

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**UNIVERSIDAD MOTOLINIA - FACULTAD DE QUIMICA**

**“Métodos Analíticos para ciertas Saponinas  
y Sapogeninas haciendo uso de la  
Cromatografía en papel”**

**TESIS**

Que para obtener el título de  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

presenta

**VICTORIA TRONCOSO SANTIBAÑEZ**

**MEXICO, D. F. 1953**



QUIMICA



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.

*A mis padres,  
Con todo cariño y gratitud.*

*A mi hermana.*

*Agradesco a los Laboratorios  
Syntex, S. A., las facilidades  
que me proporcionaron para la  
realización de este trabajo.*

*Al Dr. Alejandro Zaffaroni,  
por la dirección de esta Tesis.*

*A la Res. madre Dolores Echevarria,  
Directora de la Universidad Motolinia*

*Al Dr. José Herrán.*

*A mis maestros.*

## CAPITULOS.

### Capítulo I

Historia e importancia de Saponinas y Sapogeninas.

### Capítulo II

Parte experimental.

- a) Saponinas.  
Saponina de la Diosgenina.
- b) Sapogeninas.
  - 1) Heccogenina
  - 2) Tigogenina

### Capítulo III

Conclusiones.

### BIBLIOGRAFIA.

## **CAPITULO I**

### **HISTORIA E IMPORTANCIA DE SAPONINAS Y SAPOGENINAS**

El término saponina (del latín saponis-jabón) se empleó por primera vez en 1811 por Buchlos (1).

Se designa con este nombre a las sustancias amorfas que al agitarse, en soluciones acuosas, dan abundante espuma.

Las saponinas contienen: C, H, O, raras veces, N, S, P, se encuentran ampliamente distribuidas en plantas superiores y en cerca de 120 familias: Apocynaceae, Dioscoreaceae, Liliaceae, Scrophulariaceae, Euphorbiaceae, Amarillidaceae y otras (2).

Anteriormente se usaban estas saponinas para atarantar a los peces en los ríos y así facilitar su pesca, o también como detergentes.

Algunas saponinas tienen acción hemolítica mientras que otras están desprovistas de ella.

Esta propiedad es importante y se utiliza para su clasificación. Las saponinas son glucósidos que al hidrolizarlos, con ácidos minerales, producen una sustancia denominada aglucón y restos de monoacáridos como: rhamnosa, glucosa, arabinosa, galactosa etc.

Existen diversos tipos de aglucón; tales como triterpenos y esteroides. En el grupo de las saponinas esteroidales tenemos fundamentalmente dos tipos de aglucones: las saponinas y los aglucones cardíacos.

Durante muchos años se creyó que solamente los aglucones de los glucósidos cardíacos tenían el núcleo del ciclopentanofenantreno pero en los últimos años se ha comprobado que las clásicas saponinas de la sarsaparilla también lo poseen (3). Con esta base se extendieron estos conocimientos a otras plantas del grupo.

La única diferencia entre las saponinas obtenidas de plantas de actividad cardíaca, es la de poseer oxihidrilos terciarios.



Las saponinas se encuentran distribuidas en todas las partes del vegetal, su contenido varía de una especie a otra. Aparentemente existe una relación biogénica entre la producción de saponinas de una planta con su edad.

Como conclusión de sus extensos estudios en diversas especies Marker ha emitido la hipótesis de que hay una relación entre el número de átomos de oxígeno presente en las saponinas y la edad de la planta de donde proviene; a medida que la planta envejece disminuiría el número de átomos de oxígeno y se saturaría eventualmente su doble enlace.

La importancia que en la actualidad ha alcanzado el estudio de las saponinas esteroidales, es ser la materia prima inicial en la síntesis de numerosos esteroides, de gran actividad fisiológica tales como: las hormonas sexuales, masculinas y femeninas, las hormonas corticales, etc.

Dedicamos una parte de nuestra investigación a una saponina llamada hecogenina.

La hecogenina proviene de la hidrólisis de extractos de plantas del género *Agave*. Fue descubierta en la *Hetchia Texensis*, en muy pequeña cantidad.

Es la única saponina que posee un grupo cetónico en el carbón 12, y por esta propiedad ha sido utilizada para la síntesis parcial de una hormona-cortical denominada el compuesto E de Kendall o cortisona.

La importancia médica que tiene esta hormona es su aplicación en terapia reumatoide, enfermedad de Addison y en otras muchas enfermedades. (4)

La cortisona sintética, fue obtenida por primera vez en los Estados Unidos por Sarett (1946) a partir del ácido desoxicólico. Dicha fuente era un abasto insuficiente.

En México los Laboratorios Syntex, S. A. fueron los primeros en elaborar métodos para la conversión de hecogenina en cortisona (5, 6, 7).

El ácido desoxicólico con oxígeno en el carbón 12 era la materia prima-

inicial para obtener la cortisona. La hecogenina que también posee oxígeno en el carbón 12 podría sustituir al ácido desoxicólico, ya que por provenir de fuentes vegetales, tales como el agave, se podría obtener en cantidades muy grandes.

Este trabajo tiene como principal objetivo el desarrollo de micrométodos para la determinación cuantitativa de saponinas (saponina de diosgenina) y sapogeninas (hecogenina y tigogenina) en diferentes plantas.

El interés en desarrollar estos métodos microanalíticos radica en :

1) La posibilidad de estudiar nuevas plantas determinando su contenido en saponinas y sapogeninas.

2) El análisis cuantitativo de las saponinas elimina la necesidad de la hidrólisis ácida necesaria en el cuanteo de la sapogenina que es perjudicial ya que se destruyen algunas sapogeninas en este paso (dehidratación de la diosgenina) permitiendo además completar el análisis en tiempos más cortos.

3) Permitir el estudio comparado del contenido de ambas sustancias: saponinas y sapogeninas en las plantas de interés.

Por el hecho de ser micrométodos, requieren solamente cantidades muy pequeñas de material botánico, permitiendo por lo tanto el estudio del contenido de estas sustancias en plantas jóvenes, aún de pesos muy reducidos, y poder seguir de esta forma el contenido de saponina en relación con la edad de la planta.

**C A P I T U L O I'**

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

**I/a Parte Saponina de Diosgenina.**

## II

En la primera parte de este capítulo se tratan los siguientes puntos.

1) Obtención y purificación de la saponina de la dioegenina.

2) Propiedades.

- a) Constantes físicas.
- b) Constantes químicas.
- c) Curvas de sulfúrico.
- d) Hidrólisis.

3) Comparación con saponinas de dioegenina obtenidas por otros investigadores.

4) Desarrollo del micrométodo analítico.

- a) Separación: cromatografía en papel.
- b) Cuanteo, mediante formación de un cromógeno al reaccionar la saponina con el ácido sulfúrico.

1) La obtención de las saponinas en estado puro es una operación extremadamente difícil por el hecho de que estas sustancias son adsorbentes muy energéticas y retienen las sustancias más variadas.

El método utilizado para la extracción de la saponina de la dioegenina fue el siguiente:

1° Tratamiento con alcohol etílico (95°) a ebullición.

2° Filtración en caliente.

3° Concentración del filtrado y adición de éter sulfúrico para la precipitación de la saponina.

Debe tenerse en cuenta la parte del vegetal que se va a extraer: si se obtiene de raíces o partes secas, se pulveriza y se extrae según el método anterior. Si la saponina proviene de partes jugosas se reúne el jugo y se agrega cal apagada, se agita, se deja reposar una noche, después se filtra y el precipitado se seca, se pulveriza, y se extrae la saponina por el método

descrito antes.

1) Extracción de la saponina de raíces de dioscorea.

Cien gramos de raíz seca pulverizada se extraen 7 veces con etanol a reflujo, usando 600 ml. la primera vez y 300ml. las seis siguientes. Cada extracción dura 1 hora.

El volumen total de etanol empleado es de 2 a 3 litros. Todos los filtrados se reúnen y finalmente se concentra a sequedad, obteniéndose de extracto seco 16 g.

Purificación de la saponina.-

Cinco gramos del extracto que contienen la saponina, obtenida por el método anterior, se disuelven en 100ml. de metanol, al que se le agregan 500 mg. de alúmina sin lavar y 200 mg. de carbón activo, se calienta durante 10 minutos, se deja enfriar y finalmente se filtra.

A continuación se efectúa la concentración del líquido a un volumen de 10 ml., enseguida se precipita con 500 ml. de éter y se filtra al vacío, obteniéndose después de haberse secado el precipitado, una sustancia con las siguientes propiedades:

Peso del precipitado = 4.135 g.

2) Propiedades:

Color: blanco

Soluble en metanol, poco soluble en cloroformo y en agua, insoluble en éter.

P.F. = 205°- 207° C.

$(\alpha)_D^{20} = - 84.23$  en metanol

Para la identificación de esta saponina se le hizo su espectro de absorción con ácido sulfúrico (A), en el Espectrofotómetro de Beckman D. U., haciendo las lecturas en el ultravioleta desde 220-350  $\mu$  y en el visible de 350 -

600  $\mu$  y Fig. 1.

Por hidrólisis ácida de la saponina se obtiene 33.36 % en peso de diosgenina. El espectro de absorción de esta saponina, Fig. II, tiene máximos diferentes a la saponina.

De ambas curvas se pueden calcular los datos de Log. E. los cuales nos dan la diferencia clara que existe en dichas curvas. Tales datos se encuentran en el cuadro #1.

C U A D R O #1

SAPONINA		SAPOGENINA	
$\lambda$ max. y $\lambda$ min.	Log. E	$\lambda$ max. y $\lambda$ min.	Log. E
(min) 215	3.91	( min ) 225	3.56
(max) 270	4.46	( max ) 350	3.57
(min) 300	4.25	( min ) 260	3.52
(max) 325	4.59	( max ) 325	3.72
(mín) 370	3.79	( min ) 365	3.66
(max) 412	4.27	( max ) 412	4.15

El P. M. de la saponina se calcula de la siguiente manera: 100 g. de saponina dan 33.3 g. de diosgenina. Un mol de diosgenina será dada por 1020 de saponina.

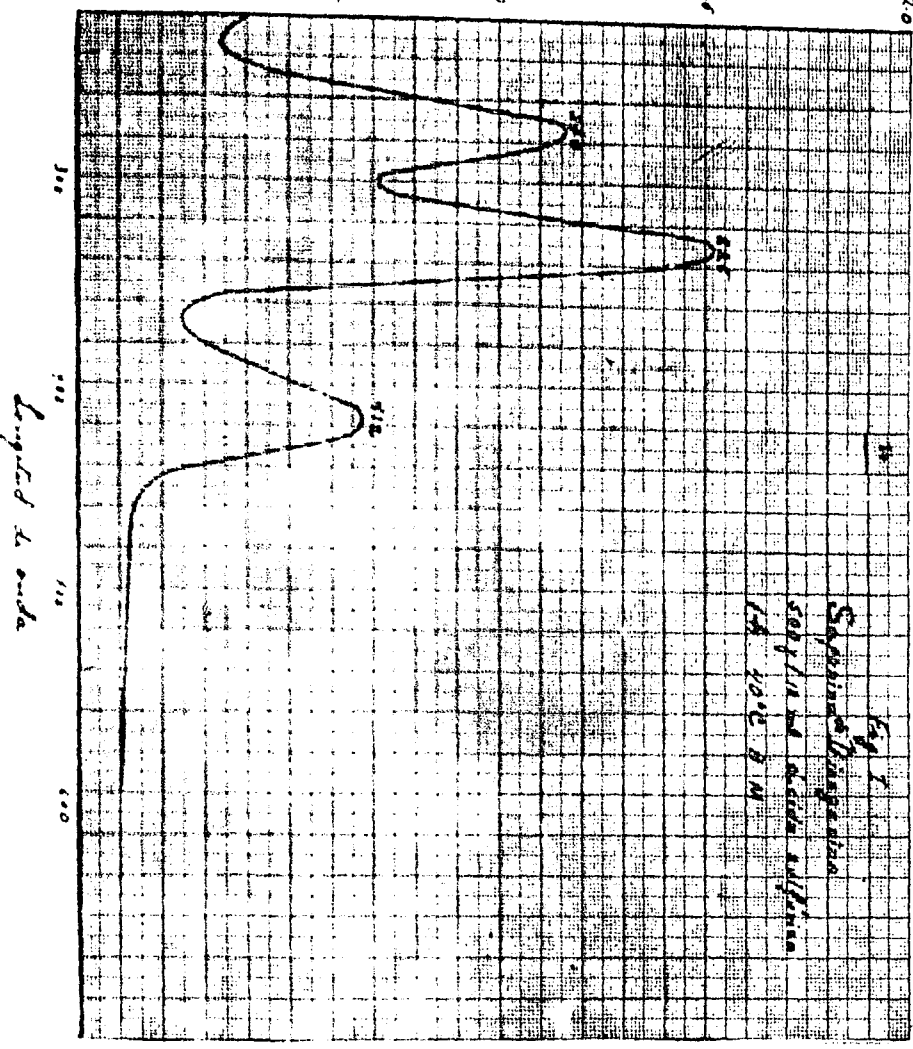
El  $\epsilon$  y el Log.  $K$  se calcula por las fórmulas abajo descritas.

$$\epsilon = \frac{\text{Densidad Óptica} \times \text{peso molecular de la sustancia}}{\text{Concentración de la sustancia} \times \text{Longitud de la celdilla}}$$

$\epsilon$  = Extinción molecular.

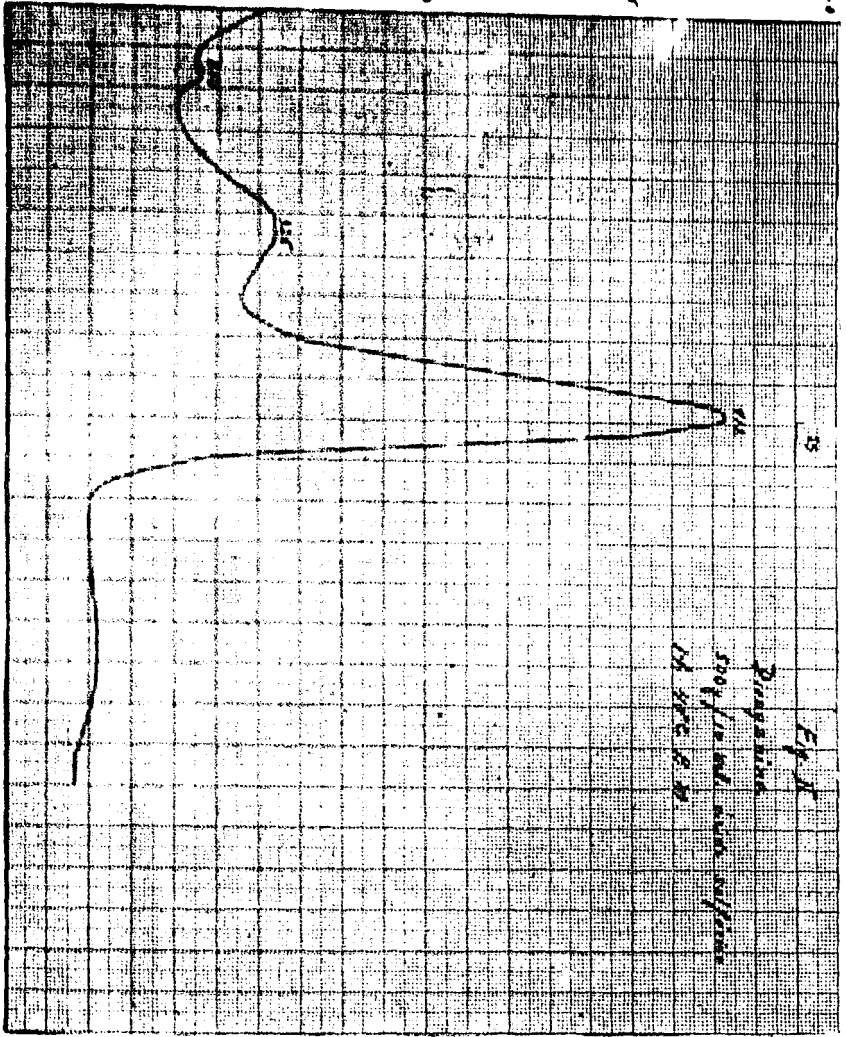
Extinción molecular es la absorción que tendrá una mol g. del esterotida en un litro de solvente.

*Damped Optics*



*Fig. 1  
Superimposed Damping  
500 ft in the vertical column  
100 1000 10000 ft in*

*Demarcada Optica*



*demarcada 1 onda*

*Exp. II*

*Diagnosica*

*500/1000 mm. superficie*

*18.000.000*



3) Trabajos anteriores de Marker, Takamoto, Russell (9, 10, 11, 12, 13), describen numerosas saponinas derivadas de la dioegenina, a las que dieron nombres especiales y cuyos constantes se encuentran en el cuadro # 2.

Estos estudios han servido para hacer una comparación con la saponina de dioegenina obtenida por nosotros.

En este trabajo se encontró que, por hidrólisis, la saponina dió dioegenina. No se ha dado una designación a esta saponina; así mismo no se ha demostrado el número de azúcares que la acompañan.

C U A D R O # 2

Saponina	Obtenida de	P.F.	(-) D	Hidrólisis Sapogenina-azúcares
Trillina	Trillium Erectum	271°C.	-107	Dioegenina - Glucosa
Trillarina	Trillium Erectum	203°C.		Dioegenina - 2 Glucosa
Diocaina	Dioscorea Tokoro Makino	248°C.	-95	Dioegenina - Rhamnosa
Saponina de Dioegenina	Dioscorea mexicana	205-207°C.	-95	Dioegenina - Glucosa Arabinosa Rhamnosa

Estos azúcares fueron identificados en el Departamento de Investigaciones Bioquímicas de los Laboratorios Syntex, S.A.; dicho trabajo no se ha publicado.

4) **Micrométodo analítico para la identificación de la saponina de diosgenina.**

Se llevó a cabo este método para obtener de una manera rápida la identificación de la saponina en extractos de plantas.

Para el desarrollo de esta técnica se emplearon los procedimientos:

- 1) **Cromatografía en papel.**
- 2) **Cuanteo por el espectro de absorción del cromógeno obtenido por reacción de la saponina con el ácido sulfúrico concentrado.**

La cromatografía en papel ha alcanzado en los últimos años gran interés como microtécnica que permite la identificación de una gran variedad de sustancias.

Conden, Gordon y Martín fueron quienes emplearon esta técnica para la separación de aminoácidos y en general sustancias solubles en agua. Actualmente se ha extendido este método para todos los campos de la Química Orgánica e Inorgánica.

Estudios iniciados en la Universidad de Rochester, en Nueva York, por el Dr. Alejandro Zaffaroni y colaboradores (14, 15), culminaron en el desarrollo de métodos cromatográficos para sustancias insolubles en agua.

Para esta técnica se emplean sistemas de solventes orgánicos inmiscibles entre sí, formados por dos fases: Fase estacionaria, constituida por formamida - metanol con la cual se impregnan los cromatogramas. Fase móvil que es el sistema de solventes no polares, hexano, benceno, acetato de etilo, ciclohexano, saturados con formamida.

Para su desarrollo se utilizan los siguientes materiales:

- 1) **Saponina.**
- 2) **Solventes: hexano, benceno, acetato de etilo, cloroformo, formamida c.p., metanol absoluto.**

- 3) Reactivos: ácido sulfúrico concentrado.
- 4) Papel filtro Whatman N° 1.
- 5) Cámaras de cromatografía, de las que existen dos tipos, para cromatografía ascendente y para cromatografía descendente. Ambas cámaras tienen el mismo fundamento.

Las primeras se utilizan para métodos de control; consisten en frascos de 12 cm. de diámetro por 23 cm. de altura.

Las cámaras descendentes son cilindros Pyrex de 10 cm. de diámetro por 45 cm. de altura, cubiertas con tapas de vidrio esmerilado impregnados con una pasta de almidón glicerizado para facilitar un cierre perfecto.

En el interior tiene un soporte de base trípode y en la parte superior se adapta una placa de metal, en la cual se coloca una charola que sirva como recipiente del solvente.

Las cámaras se forran con papel filtro y el fondo se agrega un exceso suficiente de solvente asegurando así que la atmósfera se hallé saturada con el solvente volátil respectivo.

Antes cámaras deben de estar a una temperatura de 20-25°C. y antes de utilizarse deben de dejarse reposar 3 ó 4 horas para saturación completa de las mismas.

Los cromatogramas que se emplean son de dos tamaños: para las cámaras ascendentes son de 15 cm. por 20cm. con una línea de aplicación colocada 2.5 cm. de altura del borde inferior. Para las cámaras descendentes son de 17 cm. por 41 cm. con línea de aplicación de 11 cm., el ancho del papel se puede variar, de acuerdo con la cantidad de muestra por analizar.

#### TECNICA.

La muestra por identificar es colocada en la línea de aplicación de un cromatogramapreviamente impregnado con la fase más polar.

Dicha aplicación se hace con pipeta de punta capilar, tipo Pasteur, y

empleando mezcla cloroformo y metanol en partes iguales para disolver la muestra que va a ser analizada. Debe procurarse que la muestra no alcance más de 0.5 cm. de ancho para un desarrollo perfecto del cromatograma.

Según el cromatograma en que se aplique la sustancia se introducirá en la cámara correspondiente.

Los cromatogramas ascendentes antes de introducirlos en la cámara correspondiente se engrapan por su lado más angosto procurando que los bordes no se toquen.

Los cromatogramas descendentes se colocan sobre una lámina de vidrio que actúa como soporte del papel y de esta forma se introducen en la charola con el solvente dentro de la cámara cromatográfica. El cromatograma se deja desarrollar el tiempo necesario para que las sustancias que se analizan hayan avanzado, una distancia apreciable. Al cabo del cual se sucan y se elimina el solvente frente a un ventilador de aire caliente durante 2 ó 3 horas; una vez seco se cortan tiras de 0.5 cm. de ancho de cada lado; para así determinar la posición de la sustancia en el cromatograma por medio de reactivos, a continuación se corta en pedacitos la zona en la cual se localiza la sustancia y se suelve finalmente con metanol durante 12 horas; obteniéndose así el compuesto bastante puro.

La cromatografía en papel de la saponina se estudió tanto en el sistema de cromatografía ascendente como en el de cromatografía descendente, siguiendo de la técnica descrita en párrafos anteriores.

Los resultados obtenidos con la saponina purificada se mencionan en el cuadro # 2 y # 3.

CUADRO # 2.

Cromatografía de la saponina en el sistema ascendente.

Sistema de solventes saturados con formamida.	Posición de las manchas en el cromatograma expresada en cm.	Reacción con el ácido sulfúrico concentrado.
Hexano.	0.0 - 0.5	Amarillo café intenso.
Hexano Benceno. (50 : 50)	0.0 - 0.5	Amarillo café intenso.
Benceno	0.0 - 0.5	Amarillo café intenso.
Benceno 40 % Acetato de Etilo 60%	1.8 - 3.0 7.3 - 3.8	Amarillo café + 3 Amarillo café + 3

La cantidad aplicada en cada cromatograma fué 2 - 3 mg. y el tiempo para su desarrollo una hora.

CUADRO # 3.

Cromatografía de la saponina en el sistema descendente.

Sistema de solventes saturados con formamida.	Posición de las manchas en el cromatograma expresada en cm.	Reacción con el ácido sulfúrico concentrado.
Hexano.	0.0 - 0.6	Amarillo café intenso.
Hexano Benceno. (50 : 50)	0.0 - 0.4	Amarillo café intenso.
Benceno.	0.0 - 0.5	Amarillo café intenso.
Cloroformo.	0.0 - 0.5	Amarillo café intenso.
Benceno 40 % Acetato de Etilo 60%	5.1 - 7.7 8.5 - 16.0	Amarillo café + 3 Amarillo café + 3

Se cromatografiaron muestras de 2 - 3 mg. en 10 cm. de ancho.

El tiempo de desarrollo fué de una hora no moviéndose la sustancia de la línea de aplicación. Solamente el sistema benceno - acetato de etilo saturado-

con formaido dió el mejor resultado en 12 horas.

La localización de la saponina en el cromatograma se hizo con el ácido sulfúrico para lo cual se cortaron tiras de 0.5 cm. a lo largo del cromatograma. Previamente en una charola de vidrio se colocó ácido sulfúrico con una pipeta, procurando formar líneas no muy anchas, sobre estas líneas se colocan las tiras, se deja reaccionar un minuto y observando la charola por su parte inferior se delimitan las manchas anotando finalmente la coloración de la mancha y su intensidad con lo que respecta a esto último es muy arbitraria la intensidad en cada caso.

Para una reacción colorida apenas perceptible se dió una intensidad  $\pm$  y a medida que la concentración de la sustancia aumenta las intensidades serán  $\pm 1$ ,  $\pm 2$ ,  $\pm 3$ ,  $\pm 4$ ,  $\pm 5$ ,  $\pm 6$ ,  $\pm$  intenso.

En la cromatografía se encontraron dos sustancias que al eluirse por separado y haciéndoles a cada una su curva de sulfúrico se obtuvieron curvas iguales, indicación de sustancias que posiblemente difieran en sus azúcares, - Fig. III y Fig. IV.

Para la cromatografía de extractos de plantas que contienen saponina -- de diosgenina se procedió primero a eliminar los pigmentos, ceras y otras impurezas que se extraen junto con la saponina, dicha eliminación se logró con un lavado del cromatograma durante una hora en cloroformo; teniendo en cuenta que la saponina no se mueve en cloroformo debido a su gran polaridad. Una vez limpio el cromatograma se evaporó el cloroformo frente a un ventilador, finalmente se colocó el cromatograma en la cámara benceno - acetato de etilo para su desarrollo.

Densidad Optica

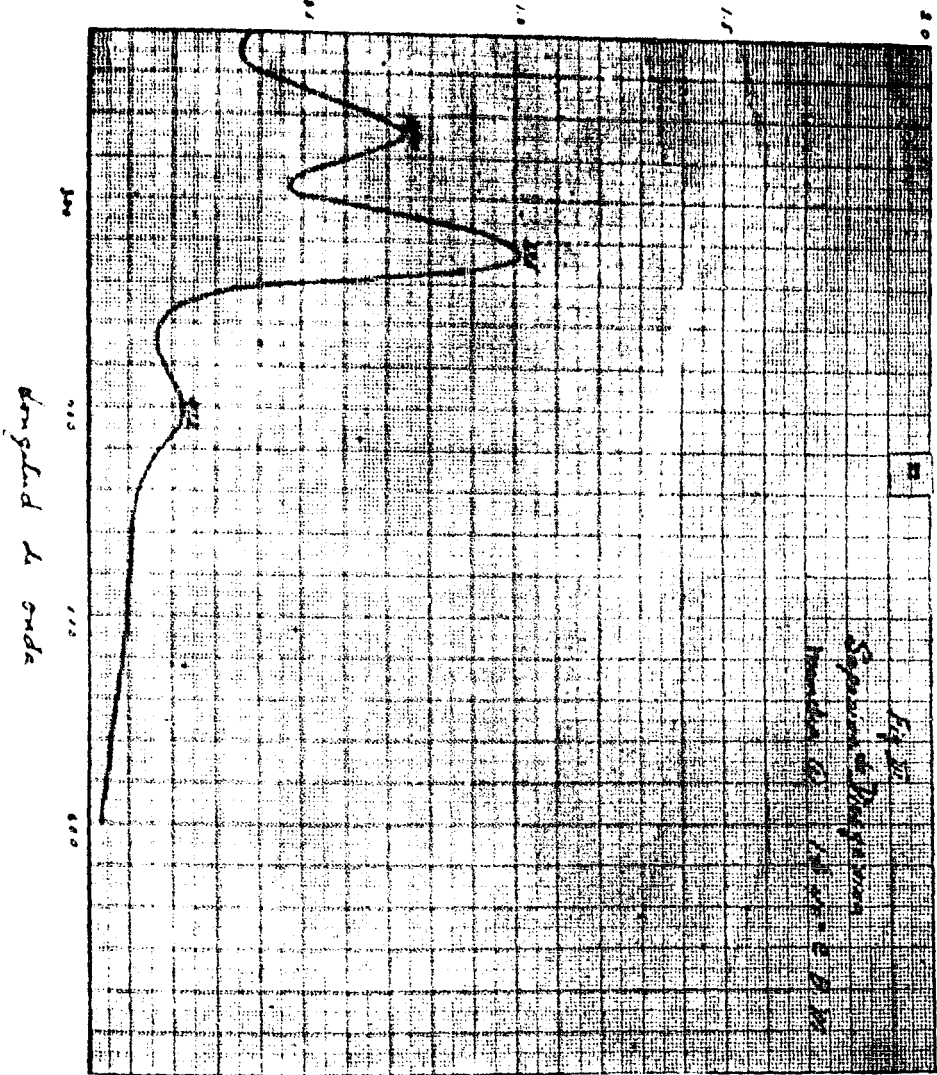


Fig. 10  
Separación de Densidades  
Inmóvil de 1000 a 2000

Densidad Óptica

20

1.8

1.0

0.1

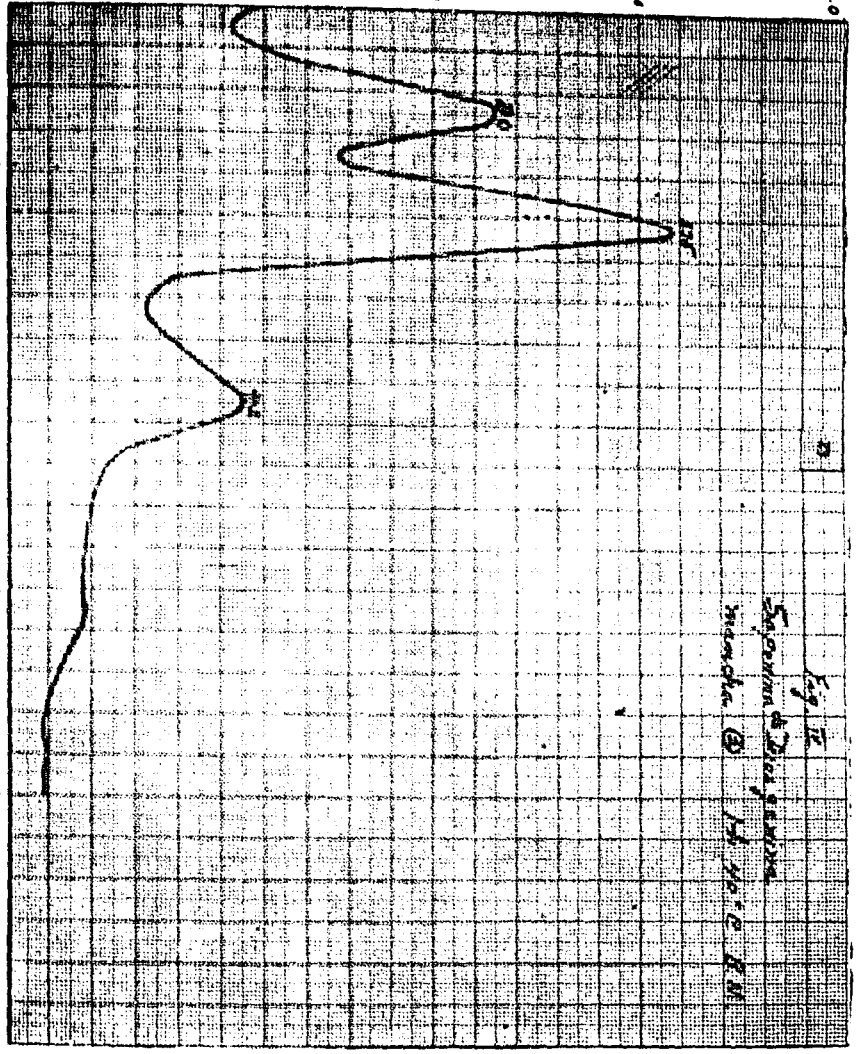


Fig. II  
Spectrum of *Dialpeltis*  
muscula (3) 14.10.1968 B.M.

longitud de onda



2) La determinación cuantitativa de la saponina se efectuó utilizando su propiedad de formar un complejo con el ácido sulfúrico concentrado que presenta una máxima intensa de absorción a  $325\mu$ .

Se pesaron 25 mg. de la saponina y se afornaron a 25 ml. con metanol (sol A) de esta solución se tomaron 5 ml. y se diluyeron a 50 ml. con el mismo solvente (sol B). De ambas matraces se tomaron las siguientes alícuotas.

1)	0.5 ml.	(sol.B)	corresponden	50 $\mu$
2)	1.0 ml.	(sol.B)	" " "	100 $\mu$
3)	2.0 ml.	(sol.B)	" " "	200 $\mu$
4)	3.0 ml.	(sol.B)	" " "	300 $\mu$
5)	4.0 ml.	(sol.B)	" " "	400 $\mu$
6)	0.5 ml.	(sol.A)	" " "	500 $\mu$

Una vez que se tomaron las cantidades antes mencionadas. Se procedió a evaporar a sequedad cada muestra en matraces afornados de 10 ml. y finalmente se afornó con ácido sulfúrico concentrado.

Se colocaron los matraces una hora a  $60^{\circ}\text{C}$ . D.M. y después se enfriaron con agua corriente. Inmediatamente se hicieron las lecturas a  $325\mu$  en el Espectrofotómetro de Beckman D. U.

Concentración de la saponina diosgenina en 10 ml. de ácido sulfúrico concentrado.

Densidad Óptica lecturas a  $325\mu$ .

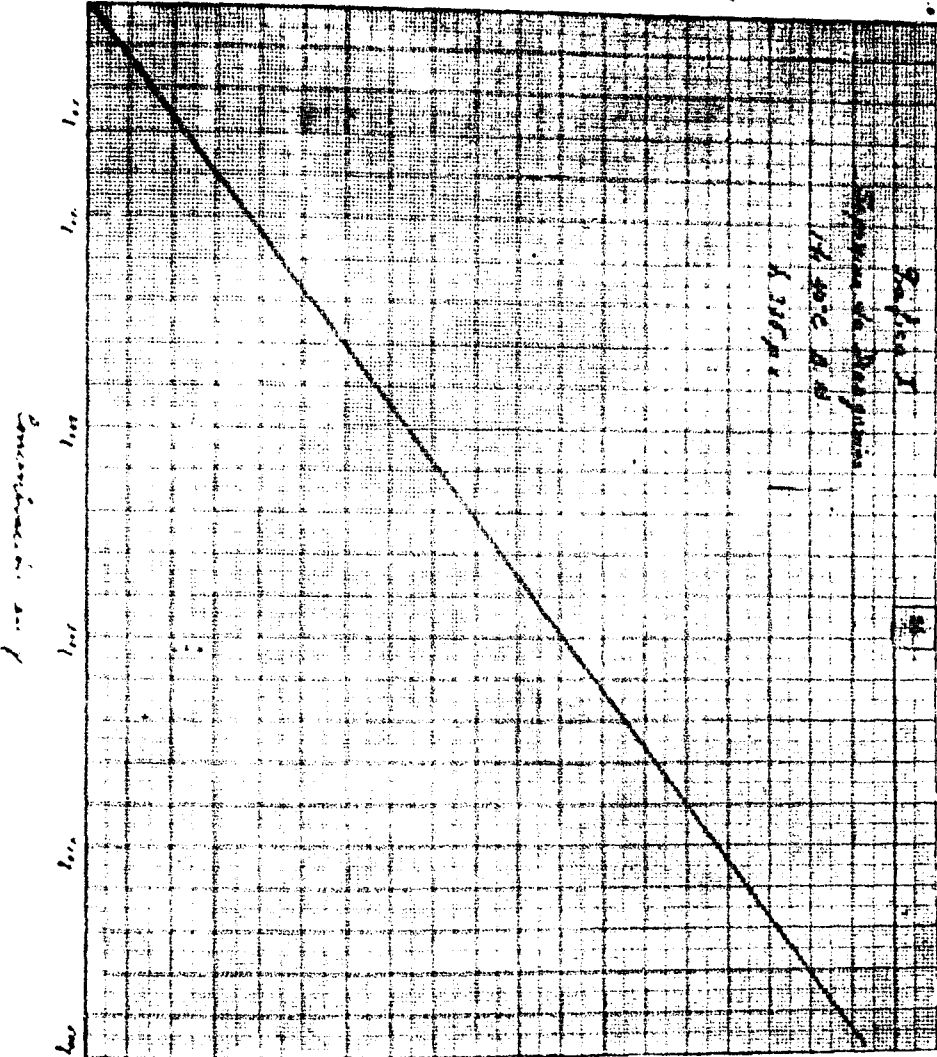
50 $\mu$	0.185
100 $\mu$	0.370
200 $\mu$	0.725
300 $\mu$	1.090
400 $\mu$	1.445
500 $\mu$	1.800

En la gráfica I se indican los resultados obtenidos. Colocando en la 11-

son de las abscisas la concentración en  $y$  y en la línea de las ordenadas las lecturas que se obtuvieron en el Espectrofotómetro de Beckman D. U. en  $725\mu$

De esta forma se demostró que el método usado es aplicable para la determinación cuantitativa de la asonina ya que la relación entre concentración e intensidad del color producido obedece a la ley de Beer, como lo indica la línea recta obtenida en la gráfica 1.

Demanda Osetra



2a. parte experimental

Espectroscopia.

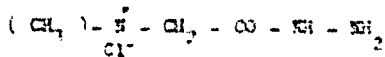
Esta segunda parte experimental está dedicado al estudio de las sapogeninas: hecogenina y tigogenina.

Dichas sustancias se encuentran generalmente asociadas en diferentes plantas del género *agave*. El interés principal fué, el de desarrollar métodos analíticos que nos permitan la identificación de la hecogenina en presencia de la tigogenina. Los siguientes métodos fueron estudiados:

- I.- Reactivo Girard T.
- II.- Cromatografía en papel.
  - a) forma libre.
  - b) como acetato.
- III.- Formación de los cromógenos obtenidos al reaccionar las sapogeninas con el ácido sulfúrico concentrado.

I.-

El reactivo de Girard T. descrito por primera vez en 1916, (16, 17) posee la siguiente estructura química.



Por su función hidrazida posee la propiedad de combinarse con compuestos que posean funciones carbonílo. Las hidrazonas obtenidas resultan solubles en el agua por el agrupamiento sal cuaternaria de amonio presente en el reactivo.

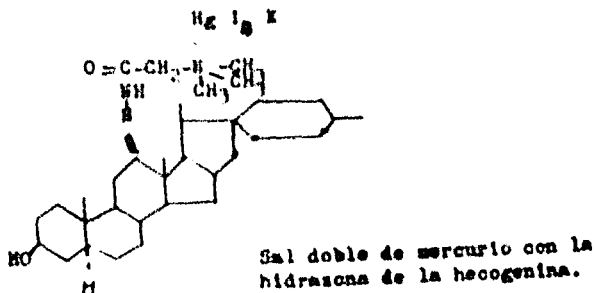
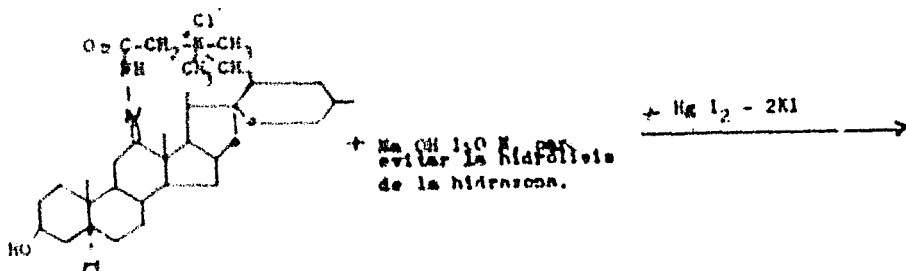
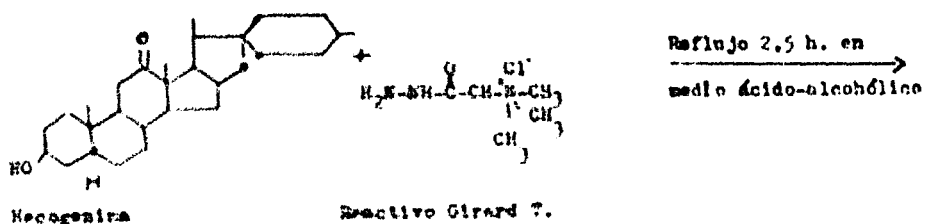
Cetonas o aldehídos de alto peso molecular, tales como los derivados de esteroides, insolubles en el agua, dan con el reactivo Girard T. hidrazonas solubles en el agua.

Este reactivo ha demostrado ser de gran valor en la separación y aislamiento de compuestos cetónicos. En nuestro caso utilizamos para separar la hecogenina (compuesto cetónico) de la tigogenina (compuesto no cetónico).

El método analítico estudiado consiste en la formación de la hidrazona-

con el reactivo  $Hg I_2 - 2KI$ , filtración y cuanteo del precipitado por secado y pesada.

El desarrollo químico del método empleado se expresa según las siguientes reacciones.



## Técnica:

Se pesaron 20 mg. de hecogenina, los que fueron colocados en una bola de 100 c.c., se le agregaron 0.500 g. del reactivo Girard T y 20 ml. de una mezcla ácido acético-alcohol (1 - 10), se calentó a reflujo en baño de vapor 2.5 horas.

Por titulación con sosa 1.0 normal, se determinó la cantidad necesaria para la neutralización de 20 ml. de la mezcla ácido acético-alcohol, llegando a un pH entre 6.5 y 7.0.

La cantidad de sosa que se empleó fue 28.6 ml. esta cantidad se introdujo en el mismo momento en un Erlenmeyer de 250 c.c. que contiene agua destilada de 0°-5°C.

Al final del reflujo, el contenido de la bola se vertió en el Erlenmeyer de la solución alcalina, se le agregó 15 ml. de una solución Hg I<sub>2</sub> 2N y 15 ml. de una solución de ácido acético al 10 % formándose un precipitado blanco amarillento, el cual se filtró en un Funckner de peso constante, el lavado final se hizo con agua destilada 0° - 5° C., se secó a una temperatura 80°-100° C. hasta que no hubo variación en el peso.

Cada molécula de hidrasoon reacciona con una de Hg I<sub>2</sub>.

## Resultados:

## Experimento I.-

Peso de la muestra = 0.0200 g. hecogenina.

Peso del precipitado mercurico = 0.0494 g.

(Peso teórico del precipitado mercurico = 0.0495 g.)

Recuperación = 99.5 %

## Experimento II.-

Peso de la muestra = 0.0200 g. de hecogenina.

Peso del precipitado mercurico = 0.0507 g.

(Peso teórico del precipitado mercurico = 0.0495 g.)

Recuperación = 102.2 %.

Por los resultados obtenidos se puede apreciar que este método dió buenos resultados, pero cuando se aplicó a mezclas de hecogenina y tigenina los resultados fueron muy variados.

Habiéndose efectuado la reacción de Girard en presencia de la mezcla (hecogenina y tigenina) se observó un aumento en el peso del precipitado siendo el rendimiento superior del 100 %.

Por ejemplo:

Peso hecogenina = 0.0200 g.

Peso tigenina = 0.1000 g.

Peso del precipitado mercurico = 0.3045 g.

Recuperación = 677 %

Se trató de eliminar la tigenina presente en el precipitado mediante lavados con varios solventes. En ningún caso se obtuvieron resultados aceptables, ya que el peso final del precipitado después de lavar fue más bajo que el teórico.

## II.-

La técnica de cromatografía en papel filtro fue la misma que se siguió en el estudio de la esponina de diogenina.

Para la localización de las sustancias en el cromatograma ya desarrollado se utilizaron los reactivos: ácido sulfúrico concentrado y el ácido sulfúrico fumante.

Tanto la hecogenina como la tigenina dan manchas de color amarillo con el ácido sulfúrico concentrado, y manchas de color café rojizo con el ácido sulfúrico fumante.

Para la cromatografía de esta esponina se utilizaron tanto los procedimientos de cromatografía ascendente como los de cromatografía descendente.



Se emplearon diferentes sistemas de solventes obteniéndose los resultados que se indican en la tabla I y en la tabla II.

TABLA I

Resultados obtenidos por la cromatografía ascendente. \*

Sistemas de solventes empleados entubados con formamida.

Sustancia	Hexano		Hexano 50 % Benzeno 50 %		Benzeno	
	Cantidad cromatografía fiada.	Revolución por reacción con el H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fumante.	rf. cromatografía fiada.	Revolución por reacción con el H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fumante.	Cantidad cromatografía fiada.	Revolución por reacción con el H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fumante.
Hochgwalin	3 mg.	0.0 - 1.0 café rojo intenso.	18.00 0.03	3 mg.	0.0 - 1.0 café rojo intenso.	0.0 - 1.0 café rojo intenso.
Tigegwalin	3 mg.	0.0 - 1.0 café rojo intenso.	17.0 0.03	3 mg.	0.0 - 1.0 café rojo intenso.	15.0-18.0 café rojo intenso.
						18.0 0.91
						19.00 0.92

\* Tiempo de desarrollo para cada cromatograma fue 1 h., se cromatografiaron las muestras en cromatogramas de 15 cm. por 20 cm.

TABLA II

Resultados obtenidos por la cromatografía descendente.

Sistemas de solventes empleados matricados con formalina.

Sapogeninas a	Hexano 50 %		Hexano 50 %		Hexano		Cloroformo	
	Tiempo de desarrollo en mg. a picada.	Posición por reactivo con H <sub>2</sub> O.	Cantidad en mg. a picada.	Posición por reactivo con H <sub>2</sub> O.	Cantidad en mg. a picada.	Posición por reactivo con H <sub>2</sub> O.	Cantidad en mg. a picada.	Posición por reactivo con H <sub>2</sub> O.
Esogenti-na	5 mg. 0.0 - 1.0	21.5 café rojo intenso.	5 mg. 0.0 - 1.0	20.0 café rojo intenso.	5 mg. 1.0 - 0.2	29.0 café rojo intenso.	5 mg. 21.0 - 27.0	27.0 café rojo intenso.
Tigogenina	5 mg. 0.0 - 1.0	20.3 café rojo intenso.	5 mg. 0.0 - 1.0	27.0 café rojo intenso.	5 mg. 0.0 - 1.0	21.0 café rojo intenso.	5 mg. 22.0 - 27.0	26.0 café rojo intenso.

\* Se aplicó la sustancia en cromatogramas de 17.0 cm. por 41.0 cm.

En los efectuados con los sistemas de solventes descritos no se llegó a separar estas dos empogoninas.

Se hicieron cromatogramas mixtos de hecogenina y tigogenina para comprobar lo anterior. La cromatografía de estas mezclas se llevó a cabo en las cámaras descendentes, cromatografiándose 1 mg. en 5 ca. y en el centro del cromatogram 500 de cada esteroide.

El tiempo para su desarrollo fue el necesario para que el solvente -- llegara al frente del cromatogram tabla III.

TABLE II:

Cromatogramas mixtos de las capogucinas por la cromatografía descendente.

Capogucinas.

Sistema de solventes saturados con formamida.	Tigogenina 1 mg.			Recogucina 50 & Tigogenina 50 %			Recogucina 1 mg.		
	Posición por reacción con el H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fumante.	Pres- s.	rf.	Posición por reacción con el H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fumante.	Pres- s.	rf.	Posición por reacción con el H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fumante.	Pres- s.	rf.
Hexano	0.0 - 1.0 café rojo int.	27.0 cm.	0.01	0.0 - 1.0 café rojo int.	27.0 cm.	0.01	0.0 - 1.0 café rojo int.	27.0 cm.	0.01
Hexano 50% Benceno 50%	0.0 - 1.0 café rojo int.	27.0 cm.	0.01	0.0 - 1.0 café rojo int.	26.0 cm.	0.01	0.0 - 1.0 café rojo int.	28.0 cm.	0.01
Benceno	0.0 - 1.0 café rojo + 1 1.0 - 23.0 café rojo + 23.0 - 27.0 café rojo 5	27.0 cm.	0.01	0.0 - 0.5 café rojo + 2 0.5 - 22.0 café rojo 1 22.0 - 26.0 café rojo + 6	26.0 cm.	0.01	0.0 - 0.5 café rojo + 2 0.5 - 17.0 café rojo 1 17.0 - 23.0 café rojo + 5	23.0 cm.	0.02
Cloreformo	24.0 - 28.0 café rojo inten- so.	28.0 cm.	0.87	23.0 - 28.0 café rojo inten- so.	28.0 cm.	0.87	23.0 - 28.0 café rojo inten- so.	28.0 cm.	0.87

36

Tiempo de desarrollo fnd de 1 h., en cromatogramas de 5.0 cm. por 41cm.

Con la cromatografía anterior se comprobó que estas sapogeninas no se pueden separar en los sistemas de solventes empleados.

Se emplearon otros sistemas como el del tolueno, éter de petróleo, etanol, agua y los resultados no fueron satisfactorios (18).

El sistema con el que se obtuvieron resultados positivos fue el ciclohexano fenil celosolve (mono éter fenílico del etilen glicol). Este sistema es ideal para las sapogeninas en forma de acetatos (19).

La saturación del ciclohexano con el fenil celosolve se logra en la proporción de un litro de ciclohexano y 50 ml. de fenil celosolve.

La impregnación de los cromatogramas se efectúa con una mezcla al 50 % de fenil celosolve: acetona. El mejor desarrollo en este sistema se logra en 12 h. tabla IV.

La acetilación de las sapogeninas se efectúa con anhídrido acético (I: 1) el tiempo que duró la acetilación fue una hora a 70° C. se cristaliza del mismo anhídrido, filtrando finalmente los cristales y lavando con etanol — frío para así eliminar el exceso de anhídrido.

Acetato de hecogenina:

P.F. = 245° - 246° C.

( $\alpha$ )<sub>D</sub> = 0 en cloroformo.

Acetato de tigogenina:

P.F. = 175° - 190° C.

( $\alpha$ )<sub>D</sub> = 60 en cloroformo

TABLA IV

Cromatograma mixto de los acetatos de hecogenina y-  
 tigenina en el sistema ciclohexano fenil celosol-  
 vo. Tiempo de desarrollo 12 horas

Zapogenina	Posición de las sustancias en el cromatograma expre - da en cm.	Reacción con ácido sulfúrico concen - trado.
Acetato de tigenina 1 mg.	5.0 - 8.2	Amarillo + 3
Acetato de tigenina 500 $\mu$	5.0 - 7.0	Amarillo + 2
Acetato de hecogenina 500 $\mu$	0.5 - 4.0	Amarillo + 2
Acetato de hecogenina 1 mg.	1.0 - 4.0	Amarillo + 3

Las manchas obtenidas se eluyeron con cloroformo. Alícuotas de las solu-  
 ciones cloroformicas se evaporaron a sequedad, y los residuos resultantes fue-  
 ron tratados con ácido sulfúrico concentrado de la forma descrita (8) para --  
 estudio espectrofotométrico. La curva de absorción de estas soluciones fueron  
 determinadas en el Espectrofotómetro de Beckman D.U.

## Resultados cuantitativos:

Sapogenina	Cantidad cromatografiada mg.	Cantidad detectada en eluido.	
		mg.	Recup. %
Hecogenina	1 mg.	0.840	84 %
Hecogenina	1 mg.	0.950	95 %
Hecogenina	500 $\mu$	0.420	84 %
Tigogenina	500 $\mu$	0.485	97 %
Hecogenina	500 $\mu$	0.450	90 %
Tigogenina	500 $\mu$	0.455	91 %
Tigogenina	1 mg.	0.900	90 %
Tigogenina	1 mg.	0.895	89 %



## III.-

Para la obtención de los cromógenos formados al reaccionar las saponinas ya sea en forma libre o como acetatos con el ácido sulfúrico concentrado, se efectuó en las mismas condiciones que para la saponina de diosgenina, - 10 ó 20 por ml. de ácido sulfúrico concentrado y  $t = 40^{\circ} \text{C. B.M.}$

Cada saponiniza presenta curva de absorción diferente Fig. V y VI.

Las saponinizas en forma de acetatos presentan igual curva de absorción que las saponinas libres Fig. VII y VIII.

Se hicieron curvas tipo para la hecogenina y tigogenina libre, de cantidades idénticas que se empleó fue la siguiente.

Se pesaron 50 g. de hecogenina y se aforaron a 50 ml. con cloroformo - (sol. A). Se tomaron de esta solución A 5ml. y se aforaron a 50 ml. también - con cloroformo (sol. B).

Se tomaron las siguientes alícuotas de ambas soluciones.

1 ml.	Sol. B = 100 $\gamma$
2 ml.	Sol. B = 200 $\gamma$
3 ml.	Sol. B = 300 $\gamma$
4 ml.	Sol. B = 400 $\gamma$
0.5 ml.	Sol. A = 500 $\gamma$

Estas alícuotas se pusieron en matraces aforados de 10 ml. y se evaporaron a sequedad y finalmente se llevó al aforo con 10 ml. con ácido sulfúrico concentrado y se colocaron a baño maría una hora  $40^{\circ} \text{C.}$  haciéndose las lecturas en el Espectrofotómetro de Beckman D.U. a  $395\mu\text{v.}$

Lecturas obtenidas a  $395\mu\text{v.}$

100 $\gamma$	0.779
200 $\gamma$	0.641
300 $\gamma$	1.020
400 $\gamma$	1.745
500 $\gamma$	1.670

Las lecturas obtenidas se grafican en la Fig. IX

Se siguió la misma técnica para la sapogenina tigogenina, obteniéndose las siguientes lecturas en el Espectrofotómetro de Beckman D.U. En este caso  $215\mu$ , por ser el máximo principal de la tigogenina.

Lecturas obtenidas a  $215\mu$

100 $\mu$	0.190
200 $\mu$	0.115
300 $\mu$	0.085
400 $\mu$	0.065
500 $\mu$	0.045

Los resultados se graficaron en la Fig. I

El método de determinación cuantitativa de estas dos sapogeninas mediante espectrofotometría con ácido sulfúrico no se puede aplicar a mezclas de las dos sustancias ya que ambas presentan máximos de absorción muy semejantes en cuanto a longitud de onda diferenciando solamente en sus intensidades relativas.

#### DISCUSION.

El método finalmente adoptado para la determinación cuantitativa de tigogenina y hecogenina en mezclas constó de dos fases:

- 1) Separación cromatográfica en papel utilizando la técnica descrita como método II.
- 2) La determinación cuantitativa de las sapogeninas se efectuó mediante espectrofotometría en ácido sulfúrico; sobre alícuotas de las muestras eluidas de los cromatogramas, usando la técnica descrita como método III.

Se siguió la misma técnica para la sapogenina tigogenina, obteniéndose las siguientes lecturas en el Espectrofotómetro de Beckman D.U. En este caso  $315\mu$ , por ser el máximo principal de la tigogenina.

Lecturas obtenidas a  $315\mu$

100 $\mu$	0.170
200 $\mu$	0.315
300 $\mu$	0.405
400 $\mu$	0.520
500 $\mu$	0.705

Los resultados se graficaron en la Fig. X

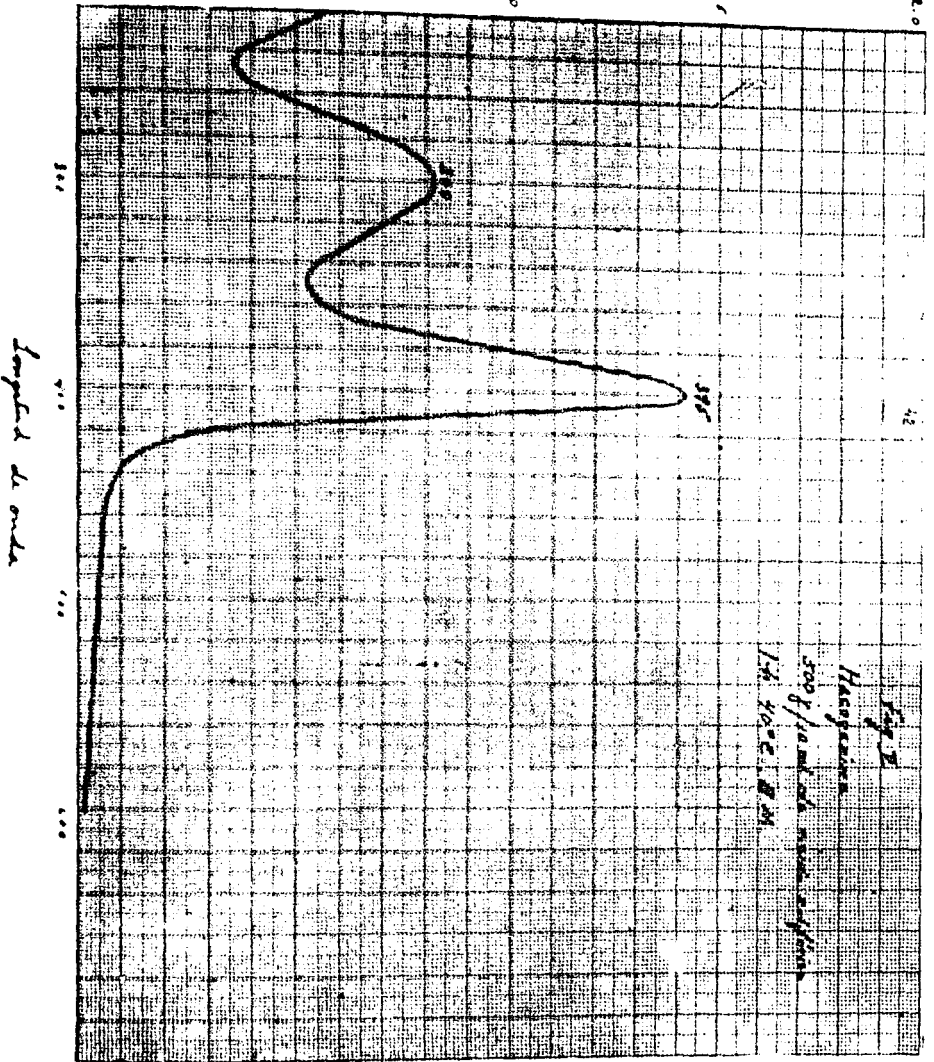
El método de determinación cuantitativa de estas dos sapogeninas mediante espectrofotometría con ácido sulfúrico no se puede aplicar a mezclas de las dos sustancias ya que ambas presentan máximas de absorción muy semejantes en cuanto a longitud de onda diferenciando solamente en sus intensidades relativas.

#### DISCUSION.

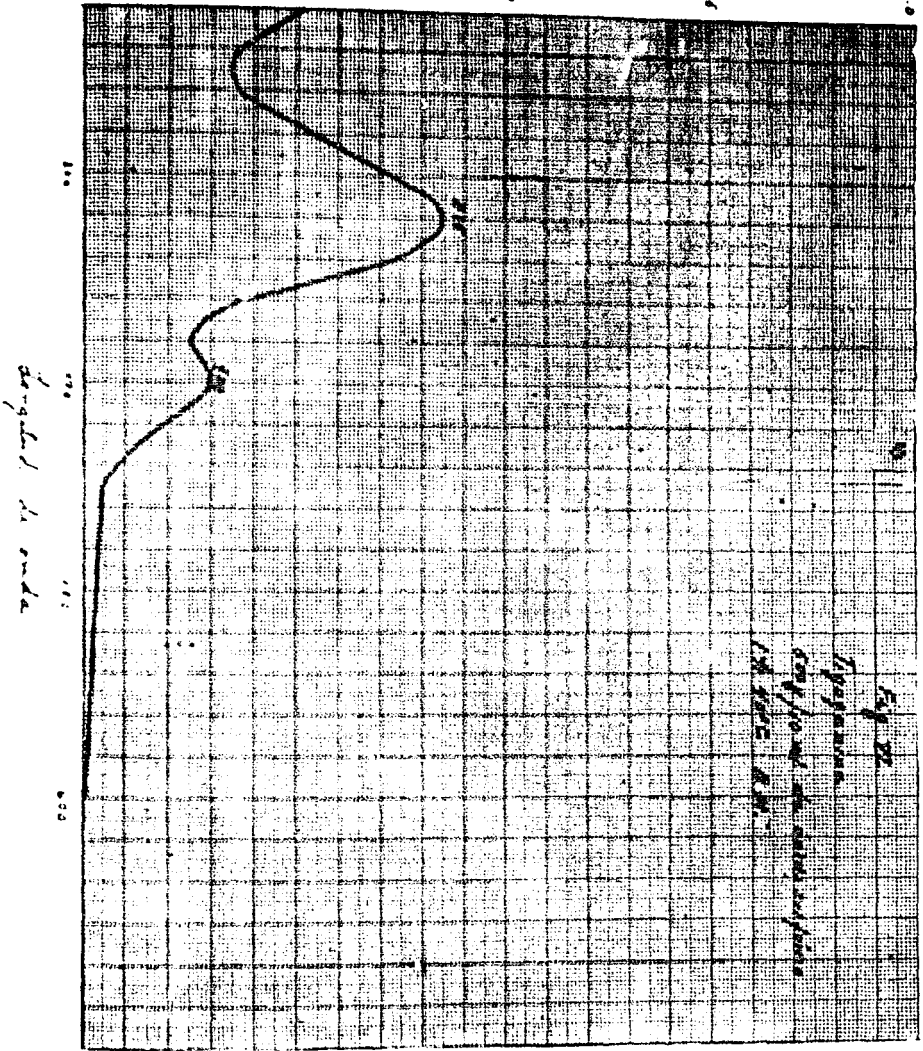
El método finalmente adoptado para la determinación cuantitativa de tigogenina y hucogenina en mezclas constó de dos fases:

- 1) Separación cromatográfica en papel utilizando la técnica descrita como método II.
- 2) La determinación cuantitativa de las sapogeninas se efectuó mediante espectrofotometría en ácido sulfúrico; sobre alícuotas de las muestras eluidas de los cromatogramas, usando la técnica descrita como método III.

Densidad Óptica



Densidad Óptica



Domada Optica

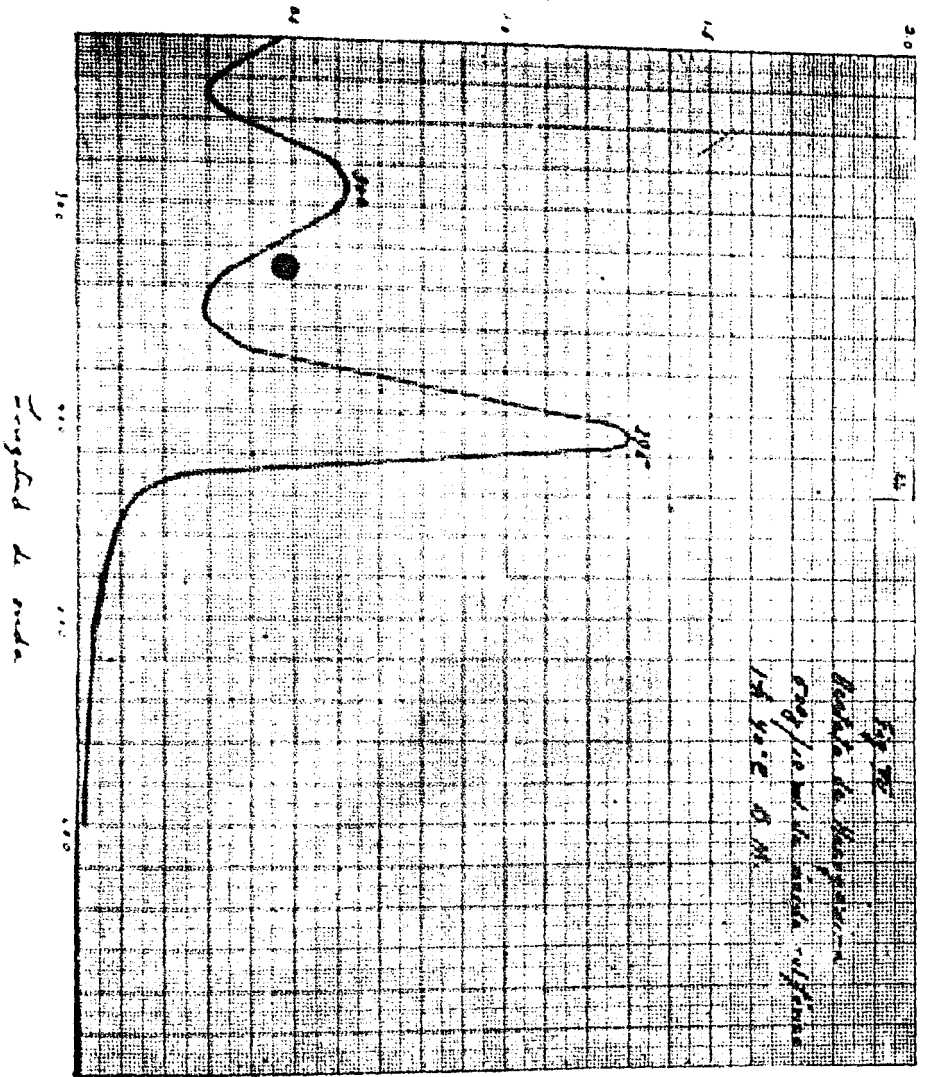
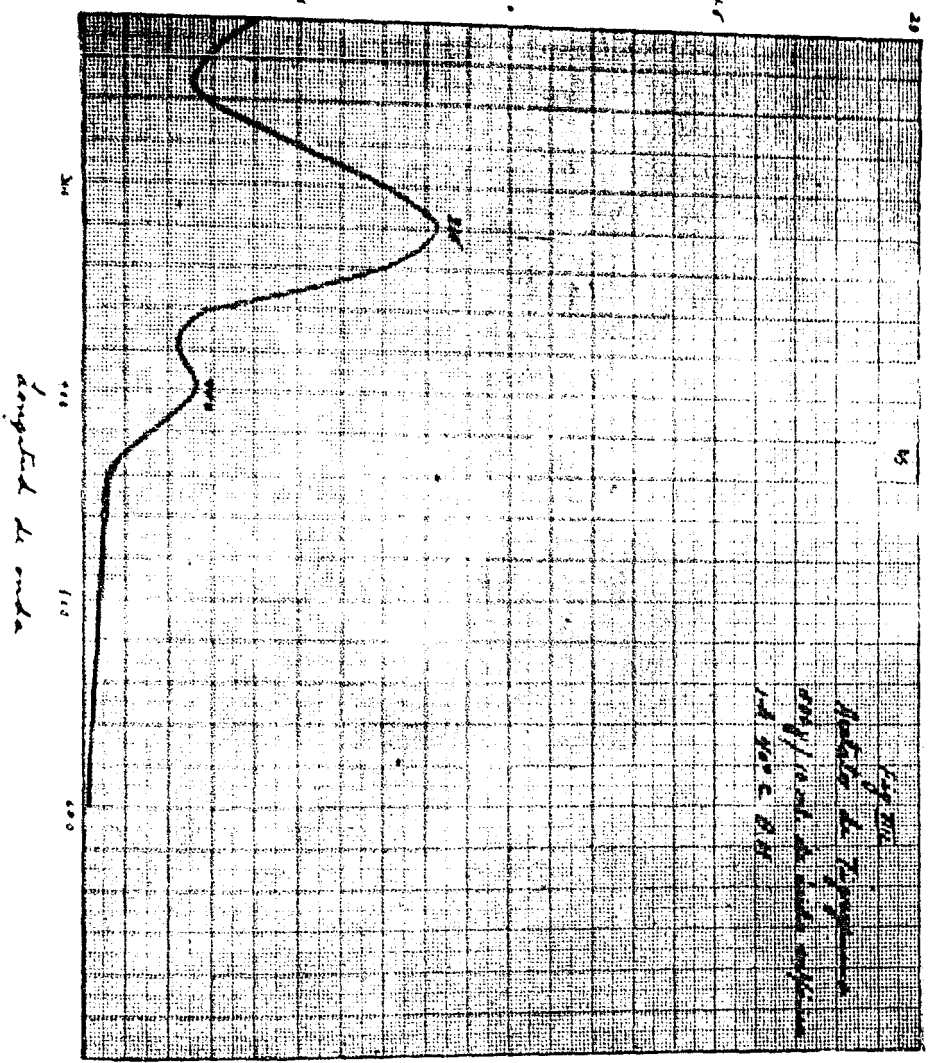
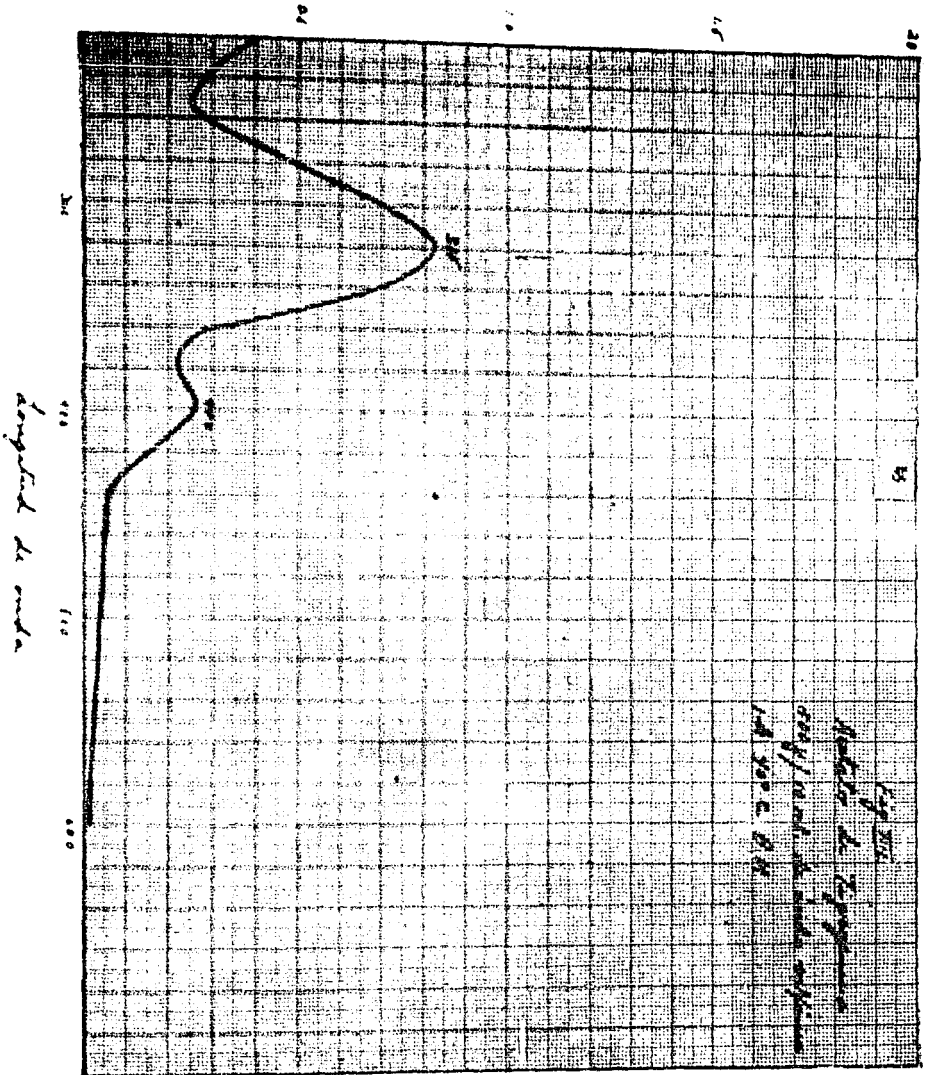


Fig. 10  
Reserva de la Universidad  
1945 E. O. M.

Densidad Optica



Densidad Optica



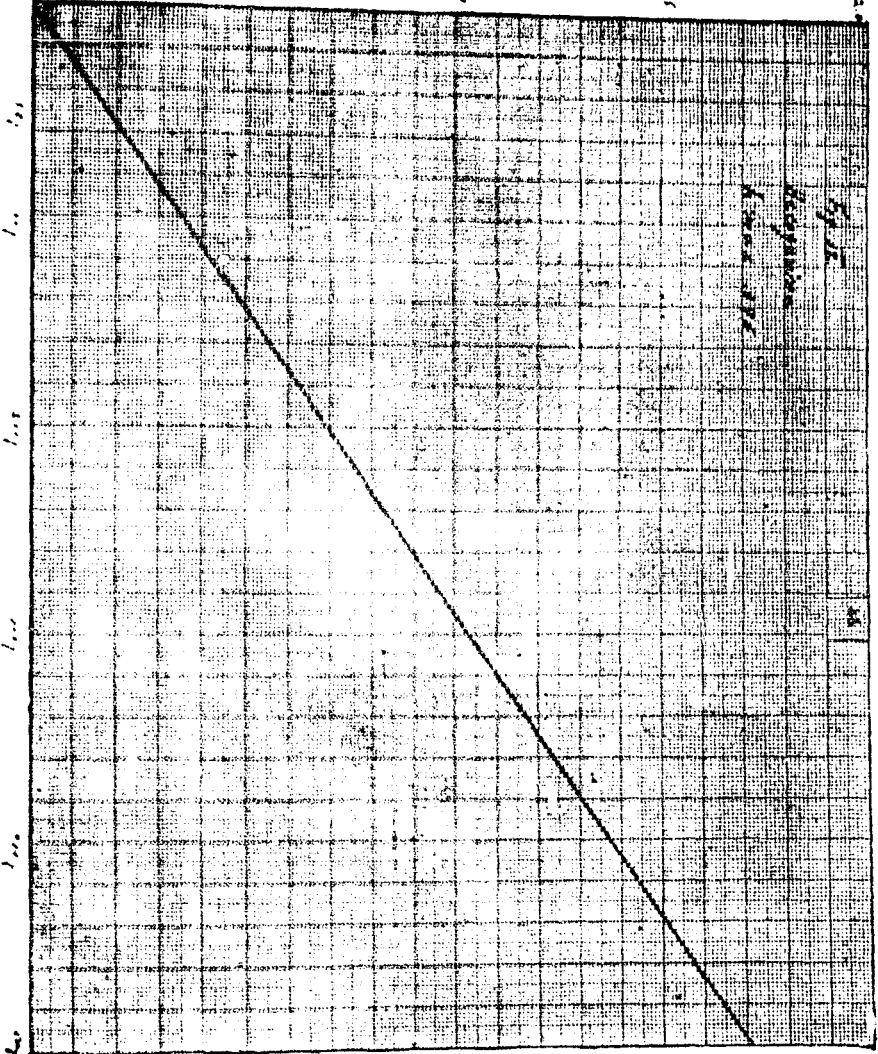


Division Optima

31

2

Construction of



# Densidad Óptica

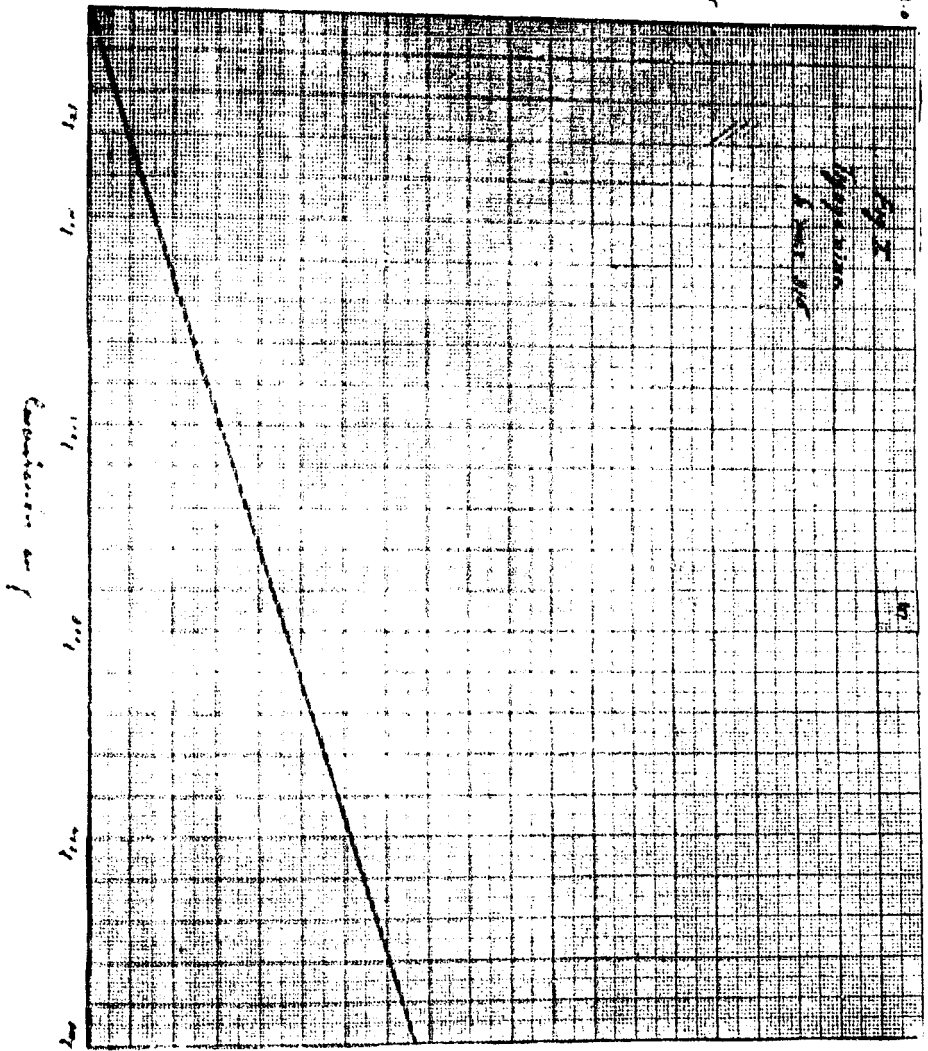


Fig. 1  
Densidad Óptica  
Concentración

**CONCLUSIONS.**

## I.-

El método de la cromatografía en papel fue aplicado al estudio de saponina ( saponina de diosgenina ) y sapogenina (hecogenina y tigogenina) obteniéndose resultados satisfactorios.

## II.-

Se logró el cuanteo de la saponina y las sapogeninas por formación del cromógeno obtenido al reaccionar con el ácido sulfúrico concentrado.

## III.-

No se logró resultados satisfactorios el azúcar Hecogenina de Tigogenina, por medio del reactivo Girard.

**BIBLIOGRAFIA.**

- 1).- Nuchlos Katechismus d. Apothekerkunst Erfurt 1810 - 765.
- 2).- Casiano Consatti " Flora Taxonómica Mexicana " Tomo II (1947) Tall. Graf. de La Esc.
- 3).- Giral - Rojahn " Productos Químicos y Farmacéuticos " Tomo III 1635 (1946).
- 4).- Hench, P. S., Kendall E. C., Slocumb, C.H. y Polley, H.F. Proc. Staff. meetings Mayo Clinic, 24, 181-197 (1949).
- 5).- Carl Djerassi, H. Martinez, y G. Rosenkrans. The Journal of Organic Chemistry. Parte I vol 16 (1951).
- 6).- Carl Djerassi, H. Martinez, y G. Rosenkrans. The Journal of Organic Chemistry. Parte II vol 16 (1951).
- 7).- Carl Djerassi, Ringold, G. Rosenkrans. The Journal of American Chemical Society Parte III vol 73 IV pág. 5513 (1951).
- 8).- A. Zaffaroni Journal of American Chemical Society vol 72 II 3828 (1950).
- 9).- Marker R. Eg. Am. Chem. Soc. 62, 2525 (1940).
- 10).- Marker Russelli Turner Ullshafer J. Am. Chem. Soc. Vol. 62, 2542 (1946).
- 11).- Marker y Krueger J. Am. Chem. Soc. Vol. 62-2548 (1940).
- 12).- Marker y Krueger J. Am. Chem. Soc. Vol. 62-3349 (1940).
- 13).- Lieberman, Chang, Borusch y Hollar J. Am. Chem. Soc. Vol. 64, 2581 (1940).
- 14).- A. Zaffaroni, Robert. B. Burton y E. Henry Keutmann. The Journal of Biological Chemistry Vol. 177 N° I Enero (1949).
- 15).- A. Zaffaroni Burton E. Henry Keutmann J. Biolog. Chem. Vol. 198 N° 2 (1951).
- 16).- Girard and Sandulesco, Brit. Pat. Appl. 6640 March (1934).
- 17).- Girard y Sandulesco, Helv. Chim. Acta, 19, 1095 (1936).
- 18).- Erich Heftman and Alma Levant Haydent The Journal of Biological Chemistry Vol. 197 pág. 47 Julio (1953). N°1.
- 19).- Neher, R. y Wettstein, A. Helv. Chim. Acta 35, 276 (1952).