

NUEVAS FUENTES NATURALES DE SAPOGENINAS ESTEROIDICAS

I. *Asparagus umbellatus* Link

P O R

R. FERNÁNDEZ DÍAZ, R. FREIRE BARREIRA y A. GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Universidad de La Laguna.

Instituto de Investigaciones Químicas de Tenerife del C. S. I. C.

Recibido el 7 de octubre de 1966

S U M M A R Y

From the rhizoms of *Asparagus umbellatus* Link, recollected in May in the South of Tenerife, we obtained β -sitosterol and three sapogenins, two of them, tigogenin and hecogenin, in great quantities, the third one, identified as hispidogenin, only small yield.

The rhizoms of *A. umbellatus* Link recollected in winter, nearly exclusively contained tigogenin and hecogenin, hispidogenin being present in traces only.

For the first time from the species *Asparagus*, were isolated three steroidal sapogenins different from *sarsasapogenin*, until now the only genin found in the *Asparagius* studied.

La fácil transformación de las sapogeninas esteroideas al correspondiente Δ^{16} -20-cetoesteroide, descubierta por Marker y Rohrmann (1), ha tenido enorme repercusión, tanto en el campo teórico como en el industrial. Así, nos encontramos con que la *diosgenina I*, frecuente en las *Dioscoreaceas*, entre otras familias botánicas; prácticamente ha desplazado al *cholesterol* como materia de partida en las síntesis de *hormonas sexuales y corticales*, fabricándose, en gran escala, primero la *progesterona* (2) y luego la *desoxicorticorterona* (3).

A raíz de la brillante aplicación industrial del descubrimiento de Marker y Rohrmann (loc. cit.) se intensifica la búsqueda de nuevas fuentes de sapogeninas esteroídicas, siendo miles las especies de plantas en las cuales

(1) MARKER, E. E. y ROHRMANN, E. J. *Amer. Chem. Soc.*, **61**, 846 (1939).

(2) MARKER, R. E., TSUKAMOTO, T. y TURNER, D. L.; *J. Amer. Chem. Soc.*, **62**, 2525 (1940).

(3) RINGOLD, H. J. y STARK, G. J.; *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 250 (1958).

se ha investigado la presencia de estas sustancias. De esta forma se han hallado nuevas fuentes ricas en sapogeninas ya conocidas y se han descubierto otras geninas nuevas, cuyas estructuras han sido establecidas. Algunas de las nuevas sapogeninas descubiertas constituyen mejores materiales de partida en la síntesis de varias hormonas y permiten la obtención de otras diferentes. Así, la *hecogenina II*, fácilmente asequible de varias especies vegetales, lo mismo que de los productos residuales de la fabricación del *sisal*, a partir de *Agaves* (4), debido a su agrupamiento cetónico en C-12 constituye el material de partida de una de las síntesis comerciales de *cortisona* (5) y *prednisona* (6). El descubrimiento de la *boto-genina III* (7) [*gentrogenina* y *correlogenina* (8)], con su doble enlace en C₅-C₆, facilita las síntesis de varias hormonas.

Dada la gran aplicación que la industria hace de varias sapogeninas esteroidales, en la síntesis de hormonas sexuales y corticales, consideramos de interés investigar la presencia y naturaleza de estas geninas en diversas especies botánicas, endémicas o introducidas en el Archipiélago canario, como parte de nuestro plan general de trabajo sobre *química de la flora canaria*.

Hemos iniciado estos estudios con la investigación de las sapogeninas esterólicas contenidas en un grupo de *Asparagus* endémicos o introducidos en el Archipiélago canario.

Había llamado nuestra atención el hecho de que en las especies de *Asparagus* citadas en la literatura; *A. Officinalis* L. (9), *A. acutifolius* L. (10), *Asparagus* sin especificar especies (11), *A. stipularis* L. (12) y *A. albus* L. (13), *se había hallado siempre, como única sapogenina esteroideal, la sarsa-sapogenina IV*.

En primer lugar, hemos estudiado la sapogeninas aisladas de los rizomas del *Asparagus umbellatus* Link, endémico del Archipiélago cana-

(4) CALLOW, R. K., CORNFORT, J. W. y SPENSLEY, P. C.; *Chem. & Ind.* 699 (1951). SPENSLEY; *Ibid.* 426 (1952); HASSALL, C. H. y SMITH, B. S. W.; *ibid.* 1570 (1957).

(5) DJERASSI, C., RINGOLD, H. J. y ROSENKRANG, G.; *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 5513 (1951); **76**, 5533 (1954); CHAPMAN, J. H., ELKS, J., PHILLIPPS, G. H. y WYMAN, L. J.; *J. Chem. Soc.*, 4344 (1956).

(6) MEYSTRE, CH., REY, H., VOSER, W., y WETTSTEIN, A.; *Helv. Chim. Acta*, **39**, 734 (1956) y SZPILFOGEL, S. A., PORCHUMUS, T. A. P., WINTER, M. S. y VAN DROT, D. A.; *Rec. Trav. Chim. Pays-bas*, **75**, 475 (1956).

(7) MARKER, R. E. y LÓPEZ, J.; *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2393 (1947).

(8) WALENS, H. A., SEROTA, S. y WALL, M. E.; *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 5196 (1955); WALENS, H. A., SEROTA, M. E.; *J. Org. Ch.*, **22**, 182 (1957).

(9) MARKER, R. E., TURNER, D. L., SHABICA, A. C., JONES, E. M., KRUEGER, J. y SURMATIS, J. D.; *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 2620 (1940).

(10) FONTAN CANDELA, J. L. y VILLAR PALASI, V.; *Estos ANALES*, **47-B**, 309 (1951).

(11) RABASSA, R. y GIOVAMBATTISTA; *Rev. Asoc. Bioquim. Argentina*, **18**, 33 (1953).

(12) DÁVILA, C. y MARTÍN PANIZO, F.; *Estos ANALES*, **54-B**, 697 (1958).

(13) MARTÍN PANIZO, F. y SCHNELL, J.; *Estos ANALES*, **57-B**, 299 (1961).

rio (14). Se han utilizado rizomas de ejemplares silvestres, recolectados en el mes de mayo en la zona Sur de Tenerife. Llegamos a un rendimiento en sapogeninas brutas de 4,8 gr/kg de rizomas frescos o de 9,5 gr/kg de rizomas deshidratados. En cromatografías en capa fina el producto se comporta como una mezcla de geninas esteroidales. Se realiza su separación por solubilidades y cromatografías preparativas con alúmina y el gel de sílice.

Las sapogeninas brutas se extraen con benceno caliente, reuniéndose las primeras extracciones, que constituyen la *fracción A*, y luego las últimas que denominamos *fracción B*.

La *fracción A* se trata con benceno a la temperatura ambiente (ver parte experimental) y la parte no disuelta se extrae con heptano y luego se cristaliza en metanol, llegamos a una sustancia que, por cromatografía en capa fina y gas líquido, se muestra como una especie pura, de Tr 32,6 minutos, en las condiciones experimentales utilizadas.

Este producto presenta en el I. R. el espectro de absorción característico de una Sapogenina esteroídica de la serie *iso* con grupo OH. Recristalizada en acetona, presente p. f. 213-214° C; $[\alpha]_D^{200} - 65^\circ$, forma un acetato que, cristalizado en $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$, da p. f. 206-212° C; $[\alpha]_D^{200} - 65,4^\circ$, un benzoato de p. f. 224-225° C, cristalizado en CHCl_3 ; $[\alpha]_D^{200} - 51^\circ$ y una cetona de p. f. 202-205° C, $[\alpha]_D^{200} - 52^\circ$. Esta genina se identifica, por sus constantes y las de sus derivados, con la *tigogenina V*, según puede verse en la tabla I.

TABLA I

	Sapogenina	Acetato	Benzoato	Cetona
Tigogenina (15)	P. F. 208 $[\alpha]_D - 67^\circ$ CHCl_3	P. F. 210-212 $[\alpha]_D - 70^\circ$	P. F. 222-224 $[\alpha]_D - 45^\circ$ (piridina)	P. F. 205-207 $[\alpha]_D - 53-55^\circ$ CHCl_3
Nuestra genina del <i>A. umbellatus</i> Link	P. F. 213-214 $[\alpha]_D^{200} - 65^\circ$ CHCl_3	P. F. 206-212 $[\alpha]_D^{200} - 70^\circ$ CHCl_3	P. F. 224-225 $[\alpha]_D^{200} - 51^\circ$ CHCl_3	P. F. 202-205 $[\alpha]_D^{200} - 51^\circ$ CHCl_3

Esta identidad es confirmada por cromatografía en capa fina, gas-líquido y por su estudio espectrográfico.

De la parte de la *fracción A* que se disolvió en benceno frío se separó, por cromatografía preparativa, en primer lugar β -sitosterol, que fue identi-

(14) PITARD, J. y PROUST, L.; *Les Iles Canaries. Flore d'Archipel*, ed. Paul Klincksiech, Paris, 1908, pág.

(15) *Elsevier's Encyclop. of Organic Chem., Springer-Verlag*. Vol. 14, pág. 3735 s., 3738 s. y 3798 s.

ficado por reacciones coloreadas y cromatografías en capa fina, luego se obtiene una mezcla de saponinas, que, por acetilación y cromatografía preparativa a través de alúmina activa, se resuelve en *acetato de tigogenina*, en las primeras fracciones. De las últimas se obtiene otro acetato de punto fusión 222-225° C, $[\alpha]_D^{200} - 53^\circ$, cuyo espectro I. R. corresponde al de un acetato de saponina de las dos series. En las fracciones intermedias se separa una mezcla de dos acetatos diferentes.

La *fracción B* se trató con benceno frío, la parte que se disuelve, después de recuperada, es extraída con heptano y luego cristalizada en metanol. Por cromatografía en capa fina da dos manchas, una de igual desplazamiento que la *tigogenina*. Cuando se eluye con cloroformo, a través de gel de sílice, se eluye, en primer lugar, *tigogenina*, luego se separan mezclas y por último un producto de p. f. 267° C, cristalizado en acetona, $[\alpha]_D^{200} + 7^\circ$ (CHCl_3 , $c=1,54$ %) y $[\alpha]_D^{200} + 6^\circ$ (CHCl_3 , $c=1,71$ %). Por cromatografía en capa fina muestra trazas de *tigogenina*.

La absorción en el I. R. de este producto corresponde a la de una saponina esteroideal de la serie *iso*, con OH y C=O (ν_{max} 1.712 cm^{-1}). Forma un acetato de p. f. 334-337° C (de MeOH), $[\alpha]_D^{200} - 3,7$ (CHCl_3) y $[\alpha]_D^{200} - 0$ (dioxano) y una 2,4-fenilhidrazona de p. f. 249-250° C. Estas características concuerdan con *hecogenina* y la identidad se confirma por cromatografía en capa fina de la genina y su acetato, así como por sus estudios en el I. R.

La parte menos soluble en benceno de la *fracción B* es una mezcla que se resuelve por cromatografía en gel de sílice. Primero pasan productos céreos, luego una mezcla de esteroides de la cual, por cristalización, se separa β -sitosterol y de las aguas madres de estas recristalizaciones se recupera un producto de p. f. 125-128° C; $[\alpha]_D^{200} + 41^\circ$ (CHCl_3), que por cromatografía gas-líquido se resuelve dando tres bandas de Tr 68,4; 72,4 y 80 minutos, el β -sitosterol, en las condiciones experimentales utilizadas, muestra Tr 80 minutos. Después de los esteroides se separa *tigogenina* y en las últimas fracciones de la cromatografía se obtienen mezclas de *tigogenina* y *hecogenina*.

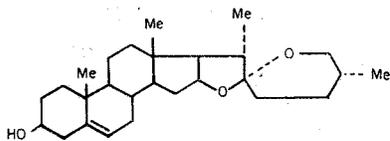
De las aguas de las cristalizaciones de los productos de la *fracción B* se recupera una mezcla de geninas. Por cromatografías en capa fina da cuatro manchas; la de mayor avance se alinea con una muestra de β -sitosterol, la siguiente observa el mismo desplazamiento y coloración a la luz UV que la *tigogenina*, la tercera no se alinea con ninguna de las saponinas disponibles en nuestro laboratorio y la cuarta se comporta como *hecogenina*.

Cromatografiada esta mezcla, a través de gel de sílice, no se revuelve por lo que procedimos a su acetilación y posterior cromatografía de la mezcla de los acetatos en alúmina neutra. Se obtiene, en las primeras fracciones, *acetatos de esteroides*, luego *acetato de tigogenina*, con trazas de la tercera genina, y luego es arrastrado un producto que, en cromatografía de capa fina, se muestra como un especie química pura con desplazamiento

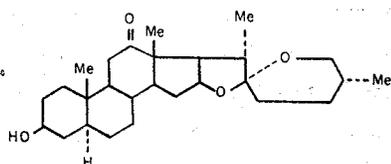
intermedio entre el acetato de tigogenina y acetato de hecogenina. Cristalizado en acetona da P. F. 206-210° C; $[\alpha]_D^{20} -47,3$ (CHCl_3). Su espectro IR en S_2C presenta bandas características de una sapogenina esteroidal de la serie *iso*, con bandas de absorción del agrupamiento éster y del agrupamiento $\text{C}=\text{O}$ (ν máx. 1720 cm^{-1}), dando positiva la reacción coloreada de Zimmerman (16) para las cetonas en C_3 . Este acetato se identifica con el acetato de hispidogenina VI aislada recientemente por C. P. Maiti y Sipra Moorkherjea (17) del *Hispidum solanum*.

Con el fin de ver si el *Asparagus umbellatus Link* contiene las mismas sapogeninas en todas las épocas del año, realizamos un estudio de las geninas aisladas de sus rizomas frescos, recolectados en el mes de noviembre en la zona sur de Tenerife.

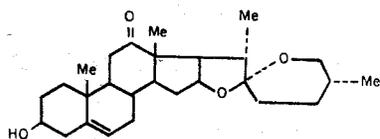
En este ensayo obtuvimos las sapogeninas siguiendo la marcha descrita por Wall y colaboradores (18). Con la sapogeninas brutas obtenidas realizamos una serie de cromatografías en capa fina. Se comprobó que los rizomas del *A. umbellatus Link* recolectado en el invierno contiene casi exclusivamente *ligogenina* y *hecogenina* y sólo ligeros indicios de una tercera sapogenina que se alínea con la *hispidogenina*.



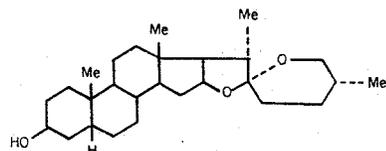
I. Diosgenina



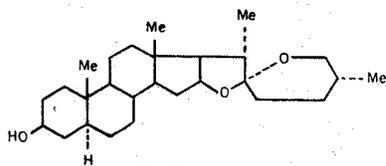
II. Hecogenina



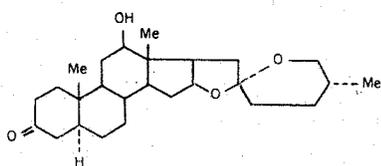
III. Botogenina



IV. Sarsasapogenina



V. Tigogenina



VI. Hispidogenina.

(16) ZIMMERMAN; *Z physiol Chem.*, **223**, 257 (1935).

(17) MAITI, C. P. y SIPRA MOOKHERJEA; *Chem. & Ind.*, 1653 (1965).

(18) WALL, M. E., KRIEDER, M. M., ROTHMAN, E. S. y EDDY, C. R.; *J. Biol. Chem.*, **198**, 533 (1952).

PARTE EXPERIMENTAL

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 Perkin-Elmer mod. 141. Los espectros ultravioletas, en un espectrógrafo Perkin-Elmer modelo 137 U. V., y los infrarrojos, en los modelos 137 I. R. y 237 I. R. Los análisis, en la Sección de Microanálisis del Instituto «Alonso Barba», dirigido por el Dr. Calderón, a quien expresamos nuestro agradecimiento.

Las cromatografías en fase gaseosa se han efectuado en un aparato «PYE-Chromatography», empleando columnas de $120 \times 0,5$ cm y gas argón como eluyente.

En las cromatografías de columna se emplea como absorbente alúmina Merck estandarizada para análisis cromatográfico, según Broockmann, o gel de sílice de «The Davison Chemical Corporations», exceptuándose los casos que se indiquen en el texto.

En las cromatografías en capa fina, siempre que no se diga otra cosa, se emplea ácido clorosulfónico al 20 por 100, en ácido acético glacial como revelador, y Kiesselgel G. Merck, como absorbente. Los disolventes o mezclas de disolventes utilizados como eluyentes se designarán de la forma 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

Material de partida.—Unos 14 Kg de rizomas frescos, recolectados durante el mes de mayo, en la zona entre Arico y La Zarza (isla de Tenerife), pertenecientes a ejemplares silvestres de *Asparagus umbellatus* Link, después de triturarlos, fueron extraídos con etanol, utilizándose 40 litros de alcohol, en dos extracciones a reflujo, durante cinco horas cada una. El extracto frío fue filtrado, luego se concentró a vacío hasta seis litros y volvió a filtrar, se unieron los dos precipitados.

El concentrado se hidrolizó calentándolo con ácido sulfúrico, estando la solución a pH 4. La solución obtenida, después de la hidrólisis, se vertió sobre un volumen igual de agua. Se separó el precipitado formado y, después de seco, fue extraído con benceno a ebullición. Se hicieron ocho extracciones, empleándose dos litros de benceno en cada una.

Se agruparon por separado las tres primeras extracciones que constituyen la *Fracción A* y las restantes, que constituyen la *Fracción B*.

Tanto la *Fracción A* como la *B* se sometieron al tratamiento siguiente: se lavaron primero con agua; luego, con solución acuosa de NaOH al 3 %, y por último, con

agua. Al destilar el benceno, después de secar las soluciones, la *Fracción A* dejó un residuo sólido de 26 g, y la *Fracción B*, uno de 49 g. En total se obtuvieron 75 g de geninas en bruto, lo que significa un rendimiento de 4,8 g/Kg de rizomas frescas, o 9,4 g/Kg de rizomas deshidratados.

Fracción A.—Los 26 g de producto se agitaron con un litro de benceno, a la temperatura del laboratorio, se separó por filtración la parte que no se disolvió (8,3 g) y se lavó, otra vez, con unos cc de benceno.

La parte que no se disolvió, en el litro de benceno frío, en cromatografía en capa fina, eluyendo con el sistema F, se desdobra en dos manchas. Después de cristalizarlo varias veces las cromatografías en capa fina, usando los sistemas eluyentes A, B, D y F, dan una sola mancha que queda, en todos los sistemas, a la misma altura que una muestra de *tigogenina* auténtica, al U. V. dan ambos productos la misma fluorescencia. Usando el revelador de Sannié y colaboradores (loc. cit.) no se obtuvieron resultados positivos.

La sapogenina obtenida, cristalizada en acetona, fijó su p. f. a 213-214° C, $[\alpha]_D^{20} -65^\circ$ (CHCl_3 , $c=1,04$ %). Su espectro I. R. es típico de una isosapogenina superponible con el dado por una muestra auténtica de *tigogenina*, ambos productos en solución de S_2C a 10 gr/litro y con célula previamente calibradas. Por cromatografías gaseoso en columna de silicona al 0,75 % sobre celita 85-100 mesh (temperatura en la parte superior de la columna 125°, flujo de gas 37 cc/minuto, tiempo de carta 6 pulgadas/hora, presión de la columna 14 p. s. i. voltaje 1500 V. y sensibilidad X 10), dio una sola banda con Tr 32,6 minutos, referido al colestano.

Se calentaron 0,0034 g de esta genina con 10 cc de SO_4H_2 al 94 % durante dieciséis horas, a 40°, el producto resultante presenta en el U. V. absorciones para λ_{max} 415 y 350 m μ .

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 %.

Esta sapogenina forma un acetato que, cristalizado en mezcla CHCl_3 — CH_3OH , fija su p. f. a 206-212° C; $[\alpha]_D^{20} -64,4^\circ$ (SHCl_3 , $c=1,80$ %). Da el espectro I. R. típico de las isosapogeninas espirostánicas.

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 %.

También forma un benzoato, al tratarla con piridina y cloruro de benzoilo; cristalizado en cloroformo da p. f. 224-226° C; $[\alpha]_D^{20} -51^\circ$ (CHCl_3 , $c=1,8$ %).

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 %.

Se trataron 0,51 g de la sapogenina que estudiamos con una jalea obtenida adicionando, poco a poco, 0,51 g de CrO_3 a 5 cc de piridina, mientras se agitaba. Se dejó la mezcla durante veinte horas a la temperatura del laboratorio y luego se vertió sobre agua, se filtró el producto separado, se disolvió en éter sulfúrico y la parte acuosa se extrajo con éter sulfúrico. Los extractos etéreos unidos fueron lavados; primero con clorhídrico al 10 % y luego con solución acuosa de bicarbonato sódico, a continuación se secaron sobre SO_4Na_2 anh. Al destilar el éter quedó un producto que cristalizado en metanol dio p. f. 202-205° C, $[\alpha]_D^{20} -52^\circ$ (CHCl_3 , $c=2,39$ %). Da positiva la reacción coloreada de Zimmermann y su espectro I. R. acusa la presencia del grupo carbonílico, habiendo desaparecido la asociación del grupo alcohólico.

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 %.

Fracción A. Parte disuelta en benceno.—Los 17,7 g que se disolvieron en el benceno se cromatografiaron a través de una columna (30×5 cm) de 400 g de gel de sílice de 150-200 mesh activada, formada en heptano. Se eluyó con C_6H_6 ; $C_6H_6-CHCl_3$ (50:1) y por último en $C_6H_6-CHCl_3$ (4:1), se obtuvieron los resultados siguientes:

Fracciones 1-13.—Productos céreos y aceites. Dan negativa la reacción coloreada de Liebermann-Burchard.

Fracciones 14-27.—Indicios de producto. En capa fina, con el sistema B como eluyente, se muestra como una mezcla compleja de esteroides. Con este sistema B eluyente aparece, en capa fina, una mancha que se comporta como la de una muestra auténtica de β -sitosterol.

Fracción 28.—Se obtienen 11 g de producto coloreado, se lavó con metanol y la parte que no se disolvió se cristalizó en cloroformo. Cromatografiado en capa fina, empleándose el sistema C como eluyente, aparecen dos manchas que se alinean perfectamente con las dadas por dos muestras auténticas de tigogenina y hecogenina. Si se emplean el sistema C como eluyente la mancha de menor desplazamiento se desdobra en dos, una de mayor intensidad que la otra.

Se cromatografió en fase gaseosa, el producto se disolvió en benceno, en las mismas condiciones en que fue cromatografiada la parte que no se disolvió en este disolvente, sólo se varió la temperatura de la cabeza de la columna que fue de 220° C. Se comportó como una sustancia de Tr 38 minutos, acompañada de una pequeña impureza.

Recristalizada en metanol forma agujas de p. f. 209-211°; $[\alpha]_D^{20} -63^\circ$, en $CHCl_3$ ($c=1,07\%$). Presenta en el I. R. las bandas de absorción características de las saponogeninas espiroestánicas de la serie *iso*, da positivas las reacciones coloreadas de Liebermann-Burchard y Salkowsky. Por cromatografías en capa fina, eluyéndose con el sistema B, aparecen dos manchas fundamentales que se ordenan con las dadas por muestras de tigogenina y hecogenina.

Acetilada esta mezcla se cristalizó, el producto obtenido, en una mezcla de metanol-cloroformo; forma plaquitas alargadas de p. f. 207-208° C, $[\alpha]_D^{20} -65,4^\circ$ en $CHCl_3$ ($c=0,98\%$). Cromatografiado el acetato de la mezcla en capa fina, eluyéndose con el sistema F, da tres manchas, de aproximadamente la misma intensidad, ordenándose dos de ellas con las manchas dadas por muestras auténticas de *tigogenina* y *hecogenina*, siendo también idénticas las fluorescencias dadas a la luz U. V.

Fracción B.—Los 49 g de producto de esta fracción se trataron con 1 litro de benceno frío, quedaron sin disolver 13 g. Se estudian por separado las dos fracciones.

La parte de la *Fracción B* que se disolvió en benceno frío fue recuperada y extraída con heptano en un Soxhlet, durante unas veinte horas. El producto extraído con heptano, después de recristalizado en metanol *Producto I*, se cromatografió en capa fina, con el sistema eluyente A, muestra dos únicas manchas, perfectamente definidas, la de mayor desplazamiento se alinea con una muestra auténtica de *tigogenina*. Si se cromatografía este producto en capa fina, usándose el eluyente D, la mancha de menor desplazamiento se desdobra en dos, una en fuerte proporción, es la de menor desplazamiento en el sistema utilizado, y la otra aparece sólo como indicios. La tercera mancha de esta cromatografía, con el sistema eluyente D, coincide con la dada por una muestra de *tigogenina*.

A la vista de las buenas separaciones conseguidas en capa fina, se cromatografiaron 1,90 g en 120 cc de $CHCl_3$ a través de 95 de gel de sílice de 0,2-0,5 mm. Se usó exclusivamente cloroformo como eluyente y se recogieron fracciones de 150 cc. Se agruparon las fracciones obtenidas de acuerdo con los resultados dados por las cro-

matografías en capa fina, usándose como eluyente el sistema B, los resultados logrados fueron los siguientes: Fracciones 1-3 productos de tipo céreo; Fracciones 4 y 5 muestra muy enriquecidas en el producto de mayor desplazamiento; Fracciones 6 y 7 aparecen dos productos en aproximadamente la misma proporción y Fracciones 8 y 9 aparece casi exclusivamente el producto de menor desplazamiento, con ligeras impurezas del de mayor desplazamiento. Los productos aislados de estas fracciones de la cromatografía fueron estudiadas con el siguiente resultado:

Fracciones 4 y 5.—Se cristalizó en acetona, p. f. 205-207° C, $[\alpha]_D^{200-640}$ (CHCl_3 , $c=1,21$ %). Por su I. R. y por cromatografía en capa fina, con diferentes sistemas de eluyente, se identifica con la tigogenina.

Fracciones 8 y 9.—Recristalizadas en acetona p. f. 267° C, $[\alpha]_D^{+7}$ (CHCl_3 , $c=1,54$ %); $[\alpha]_D^{+6}$ (CHCl_3 , $c=1,71$ %). Cromatografías en capa fina de este producto, usándose como eluyentes los sistemas A, B y F, mostraron ligeras trazas de tigogenina. Su I. R. en nujol muestra las bandas de absorción características del agrupamiento espiroestánico de una sapogenina de la serie «iso» y una banda intensa a 1712 cm^{-1} , característico de un agrupamiento cetónico.

Análisis.—Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_5$; $\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$; C, 73,63; H, 9,77 %. Hallado: C, 73,11; H, 9,90 %.

Forma un derivado acetilado que, recristalizado en metanol, da p. f. 234-237° C; siendo $[\alpha]_D^{200-3,70}$, en CHCl_3 ($c=1,60$ %) y $[\alpha]_D^{200-0}$, en dioxano ($c=1,26$ %).

Su I. R. en solución de S_2C ($c=1,1$ %) confirma que se trata de una sapogenina espiroestánica de la serie «iso» con un grupo cetónico en un ciclo hexagonal ($\nu_{\text{máx}}$ 1712 cm^{-1}).

Análisis.—Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_5$: C, 73,77; H, 9,36. Hallado: C, 73,10; H, 9,36.

Esta sapogenina forma una 2,4-dinitrofenilhidrazona de P. F. 249-250° C.

Fracción B. Sapogeninas que no se disolvieron en benceno.—Al tratar los 49 g de sapogeninas brutas de la *Fracción B* con un litro de benceno frío se disolvieron unos 36 g de producto, se tomaron 550 cc de solución bencénica, que contenían unos 20 g de geninas, se cromatografiaron a través de una columna de 400 g del gel de sílice de 150-200 mes, activada, depositada en éter de petróleo de P. Eb. 60-80°. Se pasaron como eluyentes una serie de fracciones de 500 cc de las cuales 15 fueron de benceno, 25 de benceno con el 2 % de cloroformo, 5 de benceno con el 20 % de cloroformo y, por último, 7 de benceno con el 20 % de etanol. Los productos obtenidos se agruparon de acuerdo con los resultados obtenidos de sus cromatografías en capa fina.

Al estudiar las diferentes fracciones de la cromatografía llegaron a las conclusiones siguientes:

Fracción 1.—Ceras constituidas por hidrocarburos parafínicos, impurificados con pequeña cantidad de éster ($\nu_{\text{máx}}$. 1720 cm^{-1}).

Fracciones 2 y 3.—No se pudieron cristalizar y fueron acetiladas. El acetato, cristalizado en metanol, fundió a 185-191°; $[\alpha]_D^{200+70,40}$ (CHCl_3 , $c=1,42$ %).

Fracción 4.—Con el reactivo Liebermann-Burchard da las coloraciones típicas del β -sitosterol (violeta-azul-verde, en la capa de anhídrido acético). Cristalizado en metanol P. F. 134-136° (CHCl_3 , $c=5,5$ %) por cromatografía en capa fina se alinea con una muestra de β -sitosterol.

Por cromatografía gas-líquido, en las condiciones expuestas más arriba, con temperatura 212° en la cabeza de la columna, da Tr cincuenta y cuatro minutos, valor

idéntico al dado por una muestra auténtica de β -sitosterol, en las mismas condiciones experimentales.

De las aguas madres de esta fracción se obtiene un producto que en cromatografía en capa fina da una mancha más intensa que se alinea con el β -sitosterol y otras menos intensas, casi como impurezas, de las cuales una avanza menos y las otras avanzan más que la principal. Recristalizado este producto en metanol da P. F. 125-128° C; $[\alpha]_D^{200} + 41^\circ$ ($c = 0,67$ % en CHCl_3).

Cromatografías en gas-líquido acusan la presencia de tres productos, temperatura de cabeza de columna de 204°, siendo los Tr 68,4, 72,4 y 80 minutos, respectivamente. El β -sitosterol auténtico, en estas condiciones experimentales, da Tr 80 minutos.

Fracción 5.—Recristalizada en metanol da P. F. 134-135°; $[\alpha]_D^{200} - 20^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1,2$ %). Cromatografías en capa fina, eluyendo con Be: CHCl_3 (9:1), muestra una sola mancha que se ordena con la dada por el β -sitosterol.

Las aguas madres de las recristalizaciones de este producto dan en cromatografía en capa fina, con el eluyente anterior, dos manchas, alineándose la de mayor desplazamiento con la dada por el β -sitosterol. La fluorescencia a la luz U.V. de las dos manchas es diferente, correspondiente la de la mancha de menor desplazamiento a la dada por sapogeninas espiroestánicas.

Fracción 6.—Se comportó como la anterior.

Fracciones 9-39.—Recristalizadas conjuntamente en metanol dan P. F. 211-214° C; $[\alpha]_D^{200} - 57,5^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1,46$ %) y $[\alpha]_D^{200} - 23,5^\circ$ (acetona, $c = 0,30$ %). En I.R. mostró absorciones para ν máx. 865, 900, 825 y 980 cm^{-1} , siendo la banda a 900 cm^{-1} . Presentó también otra banda a ν máx. 1240 cm^{-1} .

El producto obtenido de las aguas madres de la cristalización de estas fracciones se comporta, en cromatografías en capa fina, como una muestra auténtica de tigogenina.

Fracciones 40-42.—Cristalizadas en metanol y cromatografiadas en capa fina, con Be: CHCl_3 (9:1) como eluyente, dan dos manchas que se alinean perfectamente con muestras auténticas de tigogenina y hecogenina. La correspondiente a la primera va disminuyendo en intensidad y la segunda aumenta.

Fracción 43. Da en cromatografías en capa fina prácticamente una sola mancha, que se alinea con una muestra auténtica de hecogenina.

Fracciones 45-51.—Pequeñas cantidades de producto resinoso, purificado por cristalizaciones se llega a una pequeña cantidad de producto cristalizado que, por cromatografías en capa fina, da una mancha principal, que se alinea con la dada por una muestra de hecogenina, y otra serie de manchas secundarias como trazas.

Estudio de las sapogeninas de las aguas madres de la cristalización de diversas fracciones.—Los productos recuperados de las aguas madres procedentes de las recristalizaciones de las diferentes partes en que se dividió la *fracción B* se recuperaron y unieron. Cromatografías en capa fina del producto obtenido muestran que se trata de una mezcla de esteroides y sapogeninas asperostánicas, de estas dos se alinean con muestras auténticas de tigogenina y hecogenina, otra tiene un desplazamiento intermedio y una cuarta sapogenina, en muy pequeña proporción, tiene un desplazamiento menor que la hecogenina.

El producto procedente de las aguas madres de las recristalizaciones de las distintas partes de la *fracción B* (8 g) se disolvieron en la menor cantidad posible de cloroformo y se cromatografiaron a través de una columna de 400 g de gel de sílice de 0,2-0,8 mm. Se eluyó el cromatograma primero con 19 fracciones de cloroformo y luego con 40 fracciones de cloroformo con el 2 % de acetona. Todas las fracciones fueron de 400 cc.

Todo el producto fue obtenido de las fracciones 1-36, las finales no arrastraron sustancia. Por cromatografía en capa fina, empleándose el sistema B como eluyente, se obtuvieron los resultados siguientes:

Fracciones 1-4 (1,9 g) dan una sola mancha, que se desplaza con el frente.

Fracción 5 (0,7 g) da la reacción coloreada de los esteroides con el reactivo de Liebermann-Burchard (azul-violeta-verde) y se desdobra en dos manchas, la de mayor desplazamiento se alinea con la dada por las fracciones anteriores y la de menor desplazamiento se alinea con una muestra auténtica de β -sistosterol.

Fracción 6 (1,6 g) se desdobra en cuatro manchas; la de mayor desplazamiento se alinea con la dada por una muestra de β -sistosterol, otras dos mayores se alinean perfectamente con muestras auténticas de tigogenina y hecogenina, y una cuarta, menos intensa, de desplazamiento intermedio entre la tigogenina y hecogenina, no se alinea con ninguna de las sapogeninas espirostánicas disponibles en nuestro laboratorio.

Fracciones 7-16 (1,1 g), en las cromatografías en capa fina, dan débil la mancha que se alinea con el β -sistosterol y otras tres manchas de aproximadamente igual intensidad; dos que se alinean con muestras auténticas de tigogenina y hecogenina, y la tercera, de desplazamiento intermedio.

Fracciones 17-22 (0,18 g) arrastraron poco producto, se comportan en cromatografías en capa fina, como las anteriores.

Fracciones 23-27 (2 g).—Este producto da, en cromatografía en capa fina, tres manchas, se alinean con las dadas por las fracciones anteriores. La que se corresponde con la muestra de tigogenina aparece con menor intensidad.

Fracciones 28-35 (0,65 g); en todas estas fracciones, en cromatografía en capa fina, aparece un nuevo producto de menor desplazamiento que la hecogenina e intensa fluorescencia amarilla a la luz U.V. (pendiente de estudio).

Estudio de las fracciones 6-26.—Se reunieron y acetilaron, la mezcla de acetatos fue cristalizada en acetona. Cromatografiado el producto obtenido en capa fina, después de cristalizado en acetona, usándose como eluyente el sistema E, da tres manchas: una, poco intensa, de mayor desplazamiento, se alinea con una muestra de acetato de tigogenina; otra, más intensa, de mayor desplazamiento, lo hace con una muestra de acetato de hecogenina, y la tercera mancha tiene un desplazamiento intermedio de estos dos acetatos.

Se procede a cromatografiar 1,126 g de esta mezcla de acetatos, disuelta en éter de petróleo de P. Eb. 50-80°, a través de una columna de 43 g de alúmina neutra Merck, desactivada por agitación con 10 cc de ácido acético al 10 %. Se recogieron fracciones de 100 cc y se eluyó el cromatograma con 8 fracciones de éter de petróleo (P. Eb. 50-80°), 5 con éter de petróleo con +2 % de benceno; 3 de éter de petróleo +5 % benceno; 16 éter de petróleo con 20 % benceno y, por último, 9 de éter de petróleo con 20 % de benceno. Se llegó al resultado siguiente:

Fracciones 2-17 (0,347 g).—Cromatografías en capa fina, eluyendo con distintos disolventes, da varias manchas; la principal se alinea con una muestra auténtica de β -sistosterol.

Fracciones 18-38 (0,649 g).—Todas estas fracciones presentan aspecto cristalino. Cromatografías en capa fina, empleándose el sistema C como eluyente dan: las fracciones 18-29, una sola mancha, que se alinea exactamente con una muestra auténtica de acetato de tigogenina, y las fracciones 30-35, con idénticas cromatografías en capa fina, se mostraron muy impurificadas por colorantes, se comportan como mezclas formadas por acetato de tigogenina y acetato de la genina de desplazamiento intermedio.

Fracciones 36, 37 y 38 (0,115 g).—Por cromatografías en capa fina, con distintos sistemas de eluyentes, dan una sola mancha, que coincide con la dada por el acetato de desplazamiento intermedio, entre el acetato de tigogenina y el acetato de hecogenina.

Reunidas las fracciones (0,115 g) y cristalizadas en acetona, después de decolorar el producto con un poco de carbón activo, cristaliza muy bien, dando P. F. 206-210° C, $[\alpha]_D^{20} -47,3^{\circ}$ (CHCl₃, c=0,38 %). Su espectro I.R., en solución al 1,20 % en sulfuro de carbono, muestra las bandas de absorción típicas de una saponina esteroide de la serie «iso» y otra banda intensa a ν máx. 1720 cm⁻¹. Da positiva la reacción coloreada de Zimmerman para las cetonas en C₃.

b) *Asparagus umbellatus* Link recolectado en invierno.—11 Kg de raíces frescas de *A. umbellatus* Link, recolectados a principio de diciembre en Güimar (isla de Tenerife), fueron troceados y extraídos en un Soxhlet con etanol. Los extractos obtenidos fueron concentrados, reduciéndose su volumen a unos 2 litros. Siguiendo la marcha descrita por Wall y colaboradores (loc. cit.), filtramos el concentrado hidroalcohólico, y los precipitados separados fueron disueltos en alcohol del 50 % y filtrados. Estos filtrados se reunieron y extrajeron, en un extractor líquido-líquido, con benceno (desengrasado). La solución bencénica se extrajo con alcohol al 50 por 100, y el extracto alcohólico se unió a los otros extractos ya desengrasados. La solución bencénica fue desechada.

La solución alcohólica fue concentrada y se le añadió 5 g de ClNa por cada 100 cc de concentrado y ácido ClH diluido hasta llegar la solución a pH 4.5. Se extrae unas 4 veces con butanol-agua, en embudo de decantación. Los extractos butanólicos son lavados con solución acuosa de ClNa al 50 %, y, luego, con agua destilada. La solución butanólica se destiló mezclada con agua, para eliminar el butanol. Nos quedaron 1,5 litros de suspensión de las saponinas en agua, se diluyó con etanol al 95 %, hasta que quedó la solución con un 25 % de etanol en volumen. Se hidrolizaron las saponinas agregándole a la solución hidroalcohólica anterior ClH conc. hasta llevar la solución a 4N, aproximadamente; luego fue calentada a reflujo unas cinco horas. La solución fría fue filtrada y el precipitado separado se lavó con etanol/agua al 50 %.

El sólido separado fue calentado a reflujo durante una hora, con una mezcla formada por tres litros de benceno, un litro de metanol y 200 g de KOH. La solución fue filtrada y el precipitado separado se lavó con benceno+10 % de etanol en caliente. La parte no soluble se desechó.

Se reunieron los extractos de benceno-metanol y, después de lavarse con un litro de agua, se secaron y destilaron a sequedad.

Las saponinas obtenidas, unos 35 g (rendimiento, 3,1 g por Kg de raíz fresca), fueron acetiladas y se cristalizaron una vez en acetona. Por cromatografía en capa fina de estos acetatos en bruto, empleándose como eluyente el sistema C, da fundamentalmente dos manchas, que se alinean perfectamente con muestras auténticas de acetato de tigogenina y acetato de hecogenina. Aparece un acetato de desplazamiento intermedio entre el acetato de tigogenina y acetato de hecogenina, sólo como una pequeñísima impureza.

Prácticamente, los 38,5 g de mezcla de acetatos está constituida por acetato de tigogenina y acetato de hecogenina. Se procedió a resolver una muestra de esta mezcla en sus componentes, por cromatografía en capa gruesa de gel de sílice, empleándose como eluyente el sistema C. Los colorantes y los acetatos de las geninas intermedios aparecen solamente como trazas. Separadas las bandas que contienen los acetatos y extraída la sílice por alcohol resultó un 86 % de acetato de tigogenina y un 14 % de acetato de hecogenina.