**, 261 (1951); *CA.* **46**, 1272e.
33. RAO, P. S., BERI, R. M., y BUDHIRAJA, R. P.: *Proc. Indian Acad. Sci.*, **11B**, 127 (1952).
34. STEVENSON, A. E.: *Food Research*, **15**, 150 (1950); *CA.* **44**, 10207.
35. CANDELA, J. L., y VILLAR PALASÍ, V.: *Anal. Soc. Fis. y Quím.*, **47B**, 309 (1951).
36. RABASSA, R., y GIOVAMBATTISTA, M.: *Rev. Asoc. Bioquím. Argentina*, **18**, 33 (1953).
37. DÁVILA y PANIZO: *Anal. Soc. Esp. Fis. y Quím.*, **54B**, 697 (1958).
38. LAOARGA, R., y PINAR, M.: *Ibid.*, **56B**, 797 (1960).
39. FIESER y FIESER: *Natural Products Related to Permantrene*, Reinhold Publishing, Corp. Nueva York (1949).
40. *Elsevier's Encyclopaedia of Organic Chemistry*, vol. 14, serie III, pág. 282 (1940).
41. ASKEW, F. A., FARNER, S. N., y KON, G. A. R.: *Soc.*, 1399 (1936).
42. KON, G. A. R., SOPER, H. R., y WOLMAN, A. M.: *Ibid.*, *ibid.*, 1201 (1939).
43. MARKER, R. E., y ROHRMANN, E.: *Am. Soc.*, **61**, 2072 (1939).
44. MARKER, R. E., y SHABICA, A. C.: *Am. Soc.*, **64**, 147 (1942).
45. MARKER, R. E., y SHABICA, A. C.: *Ibid.*, **64**, 180 (1942).
46. GONZÁLEZ, A. G., BERMEJO BARRERA, J.: *Anal. Soc. Fis. y Quím.*, **58B**, 559 (1962).
47. FIESER y FIESER: *Steroids*, Reinhold Publishing Corporation, Nueva York, página 830 (1959).
48. FIESER, L. F.: *Experiments in Organic Chemistry*, 3rd., Heath, Nueva York, 1955.
49. POOS, G. I., ARTH, G. E., BEYLER, R. E., y SARETT, L. H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 422 (1953).
50. WALENS y WALL: *J. Am. Chem. Soc.*, **26**, 325 (1954).
51. RODRÍGUEZ DE LEÓN, Angelo: Memoria Doctoral, La Laguna (1964).
52. JONES, KATZENELBOGEN y DOBRINER: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 158 (1953).
53. KARRER, Walter: *Konstitution und Vorkommen der Organische Pflanzwaroffe Birkhäuser Basel und Stuttgart*, pág. 875 (1958).
54. *Chemistry of Carbon Compounds*, IIB, Alicyclic Compounds Elsevier Publishing Company, 1963.
55. EDDY, C. R., WALL, M. E., y SCOTH, M. L.: *Anal. Chem.*, **25**, 267 (1953).
56. ZIMMERMANN: *Z. Physiol. Chem.*, **233**, 257 (1935).
57. Esta Tesis. Capítulo I.
58. SIMPSON, J. C. E., y JACOBS, W. A.: *J. Biol. Chem.*, **109**, 573 (1935).
59. Esta Tesis. Capítulo II.
60. *Elsevier's Encyclopaedia or Organic Chemistry*, Ed. Radt, Londres, vol. 14, pág. 280 (1940).
61. *Über Sterine, Gallensäure und verwandte Naturstoffe*, Lettré, Inhoffen, Tschesche, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1954, pág. 208.
62. *Bestimmung des Luftabscheidungsvermögen von Turbinenölen*, Prüfvorschrift Tf/PV 19-8851, abril 1960.