



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

"Sapogeninas Esteroidales de Cadena Abierta de Calibanus Hookeri"

T E S I S

Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA ORGANICA)

presenta la químico
Rosabel Segura Torrijos



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



B U I N I C A
D. E. P. C.

Este trabajo se desarrolló en el
laboratorio de Química Farmacéutica
y Productos Naturales de la División
de Estudios Superiores de la
Facultad de Química en la U.N.A.M.
bajo la dirección de la Doctora
Carmen Rivera de Reyes a quien
doy mi sincero agradecimiento.

La realización de los estudios de Maestría fue posible gracias a la beca otorgada por la Organización de los Estados Americanos.

A MIS PADRES Y HERMANOS

A MARIO

CON GRATITUD

A MANUEL, CECI, TERE Y BLANCA

<u>C A P I T U L O S</u>	Pag.
I. INTRODUCCION	1
II. DISCUSION	5
III. PARTE EXPERIMENTAL	30
IV. GRAFICAS Y ESPECTROGRAMAS	37
V. CONCLUSIONES	60
VI. BIBLIOGRAFIA	62

I N T R O D U C C I O N

INTRODUCCION

Las sapogeninas que se encuentran en las plantas monocotiledóneas son de tipo esteroidal de acuerdo con los estudios realizados por Hegnauer, (1). Se han identificado especialmente en Liliáceas, Amarilidáceas, Dioscóreas, Agaváceas y Bromeliáceas.

En la naturaleza, se conocen algunos ejemplos de aglucones esterooidales de saponinas con cadena abierta, pero son pocos y raros. Se han aislado de plantas y de insectos, compuestos polihidroxilados con estructuras similares, los cuales tienen actividad de hormona de la muda. Este hecho, hace interesante el buscar en el Reino Vegetal fuentes abundantes de compuestos polihidroxilados que puedan tener actividad sobre las funciones vitales de los insectos. (2,3,4,5,6,7,8,9,10,11)

El Calibanus hookeri, comunmente denominado Sacamecate, pertenece a la familia de las liliáceas, del cual se han aislado en trabajos anteriores dos esteroides (colesterol y β -sitosterol), una sapogenina espirostánica (diosgenina) y una sapogenina de cadena abierta (calibagenina).

En el presente trabajo, del rizoma de Calibanus hookeri se aislaron y purificaron dos sapogeninas esterooidales polihidroxiladas de cadena abierta, cuyas estructuras se dilucidaron utilizando métodos espectroscópicos de Infrarrojo, Ultravioleta, Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C y Espectrometría de Masas.

También se aisló un hidrocarburo que se identificó como n-Hep-tacosano por espectroscopía de Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y Espectrometría de Masas y se analizaron los azúcares

de las saponinas.

Además de estos compuestos, se identificaron colesterol y β -sitosterol, calibagenina y diosgenina, habiéndose calculado el rendimiento total de esta última en el rizoma.

DIAGRAMA I

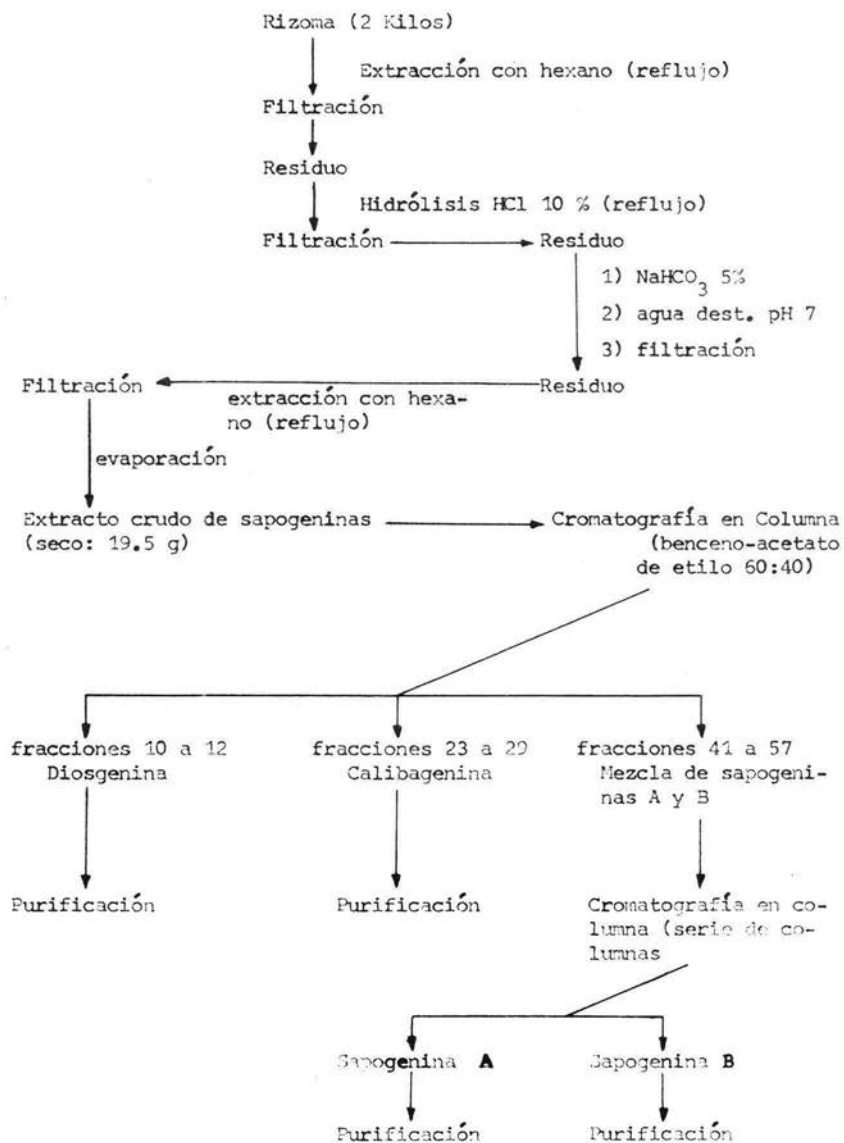
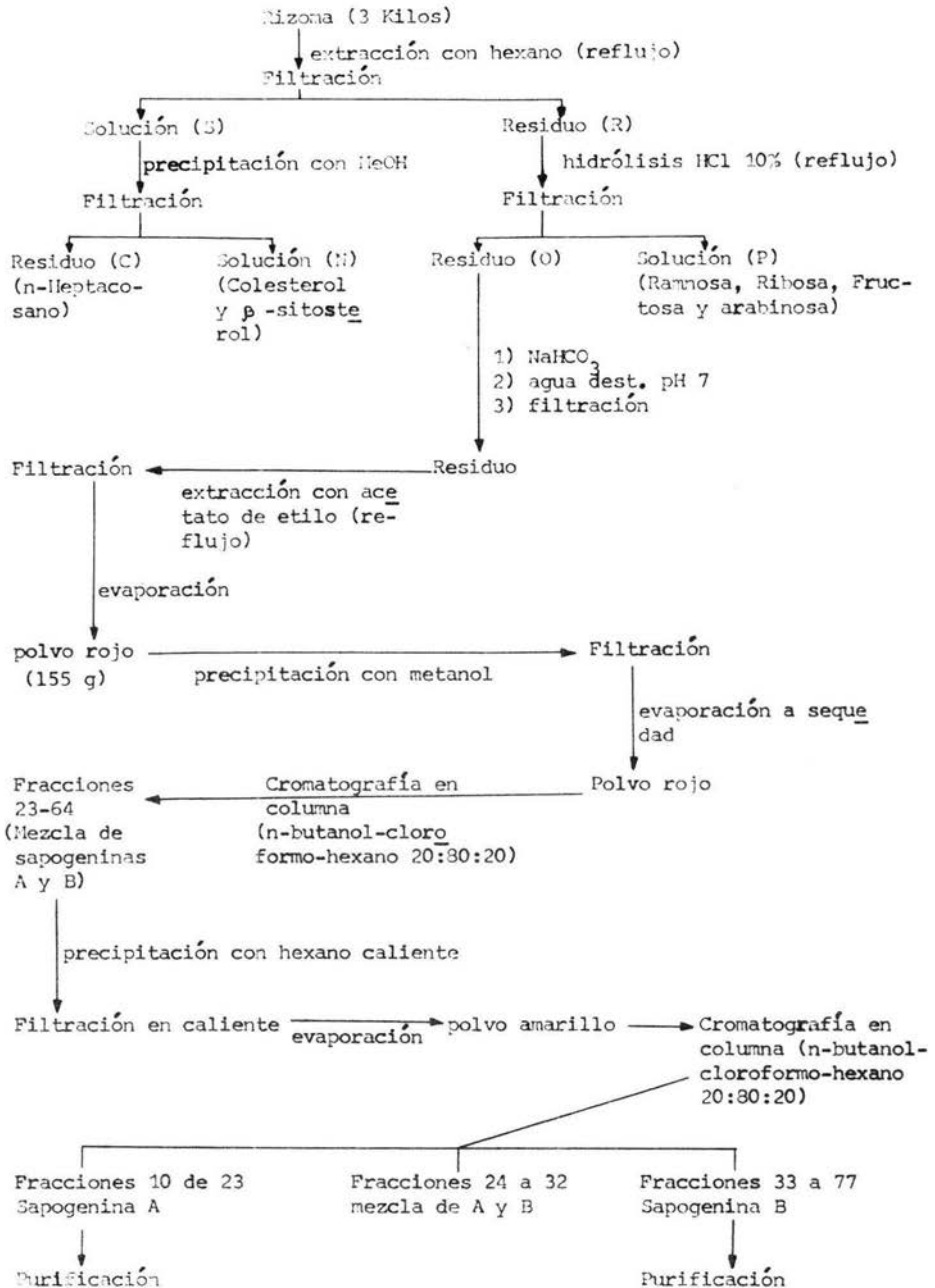


DIAGRAMA II



DISCUSIONDiosgenina y Calibagenina

El rizoma de Calibanus hookeri se hidrolizó y el residuo fué extraído con hexano. De aquí se aisló por cromatografía en columna una sapogenina que se identificó por Pf, Espectrometría de Masas (espectro #1), Infrarrojo (espectro #2) y cromatografía gas-líquido (cromatograma # 3) como diosgenina.

Los datos obtenidos coinciden con los informados en la literatura. (12,13,14,15,16,17)

De las fracciones 23 a la 29 de la misma columna, se aisló calibagenina que se identificó por Pf, RMN de ^1H (espectro # 4), IR (espectro # 5) y cromatografía de gas-líquido (cromatograma # 6). Los datos obtenidos coinciden con los descritos en la literatura. (4)

n-Heptacosano

Como se indica en el Diagrama II, del residuo C se aislaron 41 mg de un polvo blanco de Pf 56° .

El espectro de masas (# 7), muestra un ión molecular M^+ de $m/e = 330$. Calculando la relación del número de átomos de carbono se tiene (18):

$$C_n = \frac{M^+ + 1}{1.1\%} = \frac{30}{1.1} = 27.3$$

por lo tanto el compuesto debe tener 27 átomos de carbono ± 1 .

El espectro IR (# 8) en película, presenta las siguientes bandas:

2900 (m), 2930 (m) cm^{-1}	C-H
1460 (m), 1450(m) cm^{-1}	$-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_3$
1380 (f) cm^{-1}	$-\text{CH}_3$
720 (m) cm^{-1}	$(\text{CH}_2)_n$

El espectro (# 9) de RMN de ^1H (60 MHz) en CDCl_3 , muestra las siguientes señales:

1.2 ppm	50 H	protones de metilenos
0.57 ppm	6 H	protones de metilos

El espectro de masas (# 7), indica claramente que se trata de un hidrocarburo de cadena lineal.

En los hidrocarburos saturados, el ión molecular es de abundancia relativa muy baja y la distribución regular de los iones más pesados resulta porque la mayoría de los enlaces carbono-carbono tienen casi la misma energía; por lo consiguiente, las velocidades iniciales de fragmentación del ión molecular son comparables entre sí.

Lo anterior predice un aumento regular en las intensidades de los picos, al disminuir el tamaño de los iones alquilo y la probabilidad de obtener productos reordenados de mayor estabilidad, aumenta a medida que se forman los fragmentos de iones menos pesados como C_3H_7^+ y C_4H_9^+ , los cuales son principalmente ramificados más estables. (19)

Los fragmentos más abundantes del espectro de masas (# 7) en orden decreciente de intensidad son:

$m/e = 57$ (pico base) (100%), 43 (68%), 71 (68%), 85 (40%), 55 (25.3%)

Fructosa, ramnosa, ribosa y arabinosa

En la siguiente tabla se pueden observar los tiempos de retención (Tr) correspondientes a los patrones y los tiempos de retención de los picos que se muestran en el cromatograma # 11 para la mezcla de azúcares aislados del rizoma.

Patrón		Mezcla de azúcares aislados del rizoma	
	Tr (min)	Tr (min)	pico No. (cromatograma 11)
Fructosa	6.3	6.3	7
	7.5	7.5	8
	11.8	11.8	11
Ramnosa	3.9	3.9	3
	5.3	5.3	6
Ribosa	5.3	5.3	6
	4.6	4.6	5
	4.0	4.0	4
Arabinosa	4.0	4.0	4
	5.3	5.3	6

SAPOGENINA A (Diagramas I y II)

Presenta un Pf de 159-160°; el espectro de masas (# 12) muestra un ión molecular M⁺ de m/e = 416 con un M⁺ + 1 de 30%, por lo tanto el número calculado de átomos de carbono de acuerdo con la literatura (18) es:

$$C_n = \frac{30.1}{1.1} = 27.3$$

El fragmento m/e 398, corresponde a la pérdida de una molécula de agua del ión molecular y debe contener el mismo número de átomos de carbono que éste. La contribución isotópica correspondiente $(398+1)^+$, tiene una intensidad de 30.2 %, al considerar m/e 398 como 100%, por lo tanto debe contener $30.2/1.1$ átomos de carbono o sea 27.4; lo anterior confirma que 27 es el número de átomos de carbono que contiene la molécula.

El espectro IR (# 13), muestra una banda (m) fina en 3610 cm^{-1} , una banda ancha en 3440 cm^{-1} (d) y dos bandas (m) en 1080 y 1045 cm^{-1} , que indican la presencia de alcohol secundario y terciario.

El espectro de RMN de ^1H (100 MHz) (espectro # 14) muestra dos multipletes que integran para dos protones base de alcohol secundario ($\text{>C} \begin{matrix} \text{H} \\ \text{O-} \end{matrix}$) en 3.5 y 3.9 ppm lo cual indica que el número de oxhidrilos secundarios en la molécula es de dos.

El espectro de RMN de ^{13}C (# 15), muestra un singulete en 90.8 ppm que corresponde únicamente a un carbono que soporta unoxhidrilo terciario.

En los espectros de IR (# 13), RMN de ^1H (# 14), y RMN de ^{13}C (#15) no se observa ningún otro grupo funcional que contenga oxígeno. La integral total en RMN de ^1H , corresponde a 44 hidrógenos.

La fórmula elemental del compuesto, para un peso molecular de 416 con 27 átomos de carbono y tres átomos de oxígeno es $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$. (21).

En el espectro de IR (# 16) se observa una banda (d) ancha en 1630 cm^{-1} que corresponde a doble enlace y otra banda (d) en 815 cm^{-1} que pertenece a doble enlace trisustituído. El espectro de RMN de ^1H (# 14), muestra un multiplete en 5.5 ppm que corresponde a un solo protón vinílico en Δ^5 característico de un núcleo esteroidal.

El espectro IR (# 13) muestra además las siguientes bandas:

2960 (f) y 2875 (f) cm^{-1}	C-H de metilo
2935 (f) cm^{-1}	C-H de metileno
1630 (d) banda ancha	>C=C< , >C=C<_H
1465 (m) cm^{-1}	CH_2 y CH_3
1380 (m) cm^{-1}	CH_3
1155 (d) fina cm^{-1}	$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
1005 (m) y 990 cm^{-1}	cicloalcanos

En RMN de ^1H (100 MHz) (espectro # 14) puede observarse además en δ 0.82 ppm un doblete que integra para 6 protones ($J= 3.5$ Hz), correspondiente a los metilos 26 y 27 de una cadena de colestano. En 0.86 ppm hay un singulete que integra para tres protones del metilo 18, en 1.05 ppm se encuentra un doblete ($J= 3$ Hz) que corresponde a la integración de 3 protones del metilo 21, en 1.63 ppm se encuentra un singulete que integra para tres protones del metilo 19. Además se muestran 3 multipletes centrados en 1.25, 1.60 y 2.2 ppm que integran para 26 protones y que corresponden a metilenos, metinos y oxhidrilos.

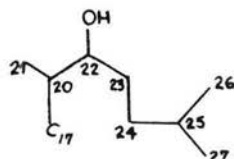
El espectro de UV (# 17) de la sapogenina muestra una sola absorción en 210 nm con un coeficiente de extinción molar de 9038, lo cual está de acuerdo con la absorción que presentan dobles enlaces sustituidos y aislados.

El compuesto A da reacción positiva con digitonina, con bromo en tetracloruro de carbono y además reacción negativa con ácido peryódico, indicando respectivamente que uno de los oxhidrilos está en 3β , que hay dobles ligaduras y que no existen oxhidrilos vicinales.

En el espectro de masas (# 12), se observa que el ión molecular pierde 129 unidades de masa, para dar un pico base de m/e 287 y el fragmento m/e 344 pierde 129 unidades originando m/e 215; estas dos fragmentos

taciones corresponden a la pérdida de la cadena lateral completa, encontrándose el correspondiente metaestable para la formación del pico base m/e 198.0 (m^* calculado 198.0). El ión molecular también se fragmenta originando m/e 285, lo cual significa la pérdida de 131 unidades de masa correspondientes a la cadena lateral más dos hidrógenos que se transfieren del núcleo a la cadena y están de acuerdo con la fragmentación de derivados del colestano que se encuentran en la literatura (22). Esto significa que la cadena lateral tiene una masa de 129 unidades y se confirma por el hecho de que el ión molecular pierde una molécula de agua originando m/e 398 quien a su vez pierde 111 unidades de masa para dar el pico base m/e 287, esto indica que la cadena lateral, de acuerdo con la literatura (22), tiene un grupo oxhidrilo y éste debe estar en el carbono 22, puesto que al perderse, se forma un doble enlace en $C_{22}-C_{23}$ el cual al fragmentarse en posición alílica de acuerdo con la literatura (22), hace que se pierda una cadena que tiene una masa de 111 unidades que debe contener el doble enlace.

Lo anterior, está de acuerdo con las fragmentaciones antes observadas en que se perdía la cadena lateral completa de 129 unidades de masa. Por lo tanto la cadena de la sapogenina A tiene la siguiente estructura:



Lo anterior también se confirma porque m/e 398 pierde una molécula de agua para dar m/e 380 que a su vez pierde 111 unidades de masa originando m/e 269, esta pérdida es la misma que en la fragmentación an

terior.

Así mismo, m/e 380 pierde 15 unidades de masa que corresponde a la ruptura alílica al doble enlace $C_{22}-C_{23}$ perdiéndose el metilo 21 para dar el fragmento m/e 365. También m/e 380 pierde 337 unidades de masa originando m/e 43 lo cual significa el rompimiento del enlace $C_{24}-C_{25}$ alílica al doble enlace, comprobando la existencia del grupo isopropilo.

El ión molecular m/e 416, pierde 72 unidades de masa que corresponden a la ruptura del anillo A en C_1-C_{10} y C_4-C_5 originando m/e 344, esto indica que el anillo A contiene un solo grupo oxhidrilo, el de la posición 3β y se confirma porque m/e 285 pierde también 72 unidades de masa (ruptura o del anillo A) dando m/e 213. También se observa que el pico base m/e 287, quien ya no contiene la cadena lateral pierde 72 unidades de masa (anillo A) originando m/e 215. El fragmento m/e 213 también se forma por la pérdida de 74 unidades de masa del pico base m/e 287 (72 unidades del anillo A con transferencia de dos átomos de hidrógeno) (22). Hasta aquí el espectro de masas ha indicado que el anillo A contiene un solo grupo oxhidrilo encontrándose el segundo en la cadena lateral; por lo tanto el tercer grupo oxhidrilo debe estar en el anillo C o en el anillo B.

El fragmento m/e 131 corresponde a la ruptura del anillo B en C_9-C_{10} y C_7-C_8 del fragmento m/e 269, lo cual indica que el anillo B contiene una doble ligadura en la posición C_5-C_6 , ésto se confirma por la presencia del fragmento m/e 145, que se forma por la ruptura C_9-C_{10} y C_6-C_7 al perderse 124 unidades de masa del fragmento m/e 269. Además, el pico base m/e 287 pierde 18 unidades de masa para dar m/e 269 el cual a su vez pierde 72 unidades de masa para dar m/e 197; también m/e 269 pierde 18 unidades de masa para dar m/e 251 que a su vez pierde 120 unidades de masa al producirse la ruptura de éste fragmento entre C_9-C_{10}

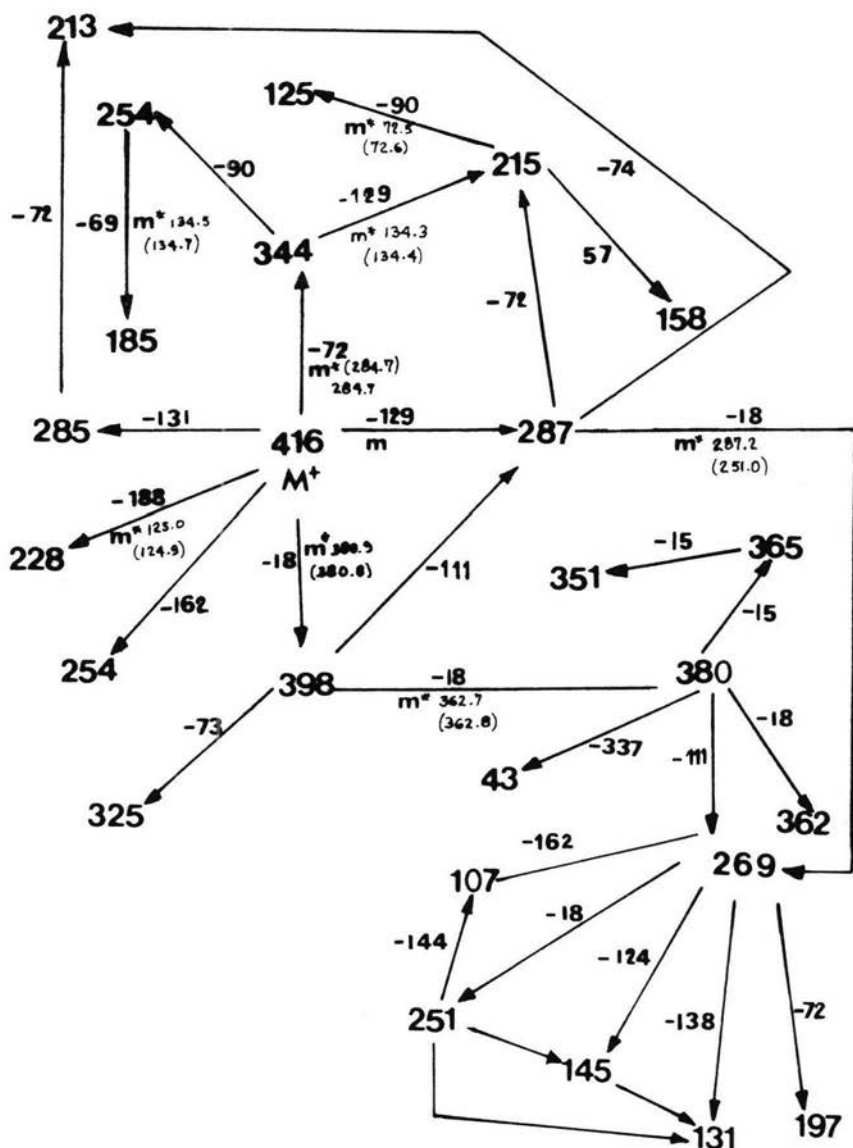
y C_7-C_8 para dar el fragmento m/e 131, lo cual se confirma porque m/e 251 también pierde 106 unidades de masa para dar el fragmento m/e 145 que proviene también de m/e 269. Todas estas fragmentaciones confirman la ruptura del anillo B, indicando que éste tiene una doble ligadura en C_5-C_6 .

El ión molecular m/e 416, pierde 162 unidades de masa para dar m/e 254, esto significa la fragmentación del anillo C en C_9-C_{11} y C_8-C_{14} , indicando que el anillo B, contiene un segundo doble enlace y que el tercer oxhidrilo de la molécula se encuentra en el anillo C o en el anillo D. Además el ión molecular, pierde 72 unidades de masa (anillo A), para dar m/e 344 el cual por pérdida de 129 unidades de masa que corresponden a la cadena lateral, dá origen al fragmento m/e 215, el cual a su vez pierde 90 unidades de masa al fragmentarse en $C_{10}-C_{11}$ y C_8-C_{14} (pérdida del anillo B) originando m/e 125, el correspondiente metaestable es 72.5 (m^* calculado 72.6); esto confirma que el anillo B contiene dos dobles enlaces y que el tercer OH se encuentra en el anillo C o en el anillo D. El mismo fragmento m/e 125 se origina también del pico base por pérdida de 162 unidades de masa lo cual corresponde a la ruptura del anillo C en C_9-C_{11} y C_8-C_{14} .

La posición del segundo doble enlace en el anillo B, se fija por la pérdida de 120 unidades de masa del fragmento m/e 251 por la ruptura C_9-C_{10} y C_7-C_8 para dar m/e 131. Además, m/e 251 también pierde 144 unidades de masa por la ruptura C_9-C_{11} y C_8-C_{14} para dar m/e 107, lo cual se confirma porque m/e 269, también pierde 162 unidades de masa para dar m/e 107.

El ión molecular m/e 416, también pierde 188 unidades de masa originando el fragmento m/e 228, significando que el anillo D, se fragmenta entre $C_{13}-C_{17}$ y $C_{14}-C_{15}$ con transferencia de dos hidrógenos del núcleo a la cadena, lo cual está de acuerdo con la literatura (22) e

ESQUEMA DE FRAGMENTACION DE LA SAPOGENINA A
EN ESPECTROMETRIA DE MASAS



indica que el tercer oxhidrilo de la molécula se encuentra en el anillo D en los carbonos 14, 15, 16 ó 17.

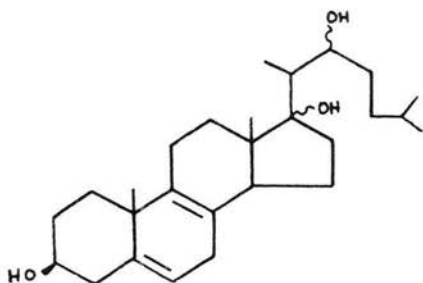
Hasta aquí, se han localizado las posiciones de los dos oxhidrilos secundarios de la molécula, el del anillo A en 3 β y el del carbono 22, faltando localizar la posición del oxhidrilo terciario que debería estar en el anillo D confirmado esto por las fragmentaciones anteriores; las posiciones probables son C₁₄ y C₁₇.

El ión molecular, pierde también 18 unidades de masa originando m/e 398 que a su vez pierde una molécula de agua para dar m/e 380. Este fragmento pierde 152 unidades de masa que significa la pérdida del anillo D por ruptura en C₁₄-C₁₅ y C₁₃-C₁₇ de un fragmento que debe contener dos dobles enlaces en C₁₇-C₂₀ y C₂₂-C₂₃, para dar m/e 228. Además el ión molecular pierde 72 unidades de masa (anillo A) para dar m/e 344 que a su vez pierde el anillo B que corresponde a 72 unidades de masa para dar m/e 254, éste pierde 69 unidades de masa para dar m/e 185, de acuerdo con lo esperado en la literatura, para derivados del colestano (16); el correspondiente metaestable es 134.5 (m* calculado 134.7). Todas estas fragmentaciones confirman que el oxhidrilo terciario se encuentra en la posición 17.

En el esquema de fragmentación de la sapogenina A puede observarse que la molécula pierde sucesivamente solo tres grupos oxhidrilos en forma de moléculas de agua, lo cual está de acuerdo con los demás espectros del mismo compuesto.

Como resultado de las pruebas químicas efectuadas y la interpretación de los espectros discutidos, la estructura de la sapogenina A es la siguiente:

SAPOGENINA A



$\Delta^5, 8(9)$ - colestadien- 3 β , 17 ξ , 22 ξ - triol

La estructura propuesta para la sapogenina A, coincide para las asignaciones de los desplazamientos de los carbonos en RMN de ¹³C (espectro # 15) y fueron efectuados de la siguiente manera:

Con la información obtenida de los espectros de desacoplamiento directos C-H se pudo hacer la asignación de los carbonos no protonados, grupos CH, CH₂ y CH₃ que aparecen respectivamente como singuletes, dobles, tripletes y cuartetos.

Con los datos anteriores y los valores de los desplazamientos en ppm del espectro de A sin desacoplamiento de ¹H, se hicieron correlaciones con modelos de esteroides de tipo colestano (23), hidroxí y dihidroxí esteroides (24 y 25) y ecdisonas (26) con referencia a TMS. Tales correlaciones es posible hacerlas ya que los desplazamientos se pueden predecir, con aproximaciones, asumiendo aditividad de los efectos de los sustituyentes observados.

Desplazamientos Químicos en RMN de ^{13}C obtenidos para la sapogenina A

átomo de carbono	δ (ppm)	multiplicidad *
1	35.5	t
2	32.1	t
3	68.1	d
4	41.4	t
5	137.8	s
6	124.9	d
7	42.2	t
8	137.8	s
9	137.8	s
10	52.9	s
11	35.3	d
12	28.4	d
13	43.1	s
14	56.6	d
15	22.9	t
16	45.1	t
17	90.8	s
18	12.7	c
19	21.1	c
20	47.8	d
21	10.3	c
22	78.8	d
23	33.1	t
24	41.2	t
25	29.0	d
26	22.5	c
27	22.7	c

(*) s: singulete, d: doblete, t: triplete, c: cuarteto

SAPOGENINA B

El punto de fusión de la muestra que se aisló fue de 180-181° y según el espectro de masas (#18), presenta un ión molecular $M^+ = 430$ y un ión $M^+ + 1 = 30.2\%$, por lo tanto el número de átomos de carbono, calculado de acuerdo con la literatura (18) es:

$$C_n = \frac{30.2}{1.1} = 27.45$$

Este resultado, puede confirmarse en el mismo espectro ya que el pico base es m/e 412 y su isótopo correspondiente m/e 413 tiene una intensidad relativa de 30% al considerar m/e 412 como 100%.

Por lo consiguiente, el número de átomos de carbono del pico base puede calcularse en la misma forma:

$$C_n = \frac{30.0}{1.1} = 27.27$$

El espectro de R.M.N. de 1H (100MHz) (#19), muestra cuatro protones en 3.43, 3.94, y 4.4 ppm los cuales están unidos cada uno a un carbono base de oxhidrilo. Además el espectro de RMN de 1H (60 MHz) muestra cuatro protones de oxhidrilos que se intercambian con agua deuterada, indicando que en la molécula existen cuatro grupos OH.

La fórmula elemental para un ión molecular m/e 430 con 27 átomos de carbono y cuatro átomos de oxígeno, corresponde a $C_{27}H_{42}O_4$ según la literatura (21).

Este compuesto dió un precipitado con digitonina, indicando que existe un oxhidrilo en β .

El espectro I.R. (#20) muestra una banda fina (m) en 3610 cm^{-1} , una banda ancha (d) en 3450 cm^{-1} y una banda (f) en 1050 cm^{-1} , indicando la presencia de alcoholes secundarios, (27). La reacción con ácido periódico fue negativa, indicando que no hay oxhidrilos vicinales.

Una banda débil y ancha en I.R. (#21) en $1650 - 1660 \text{ cm}^{-1}$, indica la presencia de dobles enlaces tri y tetrasustituídos, además se observó una banda débil en $835, 950 \text{ cm}^{-1}$, que corresponde también a trisustitución; estas insaturaciones se confirmaron por la reacción positiva de B con bromo en tetracloruro de carbono y porque en el espectro de R.M. N. de ^1H (#19) se muestra un multiplete en 5.54 ppm que integra para un protón vinílico característico en el carbono 5 de un núcleo esteroi-dal.

Otras bandas que se observan en I R en cm^{-1} son:

2960 (f) y 2870 (f)	C-H de metilo
2925 (f) y 2845 (f)	C-H de metileno
1450 (m)	CH_2 y CH_3
1435 (m)	$\text{CH}_3-\text{C}=\text{C}$
1380 (m)	CH_3
1170 (d) y 1155 (d)	$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
1000 (m), 985 (m), 925 (m)	cicloalcanos
725 (d)	$(\text{CH}_2)_n$

El espectro de RMN de ^1H (100 MHz) (#19) muestra una señal en 0.8 ppm que integra para 6H y corresponde a los metilos de los carbonos 26 y 27 en una cadena de colestano. En 1.04 ppm aparece una señal que integra para 6H y corresponde a los metilos C_{18} y C_{19} . En 1.65 ppm hay una señal que integra para 3H y corresponde al metilo C_{21} ; en 1.62 ppm se encuentra centrada una señal compleja que integra para 22 protones de metilenos, metinos y oxhidrilos. La integración total del espectro de RMN (100 y 60 MHz) corresponde a 42 protones, que están de acuerdo con la fórmula elemental encontrada por espectrometría de masas.

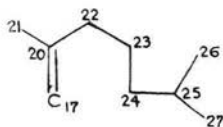
El espectro de UV (#22) muestra una sola absorción en 209 nm con

un coeficiente de extinción molar de: 11 333 lo cual está de acuerdo con la absorción que presentan los dobles enlaces aislados.

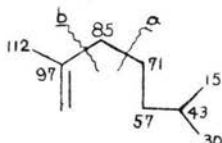
En el espectro de masas (#18) se observa un ión molecular $M^+ = 430$ que pierde 114 unidades de masa para dar m/e 316, también se observa que el ión molecular pierde 18 unidades de masa para dar m/e 412 que es el pico base del espectro, ésta pérdida corresponde a una molécula de agua; este nuevo fragmento, a su vez pierde 114 unidades de masa para dar m/e 298 y 113 para dar m/e 299, estas pérdidas de 114 y otras que se observan a lo largo del espectro corresponden a la ruptura de la cadena lateral completa más dos hidrógenos que se transfieren del núcleo a la cadena, indicando que la cadena lateral tiene una masa de 112 unidades; esta fragmentación es típica en esteroides con cadena lateral abierta. (22)

Todas las fragmentaciones anteriores están confirmadas por los correspondientes metaestables que coinciden con los calculados y aparecen en el esquema de interpretación del espectro de masas (#18) como m^* .

El fragmento m/e 359 proviene del ión molecular por pérdida de 71 unidades de masa, ésta pérdida proviene de la fragmentación de la cadena lateral por ruptura alílica a un doble enlace; esto indica que existe un doble enlace en $C_{17}-C_{20}$ de una cadena de colestano. La cadena lateral tiene la siguiente estructura:



la cual se confirma por la presencia del fragmento m/e 287 que corresponde a la pérdida de 71 unidades de masa del fragmento m/e 358 (ruptura a).



El fragmento m/e 358 pierde una molécula de agua para dar m/e 340 que a su vez pierde 71 unidades de masa (ruptura a de la cadena lateral) para dar m/e 269.

El pico base m/e 412 pierde 87 unidades de masa que corresponden a la ruptura b de la cadena lateral con transferencia de dos átomos de hidrógeno del núcleo a la cadena dando m/e 325 que a su vez pierde una molécula de agua y dá m/e 307.

La presencia de m/e 43, 112, 113 y 114 en el espectro de masas (#18) confirma la estructura de la cadena lateral propuesta. El pico base m/e 412 pierde una molécula de agua para dar m/e 394 que también pierde 114 unidades de masa dando m/e 280. Esta fragmentación que también está confirmada por la presencia de metaestables, ratifica a su vez la estructura de la cadena lateral.

Los fragmentos m/e 394, 298, 280, 340 y 358 pierden 15 unidades de masa que corresponden a la pérdida de un metilo, originando los fragmentos m/e 379, 283, 265, 325 y 343, que están apoyados por los correspondientes metaestables.

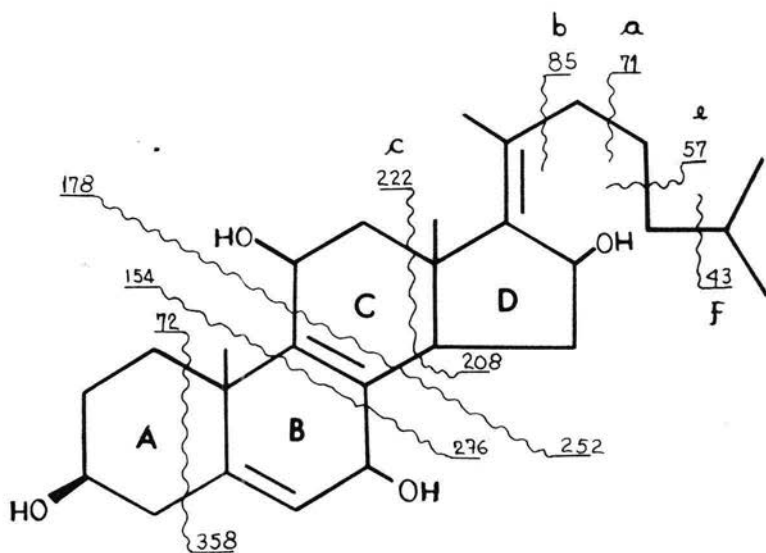
El ión molecular m/e 430, se fragmenta con pérdida de 72 unidades de masa para dar m/e 358; esto corresponde a la pérdida del anillo A por ruptura de C₁-C₁₀ y C₄-C₅, que es característica de la fragmentación de los esteroides. Este fragmento de 72 que se pierde nos indica que en el anillo A, había un solo oxhidrilo, el cual ya se sabe se sitúa en la posición 3β por la precipitación con digitonina.

El fragmento m/e 317 proviene de la pérdida de 113 unidades de masa del ión molecular (pérdida de la cadena lateral con transferencia de un hidrógeno), confirmando a su vez la estructura de la cadena lateral.

Se había mencionado que el ión molecular pierde el anillo A (72 unidades de masa) para dar m/e 358 y éste a su vez pierde 71 unidades de masa (de la cadena lateral) dando m/e 287. Se observa que este fragmento pierde tres moléculas de agua, de una en una, dando un fragmento de m/e 269 luego 251 y finalmente 233. La presencia de este último fragmento está de acuerdo con la RMN de ^1H , pues indica que los anillos B, C y D se pierden tres grupos OH en forma de moléculas de agua.

El fragmento m/e 252 viene de la ruptura del anillo B entre $\text{C}_9\text{-C}_{11}$ y $\text{C}_8\text{-C}_{14}$. Esto indica que el doble enlace tetrasustituído no puede estar en $\text{C}_8\text{-C}_{14}$ pues no ocurriría esta fragmentación sino que se encuentra en el anillo B en $\text{C}_8\text{-C}_9$. Lo anterior se confirma por la presencia en el espectro del fragmento m/e 178 que debe contener los anillos A y B con dos oxhidrilos y dos dobles enlaces.

El fragmento m/e 154 que está presente en el espectro, viene del ión molecular, por pérdida de 276 unidades de masa, correspondiendo a la ruptura del anillo B en los enlaces $\text{C}_9\text{-C}_{10}$ y $\text{C}_7\text{-C}_8$. Esto indica que el anillo B debe contener uno de los grupos oxhidrilo y la única posición en donde puede haber un alcohol secundario es en C_7 . Lo anterior se puede confirmar, porque m/e 154 a su vez pierde 15 unidades de masa, que es el metilo angular C_{19} , para dar m/e 139 el cual es uno de los fragmentos más intensos del espectro; m/e 154 pierde también una molécula de agua (18 unidades de masa) para dar m/e 136 ($m^* = 119.4$). Este fragmento pierde a su vez 15 unidades de masa dando m/e 121 el cual por pérdida de una molécula de agua origina m/e 103. La pérdida de dos moléculas de agua del fragmento m/e 154 confirma que en los anillos A y B, existen dos grupos OH.

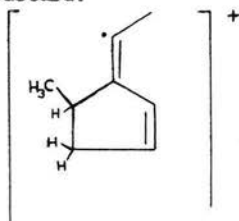


SAPOGENIN B

El fragmento m/e 121 pierde 26 unidades de masa dando m/e 95. El fragmento m/e 154 por pérdida de 73 unidades que corresponde a la ruptura del anillo A en las ligaduras C₁-C₁₀ y C₄-C₅ con transferencia de un hidrógeno al anillo, origina m/e 81. La fragmentación que dá origen a m/e 81, m/e 95 y la existencia de m/e 139, confirman la posición del oxhidrilo en C₇.

Para fijar la posición del otro de los oxhidrilos de la molécula, se observa en el espectro la existencia del fragmento m/e 175, el cual está de acuerdo con la literatura (16) y proviene de la ruptura del anillo C en las ligaduras C₁₂-C₁₃ y C₈-C₁₄, dando un fragmento inestable de m/e 208 que rápidamente pierde un metilo y una molécula de agua. Esto indica que uno de los oxhidrilos se encuentra en el anillo D ya que están ausentes en la cadena lateral.

El fragmento m/e 175 pierde a su vez 67 unidades de masa para dar origen a m/e 108 el cual a su vez pierde 67 unidades de masa originando m/e 41, esta secuencia de fragmentación solo es posible si m/e 108 tiene la siguiente estructura:



con doble enlace en C₁₅-C₁₆. La pérdida de 67 unidades de masa de m/e 175, está confirmada por la presencia del correspondiente metaestable en 66.5 (m* calculado 66.6). La subsecuente fragmentación de m/e 175 confirma su estructura y por lo tanto la posición del oxhidrilo en 16, ya se encuentra presente el fragmento m/e 118 que corresponde a la pérdida de 57 unidades de masa de m/e 175. Además, m/e 175 pierde 71 unidades de

masa (ruptura $C_{22}-C_{23}$) originando m/e 104 que se encuentra presente en el espectro y también origina los fragmentos m/e 119 y m/e 105 que corresponden a las rupturas a y e respectivamente con transferencia de un hidrógeno de la cadena al núcleo.

Otra fragmentación de m/e 175, es la pérdida de 42 unidades de masa que corresponde a la ruptura f de la cadena lateral con transferencia de un átomo de hidrógeno hacia el anillo D. Esta fragmentación origina m/e 133 y confirma la presencia del isopropilo el cual también se observa por la presencia de m/e 43 en el espectro de masas.

El fragmento m/e 175 pierde 84 unidades de masa que corresponden a la ruptura b de la cadena lateral con transferencia de un átomo de hidrógeno de ésta al núcleo, originando m/e 91.

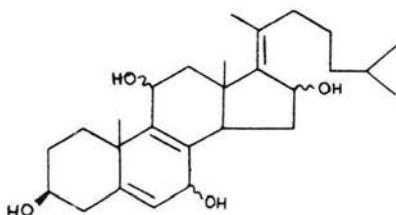
Con todas estas fragmentaciones, que confirma la estructura de m/e 175, se ratifica a su vez la posición del oxhidrilo en C_{16} .

Por lo que se ha discutido hasta ahora, sobre el espectro de masas de la sapogenina B, el cuarto oxhidrilo, de la molécula debe estar en el anillo C, en el cual existen dos posibles posiciones para un alcohol secundario: C_{11} y C_{12} .

El fragmento m/e 208, se puede formar por la ruptura c del anillo C perdiendo una molécula de agua para dar origen a m/e 190, este fragmento contiene el anillo D y la cadena lateral. Un fragmento de la misma masa m/e 208 se origina por la pérdida de 14 unidades de masa de m/e 222. Este nuevo fragmento m/e 208 contiene los anillos A, B y parte del anillo C y puede perder dos moléculas de agua para dar m/e 172 que se encuentra presente en el espectro y que se confirma por su correspondiente metaespectro 142.2 (m^* calculado 142.2). Esto indica que el cuarto oxhidrilo se encuentra en el carbono 11.

Además el ión molecular se fragmenta por las ligaduras C₉-C₁₀ y C₇-C₈ originando m/e 293 al perder 137 unidades de masa. Este fragmento pierde a su vez 54 unidades de masa que corresponde a una ruptura C₁₁-C₁₂ y C₈-C₁₄, originando un fragmento m/e 239 que se encuentra en el espectro; lo anterior confirma la posición del oxhidrilo en 11.

De acuerdo con los espectros discutidos, se propone la siguiente estructura para B:

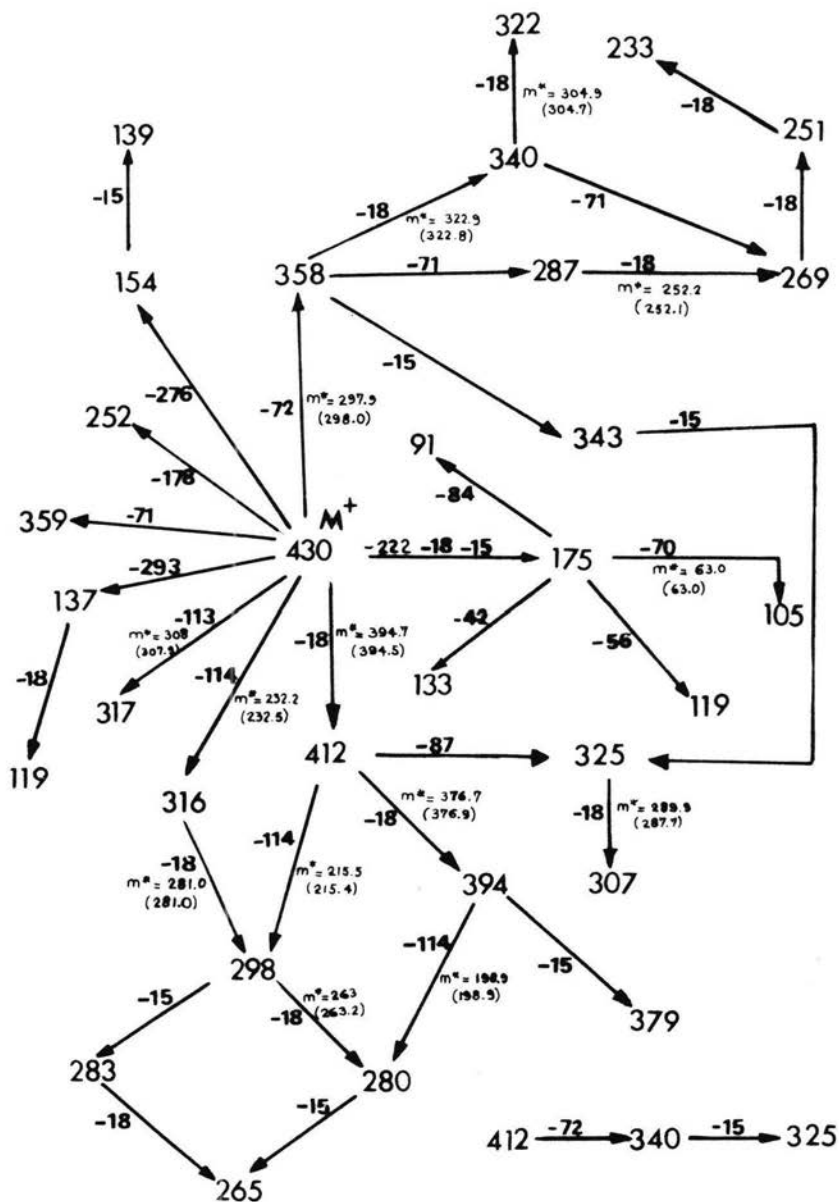


$\Delta^{5,8(9),17(20)}$ - colestatrien- 3 β , 7 ξ , 11 ξ , 16 ξ -tetraol

La asignación de los desplazamientos de los carbonos en RMN de ¹³C (espectro #23) de la sapogenina B, se hizo en forma similar a la sapogenina A.

Con la información de las multiplicidades obtenidas del espectro de desacoplamiento C-H y los valores de los desplazamientos en ppm del espectro de B sin desacoplamiento de ¹H, se hicieron correlaciones con modelos lo más adecuados posibles de esteroides con referencia a TMS (23, 24, 25, 26, 28). Los valores que resultan de la asignación, son realmente aproximados ya que no existen modelos exactamente del mismo tipo informados en la literatura de ¹³C.

ESQUEMA DE FRAGMENTACION DE SAPOGENINA B
 EN ESPECTROMETRIA DE MASAS



P A R T E E X P E R I M E N T A L

Desplazamientos Químicos en RMN de ^{13}C obtenidos para la sapogenina B

Átomo de carbono	δ (ppm)	multiplicidad *
1	40.1	t
2	32.4	t
3	67.9	d
4	42.0	t
5	138.0	s
6	125.2	d
7	80.9	d
8	138.1	s
9	138.1	s
10	50.4	s
11	80.7	d
12	31.9	t
13	42.8	s
14	56.4	d
15	31.9	t
16	75.6	d
17	136.0	s
18	14.4	c
19	16.4	c
20	109.6	s
21	27.1	c
22	39.8	t
23	23.7	t
24	42.4	t
25	28.8	d
26	25.9	c
27	25.8	c

* s: singlete, d: doblete, t: triplete, c:cuarteto

-
1. La abreviatura ccf significa cromatografía en capa fina, la cual se hizo siempre en gel de sílice tipo 60 de Merck o en gel de sílice GF-254 tipo 60 de Merck.
 2. En ccp o sea cromatografía en capa preparativa se utilizó gel de sílice GF-254, con espesor de 2 mm.
 3. En las columnas de cromatografía empleadas para todas las separaciones, la proporción de muestra a sílice fué de 1:100.
 4. En cromatografía en columna, en todos los caso se utilizó gel de sílice tipo 60 de Merck (0.063-0.2 mm).
 5. Se utilizaron como reveladores, mientras no se indique lo contrario, ácido sulfúrico 5N o sulfato cérico.
 6. Los valores descritos para los Rf, están multiplicados por el factor 100, de acuerdo con la definición de Stahl (29).
 7. Las iniciales CGL significan cromatografía de gas-líquido.
 8. Los espectros de IR, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C y masas fueron corridos en el Instituto Politécnico Federal de Zurich, Suiza para las saponinas A y B. Todos los demás espectros fueron realizados en la División de Estudios Superiores de la Facultad de Química de la UNAM, incluyendo los trabajos de cromatografía de gases.
 9. En los espectros de IR, las abreviaturas que se utilizan son: (f); fuerte, (m): mediana, (d): débil.
 10. Los espectros de RMN de ^1H se corrieron utilizando trimetil silano (TMS) como referencia externa.
 11. Los espectros de RMN de ^{13}C se corrieron utilizando TMS como referencia interna.
 12. Todas las evaporaciones, incluyendo las que se llevaron hasta sequedad se hicieron en rotavapor.
 13. Los puntos de fusión fueron tomados en un aparato de Fisher-Jones y se encuentran sin corrección.
-

PARTE EXPERIMENTAL

Aislamiento y purificación de las sapogeninas A y B

La extracción y separación de las dos sapogeninas se hizo utilizando dos procedimientos (diagrama I y diagrama II), debido al hecho de que al realizar el primer procedimiento usando hexano como disolvente de extracción se extrajeron compuestos menos polares los cuales interfirieron en la separación y purificación de las sapogeninas A y B.

El procedimiento II es una modificación del I con la ventaja de que la separación de las dos sapogeninas fué más eficiente.

PROCEDIMIENTO I (diagrama I) (Diosgenina, Calibagenina, Sapogeninas A y B)

2 kilos de rizoma de Calibanus hookeri, previamente molidos y secados a la intemperie y luego en estufa, se extajeron a reflujo con hexano durante 56 h. Después de filtrar en frío, se obtuvo un residuo el cual se secó (1930 g) y se hidrolizó por partes, empleando 700 ml de ácido clorhídrico concentrado en 7 l de agua (por cada 1000 g) y calentando a reflujo durante 18 h.

El producto de reacción se filtró, desechando la solución. El residuo sólido resultante, se neutralizó agitando con bicarbonato de sodio al 5 %, se filtró y se lavó con agua destilada hasta pH 7; se secó y se extrajo a reflujo con hexano.

El filtrado hexánico se evaporó en rotavapor y el extracto crudo de color rojizo y aspecto chicloso pesó 19.5 g.

Se hizo ccf usando sistemas eluyentes de diferente polaridad, encontrándose que en benceno-acetato de etilo (60:40), se observaron el

mayor número de manchas más o menos definidas al revelar. Se montó una columna en el mismo medio y se aplicaron 19 g del extracto crudo; se colectaron 104 fracciones de 150 ml cada una.

En las fracciones 10 a la 12, por comparación con patrones, se verificó la presencia de diosgenina. Se llevaron a sequedad estas fracciones y pesaron 616 mg. Por recristalizaciones sucesivas de metanol, metanol-hexano y metanol-cloroformo se obtuvieron 220 mg de cristales blancos de P_f 204°. Por comparación con una muestra auténtica en ccf en diferentes medios eluyentes y utilizando métodos espectroscópicos se identificó como diosgenina, (espectro de masas #1, espectro IR #2). También se identificó por cromatografía de gas-líquido, (cromatograma #3).

De las fracciones 23 a la 29, cristalizó de metanol un compuesto amarillo. Por recristalizaciones sucesivas de metanol, metanol-agua, metanol-hexano y metanol-acetona se obtuvieron 1.273 g de cristales blancos de punto de fusión 191-192°. Por comparación de R_f en ccf y de sus propiedades espectroscópicas (4) con muestra auténtica se identificó como calibagenina, (espectro de RMN de 1H #14 y espectro IR #15). Utilizando cromatografía de gas-líquido con el método de referencia externa también se comprobó la presencia de calibagenina, (cromatograma #6).

Las fracciones 41 a la 57, presentaron en ccf una mancha principal de color ladrillo al revelar después de reunir, secar y pesar, que dejó un residuo de 2.7 g de color café-rojizo y apariencia cerosa.

Se probaron diferentes sistemas eluyentes en ccf y en hexano-acetato de etilo (30:70) se obtuvo la mejor resolución.

Se montó una columna en el mismo medio eluyente y se colectaron

2097 fracciones de 10 ml cada una. Las fracciones donde se observó en ccf, la mancha principal, se reunieron y se obtuvo después de secar 1.012 g de un producto crudo de color amarillo y apariencia cerosa.

Al cristalizar de disolventes puros y mezclas de cloroformo-hexano, acetato de etilo-hexano, metanol-hexano, acetona-hexano y al controlar en ccf, se observó que siempre permanecían algunas impurezas y en diferentes medios eluyentes la mancha principal aparecía alargada al revelar, lo cual indicaba que podría tratarse de una mezcla. Consecuentemente se buscaron otros medios eluyentes en ccf y en el sistema n-butanol-benceno-cloroformo (20:30:80) se observaron dos manchas de color ladrillo con Rf de 42 y 51, se montó una columna usando el mismo medio y se colectaron 1330 fracciones de 40 gotas cada una. La separación en esta forma no fue eficiente, puesto que muchas fracciones contenían la mezcla de las dos sapogeninas impuras (395 mg) y 286 fracciones la sapogenina B impura (202 mg).

De nuevo se ensayaron otros eluyentes en ccf con el fin de obtener una mejor separación; en el sistema n-butanol-cloroformo-hexano (20:80:20) se encontraron que los Rf para la mezcla de las dos sapogeninas eran de 63 y 51. Se montó una columna con el medio eluyente anterior y se colectaron 540 fracciones de 20 gotas cada una. Las fracciones que contenían cada una de las sapogeninas separadas, se reunieron y se evaporaron a sequedad.

La purificación de cada una de estas sustancias se hizo por recristalizaciones sucesivas de hexano, cloroformo-hexano, acetato de etilo-hexano, metanol-hexano y metanol benceno. Además se usó cromatografía en capa preparativa, corrida 6 veces en hexano-acetato de etilo (50:50) y por separado 4 veces en acetona-cloroformo (30:80).

Se obtuvieron 39 mg de sapogenina A, en forma de polvo blanco con

Pf 150-160^o y 300 mg de sapogenina H también como polvo blanco con Pf 100-101^o.

PROCEDIMIENTO XI (Diagrama II)

3 kg de planta molida y seca a la intemperie y luego en estufa, se extrajeron a reflujo con hexano, exhaustivamente hasta agotamiento controlando por ccf, se filtró en caliente, obteniéndose una solución (S) y un residuo (R) que se secó y pesó 2700 g.

SOLUCIÓN (S)

Este filtrado evaporado y seco al vacío pesó 122 g, se disolvió en la mínima cantidad de cloroformo en caliente se precipitó con metanol y se enfrió con hielo. Después de filtrar, se obtuvo un sólido amarillo denominado residuo (C) de aspecto ceroso y una solución (N):

Residuo (C) (n-Heptacosano)

Después de llevar a sequedad pesó 31 g, se montó una columna utilizando cloroformo como eluyente; en las fracciones 1 a la 7 al controlar en ccf y revelar con ácido fosfomolibdico (10% en metanol), se observaron tres manchas siendo de color azul la principal de ellas. Estas fracciones se reunieron, se secaron al vacío y pesaron 608 mg; se montó una columna usando como eluyente hexano-cloroformo (40:60). Se colectaron 411 fracciones, de 2 ml cada una, en las fracciones 127 a la 260 se aisló el compuesto que al revelar dió color azul. Después de recrystalizaciones sucesivas en metanol-acetona y metanol-cloroformo, se obtuvieron 41 mg, de un polvo blanco de Pf 56^o. Se corrieron los espectros de masas (espectro #7), IR (espectro #8) y RMN ¹H (60 MHz) (espectro #9).

Solución (N) (Colesterol y β -sitosterol)

El filtrado se evaporó y se llevó a sequedad al vacío quedando un residuo rojo de aspecto aceitoso; por medio de cristalizaciones fraccionadas en cloroformo-metanol se obtuvieron 1.02 g de agujas amarillas que por recrystalizaciones sucesivas en acetona-metanol y metanol se recuperaron finalmente 738 mg de agujas blancas de Pf 130-132^o.

En diferentes medios eluyentes se compararon los Rf con patrones de colesterol y β -sitosterol; utilizando cromatografía de gas-líquido se comprobó la presencia de una mezcla de estos dos esteroides (cromatograma # 10), (30).

RESIDUO (R)

Se hidrolizó por partes, en forma similar al procedimiento I, la mezcla de reacción se enfrió, se filtró y se obtuvo un residuo Q y una solución ácida P que contenía los azúcares de las saponinas.

Solución (P) (Azúcares)

Se tomó una alícuota de 150 ml, se neutralizó con bicarbonato de sodio al 10 %, se decoloró con carbón activado y después de filtrar se concentró en el rotavapor aproximadamente hasta la mitad; a continuación se hicieron precipitaciones sucesivas de material inorgánico usando metanol, se filtró y se concentró en rotavapor hasta obtener un residuo de aspecto viscoso.

Esta mezcla de azúcares se comparó en ccf con patrones de glucosa, galactosa, fructosa, arabinosa, ribosa, ramnosa y sorbosa. Se utilizó gel de sílice tipo 60 de Merck impregnada con ácido bórico 0.02 M, como eluyente: n-butanol-ácido acético-agua (40:10:10) y como revelador ácido sulfúrico-anisaldehído.

Se empleó cromatografía de gas-líquido para la identificación, (cromatograma # 11)

Residuo (O) (Sapogeninas A y B)

Se neutralizó agitando con bicarbonato de sodio al 5 %, se fil

tró y lavó con agua destilada hasta pH 7, se secó y se extrajo con acetato de etilo exhaustivamente a reflujo hasta que por control en ccf la mancha de color ladrillo que correspondía a la mezcla de sapogeninas A y B desapareció.

Se filtró y se evaporó a sequedad, obteniéndose un polvo de color rojo oscuro que pesó 155 g.

Con el fin de eliminar la mayor cantidad de sustancias menos polares que las sapogeninas A y B, las cuales son muy solubles en metanol, se agitaron sucesivamente 150 g del polvo rojo con metanol frío, dejando luego en reposo. Este proceso se repitió hasta que no se observó formación de precipitado, se filtró, se secó y pesó dando 6.2 g. Por comparación con solución del polvo rojo oscuro en ccf usando como eluyente benceno-acetato de etilo (60:40) se observó que realmente se eliminaban casi todas las sustancias menos polares que la calibagenina, la cual se tomó como punto de referencia.

El filtrado de color rojo, libre así de gran parte de sustancias interferentes, se evaporó a sequedad obteniéndose 113 g de un polvo de color rojo.

20 g del anterior, se aplicaron a una columna utilizando n-butanol-cloroformo-hexano (20:80:20) como eluyente. Se obtuvieron 70 fracciones de aproximadamente 200 ml cada una.

Las fracciones 23 a 64 contenían la mezcla de sapogeninas A y B las cuales se reunieron y después de llevar a sequedad al vacío pesaron 4.51 g, se disolvieron en la mínima cantidad de cloroformo y se precipitó con hexano caliente, de esta forma se eliminó parte de la coloración roja en forma de un "chicle" que se pegaba a las paredes del matrás. El filtrado obtenido en caliente se llevó a sequedad y se cristalizó sucesivamente de metanol-hexano.

Se recuperó un polvo amarillo que pesó 1.62 g, se aplicó en una columna y de nuevo se utilizó como sistema eluyente n-butanol-clorofor_omo-hexano (20:80:20); se colectaron 82 fracciones de 20 ml cada una.

Las fracciones 10 a 23 contenían sapogenina A en mayor proporción por control en ccf, las fracciones 24 a 32 resultaron ser una mezcla de las sapogeninas A y B y las fracciones 33 a 77 contenían sapogenina B.

La purificación de cada una de las sapogeninas se hizo por recristalizaciones sucesivas en los mismos sistemas de disolventes utilizandos en el procedimiento I. En forma similar, se utilizó cromatografía en placa preparativa y además filtraciones en columna usando acetato de etilo y acetona por separado. Se obtuvieron 21 mg de sapogenina A y 112 mg de sapogenina B, de Pf 159-160° y 180-181° respectivamente. Se comprobó la pureza de las sapogeninas A y B por cromatografía de gas-líquido (cromatograma #6) y se corrieron los espectros de:

sapogenina A: masas (espectro # 12)

IR (espectros # 13 y # 16)

RMN de ^1H (100 MHz) (espectro # 14)

RMN de ^{13}C (25.2 MHz) (espectro # 15)

UV (espectro # 17)

y los espectros de RMN de ^{13}C de desacoplamiento C-H.

sapogenina B: masas (espectro # 18)

RMN de ^1H (100 MHz) (espectro # 19)

IR (espectros # 20 y # 21)

UV (espectro # 22)

RMN de ^{13}C (25.2 MHz) (espectro # 23)

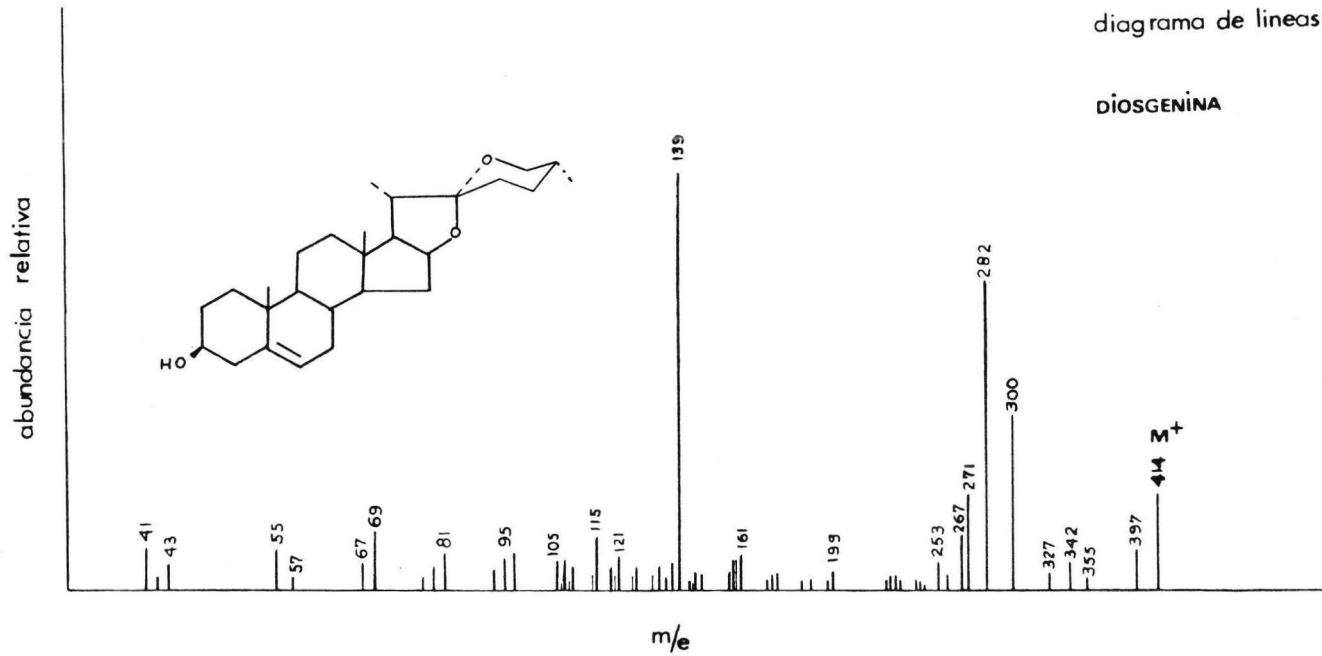
y los espectros de RMN de ^1H (60 MHz) y de desacoplamiento C-H en RMN de ^{13}C .

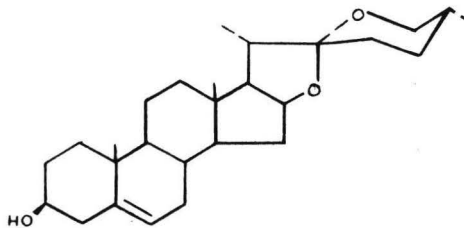
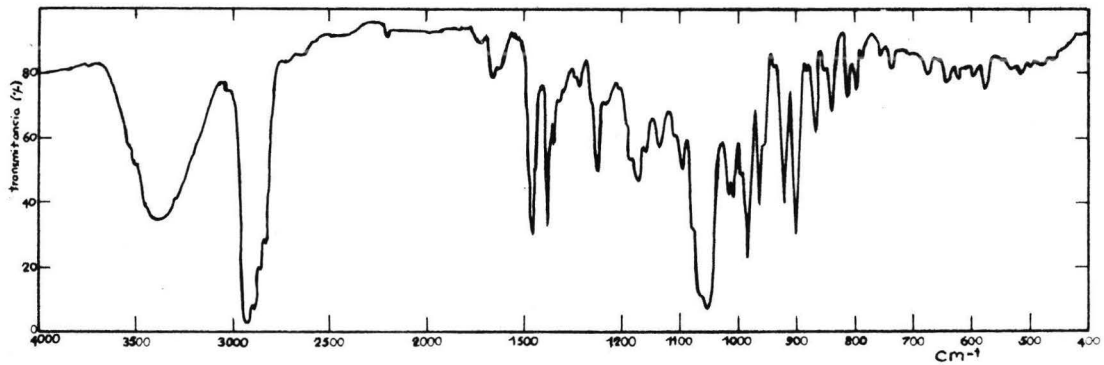
GRAFICAS Y ESPECTROGRAMAS

E.M.

diagrama de líneas

DIOSGENINA





IR

DIOSGENINA

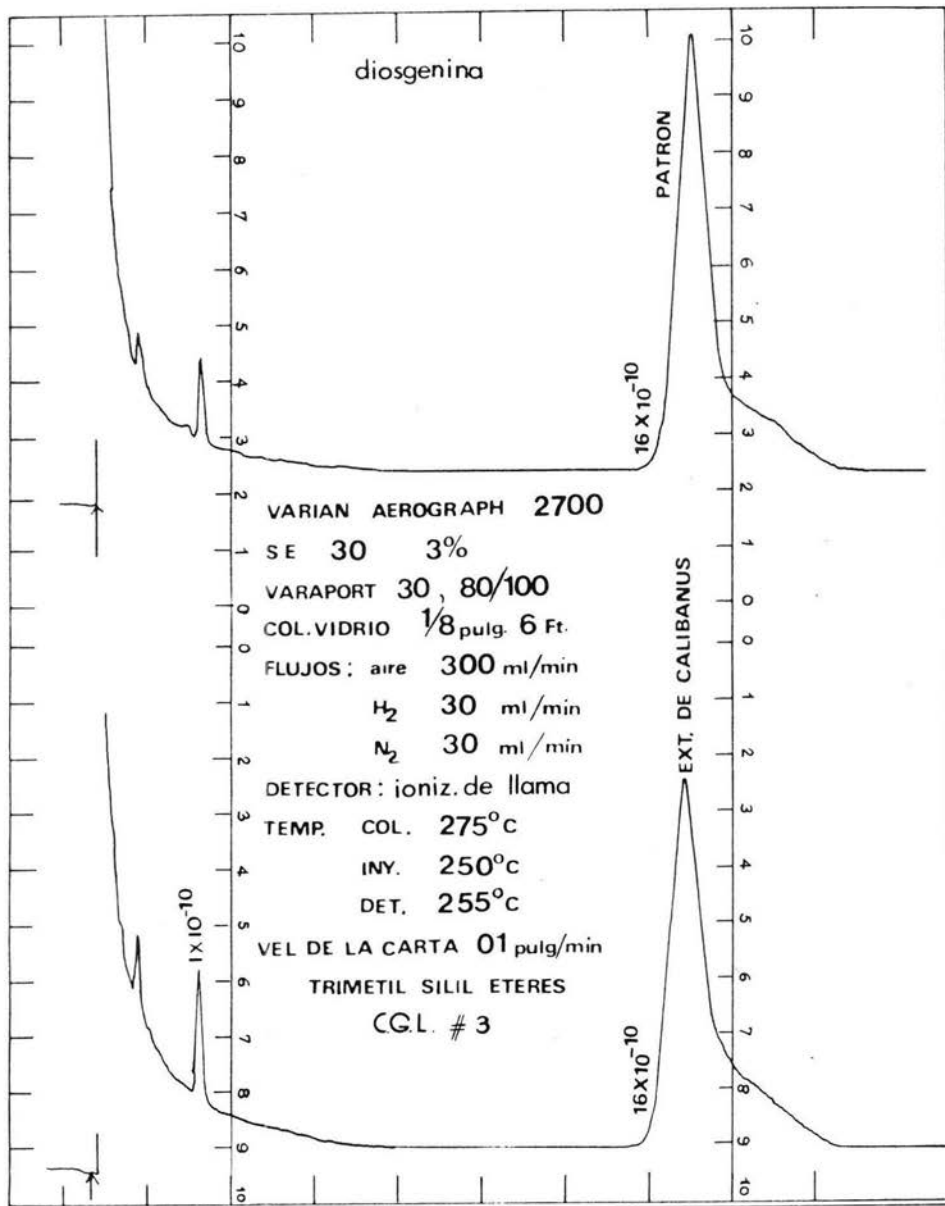
Pastilla : KBr

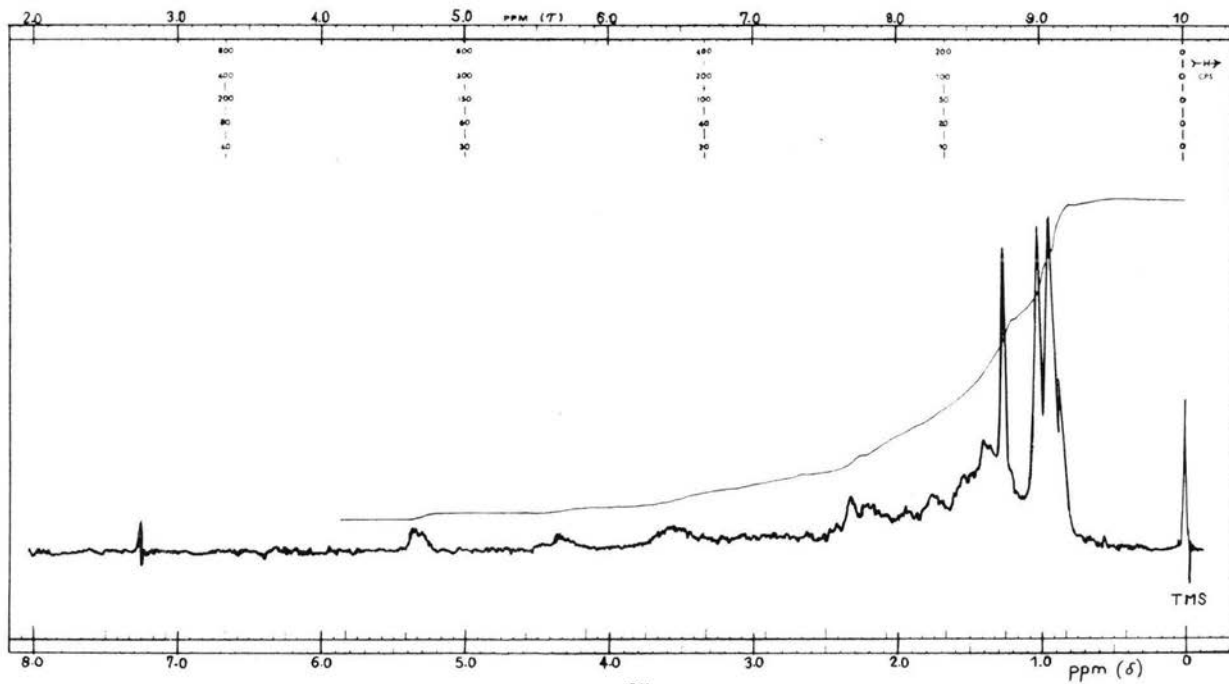
vel. Lenta

Ref. Aire

Rendija : N

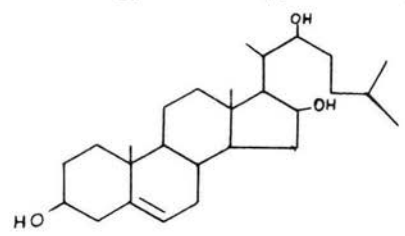
ESPECTRO # 2



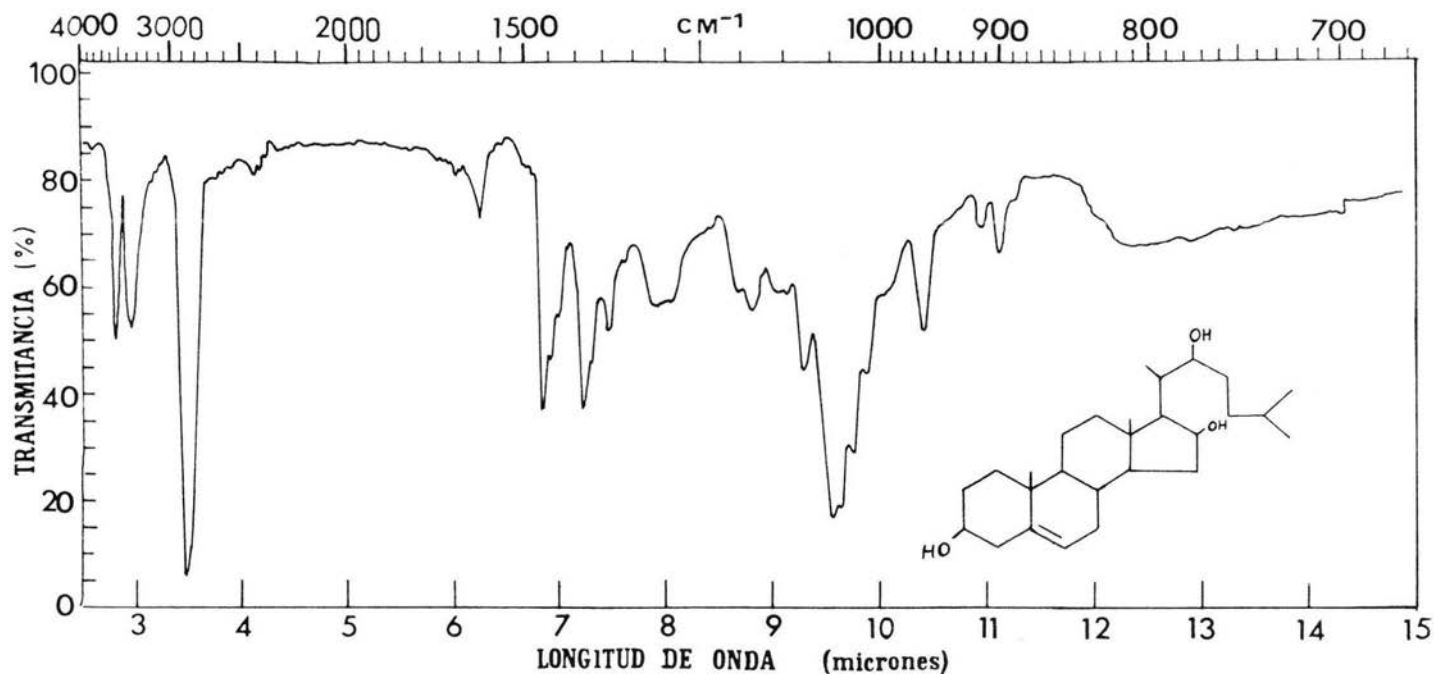


RMN ¹H
60 MHz
CALIBAGENINA

Disolvente: CDCl₃
Tiempo de barrido: 5 min.
Campo de barrido: 10 ppm
Amplitud : 1000

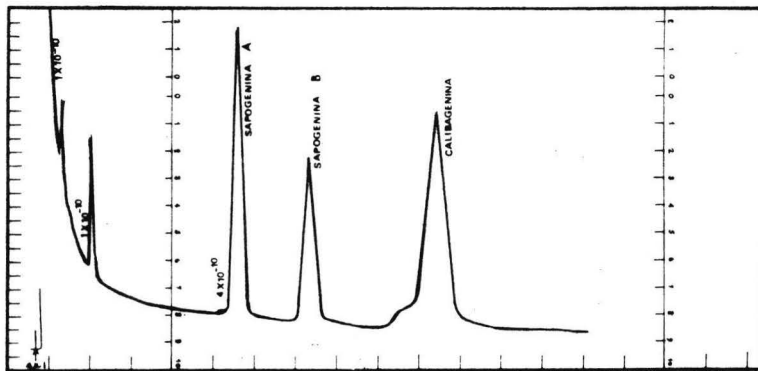
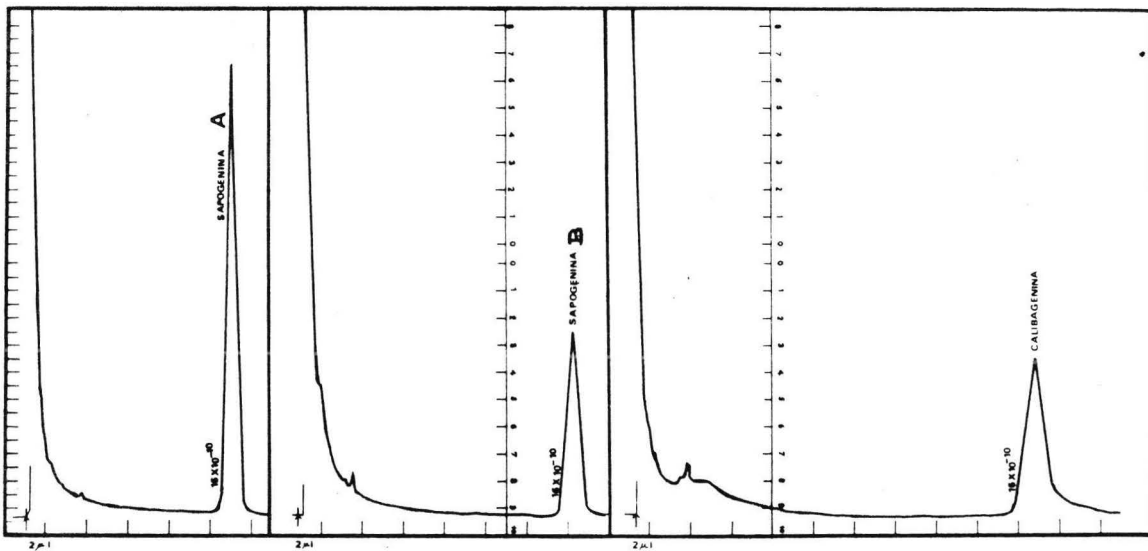


ESPECTRO # 4

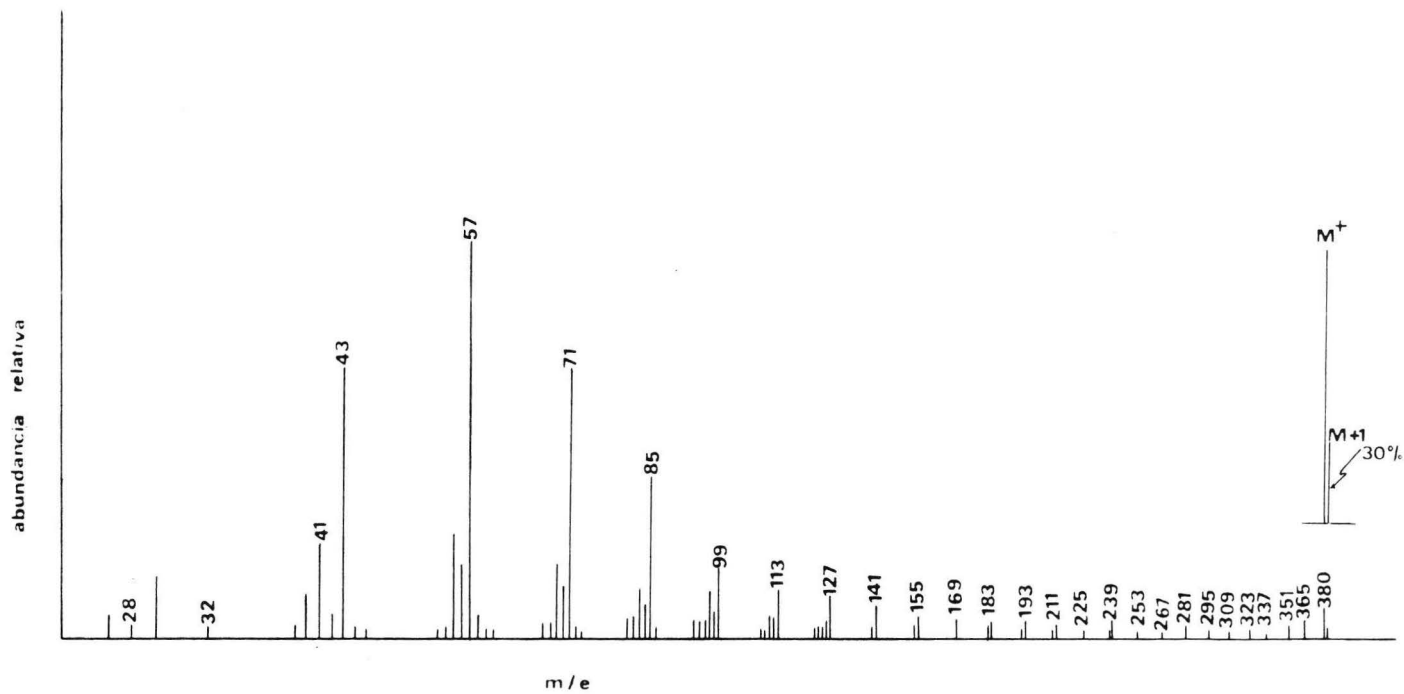


CALIBAGENINA
 1% en CHCl_3
 velocidad : lenta
 rendija : N

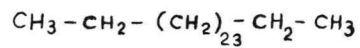
IR
 espectro # 5



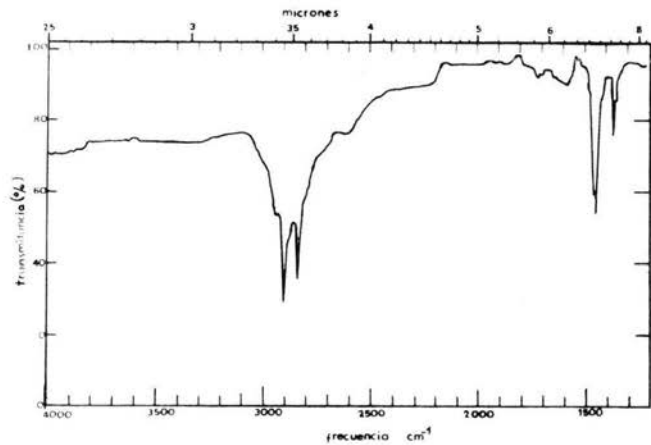
VARIAN AEROGRAF 2700
 SE 30 3%
 VARAPORT 30, 80/100
 COL. VIDRIO 1/8 plus 6 Ft.
 FLUJOS: AIRE 300 ml/min
 H₂ 30 ml/min
 N₂ 30 ml/min
 DETECTOR: IONIZ. DE LLAMA
 TEMP: COL. 275°C
 INY. 250°C
 DET. 255°C
 VEL. DE LA CARTA 01 pulg/min



E.M.
diagrama de líneas
n-HEPTACOSANO

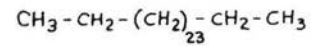
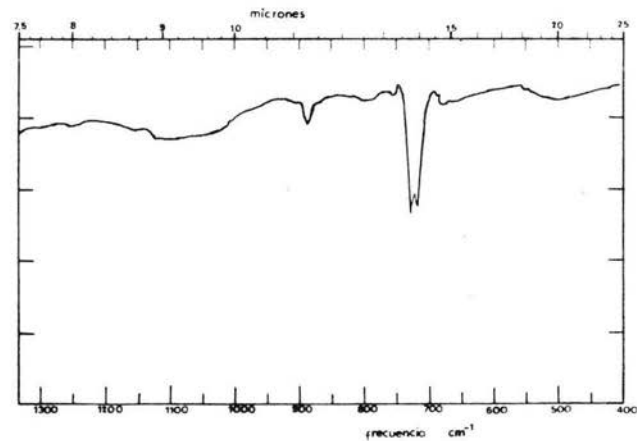


espectro # 7

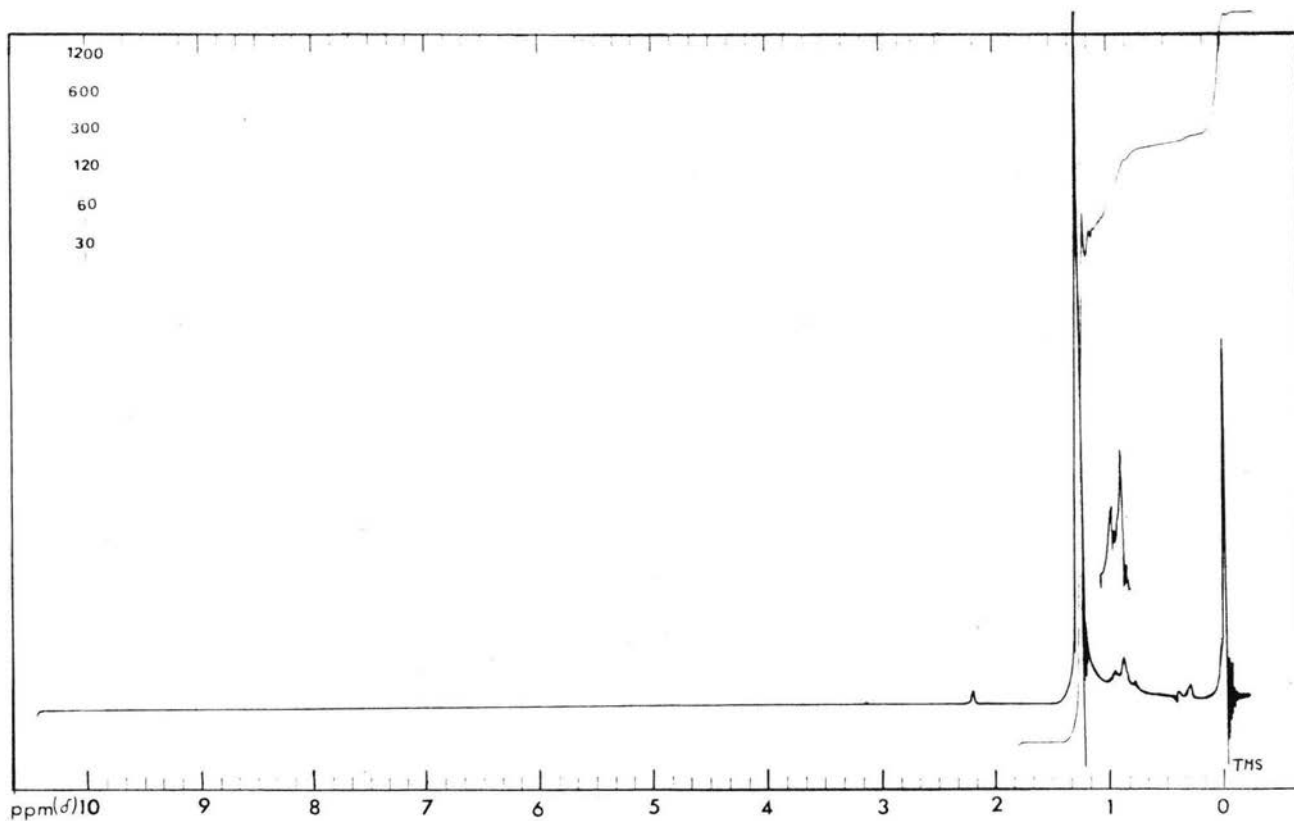


IR
n-HEPTACOSANO

VELOCIDAD : Lenta
 Referencia : aire
 Rendija : N
 película



espectro # 8



amplitud: 500
 filtro: 0.1 seg
 RF: 0.5 mG

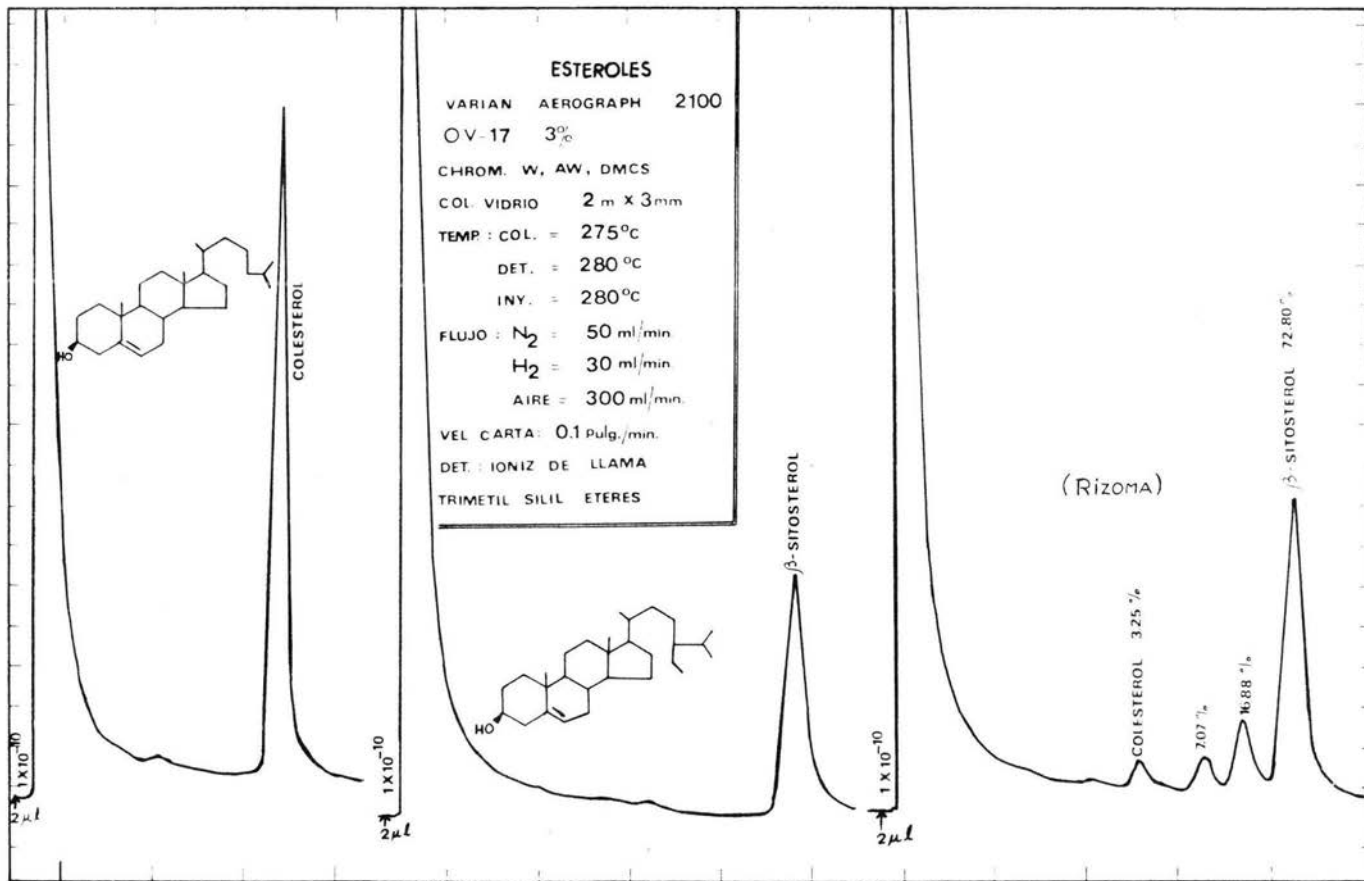
tiempo de barrido: 5 min
 campo de barrido: 10 ppm
 fuera de campo: 15 ppm
 disolvente: CDCl_3

n-HEPTACOSANO

$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{23}\text{-CH}_2\text{-CH}_3$

espectro # 9

RMN ^1H (60 MHz)



C6L # 10

AZUCARES (RIZOMA)

47

VARIAN AEROGRAPH 2100

col. de vidrio : 6' x 1/8"

OV-17 2%

CHROMOSORB W, AW, DMCS (100/120)

TEMP: INYECTOR : 150°C

DETECTOR : 150°C

COLUMNA : 135°C

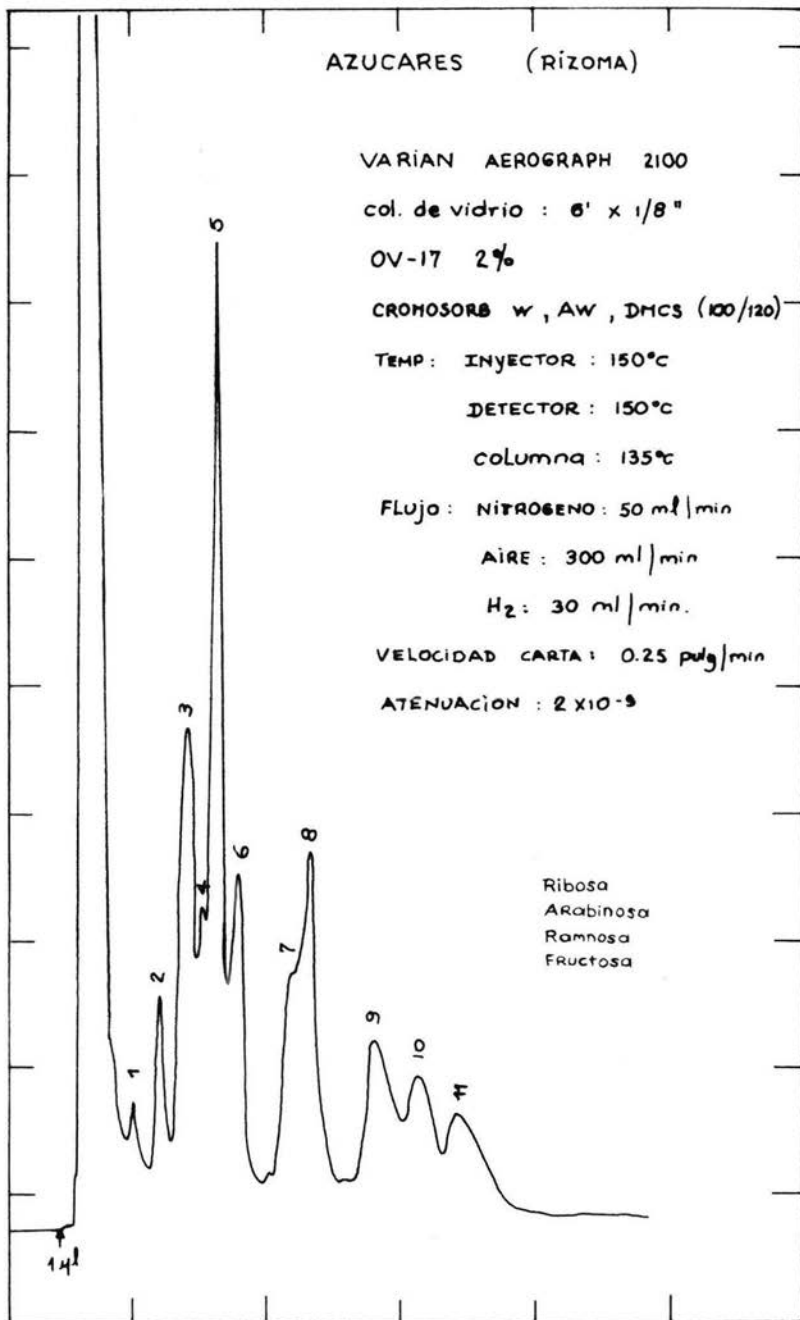
FLUJO : NITROGENO : 50 ml/min

AIRE : 300 ml/min

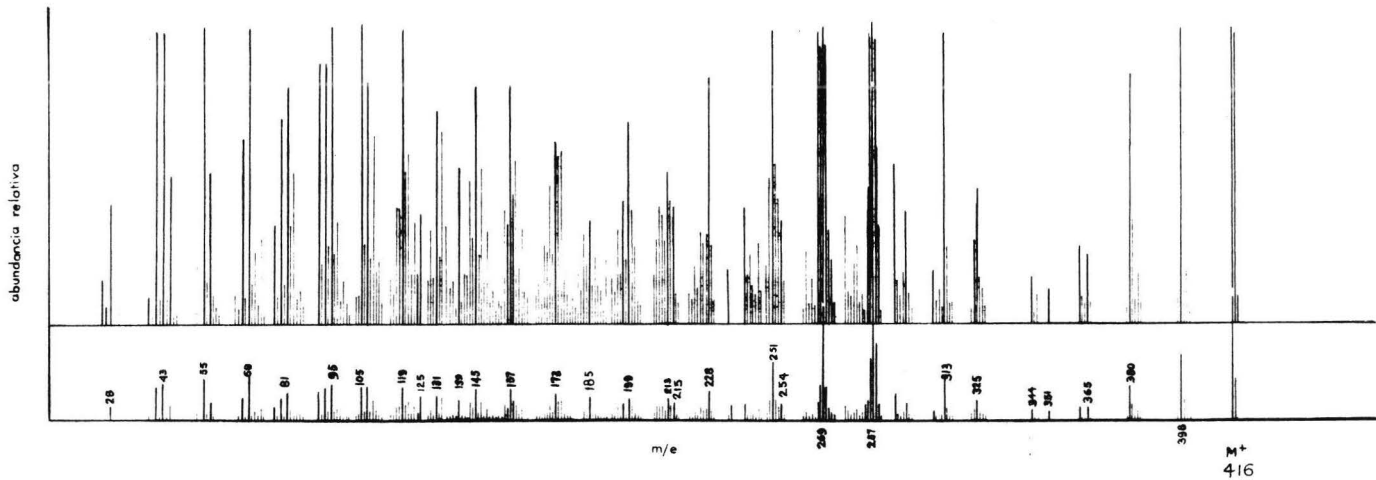
H₂ : 30 ml/min.

VELOCIDAD CARTA : 0.25 pulg/min

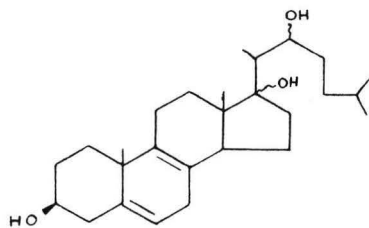
ATENUACION : 2 x 10⁻⁹



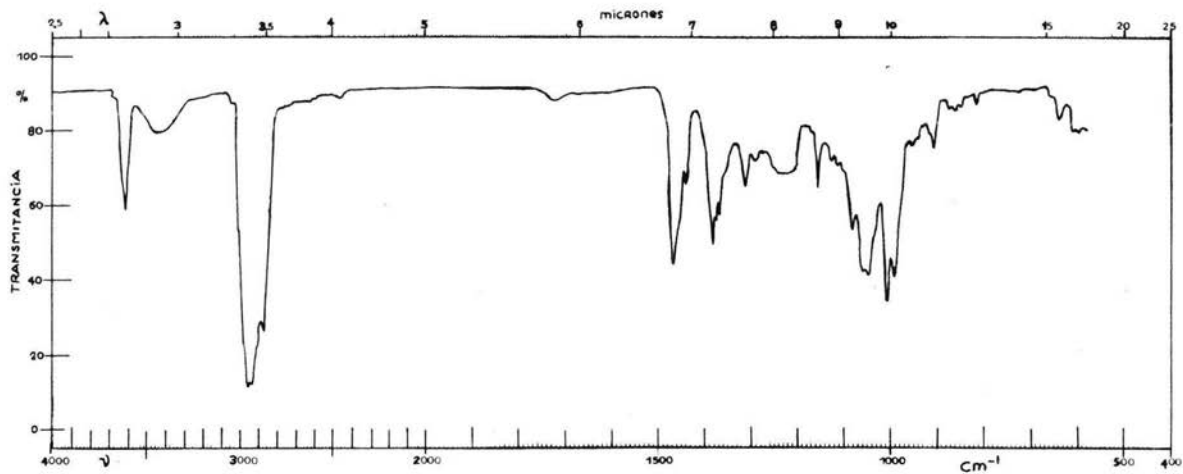
CGL # 11



EM
 DIAGRAMA DE LINEAS
 SAPOGENINA A



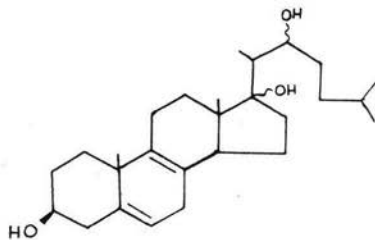
ESPECTRO # 12



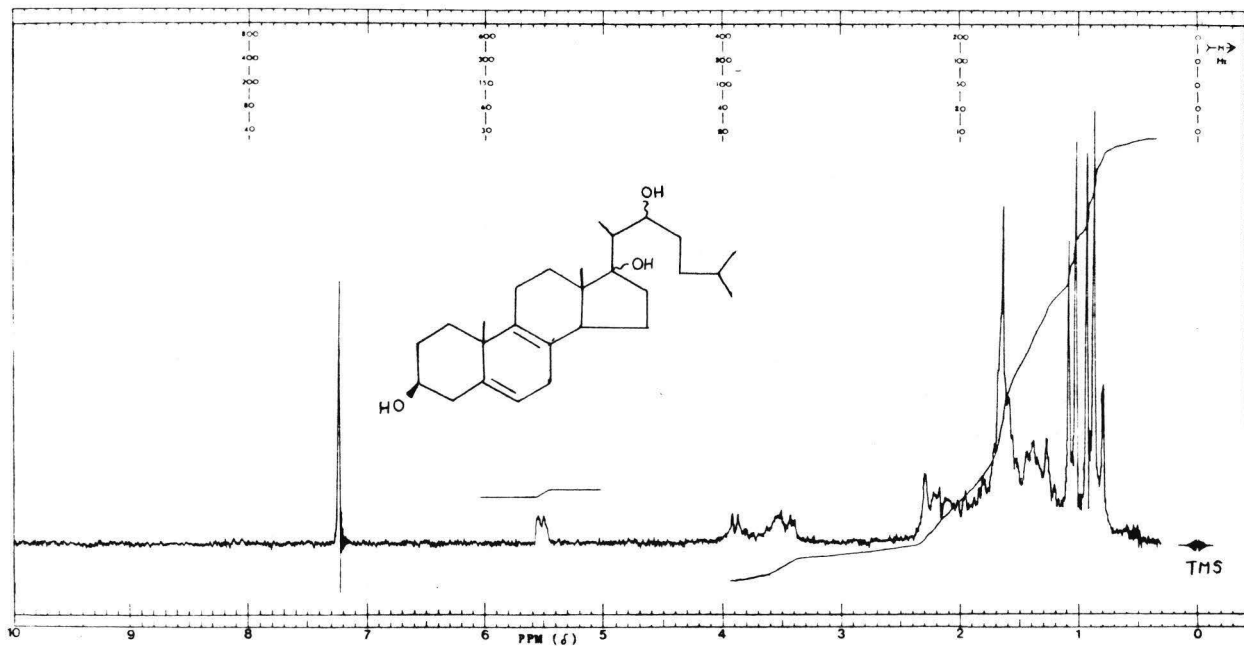
IR

SAPOGENINA A

Disolvente: CHCl_3
 Concent.: 33 mg/472 μ l



ESPECTRO # 13 49

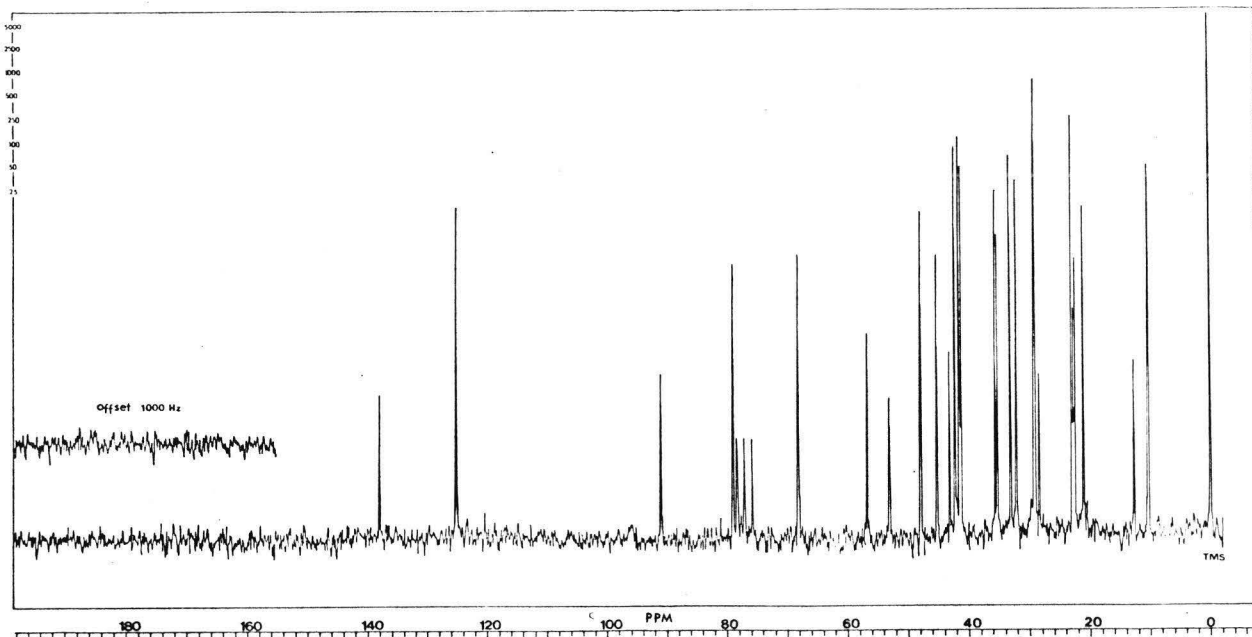


100 MHz NMR
RMN ¹H

Disolvente : CHCl₃

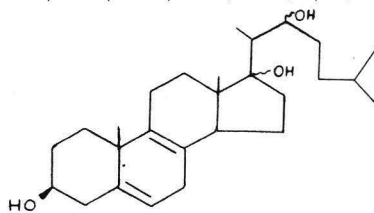
SAPOGENINA A

ESPECTRO # 14



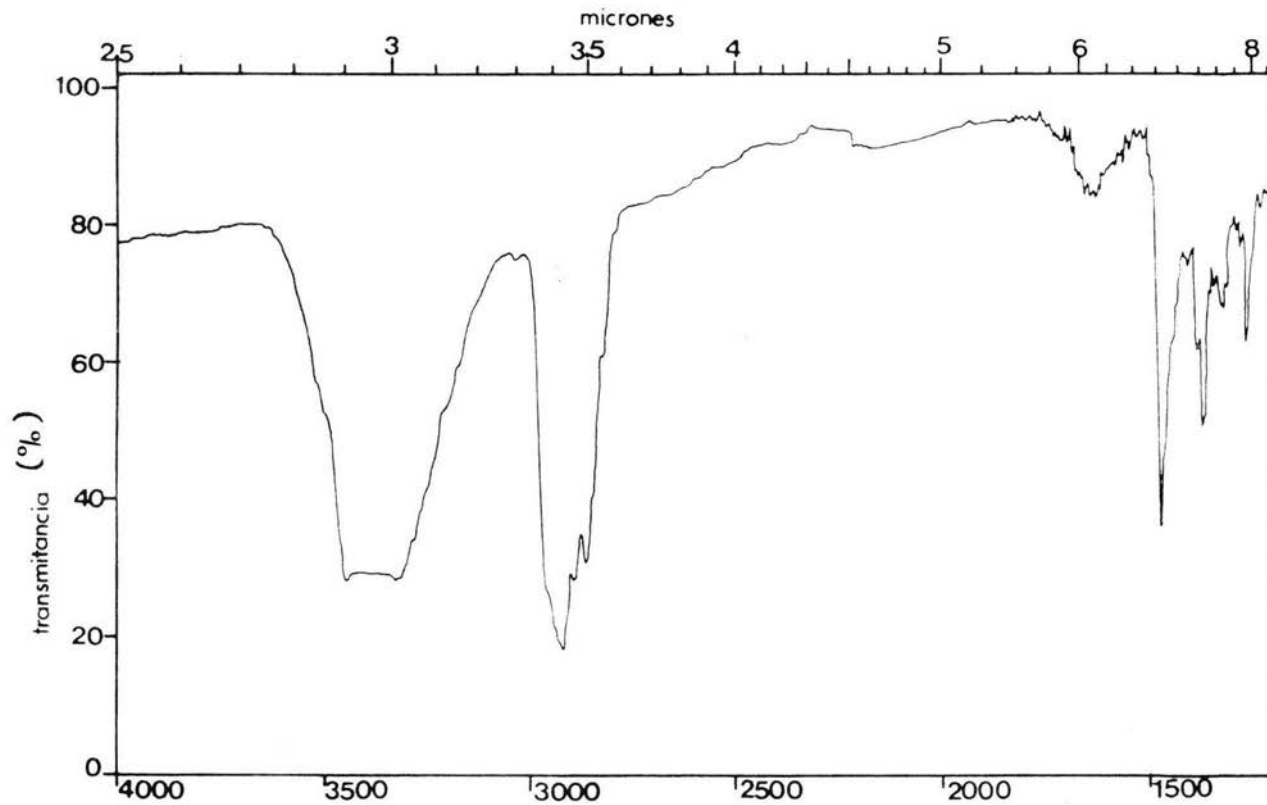
25.2 MHz

RMN ¹³C



SAPOGENINA A

espectro # 15



IR

SAPOGENINA A

frecuencia (cm⁻¹)

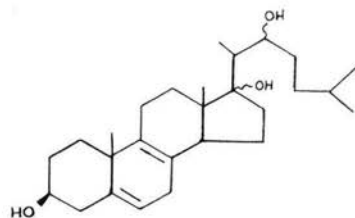
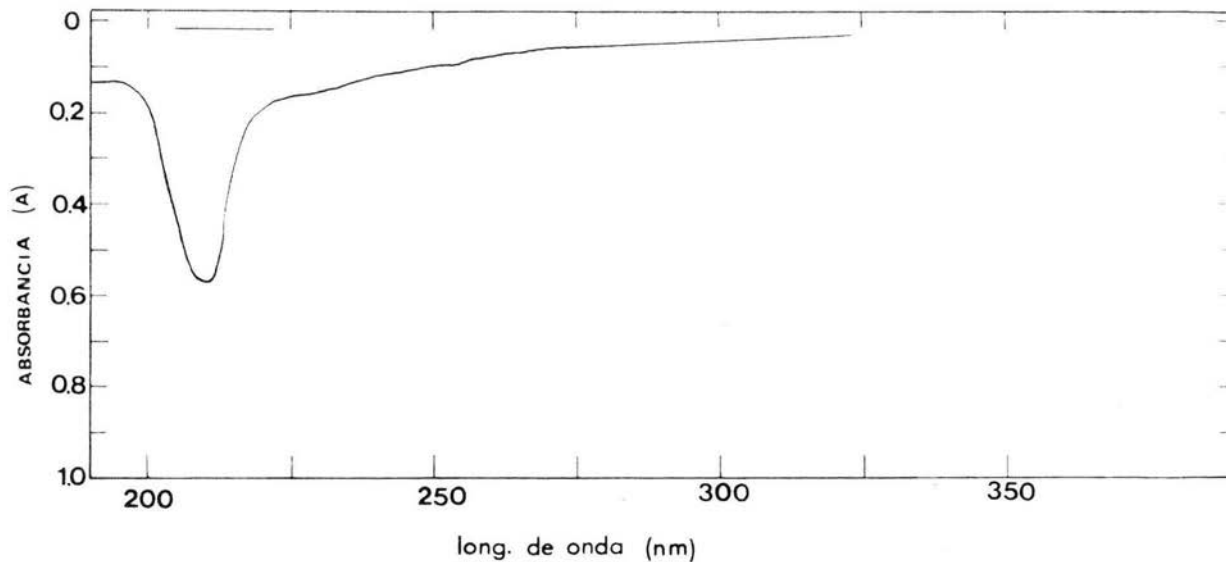
pastilla : KBr

ref. : aire

velocidad : lenta

rendija : N

ESPECTRO # 16



U.V.
sapogenina A

REF.: METANOL

VEL: RAPIDA

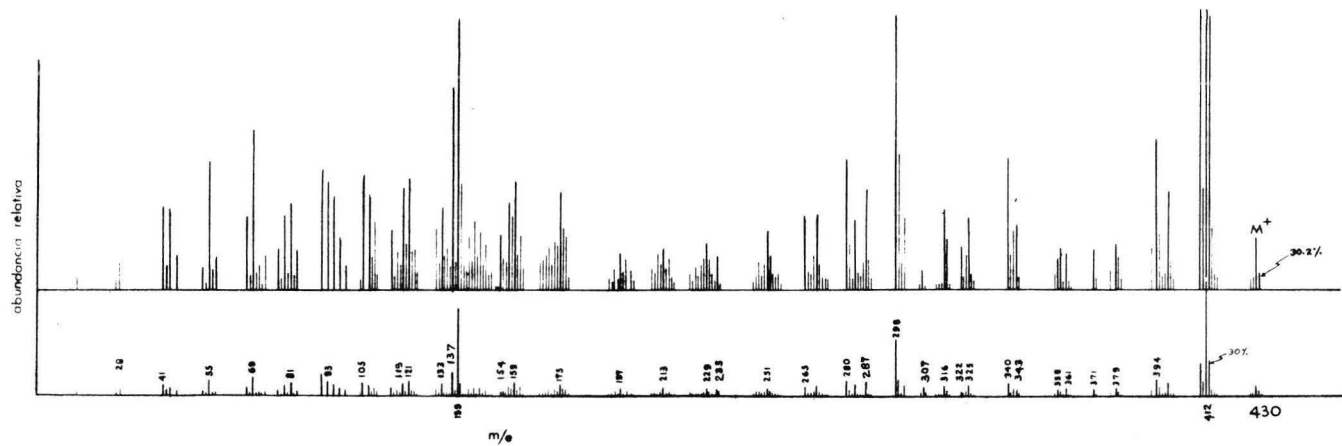
RENDIJA: 25

λ_{max} : 210 nm

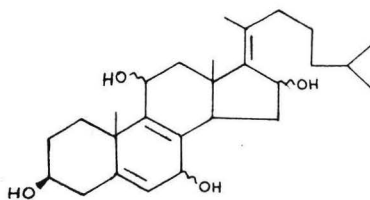
A : 0,55

PERKIN ELMER 202

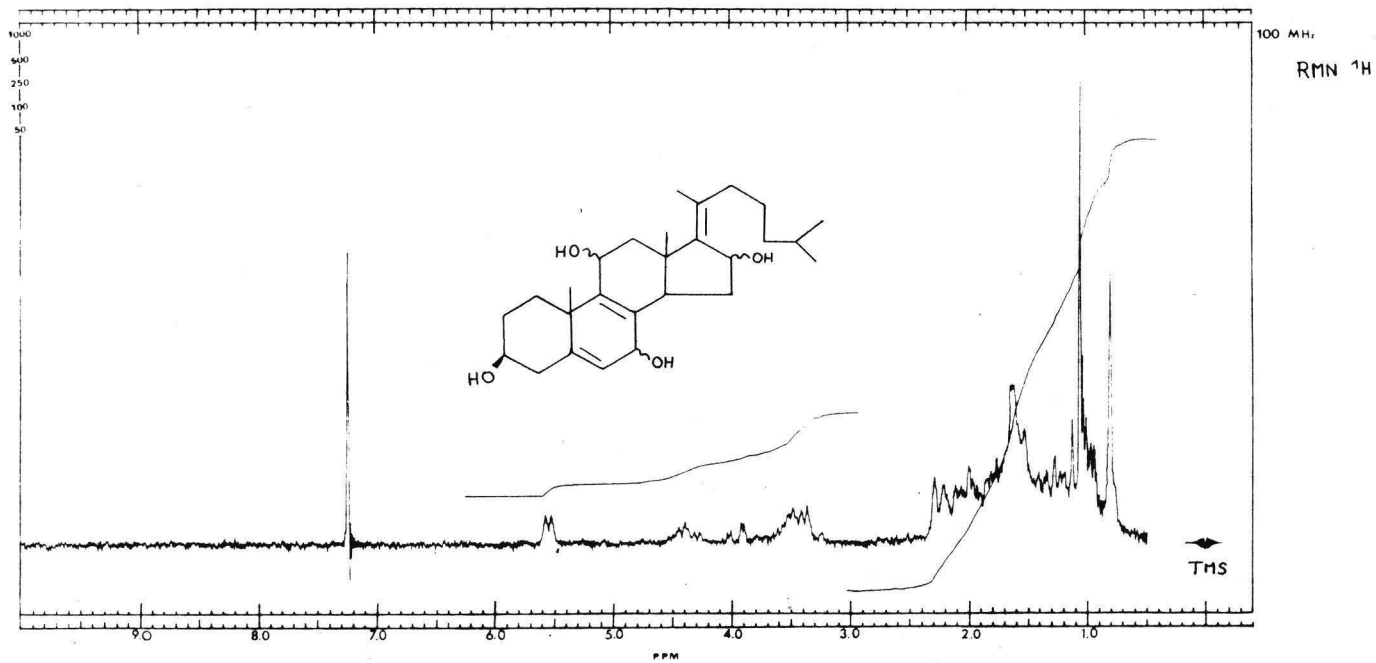
espectro \neq 17



EM
 DIAGRAMA DE LINEAS
 SAPOGENINA B



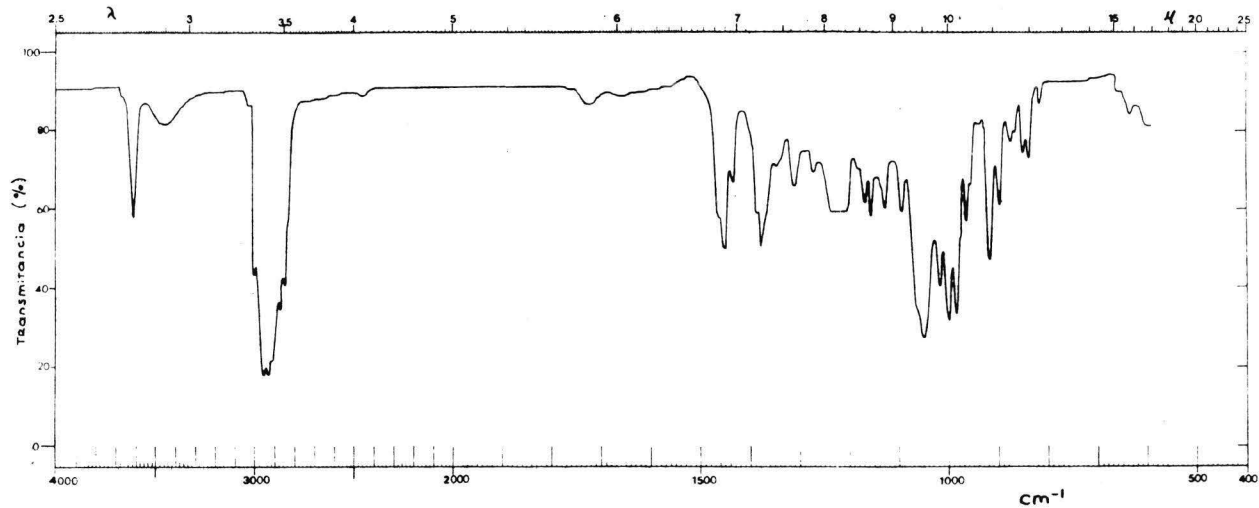
ESPECTRO # 18



Disolvente: CHCl₃

SAPOGENINA B

ESPECTRO # 19 55

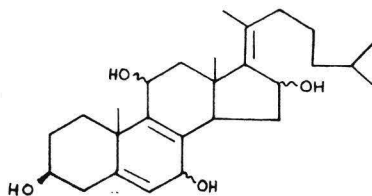


IR

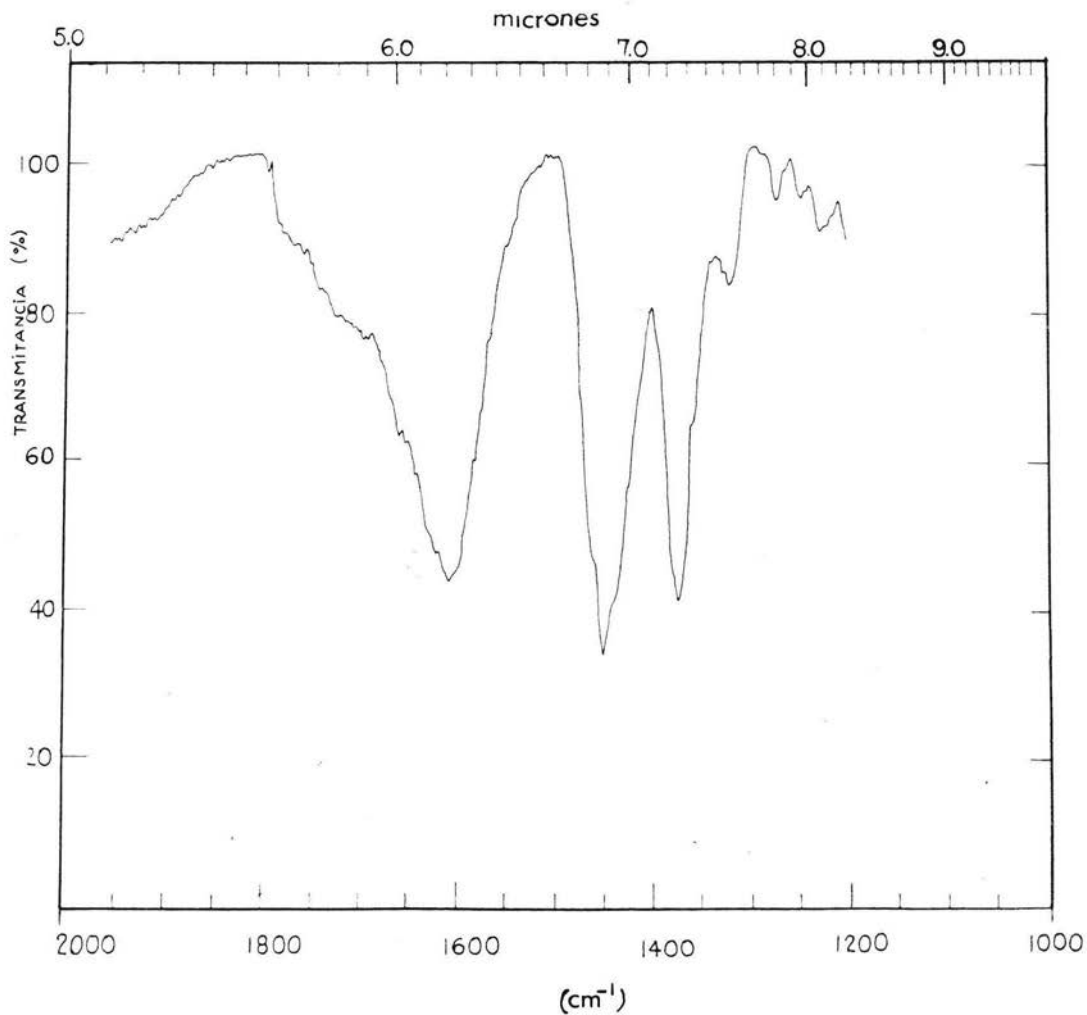
SAPOGENINA B

Disolvente: CHCl₃

Concent. : 23.8 mg/30 μl



ESPECTRO # 20



I.R.

sapogenina B

KBr

REF. : AIRE

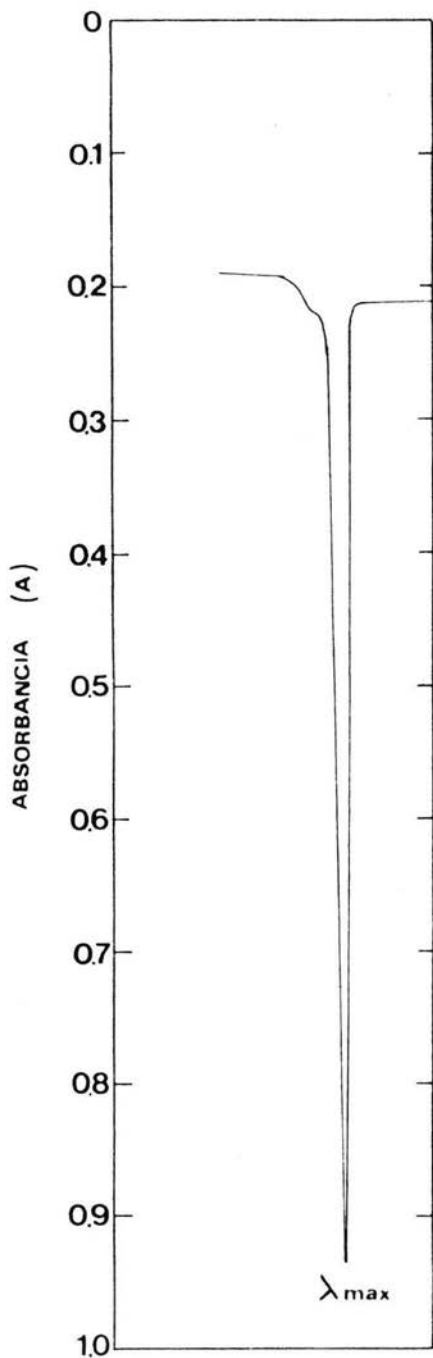
SCAN MODE : MEDIO

SLIT : N

TIME CONSTANT. : 1

EXPANSION : X 5

espectro # 21



U.V.

sapogenina B

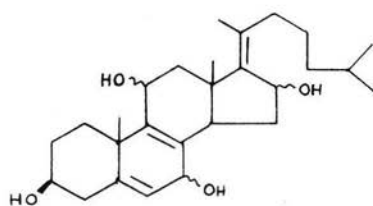
PERKIN ELMER HITACHI 200

REF: METANOL

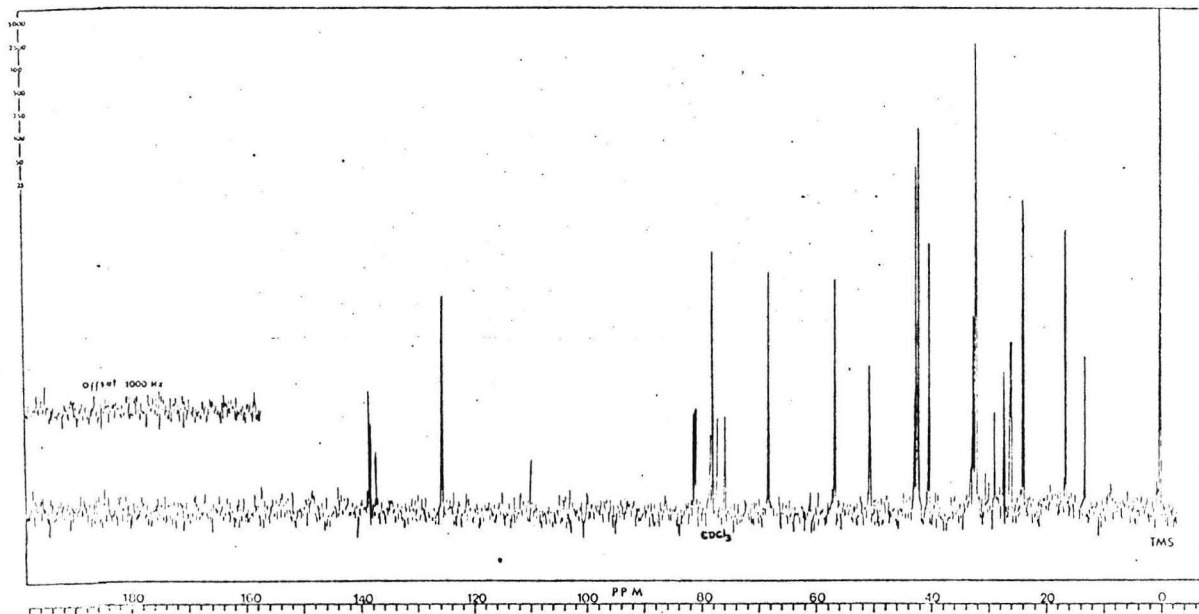
VEL: 15 nm min

λ_{max} : 209 nm

A: 0.713

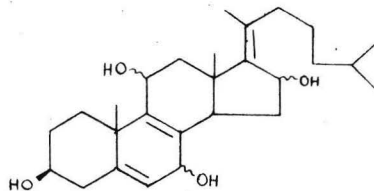


espectro # 22



25.2 MHz

RMN ¹³C



SAPOGENINA B

ESPECTRO # 23

CONCLUSIONES