

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

GLUCOSIDOS DE DIOSCOREA COMPOSITA

JESUS CAMPOS LLAVOT

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1 9 7 7



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

AB Tesis 1977  
ABE M - ~~70~~ 70  
FECHA \_\_\_\_\_  
PROC \_\_\_\_\_  
• \_\_\_\_\_



QUIMICA

JURADO ASIGNADO

Presidente : Q.F.B. Ma. Luisa García Padilla  
Vocal : Dra. Carmen Rivera de Reyes  
Secretario : Dra. Ofelia Espejo de Ochoa  
1er. Suplente: Dr. Jorge Reyes López  
2° Suplente: M.C.Ma. Teresa Reguero de la Macorra

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Química Farmacéutica y  
Productos Naturales. D.E.S. Facultad  
de Química. U.N.A.M.

Sustentante: Jesús Campos Llavot

Asesor del tema: Dra. Ofelia Espejo de Ochoa

A la memoria de mi hijo:

niño Campos Gutiérrez

A la memoria de mi abuelo:

Angel Llavot Plans

## A G R A D E C I M I E N T O S

"Al comparar las obras de varios autores he hallado que algunos de los más serios y recientes escritores han copiado, palabra por palabra, de obras ajenas y anteriores sin dar reconocimiento".

Plinio el Mayor: Historia Natural

Libro I, Sec. 22 (50 a.c.)

Resulta poco el espacio de unas cuantas líneas para dar el debido reconocimiento a cada una de las personas que de alguna forma intervinieron para que pudiera concluir mis estudios. Pero es de injusticia que los primeros en recibirlo sean mis padres, Estela y Jesus; todo cuanto pudiera decir no sería suficiente, reciban pues mi eterna gratitud.

De igual forma a la paciencia de mi esposa Ana María y de mi hijo Rodrigo por las horas robadas a su grata compañía.

A mis hermanos. A José Llavot Inclan por sus consejos y estímulo valioso.

Referente a mi formación académica quiero que en forma particular reciba mi agradecimiento la Dra. Ofelia Espejo de Ochoa por la oportunidad que me brindó de trabajar a su lado.

A STEROMEX, S.A. por su ayuda económica y a la Q.F.B. Maricela Plascencia, Ing. Richard H. Miller y al Dr. Giovanni F. Bonavia, por su asistencia técnica y comentarios.

Al Dr. F. Brueschweiler y colaboradores, del Departamento de Química Analítica de Ciba-Geigy, Ltd., Basilea, Suiza, por la interpretación parcial de los espectros de R.M.N.  $^{13}\text{C}$ .

Al Dr. J.J. Basselier (Universidad de Paris) por la obtención de los espectros de R.M.N.  $^{13}\text{C}$  de glucosa, ramnosa, glucósido B y Diosgenina que nos sirvieron como material preliminar de estudio en la determinación de la estructura de los compuestos aislados.

Finalmente a la Sra. Laura Maldonado de Mercado por el trabajo de mecanografiar el manuscrito.

J.C. Llavot

# I N D I C E

| <u>Capítulo</u>                                | <u>Página</u> |
|--|---------------|
| 1.- Introducción -----                         | 1             |
| 2.- Parte Teórica-----                         | 3             |
| 3.- Discusión de Resultados-----               | 26            |
| 4.- Parte Experimental: -----                  | 38            |
| Materia Prima-----                             | 39            |
| A.- Glucósidos Espirostánicos-----             | 39            |
| A.1.-Identificación de Azúcares libres-----    | 40            |
| A.2.-Identificación de Sapogeninas libres----- | 42            |
| A.3.-Glucósido A-----                          | 43            |
| A.4.-Glucósido B-----                          | 61            |
| A.5.-Glucósido C-----                          | 67            |
| A.6.-Glucósido D-----                          | 69            |
| B.- Glucósidos Furostánicos-----               | 79            |
| C.- Glucósidos de Penogenina-----              | 81            |
| 5.- Conclusiones-----                          | 83            |
| 6.- Bibliografía-----                          | 84            |



## 1.- INTRODUCCION

La materia prima para la producción de hormonas esteroideas es la Diosgenina que fué aislada por primera vez en 1936 de los rizomas de Dioscorea tokoro Makino <sup>(1)</sup> y en 1940 R.E. Marker <sup>(2)</sup> logró degradar la cadena lateral para obtener esteroides del tipo Progesterona y Testosterona. Con estas bases el propio Marker dedicó sus esfuerzos a la búsqueda de plantas americanas que dieran buenos rendimientos de Diosgenina encontrando que en plantas mexicanas, como Dioscorea mexicana (que es de la misma familia de D. tokoro), ésta saponina se encuentra en proporción de 1-3% en base seca con lo que la obtención de hormonas esteroideas a precios bajos fué un hecho; posteriormente se vió que Dioscorea composita (Barbasco) dá mejores rendimientos siendo actualmente ésta la principal fuente de materia prima.

La Diosgenina no se encuentra libre en la planta sino que está en forma de glucósidos. Desde 1938 se conocen algunos de los precursores de la Diosgenina en plantas como Trillium erectum (raíz de Beth) <sup>(3)</sup>, Solanum introsium <sup>(4)</sup>, Dioscorea floribunda <sup>(5)</sup>, Dioscorea nipponica <sup>(6)</sup>, etc...; pero no es sino hasta muy recientemente <sup>(7)</sup> que se empezó el estudio de estos precursores (saponinas) en plantas mexicanas.

El presente trabajo esta enfocado a confirmar parte de los resultados del trabajo antes mencionado <sup>(7)</sup> y a dar la estructura de otras saponinas que fueron aisladas de Dioscorea composita Hemsl, cuyas características son las siguientes:

Descripción botánica de la planta:

Dioscorea composita Hemsl.

Nombre común: BARBASCO

Distribución: Veracruz, Puebla, Tabasco,  
Oaxaca y Chiapas.

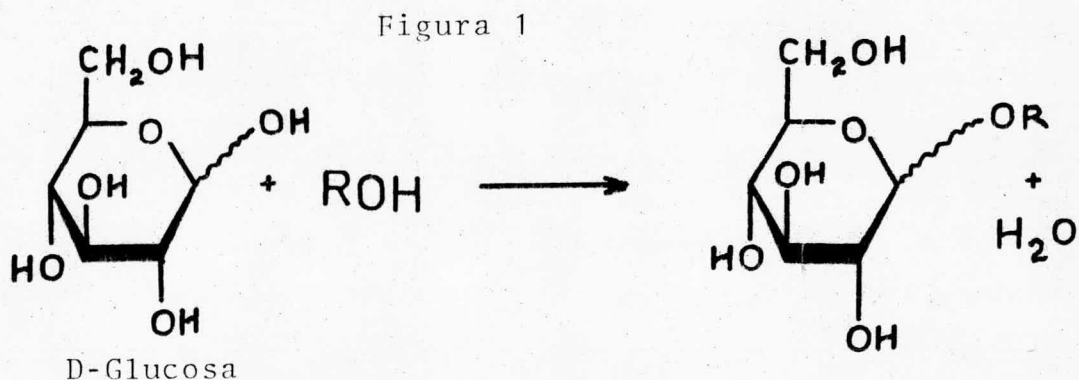
Pertenece a la familia Dioscoreaceae que está formada por 10 géneros y cerca de 650 especies divididas en dos tribus (Dioscoreae que son dioicas y la Stenomeridae que son -- monoicas) distribuidas ampliamente en los trópicos, subtrópicos y ligeramente en las zonas templadas del norte. El género más grande es el Dioscorea cuyas especies se encuentran principalmente en los trópicos americanos; los otros géneros que componen la familia son: Helmia, Stenophora y Testudinaria; la primera también es americana, la segunda es asiática y la última se encuentra en sudáfrica.

D. composita es una planta dioica, trepadora, de rizoma-hipógeo de forma característica y corteza escamosa, tallo liso, hojas pecioladas con 9 nervaduras paralelinerves, inflorescencias que van de 1-40 cm de largo con flores pequeñas; las masculinas poseen 6 estambres (3 fértiles y tres -- estériles) de filamento corto, las femeninas presentan ovario inferior trilocular donde se desarrollan dos o cuatro -- semillas en cápsulas membranosas. Se reproducen por semillas o por propagulos.

## 2.- PARTE TEORICA

### 2.1.- Heterósidos. Características generales

Los heterósidos son compuestos derivados de las formas cíclicas de las azúcares - piranosas y furanosas - en las que el hidrógeno del oxhidrilo hemiacetálico (el del carbono N°1) ha sido reemplazado por grupos alquilo o arilo formando un nuevo enlace tipo acetal:



generalmente a compuestos de este tipo se les dá el nombre de "glucósidos" sin importar las azúcares que los formen. El término más apropiado es el de Heterósido en el que el prefijo indica que la molécula está formada por dos clases diferentes de sustancias y el sufijo hace referencia a que una de ellas es un azúcar al que se le llama "radical heterosídico". A la otra fracción del heterósido se le conoce como "aglucon".

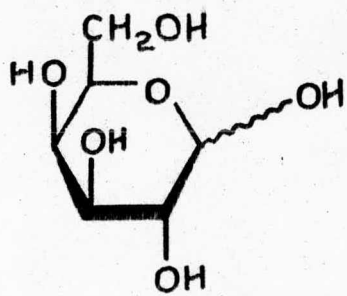
El azúcar que con mayor frecuencia forma parte de un heterósido es la glucosa aunque pueden encontrarse todos los azúcares naturales conocidos en mayor o menor proporción. Otras hexosas son: galactosa, manosa y fructosa cuya abundancia es relativamente menor. En cambio los 6-desoxi-L-manósidos y 6-desoxi-D- y L-galactósidos (L-ramnosidos y D- y L-fucósidos) son los más frecuentes. De las pentosas las más comunes son -

la L-arabinosa y la D-xilosa. Un grupo importante lo forman los desoxiazúcares de la *Digitalis purpurea* - - (heterósidos cardiotónicos) como la D-cimariosa; D-digitoxosa, L-oleandrosa, etc.. La estructura de algunos de los carbohidratos antes mencionados se encuentra en la figura 2.

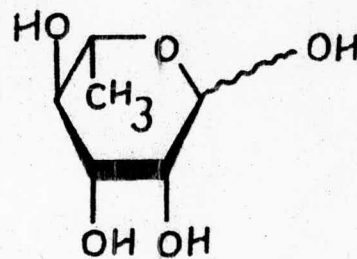
También existen en la naturaleza una amplia variedad de aglucones cuyas estructuras van desde ácidos -- grasos, como en el caso de los cerebrósidos, hasta compuestos aromáticos.

Muchos de los pigmentos vegetales son heterósidos en los que el aglucón está constituido por flavonas, flavonoles, flavononas, isoflavonas y xantonas que imparten colores rojo, violeta y azul a las flores. En forma genérica se les conoce como antocianinas y al -- aglucón como Antocianidina. Ejemplo: ver la figura 3a.

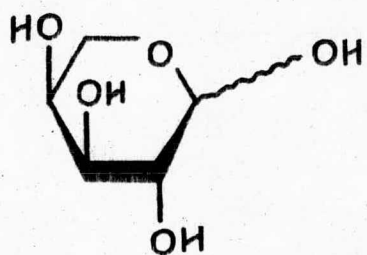
Existen heterósidos de importancia toxicológica - como los cianogenéticos (Figura 3b) en los que la toxicidad es debida precisamente al aglucón, el cual, liberado por hidrólisis enzimática, se descompone produciendo - como en el caso de la amigdalina - benzaldehido y ac. cianhídrico siendo éste el causante de la inhibición de enzimas respiratorias (citocromo oxidasa)



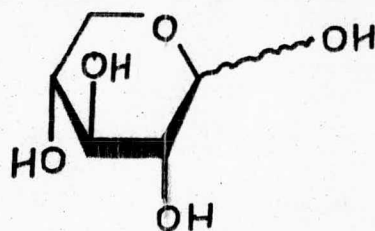
D-galactopiranososa



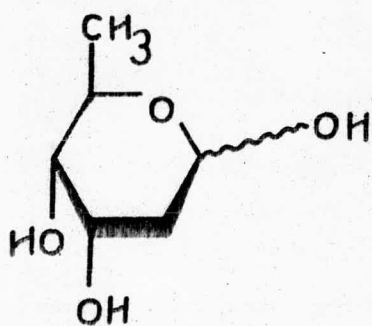
L-ramnopiranososa



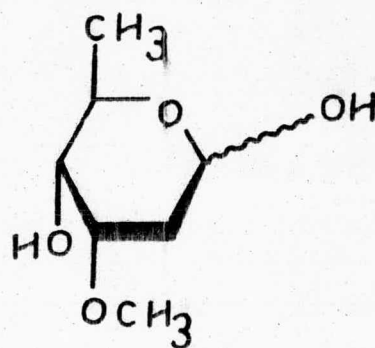
L-arabinopiranososa



D-xilopiranososa

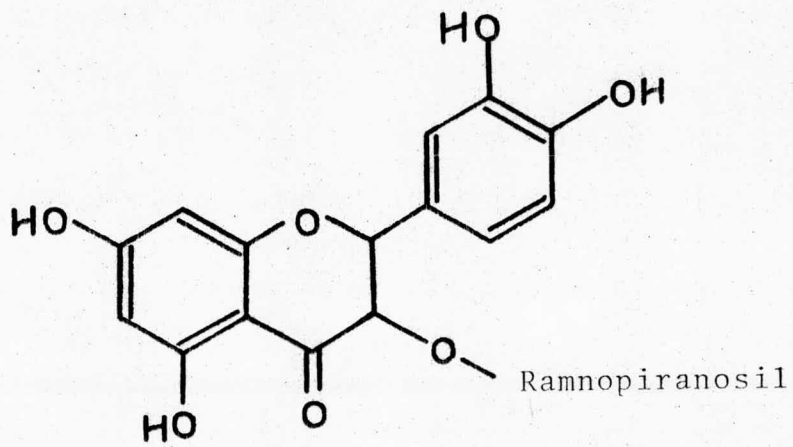


D-digitoxosa

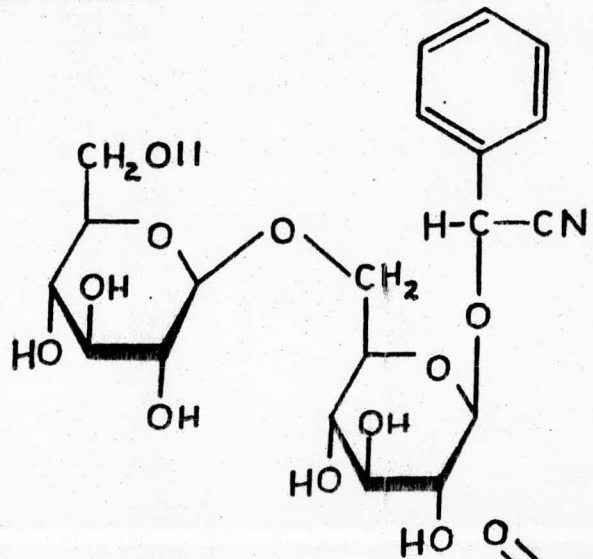


D-cimarosa

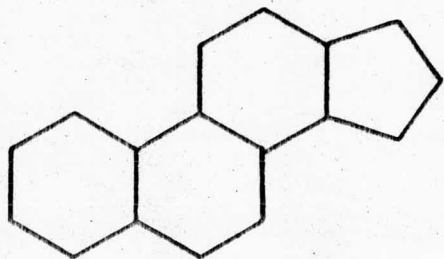
Figura 2



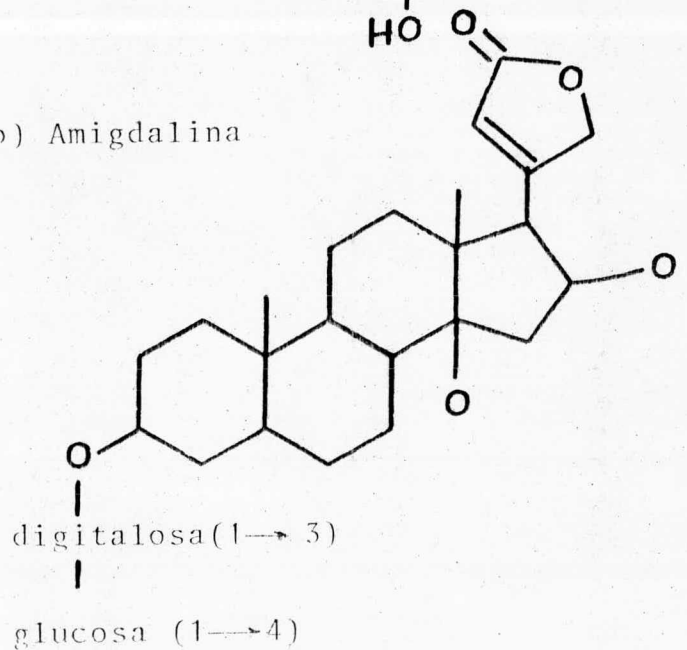
a) Quercitrina



b) Amigdalina



c) Ciclopentano-perhidrofenantreno



d) Digitalina

lo cual conduce a la muerte.

Un grupo importante de aglucones por su valor económico y farmacológico, son los derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno (figura 3 c). A estos pertenecen el aglucón de los heterósidos cardiotónicos como la Digitalina (figura 3 d) y las saponinas (del latín sapon=jabón) esteroidales. Estas últimas son sustancias que disueltas en agua abaten la tensión superficial y forman abundante espuma cuando la solución es agitada vigorosamente, en este fenómeno se basa la identificación preliminar de estos compuestos siendo muy útil en la investigación de campo durante la recolección del material vegetal. A los aglucones de las saponinas se les llama Sapogeninas.

Las sapogeninas esteroidales son sustancias de 27 átomos de carbono con un esqueleto hidrocarbonado semejante al del colesterol (figura 4 a). Algunas de ellas se muestran en la figura 4 b-f.

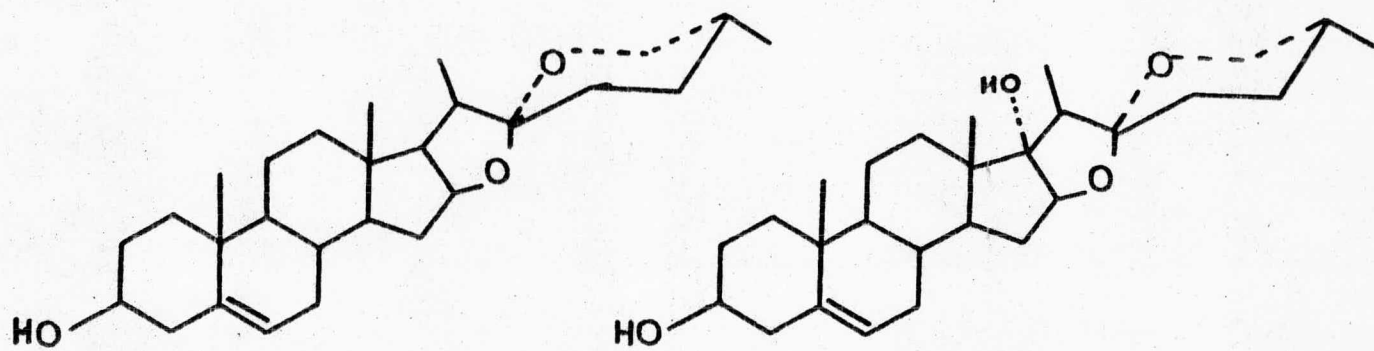
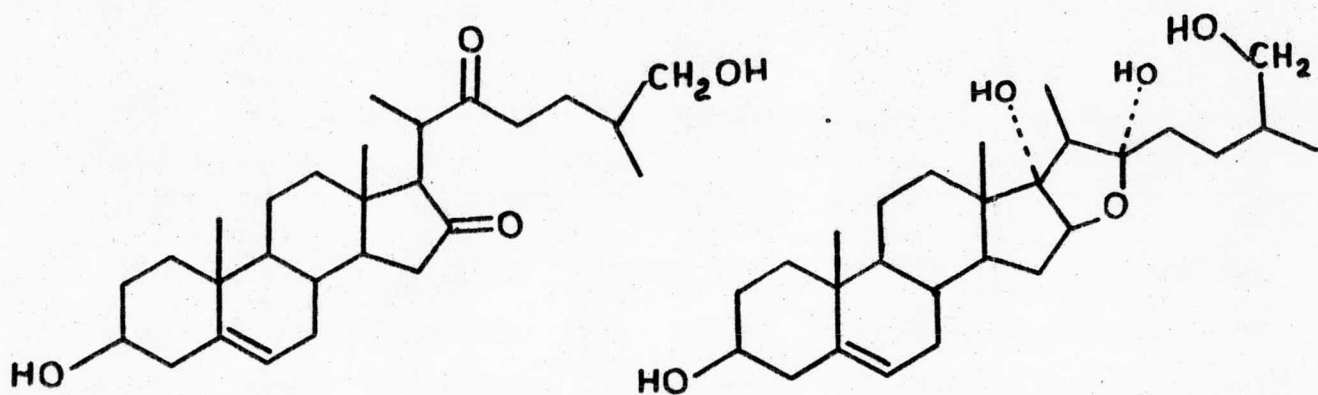
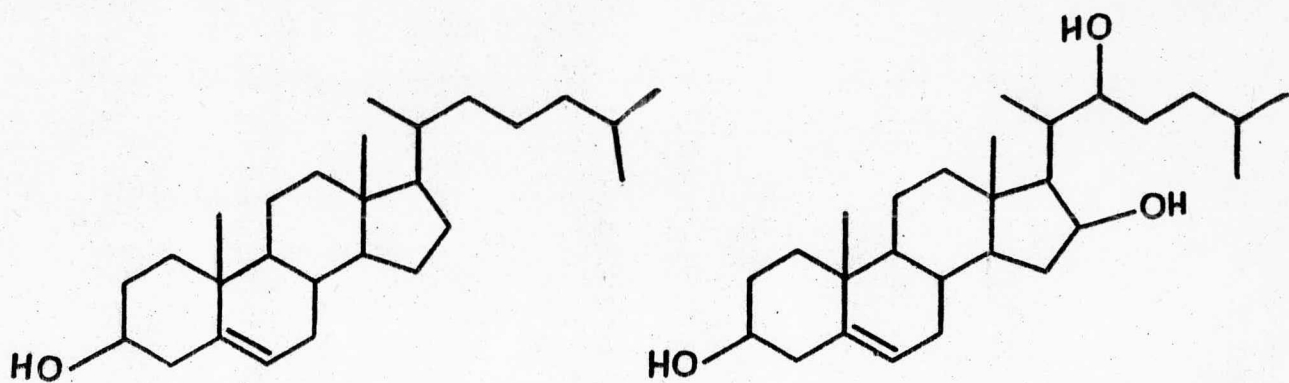


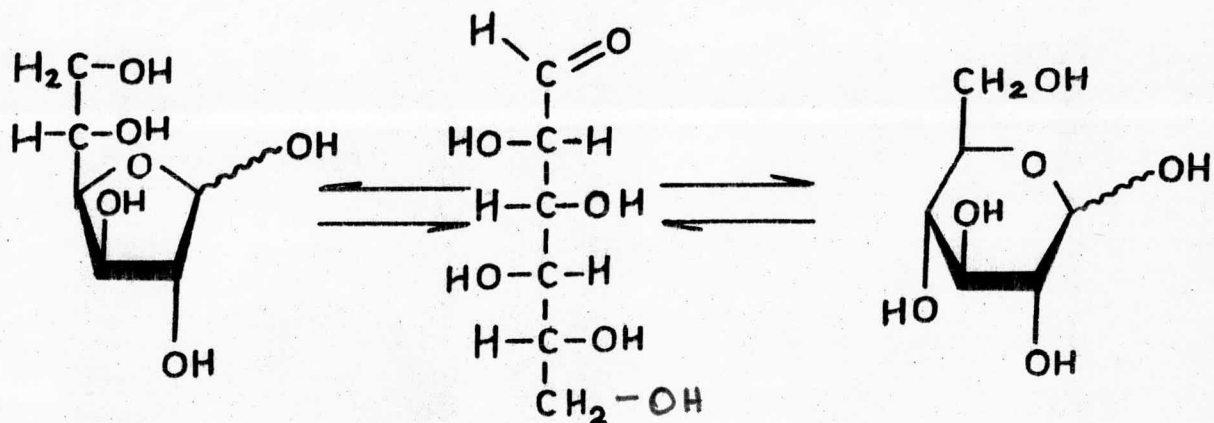
Figura 4



## 2.II.- Heterósidos. Propiedades Químicas (10)

2.II.A.- La solubilidad en agua es función inversa del carácter lipofílico del aglucón. En la serie de los n-alkil- $\beta$ -D-glucopiranosidos la solubilidad es menor a medida que la cadena hidrocarbonada es mayor de 9 átomos. Los miembros superiores son agentes tensoactivos cuando -- son tratados con óxido de etileno en presencia de un catalizador (NaOH o una amina) para solubilizarlos. Forman cristales líquidos a la temperatura de su punto de fusión.

Los azúcares reductores (azúcares que tienen la capacidad de oxidar al cobre en solución - alcalina) en solución pasan de la forma lineal, que tienen en estado sólido, a la cíclica ya sea tipo pirano o furano:

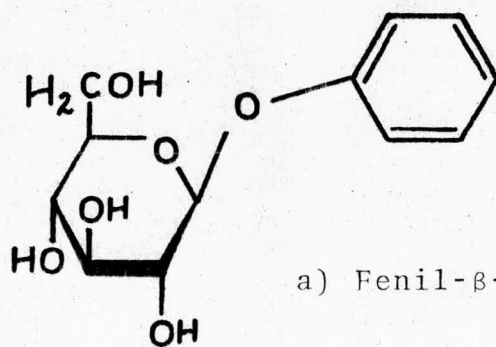


Al efectuarse la ciclización el oxhidrilo del carbono N°1 puede adquirir dos orientaciones: una axial y la otra ecuatorial. A la primera se le llama  $\alpha$ (alfa), por haber sido la primera en ser descubierta; y  $\beta$  (beta) a la segunda. Por este tipo de isomerismo, al carbono 1 que es asimétrico en la forma cíclica se le denomina carbono anomérico.

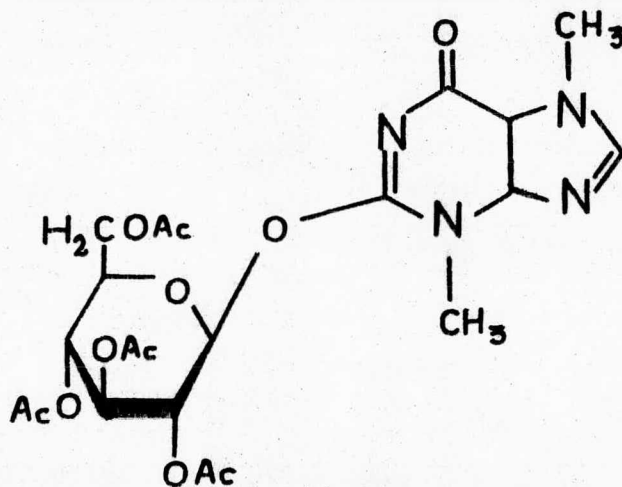
2.II.B.- Hidrólisis Alcalina. Por ser acetales, los heterósidos deberían ser resistentes a la hidrólisis con bases y por lo tanto no exhibir poder reductor frente a la solución de Fehling (prueba común para detectar monosacáridos y/o disacáridos reductores). Sin embargo, algunos sí la reducen y esto es debido a la estructura que poseen.

De acuerdo con esto, los que son sensibles a este tipo de hidrólisis, deben quedar comprendidos en alguno de los grupos siguientes<sup>(11)</sup>:

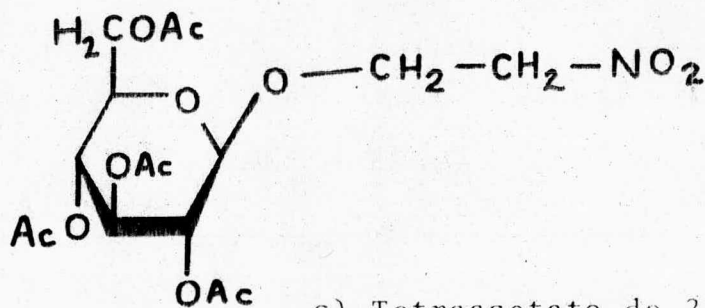
- a) Heterósidos de Fenoles (figura 5a)
- b) Heterósidos de enoles conjugados con un grupo carbonilo (figura 5b)
- c) Heterósidos de alcoholes con sustituyentes electronegativos en posición  $\beta$ . (figura 5c)



a) Fenil- $\beta$ -D-glucopiranosido



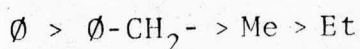
b) Tetraacetato de Teobromin- $\beta$ -D-glucopiranosido



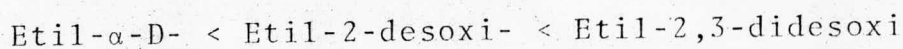
c) Tetraacetato de 2-nitroetil- $\beta$ -D-glucopiranosido

2.II.C.- Hidrólisis Ácida. Aunque es grande la importancia que tiene esta reacción para la determinación de la estructura, su aspecto teórico no es totalmente conocido. Sin embargo, los estudios hechos indican que la mayor o menor facilidad de hidrólisis depende en gran medida de factores estructurales como son:

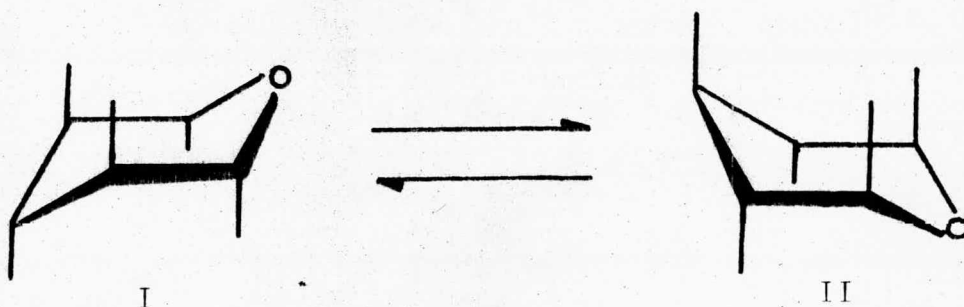
a) Efecto del aglucón.- Por regla general los heterósidos con aglucón alifático serán hidrolizados menos rápidamente que los aromáticos. ejemplo: los Et, Me,  $\text{CH}_2-\text{O}$  y  $\text{O}-\beta\text{-D-glucopiranosidos}$  siguen el orden en rapidez de hidrólisis:



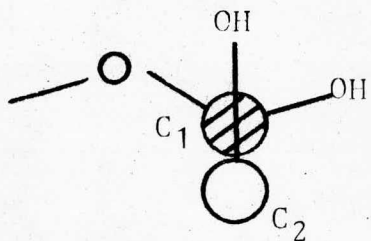
donde los  $\alpha\text{-D-glucopiranosidos}$  respectivos son más resistentes que los  $\beta$ . El tipo de sustituyente que soporten los oxhidrilos libres harán más o menos estable el enlace heterosídico. Para el caso de etilglucopiranosidos el orden de hidrólisis es:



b) Conformación del anillo piranosido.- De los ocho posibles conformeros de la glucosa los más estables son los que corresponden a las formas silla I y II:



En ambas la mitad de los hidrógenos son ecuatoriales y la otra mitad son axiales. Cualquier sustituyente diferente de hidrógeno, que ocupe una posición axial inestabiliza la conformación del anillo. Un incremento en el efecto inestabilizador se nota cuando el átomo de oxígeno del carbono N°2 es axial y la valencia C-O bisecta el ángulo que forman los dos enlaces semejantes del carbono N°1:



Para un estudio cuantitativo de los temas tratados en los incisos a) y b) ver la tabla 1.

- c) Substitución en el carbono 5. Al incrementar la substitución en este carbono hay un efecto estabilizador que se refleja en una mayor resistencia a la hidrólisis lo cual puede comprobarse con los datos de la tabla No.2. Un tercer tipo de hidrólisis es la enzimática utilizada principalmente para conocer el tipo de enlace anomérico y la cual será discutida posteriormente.

TABLA 1

| Me-heteropiranosido   | K/K' <sup>a</sup> | Factores de Inestabilidad <sup>b</sup> |                  |
|-----------------------|-------------------|--|------------------|
|                       |                   | I                                      | II               |
| $\alpha$ -D-glucósido | 1.0               | 1                                      | $\Delta$ 2,3,4,5 |
| $\beta$ -D-glucósido  | 1.9               | A                                      | A,1,2,3,4,5      |
| $\alpha$ -D-ramnosa   | 9.5               | 1,2                                    | 3,4,5            |
| $\beta$ -D-ramnosa    | 21.9              | A, $\Delta$ 2                          | A,1,3,4,5        |

a).- Razón entre la velocidad de hidrólisis del heterósido en cuestión (K) y la del Me- $\alpha$ -D-glucopiranosido en solución 0.5N de HCl a 75°C.

b).- La letra A se refiere al efecto anomérico,  $\Delta$ 2 a la influencia de un oxígeno axial en C-2, I y II a los conformeros de tipo silla y los números arábigos a los carbonos que poseen factores de inestabilidad.

TABLA 2

| Me-heterósido       | K/K' | Substituyente en C-5 |
|---------------------|------|----------------------|
| $\alpha$ -D-lixosa  | 14.5 | H                    |
| $\beta$ -D-lixosa   | 46.4 | H                    |
| $\alpha$ -D-ramnosa | 9.5  | CH <sub>3</sub>      |
| $\beta$ -D-ramnosa  | 21.9 | CH <sub>3</sub>      |
| $\alpha$ -D-manosa  | 2.4  | CH <sub>2</sub> OH   |
| $\beta$ -D-manosa   | 5.7  | CH <sub>2</sub> OH   |

2.II.D.- Acetilación. La formación de derivados peracetilados - por la facilidad de preparación, cristalización e hidrólisis - es la reacción más usada para caracterizar un heterósido. Los agentes acetilantes que han sido usados desde mediados del siglo XIX son el ác. acético glacial y el anhídrido acético. Los catalizadores más empleados son acetato de sodio anhidro (Lieberman 1878) o cloruro de zinc (Erwig 1889) éste último es específico para la preparación del pentaacetato de la  $\alpha$ -D-glucosa; también puede usarse piridina, anhídrido trifluoroacético, ác. sulfúrico o perclórico. Debe evitarse el uso de ácidos al trabajar con heterósidos. Los principales factores que afectan la esterificación son el impedimento estérico y la temperatura. Lo anterior se hace patente cuando el radical oligosacárido es relativamente grande y ramificado lo que da lugar a compuestos parcialmente acetilados si no se toman las debidas precauciones. En cambio, para las azúcares reductores los factores son el catalizador y la temperatura que determinarán el tipo de anómero que se obtiene.

## 2.III. Heterósidos. Determinación de la Estructura

La estructura de un heterósido está dada cuando se conocen: el tipo de aglucón y azúcares que la componen (Estructura Primaria); la relación cuantitativa entre ellas (Estructura Secundaria), la secuencia y sitio de unión entre azúcares (Estructura Terciaria) y el tipo de anómero del radical oligosacárido (Estructura Cuaternaria).

### 2.III.A. Métodos Químicos

Para establecer la estructura primaria los métodos principales son la hidrólisis total con ácidos minerales ( $\text{HCl}$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  principalmente) o enzimática -- y la identificación de los productos de reacción por la formación de derivados o degradación de la molécula a compuestos conocidos. Las reacciones de degradación - como oxidaciones (Oppenauer), desmetilaciones (Kuhn-Roth), tamaño del Anillo (Degradación de Blanc), etc.. - son utilizadas principalmente para llegar a la estructura del aglucón; mientras que la formación de derivados - como peracetatos, permetilados, osazonas, hidrazonas, reacciones coloridas (Molisch, Fehling, Tollens, etc.<sup>(12)</sup>), se emplean -- para la identificación de los azúcares.

El ácido más usado es el clorhídrico a una concentración  $2\text{N}$ <sup>(13)</sup><sup>(6)</sup>, aunque pueden obtenerse mejores resultados en menor tiempo con una concentración  $4\text{N}$ <sup>(14)</sup>. El inconveniente que presenta el usar un ácido tan fuerte es que se prolonga demasiado el tiempo de reacción o la temperatura es elevada (factores que varían conforme al heterósido en cuestión) con lo que pueden ocurrir

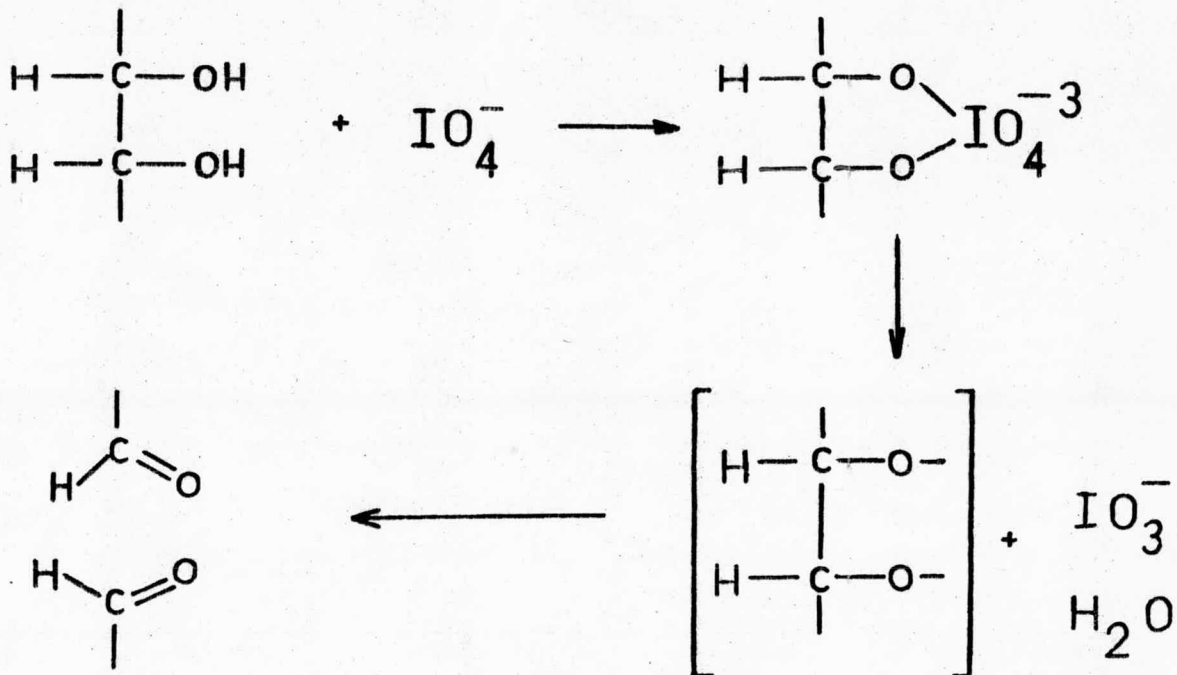


reacciones laterales de degradación tanto de los azúcares (formación de anhídridos) como del aglucón (deshidratación e isomerización <sup>(15)</sup>).

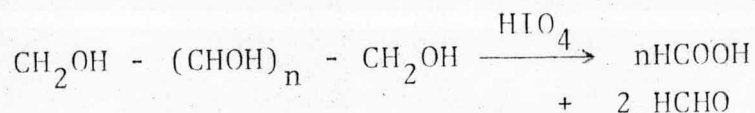
La estructura secundaria es establecida, principalmente, por la cuantificación de los azúcares aunque también hay métodos para cuantificar el aglucón <sup>(16)</sup>. Para tal fin han sido desarrollados métodos basados en las propiedades reductoras de los azúcares sobre iones  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{1+}$ ,  $\text{Hg}^{1+}$  y  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3+}$ . El más usado, y al que se le han hecho más modificaciones <sup>(17)</sup>, es el de  $\text{Cu}^{2+}$  cuyos productos de reducción ( $\text{Cu}^{1+}$ ) pueden determinarse por gravimetría, volumetría o colorimetría <sup>(12)</sup>.

El método más sencillo para determinar la estructura terciaria es el de hidrólisis parcial pero sólo es útil cuando se desea conocer la secuencia y sitio de unión de un heterósido que es homólogo superior de otros ya conocidos con los cuales se comparan los productos de reacción. Si éste no es el caso se recurre a preparar el derivado permetilado que después es hidrolizado y los productos son comparados con azúcares parcialmente metilados. Sin embargo, este método requiere de cantidades de sustancia pura relativamente grandes (0.5 - 1.5 g) además de ser tedioso por las sucesivas metilaciones y purificaciones que hay que hacer y de llevarse demasiado tiempo.

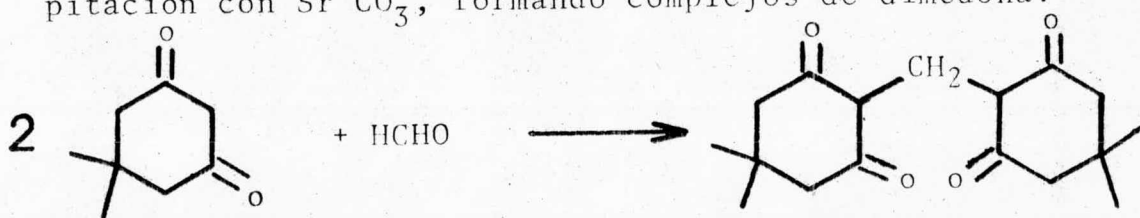
Una alternativa a lo anterior es la oxidación con ác. peryódico y análisis de los productos. El fundamento es el siguiente: todos los carbonos que soportan oxhidrilos vicinales son oxidados a aldehidos o ácidos carboxílicos por ruptura del enlace C-C. El mecanismo de la reacción es el siguiente <sup>(18)</sup>:



Cuando hay más de dos oxhidrilos vicinales, la oxidación da lugar a la formación de ác. fórmico a causa de los oxhidrilos intermedios y de formaldehído. Ej.:

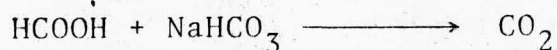


Para identificar los productos de oxidación de moléculas más complejas se recurre a hacer derivados tales como reducción de los aldehídos a alcoholes, su precipitación con  $\text{Sr CO}_3$ , formando complejos de dimedona:



o cuantificándolo colorimétricamente con ác. cromotrópico (ác, 4,5-dihidroxi-2,7-naftalendisulfónico) que

requiere se destruya el ác. peryódico residual antes de hacer la determinación. El ác. fórmico puede cuantificarse por titulación directa-destruyendo el exceso de peryódico con etilenglicol, formaldehído, ditionato de sodio, etc.. con NaOH o Ba(OH)<sub>2</sub>, potenciométricamente o gasométricamente en el respirómetro de Warburg de acuerdo a la siguiente reacción:



La oxidación de glicoles vicinales con tetraacetato de plomo dá idénticos productos pero por un mecanismo de radicales libres <sup>(19)</sup>. La utilidad de la oxidación con ác. peryódico es mostrada en la Figura 6.

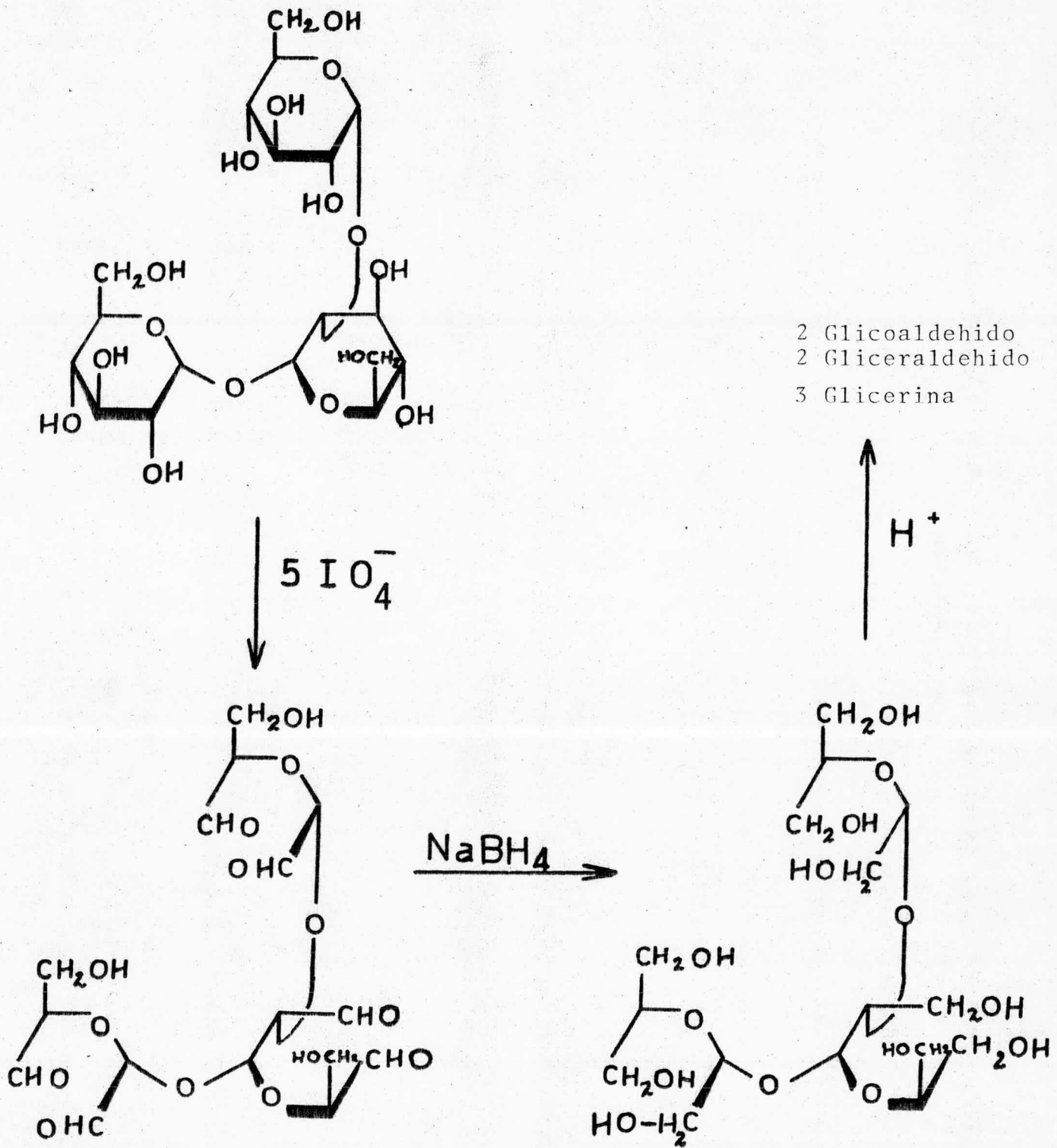


Figura 6

Oxidación de Selaginosa<sup>(20)</sup>

La determinación de la estructura cuaternaria por métodos químicos se realiza por hidrólisis enzimática.

Las enzimas que desdoblan a un heterósido formado por hexosas son llamadas  $\alpha$ - o  $\beta$ -hexosidasas aunque más comúnmente es usado el nombre trivial originado por el sustrato sobre el cual actúan o de la fuente de obtención. Así por ejemplo a la enzima que hidroliza a la maltosa se le conoce como maltasa o amilasa siendo una  $\alpha$ -hexosidasa.

Históricamente la primera enzima en ser descubierta fue la responsable del cambio de color de una tintura de guaiacum (Planch 1810, 1820) y en 1837 Liebig y Wohler establecen su identidad al extraerla de las almendras dándole el nombre de Emulsina que tiene propiedades de  $\beta$ -hexosidasa principalmente ( $\beta$ -glucosidasa), aunque dependiendo del pH presenta actividad de  $\alpha$ -hexosidasa.

El término emulsina ha sido aplicado, no solo al principio activo de las almendras, sino a la mezcla cruda de hexosidasas provenientes de cualquier fuente. De tal forma que a la mezcla de enzimas parcialmente purificadas provenientes de semillas, microorganismos u órganos y tejidos de animales se les denomina emulsinas y en este sentido la emulsina de almendras - la más usada con heterósidos - es una mezcla de enzimas y no una glucosidasa exclusivamente <sup>(10)</sup>. Otras enzimas que han sido detectadas en un extracto purificado de almendras son:  $\alpha$ -galactosidasa,  $\alpha$ -manosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucoronidasa y  $\beta$ -(N-acetil)-glucoronidasa. Estas hexosidasas además hidrolizan pentosidos de: L-arabinosa,  $\beta$ -D-xilosa y  $\alpha$ -D-lixosa.

Lo anterior puede explicarse considerando que estos pentósidos están relacionadas configuracionalmente a las hexósidos ya que pertenecen a las mismas series homomorfas derivándose de ellas por substitución de los alcoholes primarios por átomos de hidrógeno.

Al igual que todas las enzimas, la acción de las hexosidasas es afectada por el pH de la reacción, la temperatura, concentración de enzima y substrato; estructura, estereoquímica y substituyentes tanto del aglucón como de la porción de azúcar.

## 2.III.B.- Métodos Instrumentales

Con el desarrollo de las técnicas instrumentales es posible - con una combinación de ellas - dar la estructura química de una sustancia dada en un tiempo relativamente corto. Sin embargo, para fines de exposición en relación a los glucósidos se tratarán por separado a - aquellos que prestan mayor utilidad para elucidar las - estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

El análisis rápido de la estructura primaria puede efectuarse por medio de la espectrometría de gases; en el departamento donde se efectuó el presente trabajo se -- han establecido las condiciones de operación para la identificación tanto de aglucones como de azúcares<sup>(29)</sup>. Si éste método se realiza en forma cuantitativa partiendo de los productos de hidrólisis de un glucósido es posible determinar la estructura secundaria, la cual también puede conocerse por cuantificación colorimétrica - existiendo para ello procedimientos específicos para -- grupos de azúcares (pentosas, hexosas, etc.) o bien para azúcares individuales.<sup>(12)</sup>

Hace poco menos de 10 años que grupos de investigadores en California, E.U. (C.Djerassi); Arizona E.U. (P.Brown, F.Bruschweiler) y en Suiza (F.Reichstein) han desarrollado las técnicas necesarias de espectrometría de masas para determinar la estructura terciaria.

El procedimiento consiste en obtener los espectros por ionización de campo y por impacto electrónico para de esta forma establecer con mayor precisión el peso molecular y el patrón de fragmentación respectivamente.

Así han obtenido los pesos moleculares y fragmentaciones características de una serie de cardenólidos como la Digitoxigenina, Digitoxina, Neriifolina, Cimarina, K-Strofantina- $\beta$ ; y las de azúcares libres como D-glucosa, D-cimariosa y L-Tevetosa. (30)

Otra técnica que presta ayuda valiosa para conocer la estructura terciaria es la RMN- $^{13}\text{C}$ . De acuerdo con autores japoneses (21) si se toma al metil- $\beta$ -D-glucopiranosido como referencia - a 105.5 ppm aparece la señal para su C-1- la diferencia de desplazamientos químicos por efecto de sustitución glucosídica para el glucósido de un alcohol primario será de -0.5 a -1.5 ppm; para el de un alcohol secundario de -2 a -3 ppm y para el de un alcohol terciario de -6 a -8 ppm; es decir, la señal del C-1 de la glucosa aparecerá entre 105.0 -104.0 ppm, 103.5-102.5 ppm y 99.5-97.5 ppm respectivamente. Las diferencias de desplazamiento para los carbonos restantes (c-2 a c-6) son del orden de  $\pm$  0.7 ppm. Para los derivados peracetilados las diferencias son similares (la señal para el C-1 del metil- $\beta$ -D-glucopiranosido peracetilado aparece a 101.5 ppm). Estos valores se modifican cuando los factores estéricos y de conformación se hacen importantes. (22)

Las relaciones cuantitativas para el aglucón en el caso de un alcohol secundario son: para el carbono  $\alpha$  al enlace de + 6.5 a + 8 ppm en el  $\alpha$ -glucósido y de +7 a + 9 en el  $\beta$ -glucósido; para el carbono  $\beta$  de -2 a -5 ppm para ambos anómeros y de - 0.5 a + 0.5 para el carbono  $\gamma$  en el  $\alpha$ - y  $\beta$ -D-glucósidos. Para los carbonos restantes en aglucones complejos los efectos de sustitución pueden calcularse de la manera habitual. (23)



Una técnica instrumental confiable para establecer la estructura cuaternaria es la de rotación óptica aplicando la regla de Klyne<sup>(24)</sup>. Desarrollada originalmente para establecer el enlace anomérico de glucósidos cardiotónicos su uso se ha extendido a los esterooidales.<sup>(25)</sup> Consiste en calcular la diferencia de rotación molecular entre un glucósido y su aglucón - para luego sustraer éste resultado a la rotación molecular de un metil-glucósido que se usa como referencia y cuyo enlace anomérico es conocido; si esta última diferencia cae en el rango de  $+100^{\circ}$  y  $-70^{\circ}$  se dice que el anómero desconocido es el mismo del glucósido de referencia.

### 3.- Discusión de Resultados

Siendo el barbasco la fuente principal de materia prima para la fabricación de hormonas esteroides el interés químico sobre la planta se ha circunscrito al estudio del aglucón, en este caso la diosgenina, dejando a un lado a sus precursores, los glucósidos, por considerarse que su análisis es difícil y sin valor industrial.

Lo anterior se confirma por la investigación bibliográfica realizada la cual indica que en los pocos artículos en los que se menciona a D. composita <sup>(6,14,32,33)</sup> los estudios se limitan al papel que juegan las enzimas que desdoblan a los glucósidos en sus partes constituyentes. Wall y colaboradores <sup>(34)</sup> identifican una sustancia a la que llaman Dioscina que no se describe químicamente y que posiblemente se trata de una mezcla de glucósidos.

El presente trabajo se inició con la idea de que la composición de glucósidos de D. composita debería ser similar, pero no necesariamente igual, a la de plantas de la misma familia estudiadas por autores japoneses. <sup>(6,25,35)</sup>

De barbasco fermentado se obtiene una mezcla de 5 glucósidos principales de los cuales se lograron aislar 3 en forma pura que se mencionan en el texto como glucósidos A, B y D respectivamente.

Al glucósido A se le había identificado anteriormente como un mono glucósido de diosgenina <sup>(26)</sup> - ver estructura I - lo cual es confirmado al hacer la cuantificación de azúcares por yodometría. El enlace anomérico de la glucosa con la diosgenina fue establecido como un enlace  $\beta$  por el método de diferencias de rotación molecular o Regla de Klyne. <sup>(24)</sup>

La estructura primaria y secundaria del glucósido B había sido establecida como la de un diglucósido de diosgenina con una glucosa

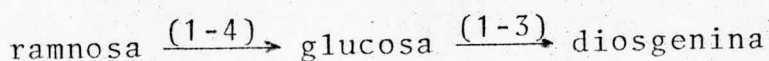
y una ramnosa<sup>(7)</sup>. El establecimiento de la estructura terciaria por los métodos químicos clásicos de permetilación e hidrólisis posterior presupone la disposición de cantidades de materia prima relativamente grandes y la inversión de mucho tiempo por lo que se decidió hacer un estudio intenso de espectroscopía de R.M.N.-<sup>13</sup>C como una alternativa al trabajo químico que es tedioso y tardado.

Aunque la hidrólisis directa de material fermentado muestra una mezcla de sapogeninas constituida principalmente por diosgenina, yamogenina y penogenina, los espectros de R.M.N.-<sup>13</sup>C de estos aglucones - cuyas asignaciones fueron hechas por comparación con datos de la literatura<sup>(28)</sup> y por el cálculo de desplazamientos por efectos de sustitución - permiten establecer sin lugar a dudas que la sapogenina que constituye el aglucón de los glucósidos A, B y D es la diosgenina, puesto que sus espectros respectivos no muestran las señales distintivas de los carbonos N°23,24, 25,26 y 27 de la yamogenina que se encuentran desplazados diamagnéticamente con respecto a la diosgenina ni tampoco muestran el desplazamiento paramagnético típico de un carbono terciario que soporta un oxhidrilo como sería el caso del C-17 en la penogenina, la presencia de yamogenina en el hidrolizado se debe a la epimerización que sufre el C-26 de la diosgenina en condiciones ácidas. Es de notarse que el C-3 de la diosgenina en los glucósidos se encuentra desplazado +7 ppm debido a la sustitución glucosídica. Ver tablas N°2 y 4.

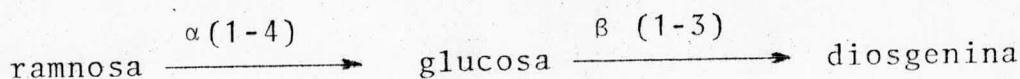
Con respecto a la porción de azúcar y tomando como referencia al metil-β-D-glucopiranosido, el glucósido A presenta una señal a 102.6 ppm que corresponde al carbono anomérico (C-1), confirmando su estructura de monoglucósido, y que está de acuerdo con el valor calculado de 102.5 ppm. Las señales de los carbonos restantes aparecen desplazadas a campos bajos entre 1.0 y 1.5 ppm debido probablemente al efecto, a larga distancia, de sustitución glucosídica. En cambio en el compuesto peracetilado las señales aparecen a campos altos con respecto al compuesto libre debido a que

los carbonos del anillo piranósido quedan comprendidos en la región de protección generada por el grupo carbonilo

En cuanto al glucósido B, la presencia de sólo dos azúcares se confirma por aparecer en su espectro de  $^{13}\text{C}$  dos señales a 102.5 ppm y 102.3 ppm asignadas a los carbonos anoméricos de la glucosa y ramnosa respectivamente. El carbono 4 de la glucosa se encuentra desplazado +7ppm por substitución glucosídica estableciéndose que la estructura terciaria para este glucósido es:



La estructura cuaternaria, establecida por la Regla de Klyne, dá como resultado la siguiente estructura para el glucósido B: (ver estructura II)



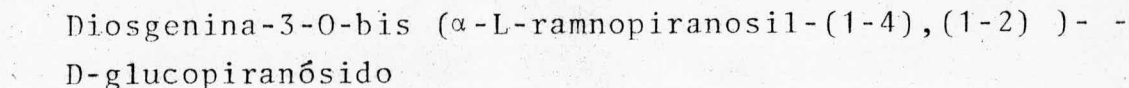
el cual se encuentra en mayor concentración (50% aproximadamente) en la mezcla total de glucósidos.

El espectro del glucósido D muestra 3 señales de carbonos anoméricos a 102.9, 102.0 y 100.3 ppm que indican se trata de un triglucósido que debería presentar un total de 45 señales; sin embargo, solo se distinguen 41 debido a que 4 de ellas se presentan dobles. Dos señales dobles pueden diferenciarse por los datos de la computadora y asignarse a los carbonos N°2,7,8 y 23 del aglucón (ver tabla 4). La señal a 72.5 se atribuye a los C-2 de las ramnosas residuales mientras que para el C-2 de la glucosa se le asigna la señal de 81.1 junto con el C-16 de la diosgenina ya que por el efecto de substitución glucosídica debería desplazarse de 75.2ppm en el glucósido B a 82.0 ppm en el glucósido D. Los carbonos restantes aparecen desplazados paramagnéticamente debido probablemente al efecto a larga distancia del enlace glucosídico.

Inicialmente los datos de análisis elemental del glucósido D obtenidos por nosotros nos hicieron pensar en la posibilidad de que la estructura de este compuesto correspondiese a un tetraglucósido. Por otra parte, los datos espectrográficos y de hidrólisis parecían confirmar esta posibilidad, siempre y cuando se considerara que dos de las ramnosas terminales fueran equivalentes y que el glucósido C fuera un triglucósido como lo sugería la secuencia de polaridad por cromatografía en capa fina.

La imposibilidad, por una parte, de hacer una cuantificación de azúcares con exactitud debido a que la hidrólisis cuando es suave sólo es parcial y cuando es drástica produce degradación de las moléculas de azúcares (ver sec. A.7 de la parte experimental) y por la otra, de determinar el peso molecular por otros métodos, como por ejemplo espectrometría de masas (método por el cual, en los aparatos a los que tuvimos acceso, sólo es posible obtener el P.M. del aglucón pues los azúcares se pierden en el proceso); sin mencionar que otros métodos indirectos como por ejemplo una determinación del índice de acetilos tampoco nos proporcionó resultados confiables; hicieron que ésta hipótesis de trabajo fuese mantenida por algún tiempo.

El profesor T. Kawasaki amablemente nos envió una muestra auténtica de Dioscina que es el:



sobre la cual se hicieron los estudios que le llevaron a la determinación de la estructura propuesta para ésta substancia; resultó idéntica, por una comparación cromatográfica, con el glucósido D.

La alternativa que se nos presentaba era considerar la estructura del glucósido D idéntica a la Dioscina o revisar la estructura --

propuesta por T. Kawasaki.

Debemos hacer hincapié en que nuestros datos de análisis elemental son muy similares a los obtenidos por T. Tsukamoto y T. Kawasaki<sup>(6)</sup> y que ellos explican esta discrepancia por adición de moléculas de agua de cristalización a pesar de que las muestras fueron secadas exhaustivamente antes de efectuar el análisis y de que se empleó metanol para la cristalización.

Las pruebas de hidrólisis parcial para ambos compuestos dan como productos: glucósido A, glucósido B y glucósido C (identificado preliminarmente como el diglucósido: ramnosa  $\alpha(1-2)$  glucosa  $\beta(1-3)$  diosgenina ver estructura III), lo que conduce a establecer como posibilidad única para el glucósido D: estructura similar a Dioscina.

Esto se confirma por un análisis detallado de la espectroscopía de  $^{13}\text{C}$  y el empleo de la técnica de "Gated decoupling" en la que se elimina el efecto Overhauser para distinguir entre carbonos equivalentes, la cual indica que sólo hay 3 señales de carbonos anoméricos en el compuesto peracetilado. Ver estructura IV.

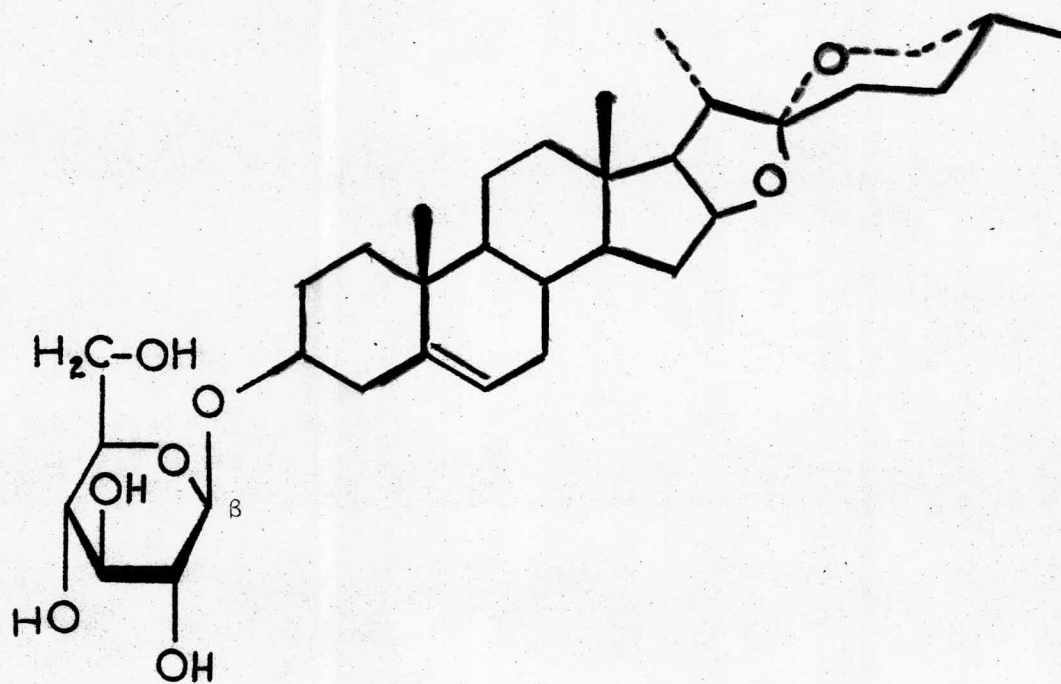
Trabajando con rizomas frescos de D. composita se obtiene una mezcla de 5 glucósidos 4 de los cuales dan reacción positiva para furostanoles con reactivo de Ehrlich, mientras que el quinto corresponde en capa fina al glucósido D de barbasco fermentado y que representa la mayor concentración (~70%) de la mezcla de glucósidos.

Revelando con el mismo reactivo el extracto de barbasco fermentado se detectan dos furostanoles que se mencionan en el texto como Furostanoles A y B respectivamente. Al primero se le identifica preliminarmente como precursor del glucósido A (ver estructura V) y por analogía al furostanol B se le considera el precursor del glucósido B (ver estructura VI). Estos resultados hacen pensar - que en el extracto de barbasco fresco se encuentran los precursores furostánicos que por hidrólisis enzimática en la misma planta

dan origen a los glucósidos de barbasco fermentado.

Debido a que en los glucósidos identificados hasta ahora no se encuentra penogenina como aglucón, se trabajó con un clon especial de D. composita en el que abunda esta sapogenina. El extracto metanólico del rizoma fresco muestra una mezcla de glucósidos similar a la de barbasco fresco. La hidrólisis total de una muestra de tal extracto indica la presencia de penogenina en una concentración 1:1 aproximadamente con la diosgenina - confirmando que en él existen glucósidos de las dos sapogeninas.

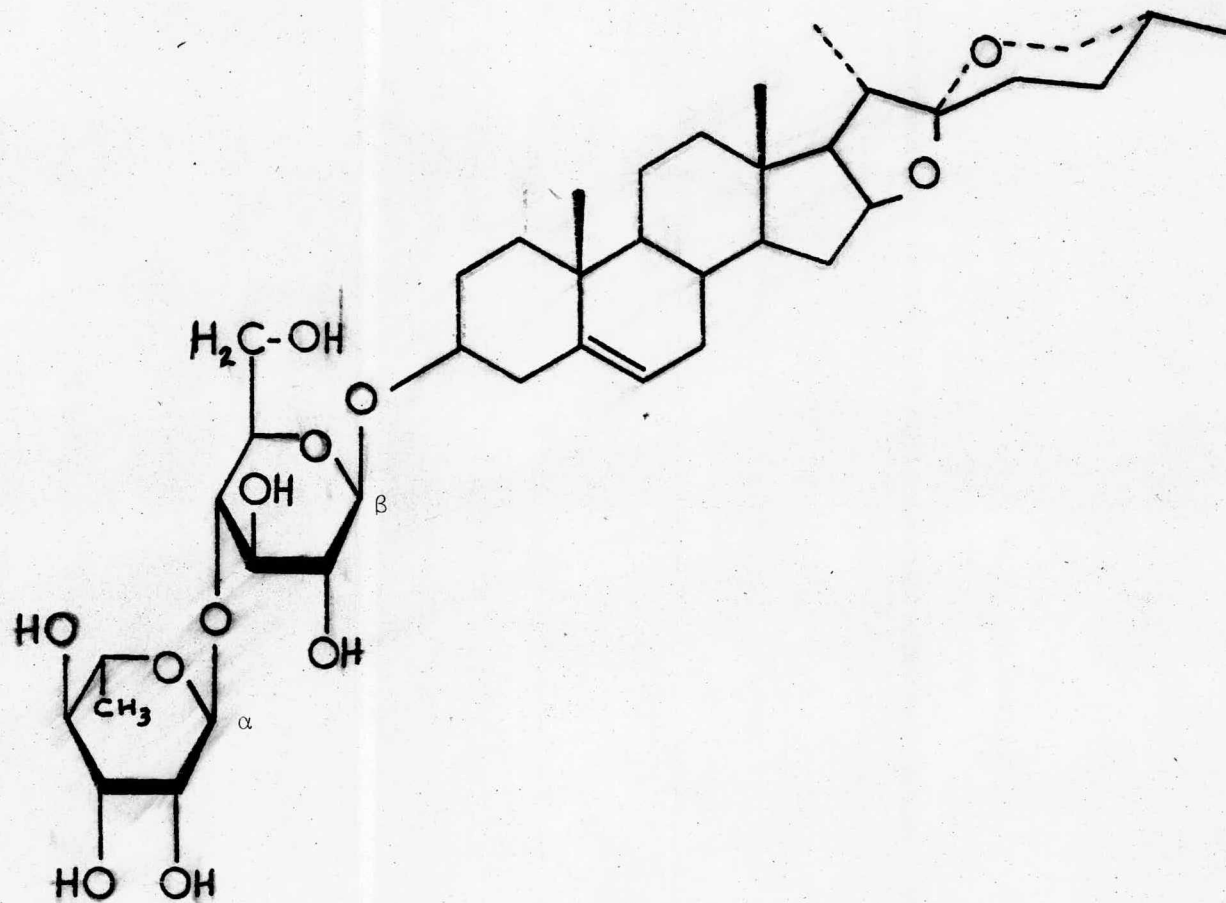
Los resultados obtenidos establecen que efectivamente la composición de glucósidos en plantas de la misma familia puede ser la misma encontrándose diferencias sólo en concentración al utilizar materiales recolectados en forma diferente. Al respecto, haciendo una comparación con los datos reportados por autores japoneses <sup>(6)</sup> sobre Dioscorea nipponica encuentran los mismos glucósidos reportados en el presente trabajo siendo su compuesto mayoritario la Dioscina mientras que en rizomas fermentados de Dioscorea composita, lo es el glucósido B y en rizomas frescos lo es el glucósido D o Dioscina. Otra diferencia consiste en que el extracto de rizomas fermentados contiene el monoglucósido y los dos diglucósidos que estos autores obtienen sólo al hacer hidrólisis parcial de la Dioscina por lo que lo más probable es que hayan utilizado material fresco para sus estudios.



ESTRUCTURA I.- GLUCOSIDO A

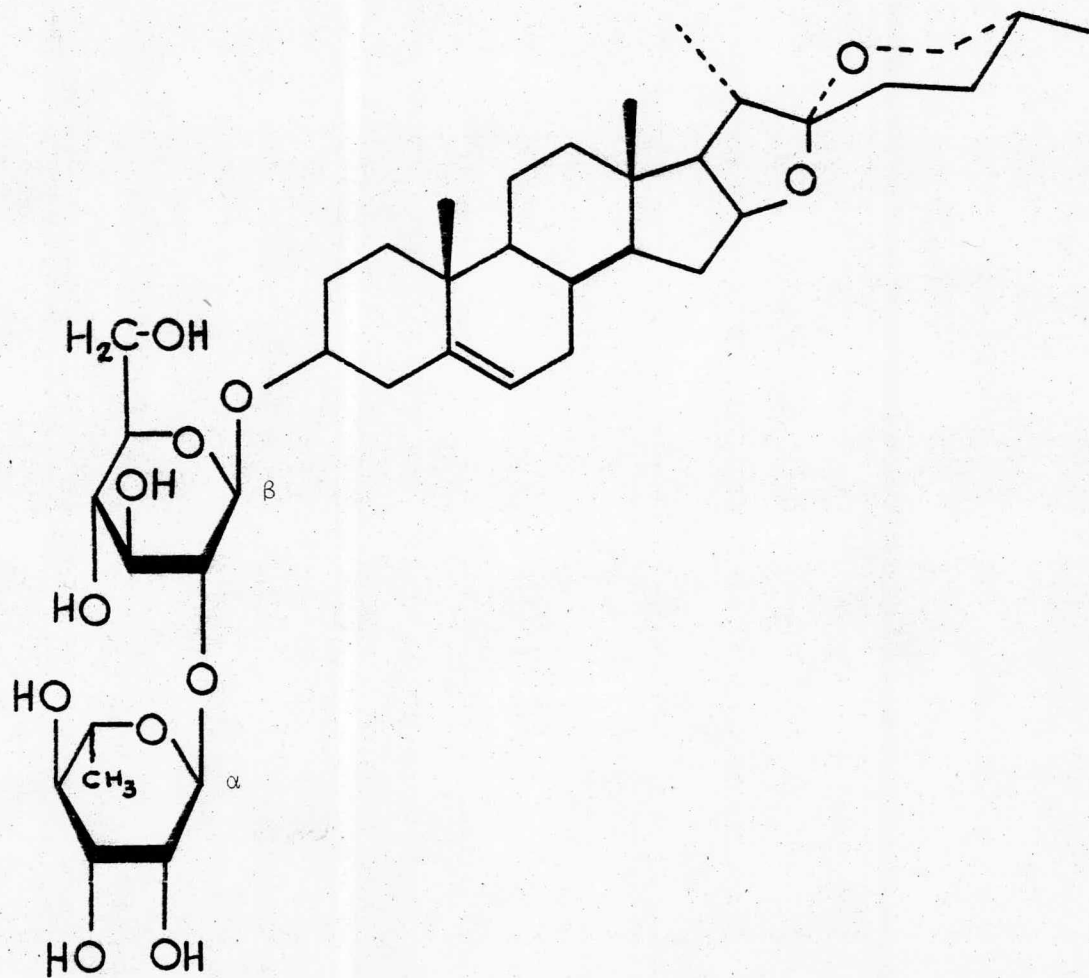
Diosgenina-3-O-β-D-glucopiranosido





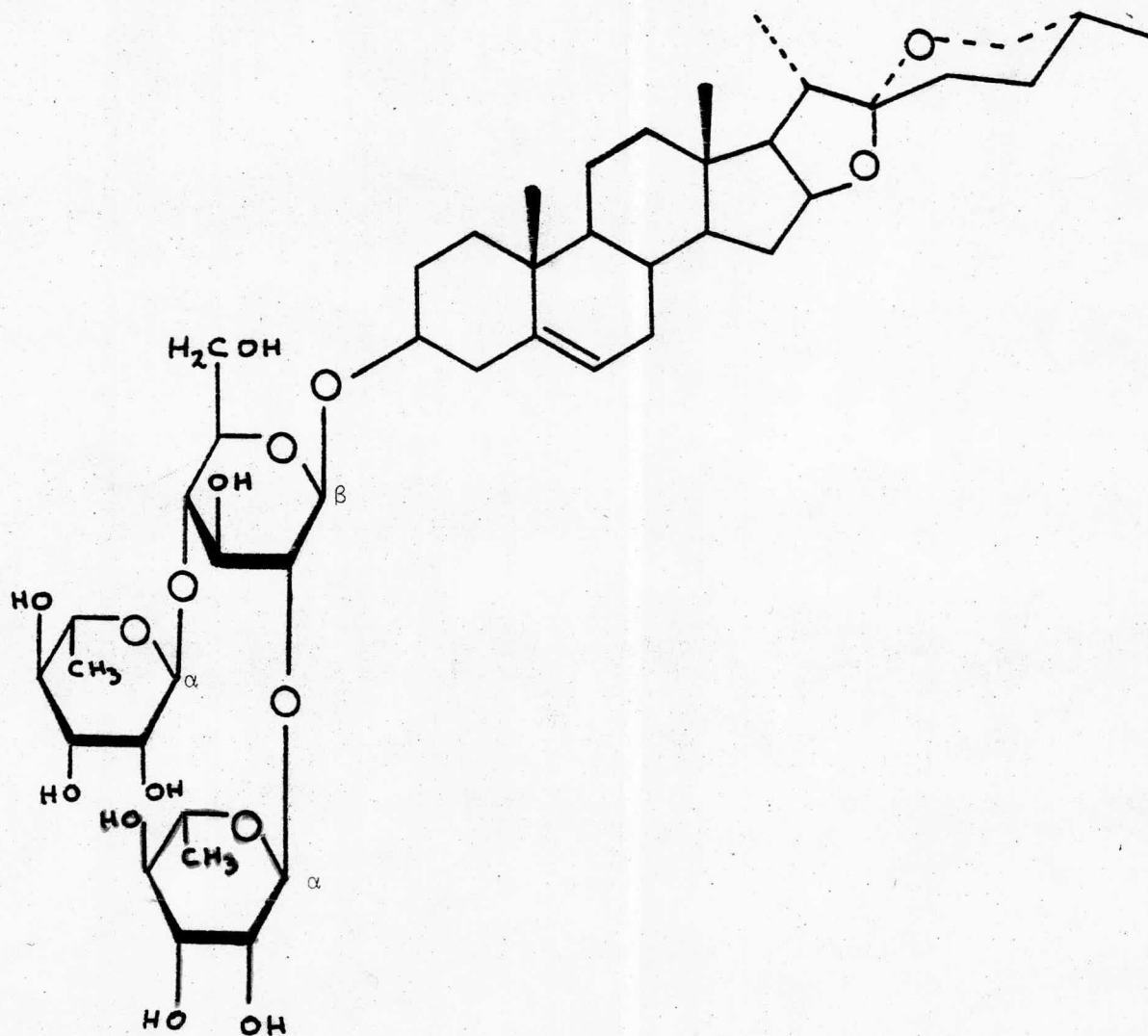
ESTRUCTURA II.- GLUCOSIDO B

Diosgenina-3-O-( $\alpha$ -L-ramnopiranosil,1-4)- $\beta$ -D-glucopiranosido



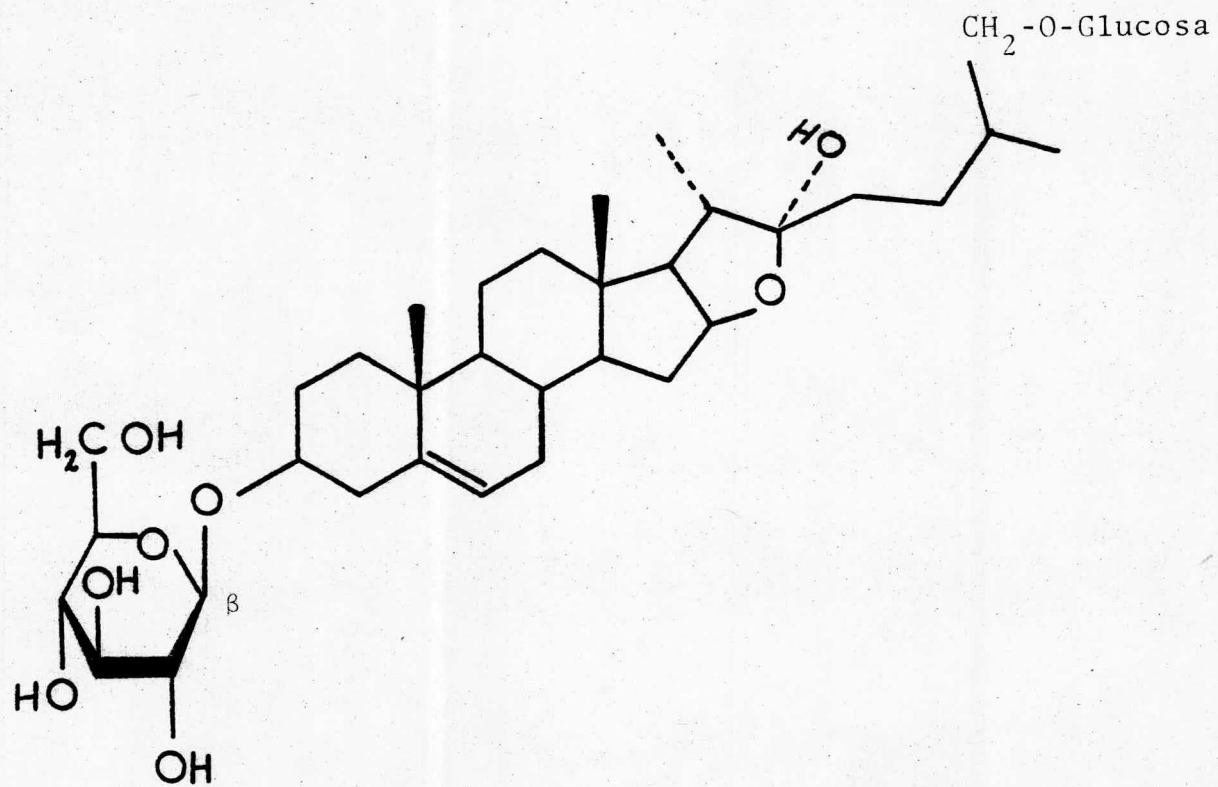
ESTRUCTURA III.- GLUCOSIDO C

Diosgenina-3-O-( $\alpha$ -L-ramnopiranosil,1-2)- $\beta$ -D-glucopiranoído

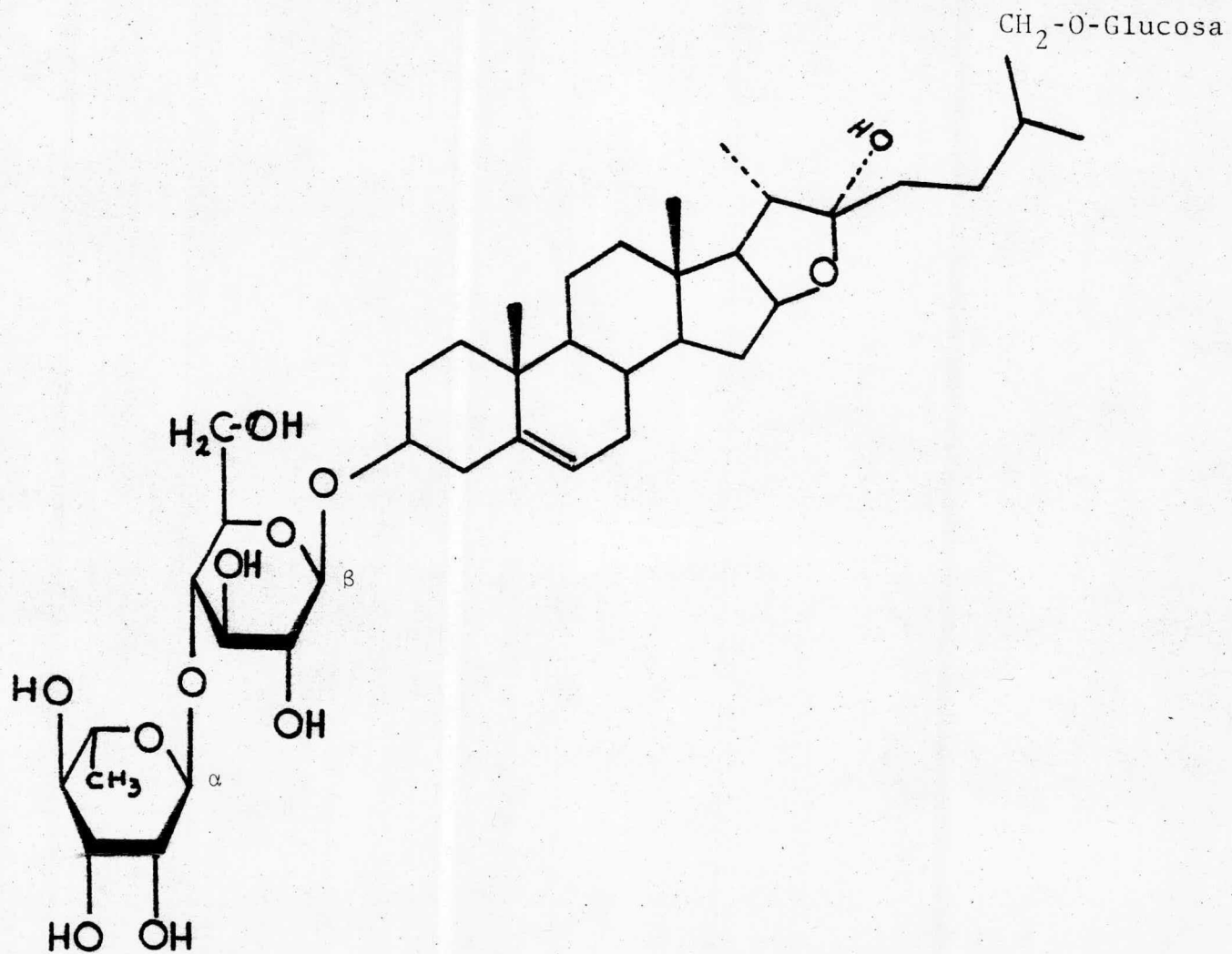


ESTRUCTURA IV.- GLUCOSIDO D

Diosgenina-3-O-bis( $\alpha$ -L-ramnopiranosil 1-2,1-4)- $\beta$ -D-glucopiranósido



ESTRUCTURA V.- FUROSTANOL A



ESTRUCTURA VI.- FUROSTANOL B

#### 4.-PARTE EXPERIMENTAL

- 1.- Los puntos de fusión fueron tomados en un aparato Fisher-Johns.
- 2.- Los espectros de IR y las rotaciones específicas fueron hechos en un aparato Perkin Elmer 337 y 241 respectivamente y los espectros de RMN-H en un aparato Varian A60 del Departamento de Química Analítica de la D.E.S. Facultad de Química. UNAM.
- 3.- La RMN-<sup>13</sup>C se hizo en un aparato Varian XL-100 del Departamento de Química analítica de Ciba-Geigy Ltd de Basilea, Suiza.
- 4.- Los análisis elementales fueron realizados en el laboratorio Alfred Bernhardt (525) Elbach uber Engelskirchen, Fritz-Pregl-Strabe 14-16, Alemania) y en Micro-Tech Laboratories Inc. 4117 Oakton Street, Skokie, Illinois 60076.
- 5.- En todos los casos el gel de sílice usado para cromatografía en columna fué de la casa Merck con un diámetro de partícula de 0.063 - 0.2 mm y para cromatografía en capa fina la Tipo 60 según Stahl.

## MATERIA PRIMA

Se hicieron 3 diferentes tipos de extracción de las que se obtuvieron: A) mezcla de glucósidos espirostánicos (aquellos en las que la cadena lateral del aglucón ha sido oxidada y ciclizada enzimáticamente - al fermentar el material de partida - para formar los anillos E y F); B) mezcla de glucósidos furostánicos - - (aquellas en los que el anillo F está abierto y el oxhidrilo del C-26 está en forma glucosídica) identificables por cromatografía en capa fina por dar un color rojo característico con el reactivo de Erhlich; y c) una mezcla de glucósidos en donde existe glucósido de Penogenina en cantidad apreciable.

### A) Glucósidos Espirostánicos.

Fueron obtenidos por extracción con metanol de una muestra representativa de barbasco (*Dioscorea composita*) fermentado, seco, molido, previamente desengrasado con hexano.<sup>(7)</sup> y purificado de metanol por sucesivas cristalizaciones. De 3 kg del material, el peso total del extracto purificado fue de 138.4 g que representa el 4.6%.

Para la separación de cada uno de los componentes de que consta la mezcla se utilizó la cromatografía en columna y/o la cromatografía en capa fina con una proporción de glucósido-soporte para el primer caso de 1:100 o de 1:200. El Rf para cada glucósido determinado en varias mezclas de disolventes, se encuentra en la tabla 1. Debido a que se obtiene mejor separación y por su facilidad de manejo el sistema elegido fue el No.2.

#### A.1.- Identificación de Azúcares Libres

Para la determinación de azúcares libres en el extracto, aproximadamente 1mg de la mezcla de glucósidos totales es tratada con 0.1 ml de reactivo de Fehling calentando en baño de agua por 5 min., utilizando como patrón positivo aproximadamente 1 mg de glucosa tratandola en forma paralela al problema.

Resultado: negativo, no hay formación del precipitado rojo de óxido de cobre característico.

#### Preparación del reactivo de Fehling

Solución A:  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (10% P/v)

Solución B: 28 g de  $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  disuelto en 700 ml de agua destilada más 40 g de tartrato doble de Sodio y Potasio tetrahidratado; agregar 100 ml de NaOH 1N y 120 g de sulfato de Sodio anhidro. Aforar a 900 ml y filtrar después de 2 días en reposo a temperatura ambiente.

El reactivo se prepara mezclando la solución A y B en proporción 1:9 (v/v) respectivamente.



TABLA N° 1

Valores de Rf para Espirostanoles en Diferentes Sistemas de Disolventes:

| gl | S I S T E M A |      |     |    |     |     |
|----|---------------|------|-----|----|-----|-----|
|    | 1             | 2    | 3   | 4  | 5   | 6   |
| A  | 79            | 83   | 87  | 47 | 63  | 63  |
| B  | 69            | 68   | 77  | 40 | 60  | 54  |
| C  | 43            | 42   | 73  | 33 | 45  | 49  |
| D  | 36            | 28   | 67  | 29 | 37  | 43  |
| E  | 18*           | 14   | 61* | 24 | 31* | 39* |
| F  |               | 0.08 |     | 22 |     |     |

1. Cloroformo: MeOH: Agua, 75:15:15
2. Diclorometano: MeOH: Agua, 80:20:0.1
3. Butanol: Etanol: Agua, 5:1:4 (fase orgánica)
4. Cloroformo: MeOH: Agua, 65:35:10 (fase orgánica)
5. Butanol saturado con agua
6. Butanol: AcOH: Agua, 4:1:5

\* Esta mancha está formada por los glucósidos E y F.

## A.2.- Identificación Sapogeninas Libres

Para detectar la presencia de sapogeninas libres en el extracto metanólico de esteroles totales, se empleó la prueba cualitativa de precipitación con Digitonina de la siguiente forma:

A una solución alcohólica al 1% del problema en EtOH 95% se le agrega en caliente una solución alcohólica también al 1% de Digitonina en EtOH 90%. La prueba es positiva cuando hay formación de un precipitado blanco (Digitónido). Resultado:

| Substancia    | Resultado |
|---------------|-----------|
| Diosgenina    | +         |
| Colesterol    | +         |
| Ac-Diosgenina | -         |
| Ac-Colesterol | -         |
| Problema      | -         |

Sin embargo, la cromatografía en capa fina, utilizando sapogeninas libres como patrones, indica la presencia de Diosgenina y Penogenina que en el sistema de disolventes compuesto por Bence no: AcEt 80:20 presentan Rf de 38 y 23 respectivamente.

Para cuantificar estos aglucones se hizo una cromatografía en columna con las siguientes condiciones: longitud de la columna = 120 cm; diámetro interno = 1.5 cm; proporción de glucósido: gel = 1:100; sistema de elución = N°2; cantidad de muestra = 1 g; flujo = 30-35 gotas por mín.; volumen muerto = 100 ml y fracciones de 20 ml. Las sapogeninas quedan en las 7 primeras fracciones. Después de evaporar, la cantidad que se obtiene de las dos sapogeninas es de 13.5 mg, es decir, 1.35% del que la mayor proporción corresponde a Diosgenina.

### A.3.- Glucósido A

A.3.a.- Aislamiento.- Fue obtenido por hidrólisis parcial de 5 g de la mezcla total de espirostanos con ácido sulfúrico 1 N (50 ml) y etanol (40 ml) a reflujo por 6 hr y a temperatura ambiente por 24 hrs. deteniendo la reacción por adición de agua fría (aprox. 200 ml), se forma un precipitado que en cromatografía en capa fina da 5 manchas de las cuales la mayor parte (aprox. 80%) corresponde al glucósido A. Para su purificación se hizo una columna de acuerdo a las siguientes condiciones: longitud = 50 cm; diámetro interno = 2.5 cm; soporte = gel de sílice (75 g); eluyente = sistema N°2; flujo = 28 gotas por mín.; volumen muerto = 45 ml y fracciones de 2 ml cada una.

Este compuesto así purificado presenta las siguientes constantes físicas:

#### GLUCOSIDO A LIBRE

Datos obtenidos anteriormente: (26)

p.f. = 245 - 50°C

$[\alpha]_D^{24} = -94.2^\circ (C=10\% \text{ en g}).$

Fórmula:  $C_{33}H_{52}O_8$  P.M. = 576.78

Análisis elemental:

|             | % C   | % H  | % O   |
|-------------|-------|------|-------|
| calculado:  | 68.77 | 9.08 | 22.19 |
| encontrado: | 67.19 | 9.17 | 23.48 |

Infrarojo: (Espectro N°1)

Bandas ( $cm^{-1}$ ) Correspondiente a:

3400 -OH

1650 c = c

900 y 920 Isosapogenina (27)

R.M.N. de Hidrógeno:

| ppm       | Correspondiente a:             |
|-----------|--------------------------------|
| 0.8 - 1.1 | - CH <sub>3</sub> angulares    |
| 1.5 - 2.5 | - CH <sub>2</sub>              |
| 3.4       | - CH <sub>2</sub> -0-de azúcar |
| 4.1 - 5.2 | - CH-0-de azúcar               |
| 5.4       | - H-C=C-H                      |

Datos actuales:

p.f. = 263 - 4° C

$$[\alpha]_D^{23} = -94.3^\circ (\text{C} = 1.5 \text{ g } \%)$$

R.M.N. de <sup>13</sup>C: (espectro N°2)

Las asignaciones para la porción glucosídica se hicieron por comparación con los desplazamientos reportados para el metil-β-D-glucopiranosido,<sup>(23)</sup> datos obtenidos del espectro de la glucosa (espectro N°3) y por el cálculo de los efectos de substitución glucosídica.<sup>(21)</sup> Resultado:

| C | * t   | GI-A t |
|---|-------|--------|
| 1 | 104.2 | 102.6  |
| 2 | 74.1  | 75.3   |
| 3 | 76.9  | 78.4   |
| 4 | 70.7  | 71.7   |
| 5 | 76.8  | 78.1   |
| 6 | 61.9  | 62.9   |

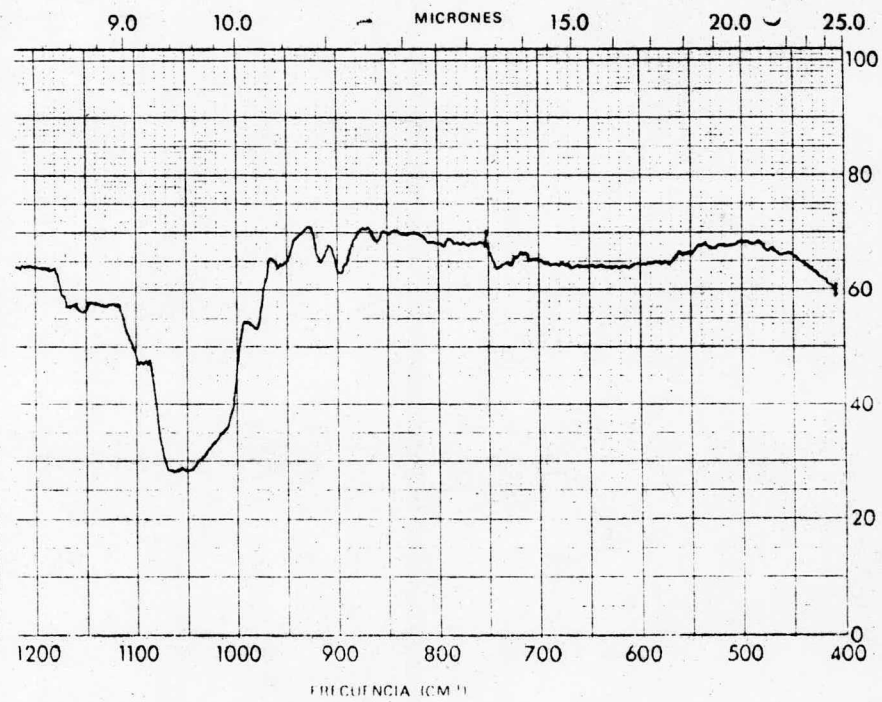
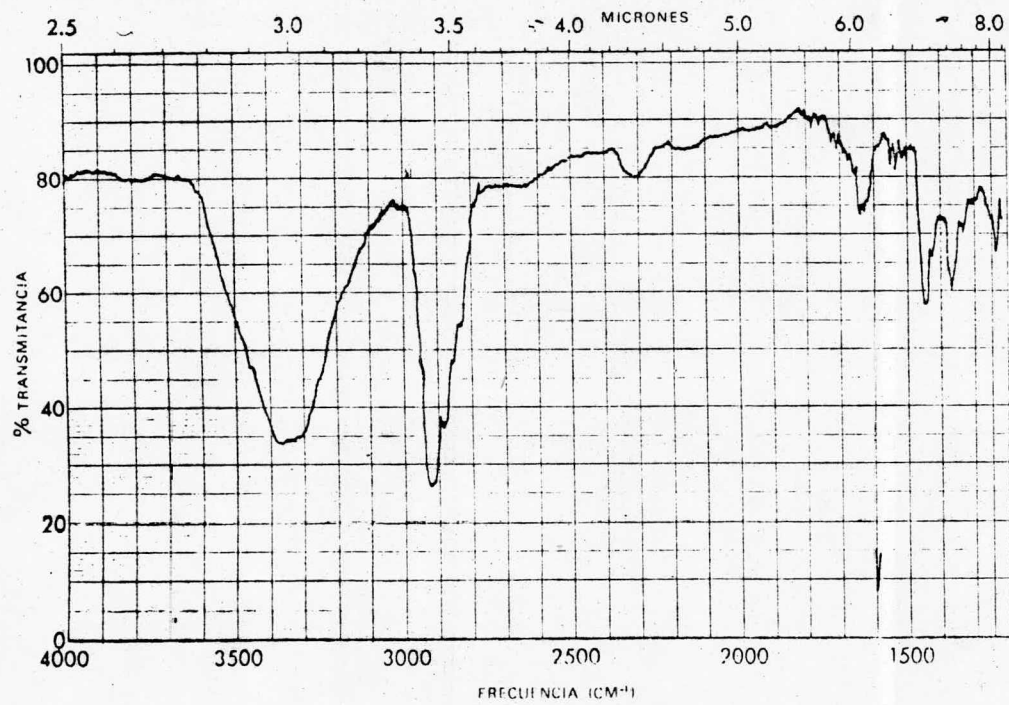
\* metil-β-D-glucopiranosido  
t en ppm a partir del TMS

Para el aglucón las asignaciones fueron hechas en base a los datos reportados en la literatura para Diosgenina (28) y los obtenidos de Ciba-Geigy LTD (Suiza) para Diosgenina, yamogenina y penogenina (Espectros N°4,5 y 6 respectivamente), ver tabla N°.2.

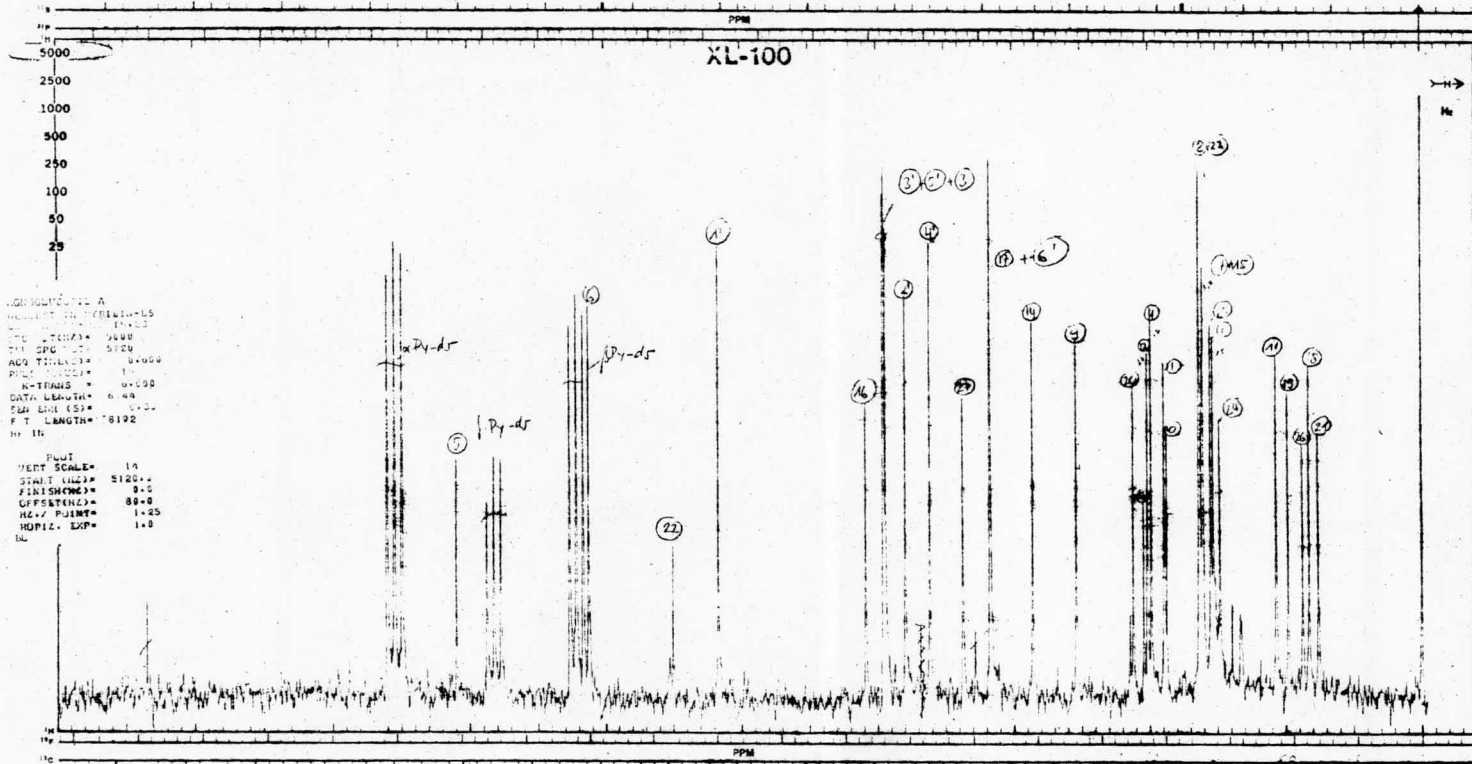
TABLA N° 2

| C  | Diosg.*<br>EGGERT | Diosg.*<br>UNAM | Yamog.*<br>UNAM | Pennog.*<br>UNAM | GL-A* | Ac-A* |
|----|-------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------|-------|
| 1  | 37.2              | 37.8            | 37.8            | 37.9             | 37.5  | 37.4  |
| 2  | 31.6              | 32.5            | 32.5            | 32.4             | 31.7  | 31.7  |
| 3  | 71.5              | 71.2            | 71.2            | 71.2             | 78.5  | 79.7  |
| 4  | 42.2              | 43.4            | 43.4            | 43.4             | 39.3  | 39.3  |
| 5  | 140.8             | 142.0           | 142.0           | 142.0            | 141.0 | 140.6 |
| 6  | 121.3             | 121.0           | 121.0           | 121.0            | 121.7 | 122.1 |
| 7  | 32.0              | 32.3            | 32.3            | 32.2             | 32.3  | 32.3  |
| 8  | 31.4              | 31.8            | 31.8            | 32.4             | 31.8  | 31.8  |
| 9  | 50.1              | 50.5            | 50.5            | 50.4             | 50.3  | 50.3  |
| 10 | 36.6              | 37.0            | 37.0            | 37.0             | 37.1  | 37.0  |
| 11 | 20.9              | 21.2            | 21.2            | 21.0             | 21.1  | 21.1  |
| 12 | 39.8              | 40.0            | 40.0            | 32.4             | 39.9  | 39.9  |
| 13 | 40.2              | 40.5            | 40.5            | 44.8             | 40.5  | 40.5  |
| 14 | 56.5              | 56.8            | 56.8            | 53.2             | 56.7  | 56.7  |
| 15 | 31.8              | 29.3            | 29.3            | 28.8             | 30.3  | 30.0  |
| 16 | 80.7              | 81.1            | 81.1            | 90.0             | 81.1  | 81.1  |
| 17 | 62.1              | 62.9            | 62.8            | 90.0             | 62.9  | 63.0  |
| 18 | 16.3              | 16.4            | 16.4            | 17.2             | 16.4  | 16.4  |
| 19 | 19.4              | 19.6            | 19.6            | 19.6             | 19.4  | 19.4  |
| 20 | 41.6              | 42.0            | 42.5            | 45.2             | 42.0  | 42.0  |
| 21 | 14.5              | 15.0            | 15.0            | 9.7              | 15.0  | 15.0  |
| 22 | 109.1             | 109.2           | 109.7           | 109.9            | 109.3 | 109.3 |
| 23 | 31.4              | 32.2            | 26.2            | 32.1             | 32.3  | 32.3  |
| 24 | 28.8              | 29.3            | 27.6            | 30.4             | 29.3  | 29.3  |
| 25 | 30.3              | 30.6            | 26.4            | 31.8             | 30.6  | 30.6  |
| 26 | 66.7              | 66.9            | 65.1            | 66.7             | 66.9  | 66.9  |
| 27 | 17.1              | 17.3            | 14.9            | 17.3             | 17.3  | 17.3  |

\* en ppm



ESPECTRO N° 1  
IR - GLUCOSIDO A LIBRE



MAGNETIC A  
 CHANNELS IN FIELD-LS  
 CHANNELS IN-LS  
 CPU TIME: 00:00  
 CPU SPC: 5120  
 ACO TIME: 0:00:00  
 PILE TIME: 0:00:00  
 N-TRANS: 0:00:00  
 DATA LENGTH: 648  
 SCA LEN (S): 1:2  
 F T LENGTH: 8192  
 H: 11  
 PLUT  
 VERT SCALE: 14  
 START (MHz): 5120  
 FINE SCANS: 8  
 OFFSET (Hz): 80.0  
 Hz/PRINT: 1.25  
 REPIC. EXP: 1.0

XL-100 SPECTRUM NO. **73089**  
 OBSERVE  LOCK   
 1H 100.1 MHz  1H 15.4 MHz   
 13C 94.1 MHz  HOMO   
 13P 40.5 MHz   
 13B 32.1 MHz   
 13C 25.2 MHz  INT   
 EXT

SAMPLE \_\_\_\_\_

SOLVENT Py-dr TEMP 20.0 °C  
 TUBE O.D. \_\_\_\_\_ mm SPIN RATE 100 rpm

OBSERVE  
 SWEEP WIDTH 6000 Hz TIME \_\_\_\_\_ sec  
 SWEEP OFFSET 322.1 Hz FROM \_\_\_\_\_  
 FILTER \_\_\_\_\_ Hz RF FIELD \_\_\_\_\_ dB  
 SPECTR. AMPL. 50 NO. OF SCANS \_\_\_\_\_

LOCK  
 SIGNAL Py-dr RF FIELD 15 dB

SPIN DECOUPLER  
 NUCLEUS 13C GYROCODE 13C  
 OFFSET 6500 Hz RF POWER 100 dB  
 NOISE BANDWIDTH 1600 Hz  
 INDR SWEEP WIDTH \_\_\_\_\_ Hz  
 OPERATOR \_\_\_\_\_ DATE 20/1/77

CHART S.100XL  
 PRINTED IN U.S.A.

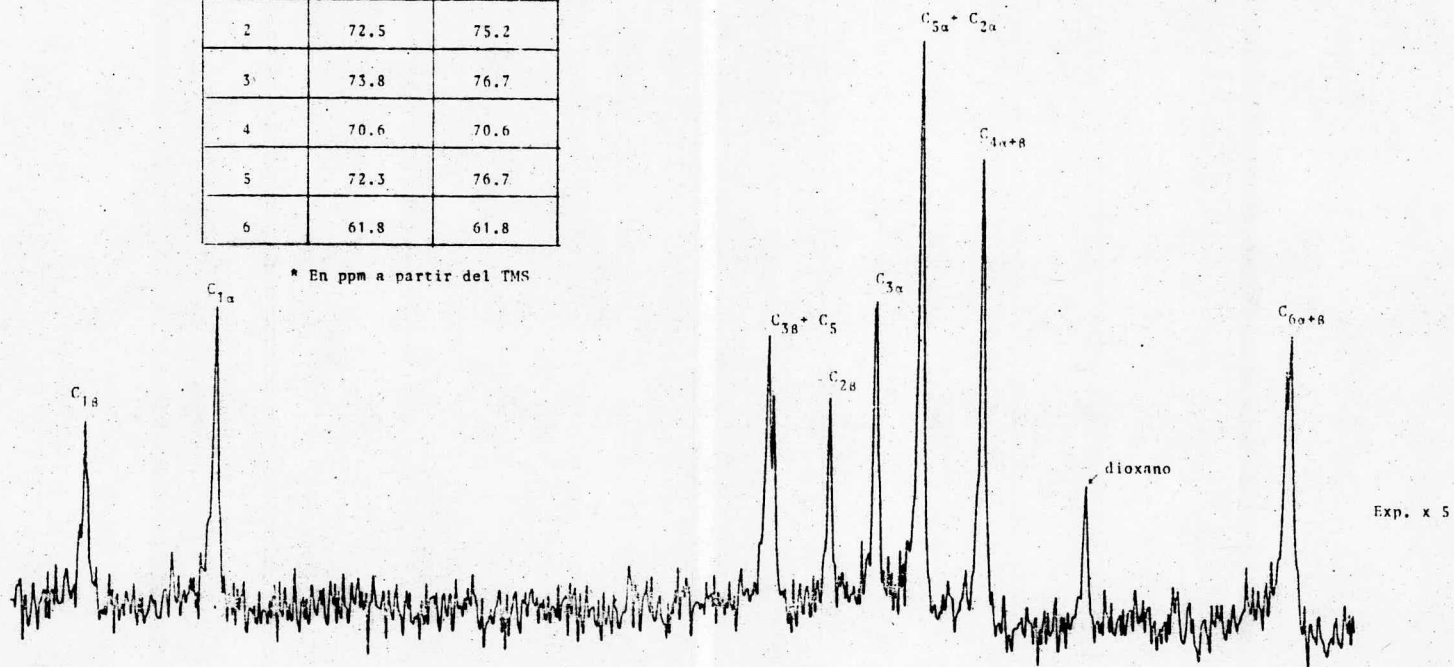
ESPECTRO N° 2  
 R.M.N. <sup>13</sup>C GLUCOSIDO A LIBRE



RMN -  $^{13}\text{C}$  - GLUCOSA

| C | $\alpha^*$ | $\beta^*$ |
|---|------------|-----------|
| 1 | 93.0       | 96.8      |
| 2 | 72.5       | 75.2      |
| 3 | 73.8       | 76.7      |
| 4 | 70.6       | 70.6      |
| 5 | 72.3       | 76.7      |
| 6 | 61.8       | 61.8      |

\* En ppm a partir del TMS



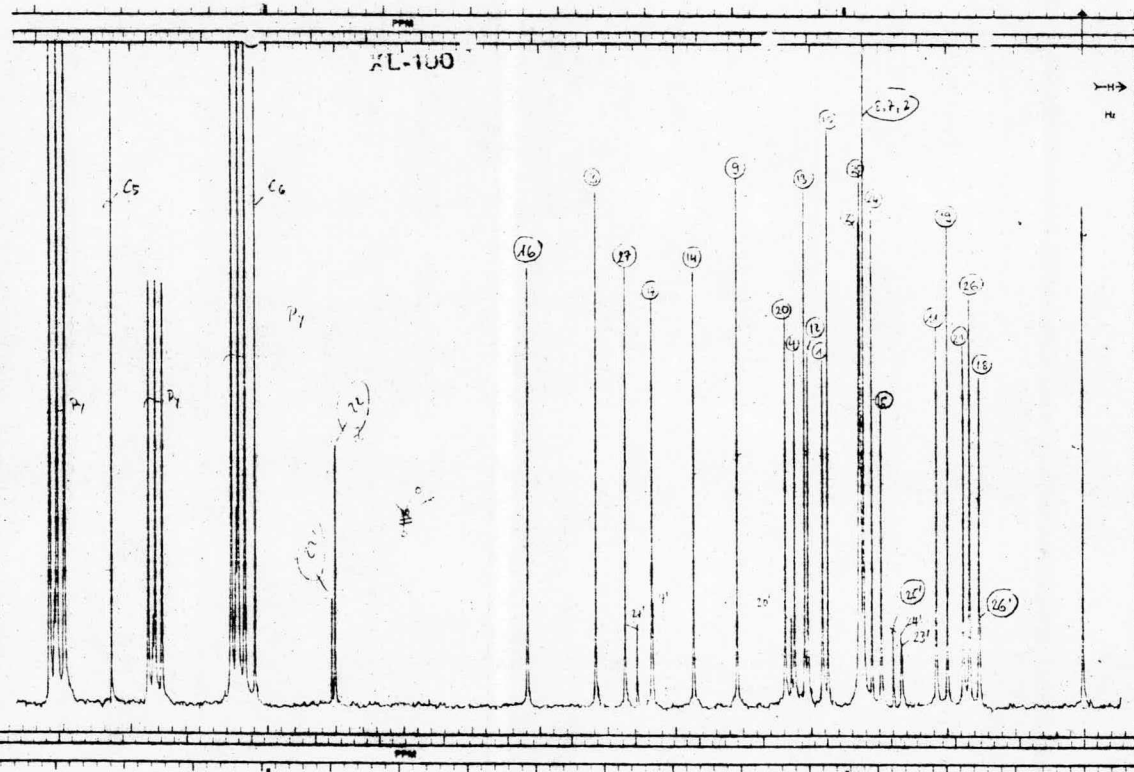
ESPECTRO N° 3

R.M.N.  $^{13}\text{C}$  GLUCOSA

1  
2500  
1000  
500  
250  
100  
50  
25

XL-100

| MG. | INT. | OFFSET(CH2) | PPM     |
|-----|------|-------------|---------|
| 1   | 234  | 3796.6      | 159.934 |
| 2   | 41   | 3796.2      | 159.193 |
| 3   | 940  | 3769.4      | 149.855 |
| 4   | 238  | 3748.5      | 148.781 |
| 5   | 238  | 3578.5      | 142.823 |
| 6   | 146  | 3434.3      | 136.819 |
| 7   | 33   | 3416.4      | 135.819 |
| 8   | 146  | 3409.2      | 135.533 |
| 9   | 145  | 3384.4      | 134.749 |
| 10  | 258  | 3131.6      | 124.497 |
| 11  | 73   | 3114.3      | 123.797 |
| 12  | 265  | 3106.7      | 123.507 |
| 13  | 255  | 2981.7      | 122.513 |
| 14  | 219  | 3043.7      | 121.003 |
| 15  | 39   | 2769.2      | 107.742 |
| 16  | 91   | 2748.1      | 107.251 |
| 17  | 151  | 2241.1      | 91.145  |
| 18  | 174  | 1799.2      | 71.168  |
| 19  | 151  | 1684.6      | 66.891  |
| 20  | 31   | 1637.5      | 65.898  |
| 21  | 141  | 1583.9      | 62.969  |
| 22  | 37   | 1508.1      | 62.016  |
| 23  | 158  | 1425.6      | 56.837  |
| 24  | 181  | 1272.1      | 50.492  |
| 25  | 135  | 1091.7      | 43.402  |
| 26  | 33   | 1068.8      | 42.491  |
| 27  | 123  | 1057.8      | 42.324  |
| 28  | 177  | 1019.8      | 40.945  |
| 29  | 182  | 1016.7      | 40.822  |
| 30  | 120  | 981.8       | 37.848  |
| 31  | 198  | 932.5       | 37.071  |
| 32  | 167  | 819.5       | 32.541  |
| 33  | 183  | 813.7       | 32.350  |
| 34  | 166  | 811.2       | 32.258  |
| 35  | 238  | 688.5       | 31.423  |
| 36  | 170  | 772.1       | 30.615  |
| 37  | 124  | 736.6       | 29.285  |
| 38  | 206  | 623.6       | 27.575  |
| 39  | 244  | 615.4       | 26.426  |
| 40  | 24   | 659.8       | 26.234  |
| 41  | 131  | 534.5       | 21.232  |
| 42  | 166  | 493.7       | 19.428  |
| 43  | 123  | 438.1       | 17.738  |
| 44  | 141  | 412.7       | 16.496  |
| 45  | 115  | 377.6       | 15.019  |
| 46  | 32   | 374.8       | 14.870  |
| 47  | 172  | 1.0         | 0.000   |



XL-100 SPECTRUM NO. 2623

OBSERVE LOCK  
 H. 100.1 MHz  H. 15.4 MHz   
 19. 94.1 MHz  HOMO   
 31. 40.5 MHz   
 11. 32.1 MHz   
 12. 25.2 MHz  NT

VERS. NO. L-10919-20  
 GELDEST IN P.Y. 05  
 CL. HOURS 15.30  
 SPC. VOLTAGE 5000  
 SPC. WDT. 5100  
 ACW. TIME(S) 0.000  
 PULS. DLY(S) 1.000  
 PULS. VERT(S) 25  
 TRANS. 30.000  
 DATA LENGTH 8192  
 SEN. LVL(S) 8.70  
 T. 7.000000 8192  
 HF 10

PLOT  
 VERT SCALE 25  
 START (HZ) 5120.0  
 FINISH (HZ) 8.0  
 OFFSET (HZ) 137.5  
 HZ./POINT 1.05  
 NOISE EXP. 1.0

SOLVENT  $\text{D}_2\text{O}$  TEMP. 20.00  
 TUBE O.D. 12 mm SPIN RATE 20 rpm

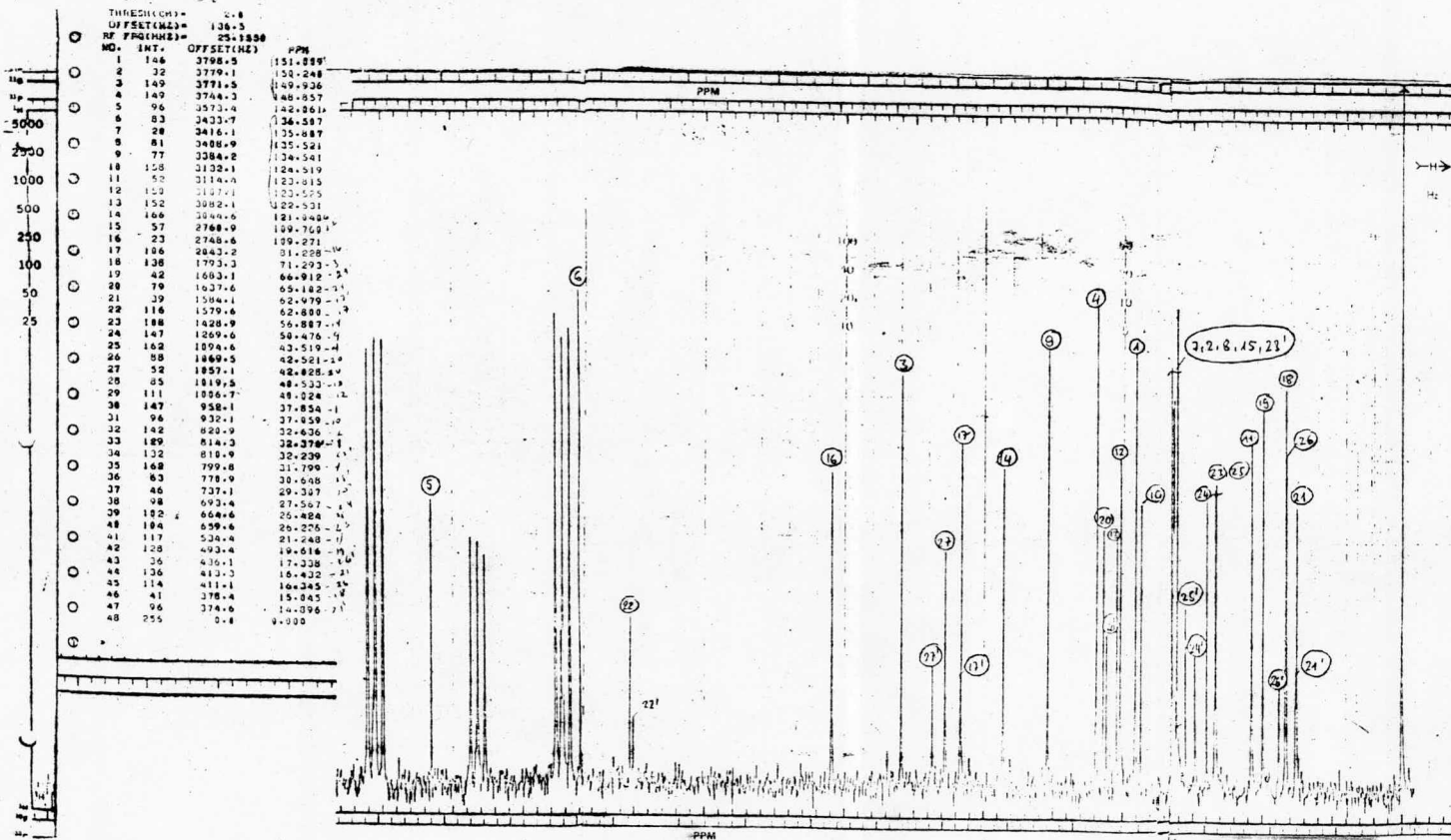
OBSERVE  
 SWEEP WIDTH 5000 Hz TIME \_\_\_\_\_ sec  
 SWEEP OFFSET 2257 Hz from \_\_\_\_\_  
 FILTER 4 Hz RF FIELD \_\_\_\_\_ dB  
 SPECTR. AMPL. 90 NO. OF SCANS \_\_\_\_\_

LOCK  
 SIGNAL  $\text{P}_2=1$  RF FIELD 10 dB

SPIN DECOUPLER  
 NUCLEUS  $^1\text{H}$  GYROCODE  $\text{ON}$   
 OFFSET 4022 Hz RF POWER Full dB  
 NOISE BANDWIDTH 4000 Hz  
 INDR SWEEP WIDTH \_\_\_\_\_ Hz  
 OPERATOR R DATE 12/24

CHART S-100XL  
 PRINTED IN U.S.A.

ESPECTRO N° 4  
 R.M.N.  $^{13}\text{C}$  DIOSGENINA



XL-100 SPECTRUM NO. 71696

OBSERVE  LOCK

<sup>1</sup>H - 100.1 MHz  <sup>1</sup>H - 15.4 MHz

<sup>13</sup>C - 94.1 MHz  HOMO

<sup>13</sup>C - 40.5 MHz

<sup>13</sup>C - 32.1 MHz

<sup>13</sup>C - 25.2 MHz  INT

EXT

SAMPLE YAMAGENIN

15 MGR IN 0.4 ML PY-05

CL. HOURS = 18.60

SFC VDT(HZ) = 5000

TRU SPC VDT = 5128

ACC TIME(S) = 0.800

PULS WID(US) = 20

X-TRANS = 90.000

DATA LENGTH = 8192

SEN ENH (S) = 0.60

F T LENGTH = 8192

HF IN

PLOT

VERT SCALE = 25

START (HZ) = 5120.0

FINISH (HZ) = 5120.0

OFFSET(HZ) = 136.5

HEAT POINT = 1.25

HORIZ. EXP = 1.0

SOLVENT Pyrid TEMP. Room

TUBE O.D. 5 mm SPIN RATE 30 rpm

OBSERVE

SWEEP WIDTH 5000 Hz TIME \_\_\_\_\_ sec

SWEEP OFFSET 2158 Hz from \_\_\_\_\_

FILTER \_\_\_\_\_ Hz RF FIELD \_\_\_\_\_ dB

SPECTR. AMPL. 40 NO. OF SCANS \_\_\_\_\_

LOCK

SIGNAL Pyrid RF FIELD 65 dB

SPIN DECOUPLER

NUCLEUS 13C GYROCODE 13C

OFFSET 436.1 Hz RF POWER 100 dB

NOISE BANDWIDTH \_\_\_\_\_ Hz

INOUR SWEEP WIDTH \_\_\_\_\_ Hz

OPERATOR BA DATE 060271

CHART S-100XL PRINTED IN U.S.A.

ESPECTRO N° 5  
 R.M.C. <sup>13</sup>C YAMAGENINA

XL-100 SPECTRUM NO. 71653

OBSERVE LOCK  
 1H - 100.1 MHz  1H - 15.4 MHz   
 13C - 94.1 MHz  HOMO -   
 13C - 40.5 MHz   
 13C - 32.1 MHz   
 13C - 25.2 MHz  INT

DR. SIKEMEIER  
 VERS. NO. L-452  
 100 MGR IN 5 ML PY-D5  
 CL. HOURS 18-00  
 SPC VDT(HZ) 5000  
 TRU SPC VDT 5120  
 ACC TIME(S) 0-000  
 PULS OLTS(C) 0-500  
 PULS VDU(S) 25  
 K-TRANS 50-000  
 DATA LENGTH 8192  
 SEN ENH (S) 0.68  
 F T LENGTH 8192  
 HF IN

PLOT  
 VERT SCALE 39  
 START (HZ) 5120.0  
 FINE SCHE 2.8  
 OFFSET(HZ) 136.4  
 HZ / POINT 1.25  
 HORIZ. EXP 1.0

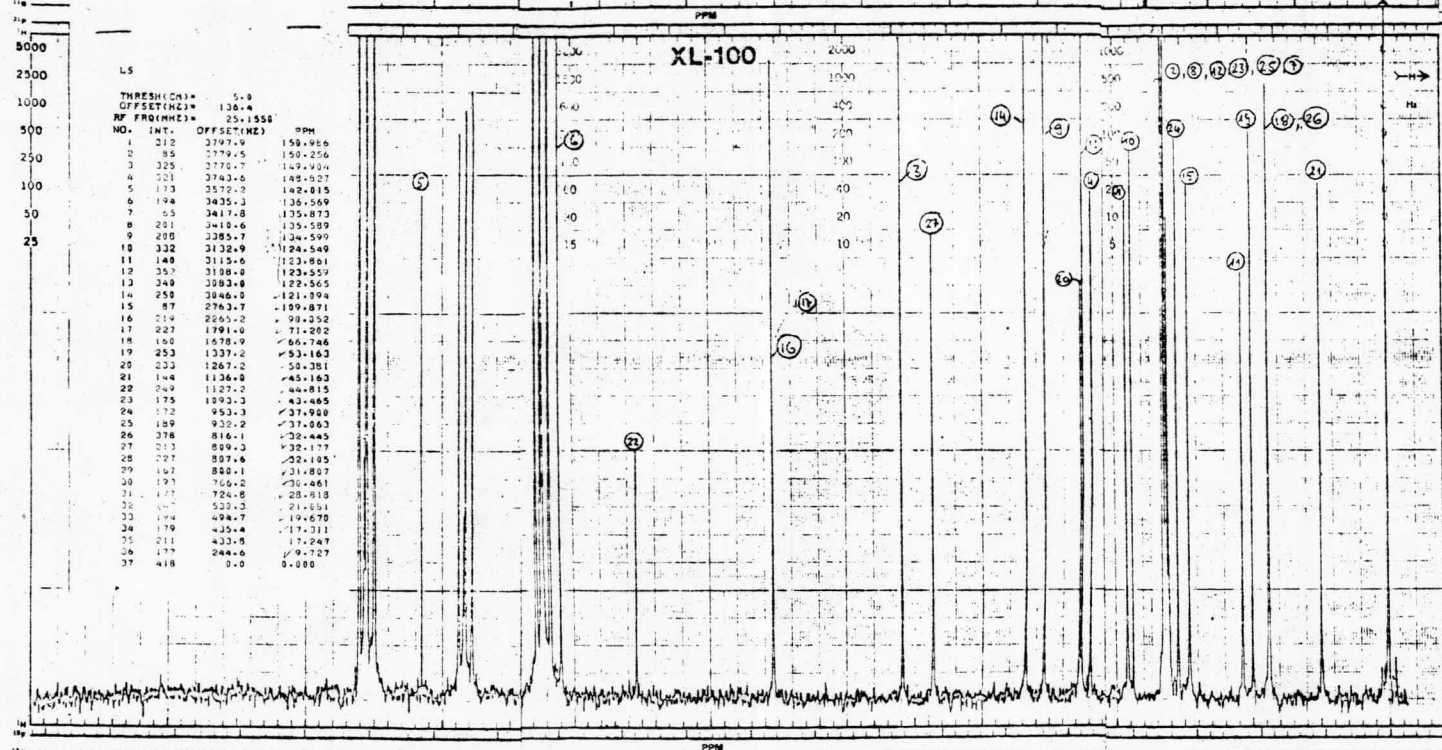
SOLVENT Py-d5 TEMP Room  
 TUBE O.D. 12 mm SPIN RATE 12 rpm

OBSERVE  
 SWEEP WIDTH 5000 Hz TIME \_\_\_\_\_ sec  
 SWEEP OFFSE 8192 Hz FROM \_\_\_\_\_  
 FILTER Y Hz RF FIELD \_\_\_\_\_ dB  
 SPECTR. AMPL 50 NO. OF SCANS \_\_\_\_\_

LOCK  
 SIGNAL Py-d5 RF FIELD 21 dB

SPIN DECOUPLER  
 NUCLEUS 13C GYROCODE 13C  
 OFFSET 4.078 Hz RF POWER 60.0 dB  
 NOISE BANDWIDTH 4000 Hz  
 INDOOR SWEEP WIDTH \_\_\_\_\_ Hz  
 OPERATOR DATE 12.01.79

CHART S-100XL  
 PPM



L5

THRESHOLD = 5.0  
 OFFSET(HZ) = 136.4  
 RF FREQ(HZ) = 25.1550

| NO. | INT. | OFFSET(HZ) | PPM     |
|-----|------|------------|---------|
| 1   | 212  | 3797.9     | 150.488 |
| 2   | 85   | 3779.5     | 150.256 |
| 3   | 325  | 3770.7     | 149.904 |
| 4   | 221  | 3743.6     | 148.827 |
| 5   | 173  | 3572.2     | 142.815 |
| 6   | 194  | 3435.3     | 136.569 |
| 7   | 55   | 3417.8     | 135.873 |
| 8   | 261  | 3410.6     | 135.589 |
| 9   | 208  | 3285.7     | 134.599 |
| 10  | 332  | 3132.9     | 124.549 |
| 11  | 140  | 3115.6     | 123.801 |
| 12  | 357  | 3108.0     | 123.554 |
| 13  | 340  | 3083.0     | 122.565 |
| 14  | 258  | 3046.0     | 121.094 |
| 15  | 87   | 2763.7     | 109.871 |
| 16  | 219  | 2695.2     | 99.052  |
| 17  | 227  | 1791.0     | 71.202  |
| 18  | 160  | 1578.9     | 66.746  |
| 19  | 253  | 1337.2     | 53.163  |
| 20  | 233  | 1267.2     | 50.351  |
| 21  | 144  | 1136.0     | 45.163  |
| 22  | 249  | 1127.2     | 44.815  |
| 23  | 175  | 1093.3     | 43.405  |
| 24  | 172  | 953.3      | 37.958  |
| 25  | 189  | 932.2      | 37.063  |
| 26  | 376  | 816.1      | 32.445  |
| 27  | 213  | 809.3      | 32.177  |
| 28  | 227  | 807.4      | 32.145  |
| 29  | 167  | 800.1      | 31.807  |
| 30  | 171  | 766.2      | 30.461  |
| 31  | 177  | 724.8      | 28.918  |
| 32  | 167  | 520.3      | 21.051  |
| 33  | 194  | 494.7      | 19.670  |
| 34  | 179  | 435.4      | 17.311  |
| 35  | 121  | 433.5      | 17.247  |
| 36  | 177  | 244.6      | 9.727   |
| 37  | 418  | 0.0        | 0.000   |

ESPECTRO N° 6  
 R.M.N. <sup>13</sup>C PENOGENINA

A.3.b.- Derivado peracetilado: 85 mg de glucósido A disueltos en 0.5 ml de piridina anhidra se acetilan con 1.5 ml de anhídrido acético con agitación a temperatura ambiente por 24 hrs. y 15 min. a reflujo; el peracetato se obtiene por precipitación sobre agua fría (20 ml). Después de 3 recristalizaciones de metanol presenta las siguientes constantes físicas:

### GLUCOSIDO A PERACETILADO

Datos obtenidos anteriormente<sup>(26)</sup>

p.f. = 208-10°C

$[\alpha]_D^{24} = -89.8^\circ$  (c=10% en g)

Fórmula:  $C_{41}H_{60}O_{12}$  P.M. = 744.93

Análisis elemental:

|             | % C   | % H  | % O   |
|-------------|-------|------|-------|
| calculado:  | 66.10 | 8.11 | 25.77 |
| encontrado: | 66.64 | 8.27 | 25.24 |

Infrarojo: (espectro N°7)

| Bandas ( $cm^{-1}$ ) | Correspondiente a: |
|----------------------|--------------------|
| 2980                 | - $CH_3$ , $CH_2$  |
| 1750                 | - C=O de ester     |
| 1650                 | c = c              |

R.M.N. de Hidrógeno:

| ppm       | Correspondiente a:                         |
|-----------|--|
| 0.5-0.9   | - $CH_3$ angulares ( $C_{21}$ y $C_{27}$ ) |
| 0.88-1.01 | - $CH_3$ angulares ( $C_{18}$ y $C_{19}$ ) |
| 2.1 -3.0  | cuatro señales de acetatos                 |
| 3.4       | - $CH_2$ -O-de azúcar                      |
| 4.1-5.1   | -CH-O-de azúcar                            |
| 5.4       | H C=C H                                    |

Datos actuales:

p.f. = 203-5°C

R.M.N. de  $^{13}\text{C}$ : (espectro N°8)

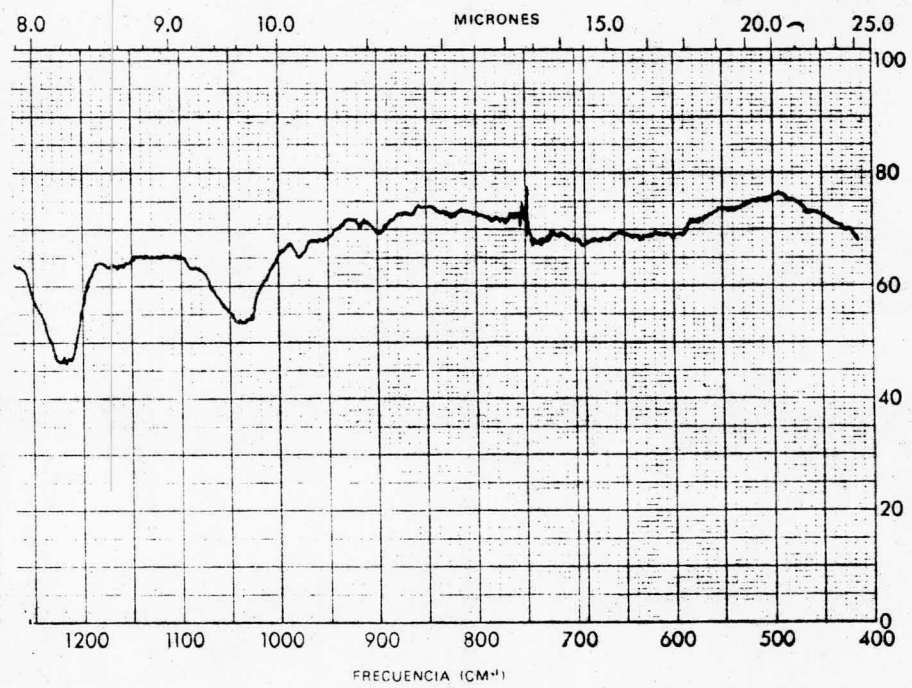
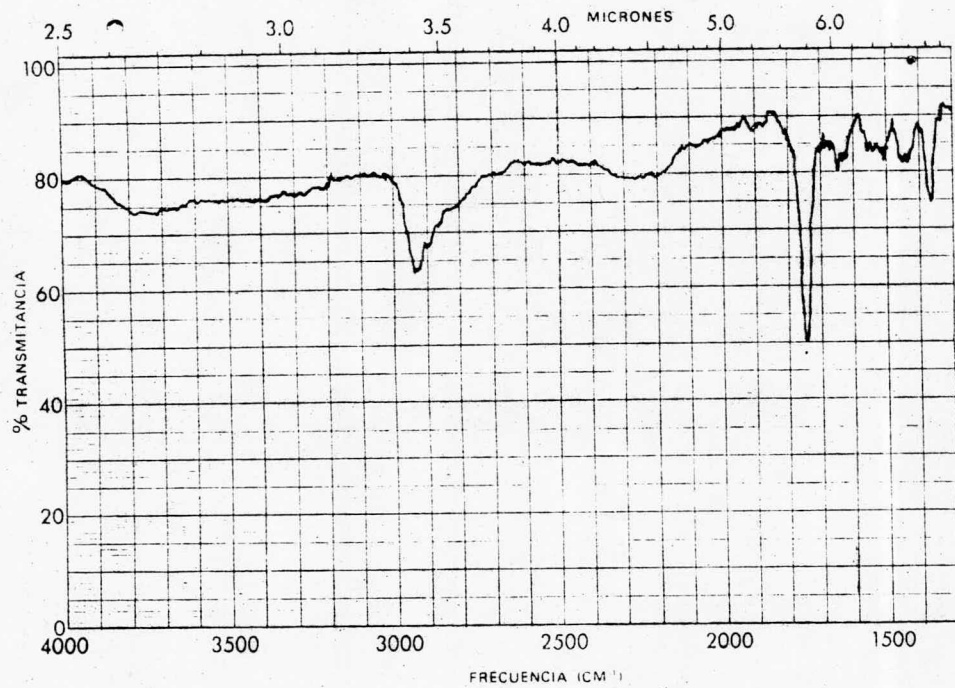
Las asignaciones para la porción glucosídica se hicieron por comparación con los desplazamientos reportados para el metil- $\beta$ -D-glucopiranosido <sup>(23)</sup> y por el cálculo de los efectos de substitución glucosídica <sup>(21)</sup> Resultado:

| C | * t   | AcG1-A t |
|---|-------|----------|
| 1 | 104.2 | 99.8     |
| 2 | 74.1  | 72.2     |
| 3 | 76.9  | 72.3     |
| 4 | 70.7  | 69.3     |
| 5 | 76.8  | 73.6     |
| 6 | 61.9  | 62.5     |

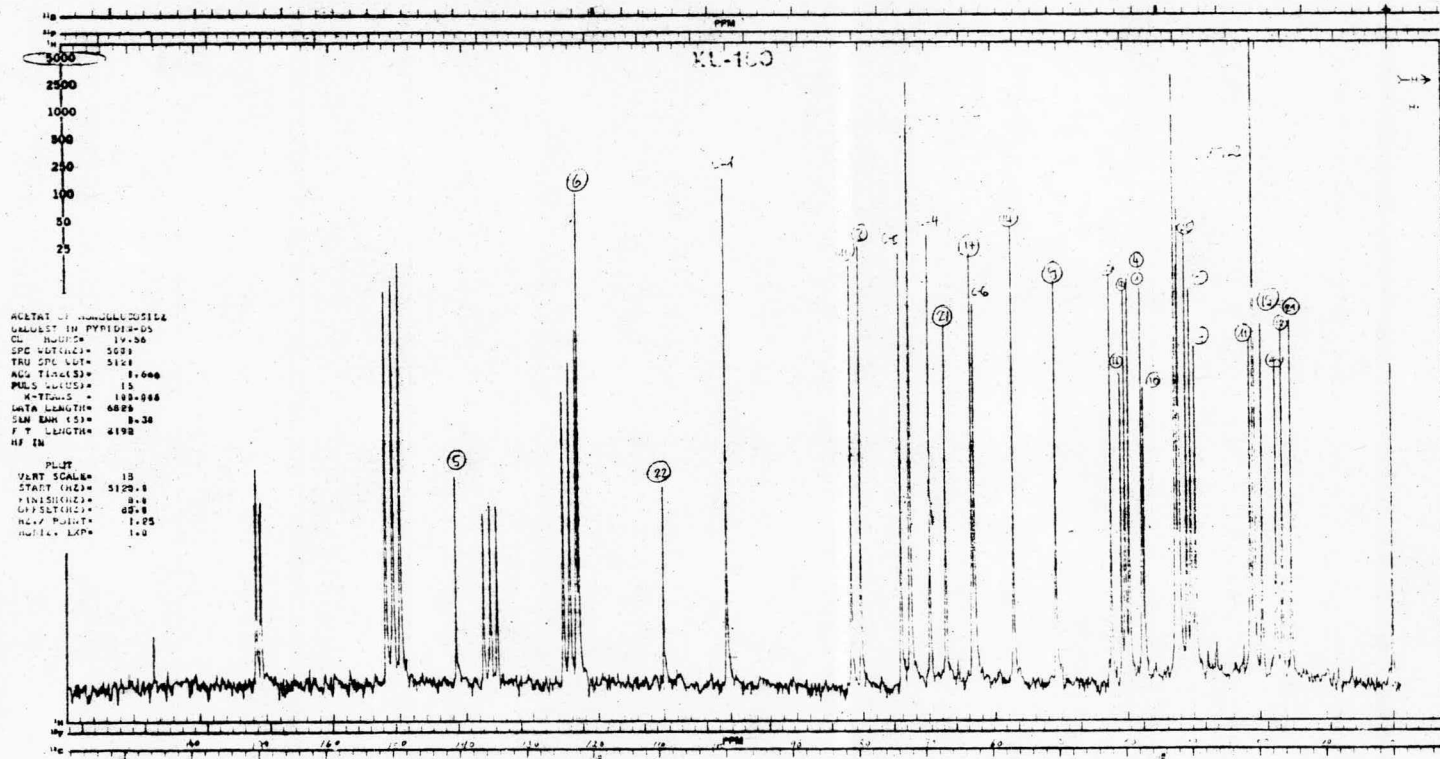
\* metil- $\beta$ -D-glucopiranosido

t en ppm a partir del TMS

Para los valores correspondientes al aglucon ver la tabla N°2.



ESPECTRO N° 7  
 IR - GLUCOSIDO A PERACETILADO



ACETAT DE MONOGLUCOSIDA  
 SOLUCIÓ EN PIRIDINA-D5  
 CL. NÚMERO 19-36  
 SPC. NÚMERO 5089  
 TRU. SPC. LUT. 5124  
 ACQ. TIME(S) 1.000  
 PULS. CANTIDAD 15  
 N-TICMS 100-066  
 DATA LENGTH 6829  
 SW. BWH. (S) 8-30  
 F. T. LENGTH 2192  
 HF IN  
 PULS.  
 VERT. SCALE 18  
 START (HZ) 5120.8  
 FINISH (HZ) 0.0  
 OFFSET (HZ) 00.0  
 RES. POINT 1.25  
 RES. LXP 1.0

XL-100 SPECTRUM NO. 33087  
 OBSERVE  LOCK   
<sup>1</sup>H - 100.1 MHz  <sup>2</sup>H - 15.4 MHz   
<sup>13</sup>C - 94.1 MHz  HOMO   
<sup>31</sup>P - 40.5 MHz   
<sup>15</sup>N - 32.1 MHz   
<sup>19</sup>F - 25.2 MHz  INT   
 EXT   
 SAMPLE -----

SOLVENT Pyr-d5 TEMP. Room  
 TUBE O.D. 5 mm SPIN RATE 30 rpm  
 OBSERVE  
 SWEEP WIDTH 5000 Hz TIME ----- sec  
 SWEEP OFFSET 2211 Hz from -----  
 FILTER Y Hz RF FIELD ----- dB  
 SPECTR. AMPL. 70 NO. OF SCANS -----  
 LOCK  
 SIGNAL Pyr-d RF FIELD 10 dB  
 SPIN DECOUPLER  
 NUCLEUS 13C GYROCODE 13C  
 OFFSET 6500 Hz RF POWER Full dB  
 NOISE BANDWIDTH 1600 Hz  
 INDR. SWEEP WIDTH ----- Hz  
 OPERATOR B DATE 12/17

CHART S-100XL  
 PRINTED IN U.S.A.

ESPECTRO Nº 8  
 R.M.N. <sup>13</sup>C GLUCOSIDO A PERACETILADO



A.3.c.- Prueba para azúcares reductores:

Aproximadamente 1mg del glucósido A es mezclado con 0.1 ml de reactivo de Fehling y la mezcla se calienta en baño de agua por 5 minutos. Resultado = negativo.

A.3.d.- Cuantificación de Azúcares.

100 mg del glucósido A fueron hidrolizados totalmente con 0.3 ml de HCl concentrado y 6.6 ml de etanol (95%) a reflujo por 6 hr. El aglucón se separó por precipitación con agua fría; después de filtrar, las aguas que resultan fueron aforadas a un volumen de 25 ml.

Método.- Oxidación con dicromato de potasio y titulación del dicromato residual con tiosulfato de sodio.

A una alicuota de 1 ml se le añaden 25 ml de dicromato de potasio 0.01N y 5 ml de ácido sulfúrico 7% calentando en baño de agua durante 1 hr. Al enfriar a temperatura ambiente se agregan 20ml de agua destilada y 5 ml de yoduro de potasio 5%; después de exactamente 20 minutos de estar en reposo y en la obscuridad el exceso de dicromato es titulado con tiosulfato de sodio 0.01N. La curva estandar para hacer la interpolación fue preparada usando glucosa procesada de la forma descrita en un rango de concentraciones comprendido entre 1 y 3 mg.

Resultado:

Valor promedio encontrado = 29 mg/100mg de muestra

Valor calculado para un glucósido de Diosgenina con:

a) Una molécula de glucosa = 31.23 mg %

b) Dos moléculas de glucosa = 48.50 mg %

A.3.e.- Rotación Óptica.- Determinación del Enlace anomérico:  
El carácter del enlace anomérico puede establecerse aplicando  
la regla de Klyne de diferencias de rotación molecular<sup>(24)</sup>.

Siguiendo el procedimiento de cálculo descrito en la parte - -  
teórica para éste método (pág.25) se obtienen los resultados -  
de la tabla N°3.

TABLA N° 3

DIFERENCIAS DE ROTACION MOLECULAR

| Comp. | P.M.   | $[\alpha]$ | $[M]_D$ | $\Delta C$ | $\Delta [M]_D$ | E        |
|-------|--------|------------|---------|------------|----------------|----------|
| DIOSG | 414.61 | -121.0     | -501.67 |            |                |          |
| GL. A | 576.74 | -94.3      | -543.86 | - 42.19    | +23.81         | $\beta$  |
| GL. B | 722.88 | -95.3      | -688.90 | -145.04    | -34.04         | $\alpha$ |
|       |        | -89.0      | -643.36 | - 99.50    | +11.40         | $\alpha$ |
|       |        | -81.0      | -585.53 | - 41.67    | +69.33         | $\alpha$ |

E = Enlace anomérico

$[M]_D$  de metilglucósidos:

$\alpha$  -metil-D-glucopiranosido = +309°

$\beta$  -metil-D-glucopiranosido = - 66°

$\alpha$  -metil-L-ramnopiranosido = -111°

$\beta$  -metil-L-ramnopiranosido = +170

Tomados de: Kawasaki, T. and T. Yamauchi, Chem. Pharm. Bull., 10, 703 (1962).

TABLA N° 4

| C  | GL-A* | GL-B* | GL-D* | Ac.-D* |
|----|-------|-------|-------|--------|
| 1  | 37.5  | 37.4  | 37.5  | 37.4   |
| 2  | 31.7  | 31.6  | 31.7  | 31.7   |
| 3  | 78.5  | 78.4  | 78.7  | 78.4   |
| 4  | 39.3  | 39.2  | 39.0  | 38.5   |
| 5  | 141.0 | 140.9 | 140.9 | 140.4  |
| 6  | 121.7 | 121.7 | 121.8 | 122.5  |
| 7  | 32.3  | 32.2  | 32.2  | 32.3   |
| 8  | 31.8  | 31.6  | 31.8  | 31.8   |
| 9  | 50.3  | 50.2  | 50.4  | 50.3   |
| 10 | 37.1  | 37.0  | 37.1  | 37.1   |
| 11 | 21.1  | 21.1  | 21.1  | 21.5   |
| 12 | 39.9  | 39.9  | 39.9  | 39.9   |
| 13 | 40.5  | 40.4  | 40.4  | 40.5   |
| 14 | 56.7  | 56.6  | 56.7  | 56.6   |
| 15 | 30.3  | 30.2  | 30.2  | 29.9   |
| 16 | 81.1  | 81.1  | 81.1  | 81.1   |
| 17 | 62.9  | 62.8  | 62.9  | 62.9   |
| 18 | 16.4  | 16.3  | 16.3  | 16.4   |
| 19 | 19.4  | 19.4  | 19.4  | 19.4   |
| 20 | 42.0  | 41.9  | 42.0  | 42.0   |
| 21 | 15.0  | 15.0  | 15.0  | 15.0   |
| 22 | 109.3 | 109.4 | 109.3 | 109.3  |
| 23 | 32.3  | 32.2  | 32.3  | 32.3   |
| 24 | 29.3  | 29.2  | 29.3  | 29.3   |
| 25 | 30.6  | 30.5  | 30.6  | 30.6   |
| 26 | 66.9  | 66.9  | 66.9  | 66.9   |
| 27 | 17.3  | 17.3  | 17.3  | 17.3   |

\* en ppm

#### A.4.- Glucósido B

A.4.a.- Aislamiento: 5 g de espirostanoles totales fueron sometidos a cromatografía en columna con gel de sílice como soporte en una proporción glucósido: gel de 1:300 eluyendo con el sistema de disolventes N°2, colectando un volumen muerto de 1.5 l y fracciones de 50 ml. Las dimensiones de la columna fueron: longitud = 100 cm, diámetro interno = 7 cm.

Después de evaporar a sequedad en un rotavapor a vacío las fracciones correspondientes a este compuesto (63-90) dan un peso total de 2.3594 g que representan el 47.19% de la mezcla total de espirostanoles. Una vez recristalizado de metanol acuoso presenta las siguientes constantes físicas:

#### GLUCOSIDO B LIBRE

Datos obtenidos anteriormente: (7)

p.f. = 210°

$[\alpha]_D^{20} = -81^\circ$  (Piridina)

Composición: 1 mol de Diosgenina, 1 mol de glucosa y 1 mol de ramnosa.

Fórmula:  $C_{39}H_{62}O_{13} \cdot CH_3OH$  P.M. = 770.96

(con 2 mol. de glucosa)

Análisis elemental:

|             | % C   | % H  | % O   |
|-------------|-------|------|-------|
| calculado:  | 62.31 | 8.62 | 29.05 |
| encontrado: | 62.06 | 8.68 | 29.17 |

Infrarojo: (ver espectro en rf.7)

Bandas ( $cm^{-1}$ ): correspondiente a:

|           |                   |
|-----------|-------------------|
| 3400      | - OH              |
| 1650      | c = c             |
| 895 y 920 | isosapogenina(27) |

R.M.N. H : (ver espectro en ref.7)

"No es muy significativo por la presencia de gran cantidad de oxhidrilos, sólo es posible observar el perfil característico de una sapogenina esteroide".

Datos actuales:

p.f. = 230 -31°C

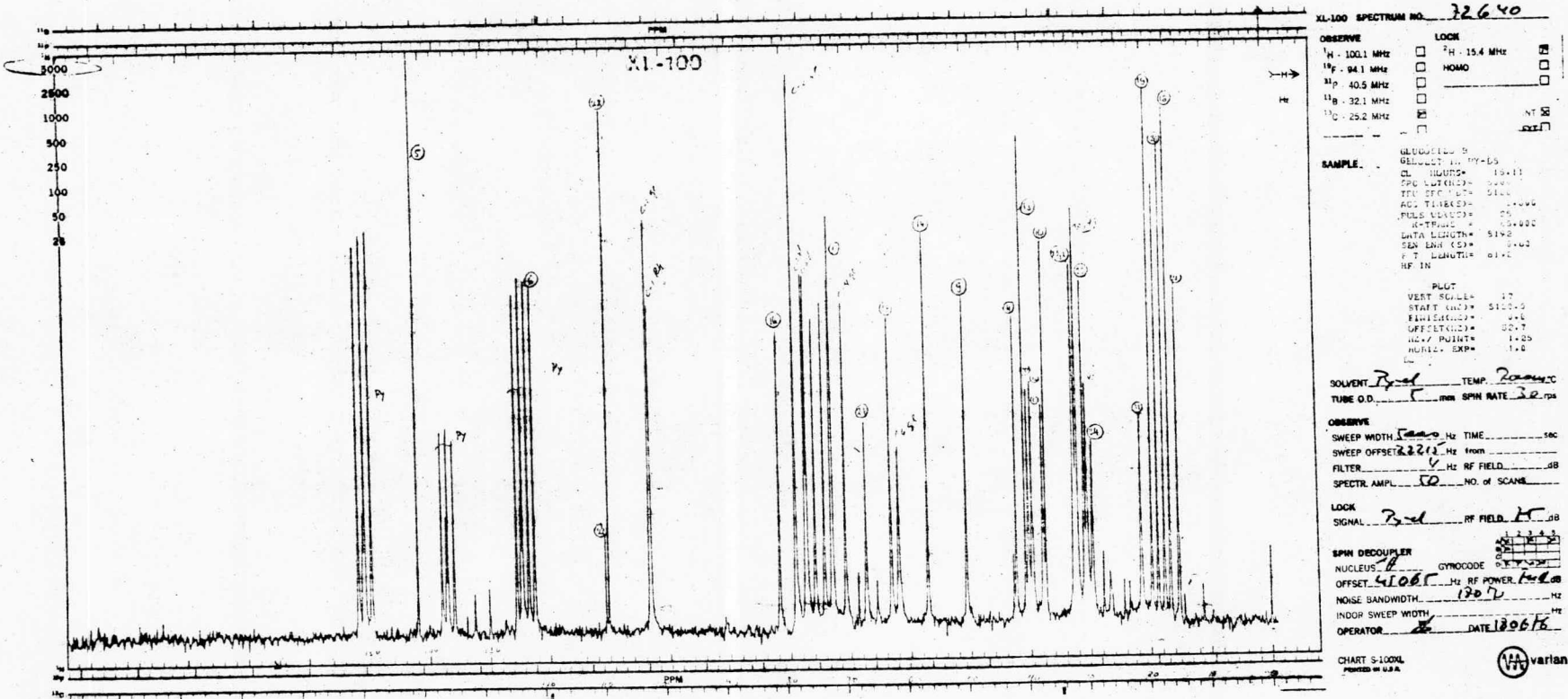
$[\alpha]_D^{23} = -89^\circ$  (Piridina)  
 $-95.3^\circ$  (CHCl<sub>3</sub> / MeOH)

R.M.N.-<sup>13</sup>C: (espectro N°9)

Las asignaciones se hicieron por comparación tomando como referencia los desplazamientos obtenidos para el glucósido A y los reportados para la ramnosa<sup>(23)</sup> (espectro N°10). Resultado:

| C | G1-A  | Glucósido - B |         | Ramnosa |      |
|---|-------|---------------|---------|---------|------|
|   |       | Glucosa       | Ramnosa | α       | β    |
| 1 | 102.6 | 102.5         | 102.3   | 94.9    | 94.5 |
| 2 | 75.3  | 75.2          | 72.5    | 71.9    | 72.3 |
| 3 | 78.4  | 76.7          | 70.2    | 70.8    | 73.9 |
| 4 | 71.7  | 78.4          | 73.7    | 73.2    | 72.8 |
| 5 | 78.1  | 76.5          | 70.2    | 69.1    | 72.8 |
| 6 | 62.9  | 61.4          | 18.3    | 17.8    | 17.8 |

Para la asignación de las señales del aglucón se hizo la comparación con los desplazamientos del glucósido A, ver tabla N°4.



X1-100 SPECTRUM NO. 32640

OBSERVE      LOCK  
 1H - 100.1 MHz       2H - 15.4 MHz        
 13C - 40.5 MHz       HOMO        
 13C - 32.1 MHz        
 13C - 25.2 MHz       NT

SAMPLE      GLUCOSIDO B  
 SUBJECT NO.      32640  
 CL. HOURS      19-11  
 CPU      000  
 FILE      000  
 ADD. TRACES      0000  
 PULS. SEQU.      00  
 R-TRIGG      000000  
 DATA LENGTH      5120  
 SCAN ENH (S)      0.00  
 P.T. LENGTH      0.10  
 HF IN

PLUT  
 VERT SCALE      17  
 START GAIN      5120.0  
 END GAIN      0.1  
 OFFSET (G)      00.7  
 Hz/P POINT      1.05  
 MULT. EXP      1.0

SOLVENT Bz-d      TEMP. 20.0 °C  
 TUBE O.D.      mm      SPIN RATE 32 rpm

OBSERVE  
 SWEEP WIDTH 5000 Hz      TIME \_\_\_\_\_ sec  
 SWEEP OFFSET 2221 Hz      from \_\_\_\_\_  
 FILTER      Hz      RF FIELD      dB  
 SPECTR. AMPL. 10      NO. OF SCANS \_\_\_\_\_

LOCK  
 SIGNAL Bz-d      RF FIELD 15 dB

SPIN DECOUPLER  
 NUCLEUS 13C      CYCLOCODE 0.1  
 OFFSET 4100 Hz      RF POWER 1.0 dB  
 NOISE BANDWIDTH 130 Hz  
 INDR. SWEEP WIDTH \_\_\_\_\_ Hz  
 OPERATOR ...      DATE 120676

CHART S-100XL  
 PRINTED IN U.S.A.

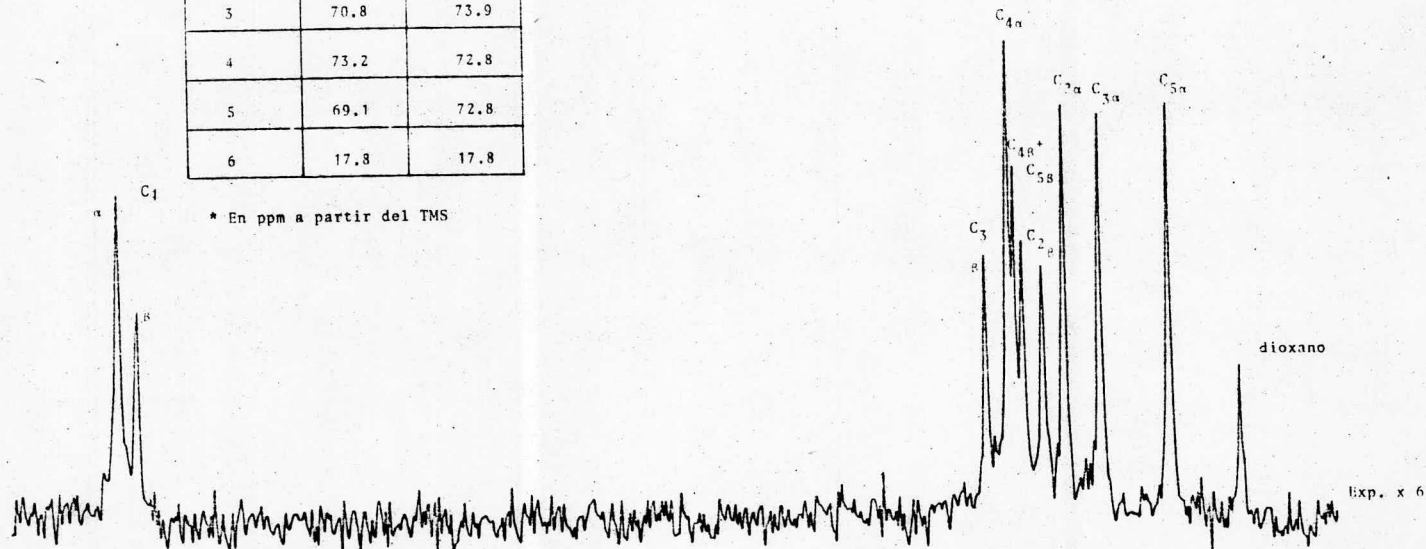
varian

ESPECTRO N° 9  
 R.M.N. <sup>13</sup>C GLUCOSIDO B LIBRE

RMN-<sup>13</sup>C RAMNOSA

| C | α*   | β*   |
|---|------|------|
| 1 | 94.9 | 94.5 |
| 2 | 71.9 | 72.3 |
| 3 | 70.8 | 73.9 |
| 4 | 73.2 | 72.8 |
| 5 | 69.1 | 72.8 |
| 6 | 17.8 | 17.8 |

\* En ppm a partir del TMS



ESPECTRO N° 10

R.M.N. <sup>13</sup>C RAMNOSA



A.4.b.- Derivado peracetilado: 37 mg de glucósido B disueltos en 0.1 ml de piridina anhidra se acetilan con 0.5 ml de anhídrido acético con agitación a temperatura ambiente por 24 hr y 15 min. a reflujo; el peracetato se obtiene por precipitación sobre agua fría (aprox.10ml). Después de 4 recristalizaciones de metanol acuoso presenta las siguientes constantes físicas:

#### GLUCOSIDO B PERACETILADO

Datos obtenidos anteriormente: (7)

p.f. = 110°C

Fórmula:  $C_{51}H_{74}O_{18}$  P.M. = 975.15

Análisis elemental:

|             | % C                     | % H  | % O   |
|-------------|-------------------------|------|-------|
| calculado:  | 62.81                   | 7.64 | 29.53 |
| encontrado: | 62.85                   | 7.62 | 29.53 |
| Infrarojo:  | (ver espectro en ref.7) |      |       |

| bandas ( $cm^{-1}$ ) | correspondiente a:        |
|----------------------|---------------------------|
| 1750                 | - C - de ester<br>  <br>O |
| 1650                 | C = C                     |
| 895 y 920            | Isosapogenina             |

R.M.N. H : (Ver espectro en ref.7)

| bandas (ppm) | correspondiente a:                                   |
|--------------|--|
| 0.8 - 1.1    | metilos angulares                                    |
| 1.1 - 1.5    | $\text{-CH}_2\text{-}$ , $\text{CH-}$                |
| 1.6 - 2.1    | 5 señales de acetatos que integran para 18 protones. |
| 3.5          | $\text{-CH}_2\text{-O-}$                             |
| 4.3 - 5.6    | $\text{-OH}$ de azúcar                               |

A.4.c.- Rotación óptica. Determinación del enlace anomérico. El tipo de enlace anomérico entre la ramnosa y la glucosa fue establecido por el mismo procedimiento usado para el glucósido A, es decir, aplicando la regla de Klyne de diferencias de rotación molecular. Resultado: ver tabla N°3.

#### A.5.- Glucósido C

A.5.a.- Aislamiento: Fue obtenido en forma impura (aprox. 85% de pureza, determinada en capa fina) por cromatografía en columna bajo las siguientes condiciones: longitud de la columna = 50 cm; diámetro interno = 10 mm; soporte = 8 g de gel de sílice; eluyente = sistema N°2; flujo = 60 gotas por min.; volumen muerto = 25 ml y -- fracciones de aproximadamente 1.5 ml. El compuesto así aislado presenta un punto de fusión de 209-211°C y un espectro de infrarojo similar al del glucósido A.

A.5.b.- Hidrólisis ácida total: 5 mg disueltos en 0.3 ml de EtOH se hidrolizan con 0.03 ml de HCl concentrado a reflujo por 6 hrs. Por cromatografía en capa fina se identifican los siguientes productos de reacción: Diosgenina, glucosa y ramnosa, además de una mancha amarilla no identificada.

A.5.c.- Hidrólisis ácida parcial: 4.0 mg disueltos en 0.5 ml de EtOH fueron hidrolizados parcialmente con 0.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N a reflujo -- por 3 hrs. siguiendo el curso de la reacción a diferentes tiempos -- por cromatografía en capa fina.- De esta forma se identifican como productos de hidrólisis: diosgenina, glucósidos A, B y C que no se hidroliza.

A.5.d.- Hidrólisis ácida parcial en cromatografía en capa fina. Las placas deben reunir las siguientes condiciones: placas de vidrio de 20 x 20 cm; soporte = gel de sílice; espesor; aproximadamente 250 micras; activación = 110° durante 1 hr. Método: la elución es bidimensional empleando el sistema de disolventes N°2; se hacen dos aplicaciones (A y B) de espirostanos totales separadas entre sí 1.5cm y se eluye la primera dimensión revelando con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 N y calor la aplicación A que queda en el extremo para identificar la posición de los glucósidos en la placa; una vez hecho esto se aplica una gota de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N a cada una de las posiciones correspondientes en la aplicación B dejando secar en un desecador a vacío a temperatura ambiente.

Posteriormente se eluye en la segunda dimensión para luego revelar toda la placa con  $H_2SO_4$  5 N y calor para identificar los productos de hidrólisis. Resultado: el glucósido C se degrada exclusivamente al glucósido A y diosgenina.

## A.6.- Glucósido D

A.6.a.- Aislamiento: Fue obtenido por cromatografía en columna a -- partir de barbasco fresco (extracto B) en el que se encuentra en ma yor proporción. Las condiciones fueron: longitud de la columna = 120 cm; diámetro interno = 15 mm; soporte = 100 g de gel de sílice; volumen muerto = 150 ml; fracciones de 1.0 ml; eluyente = N°2. La aplicación tuvo que ser hecha disolviendo la muestra de 1 g en DMSO con lo que varió la polaridad del eluyente formándose una zona de precipitación que tuvo que ser removida. Una vez recristalizado de metanol acuoso presenta las siguientes constantes físicas:

### GLUCOSIDO D LIBRE

p.f. = 274 - 75°C

$[\alpha]_D^{23} = -107^\circ$  (Piridina)

Fórmula =  $C_{45} H_{72} O_{16} \cdot 2H_2O$  P.M. = 905.04

Análisis elemental:

|              | % C   | % H  | % O   |
|--------------|-------|------|-------|
| calculado =  | 59.71 | 8.46 | 31.82 |
| encontrado = | 59.84 | 8.06 | 32.10 |

Infrarojo: (espectro similar al del glucósido A)

| bandas ( $cm^{-1}$ ) | correspondiente a: |
|----------------------|--------------------|
| 3400                 | - OH               |
| 1650                 | c = c              |
| 892 y 920            | isosapogenina      |

R.M.N. - H:

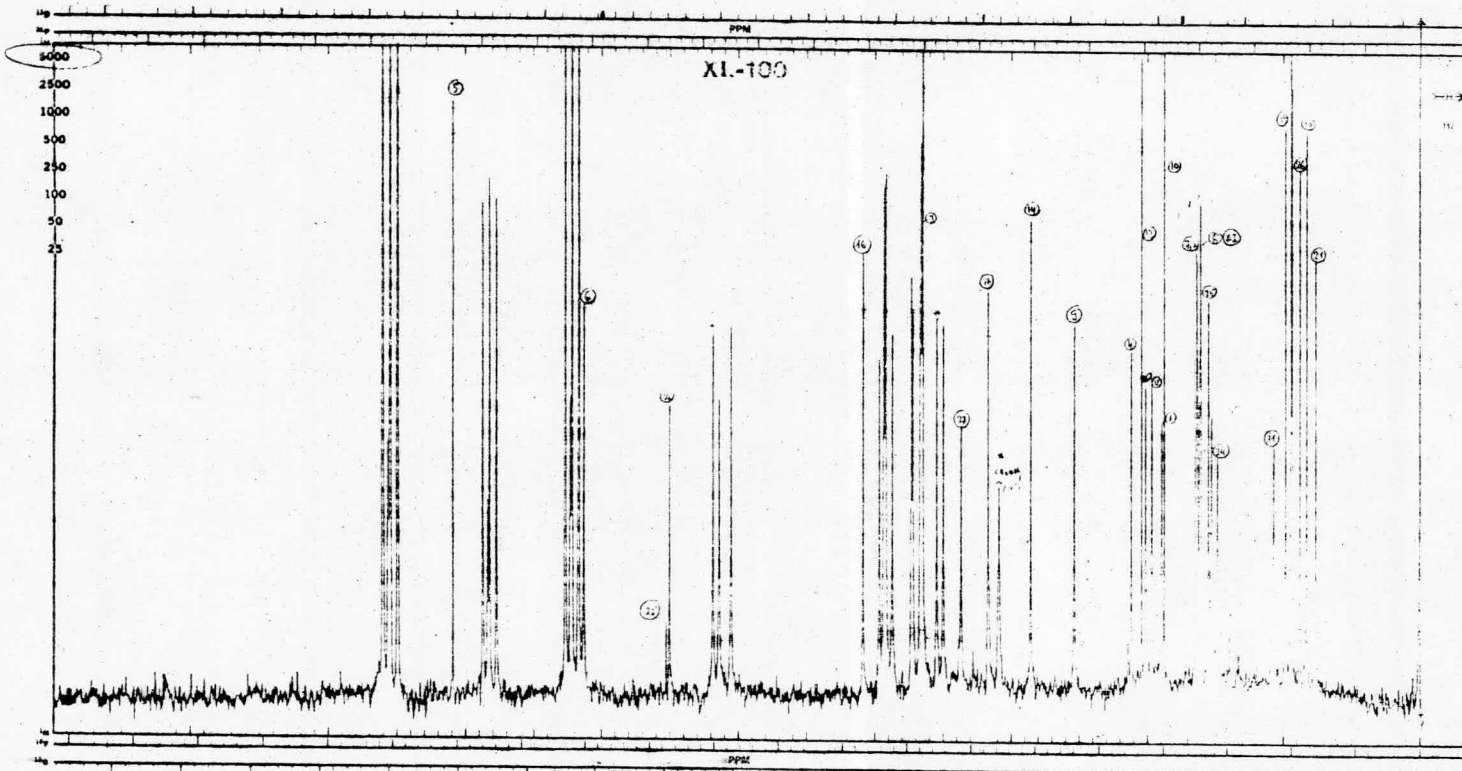
| bandas (ppm) | correspondiente a:   |
|--------------|----------------------|
| 0.75 - 1.1   | metílos angulares    |
| 1.3 - 1.7    | CH <sub>2</sub> , CH |
| 3.8 - 4.7    | OH de azúcar         |

R.M.N.-<sup>13</sup>C: (espectro N°11)

La asignación de las señales se hizo por comparación con las encontradas para el glucósido B. Resultado:

| C | G1 - B<br>Glucosa | Glucosido D |       |       | G1 - B<br>Ramnosa |
|---|-------------------|-------------|-------|-------|-------------------|
|   |                   | G1          | Ra-I  | Ra-II |                   |
| 1 | 102.5             | 102.9       | 102.0 | 100.3 | 102.3             |
| 2 | 75.2              | 81.1        | 72.5  | 72.5  | 72.5              |
| 3 | 76.5              | 76.9        | 70.4  | 72.7  | 70.2              |
| 4 | 78.4              | 78.7        | 73.9  | 74.1  | 73.7              |
| 5 | 76.7              | 77.9        | 69.5  | 72.8  | 70.2              |
| 6 | 61.4              | 61.3        | 18.4  | 18.3  | 18.3              |

Para la asignación de las señales correspondientes al aglucón ver la tabla N°2.



XL-100 SPECTRUM NO. 72621

OBSERVE LOCK

$^1\text{H}$  100.1 MHz   $^2\text{H}$  154 MHz

$^3\text{P}$  94.1 MHz  HOMO

$^3\text{P}$  40.5 MHz

$^1\text{B}$  22.1 MHz

$^{13}\text{C}$  25.2 MHz  INT

EXT

SAMPLE

NAME: GLUCOSIDO D LIBRE

CONC: 0.5%

SOLV: D<sub>2</sub>O

PRO: STUDY

TRF: 5000

NO. TURNS: 1000

RECORDING: 271-600

DATE: 08/05/66

OPERATOR: ...

SOLVENT: D<sub>2</sub>O TEMP: Room

TUBE O.D.: 5 mm SPIN RATE: 30 rps

OBSERVE

SWEEP WIDTH: 5000 Hz TIME: \_\_\_\_\_ sec

SWEEP OFFSET: 2225 Hz from \_\_\_\_\_

FILTER: Y Hz RF FIELD: \_\_\_\_\_ dB

SPECTR. AMPL: 40 NO. OF SCANS: \_\_\_\_\_

LOCK

SIGNAL: Pro RF FIELD: X dB

SPIN DECOUPLER

NUCLEUS: H GYROCOD: ...

OFFSET: 5000 Hz RF POWER: 5 dB

NOISE BANDWIDTH: 120 Hz

INDOR SWEEP WIDTH: \_\_\_\_\_ Hz

OPERATOR: X DATE: 08/05/66

CHART S.100X

ESPECTRO N° 11  
R.M.N.  $^{13}\text{C}$  GLUCOSIDO D LIBRE

A.6.b.- Hidrólisis ácida parcial: 5mg disueltos en 1.0 ml de EtOH se hidrolizaron con 0.5 ml de  $H_2SO_4$  1N a reflujo por 6 hrs. siguiendo el curso de la reacción a diferentes tiempos por cromatografía en capa fina. Como productos de reacción se detectan: trazas de diosgenina, glucósidos A,B,C y ramnosa.

A.6.c.- Hidrólisis ácida total: a la mezcla de reacción de la hidrólisis parcial se le agregó una gota de HCl concentrado calentando a reflujo por una hora; a éste tiempo se detectan por placa solo a los glucósidos A, B y ramnosa. Después de 4 hrs. más a reflujo y 48 a temperatura ambiente sólo se detecta diosgenina, glucosido A y ramnosa por lo que se agregó una gota más de HCl concentrado y después de 6 hrs de calentamiento a reflujo y 12 a temperatura ambiente se logra la hidrólisis total identificando por cromatografía en capa fina lo siguiente: diosgenina, dieno de diosgenina, glucosa, ramnosa y la mancha amarilla no identificada.

A.6.d.- Rotación óptica. Determinación del enlace anomérico: Aplicando la regla de Klyne:

I.- P.M. del glucósido D calculado = 869.02

II.-  $[\alpha]$  del glucósido D =  $-107^\circ$

III.-  $[M]$  del glucósido D =  $869.02 \times -107/100 = -929.86$

IV.-  $[M]$  del glucósido B =  $-688.90$

V.-  $\Delta C = -929.86 - (-688.90) = -240.96$

VI.-  $[M]$  del metil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido =  $-111.0^\circ$

V-VI.- =  $-240.96 - (-111.0) = -131.96$

VII.-  $[M]$  del metil- $\beta$ -L-ramnopiranosido =  $+170$

VI-VII =  $-240.96 - (+170) = -410.96$



A.6.e.- Derivado peracetilado: 25 mg disueltos en 0.5 ml de piridina anhidra son acetilados con 1.5 ml de anhídrido acético con agitación por 24 hrs. a temperatura ambiente y 15' a reflujo. El peracetato se obtiene por precipitación sobre agua fría (5 ml); después de dos recristalizaciones de metanol acuoso presenta las siguientes constantes físicas:

GLUCOSIDO D PERACETILADO

p.f. = 133 - 34°C

Fórmula:  $C_{61}H_{88}O_{24}$

P.M. = 1205.31

Análisis elemental:

|              | % C      | % H   | % O   |
|--------------|----------|-------|-------|
| calculado:   | 60.78    | 7.36  | 31.86 |
| encontrados: | a) 59.82 | 7.19  | 32.99 |
|              | b) 59.65 | 7.13  | 33.22 |
|              | c) 60.84 | 7.54  | 31.62 |
|              | d) 60.87 | 7.59  | 31.54 |
|              | e) 61.04 | 7.25  | 31.71 |
|              | f) 61.00 | 7.35  | 31.65 |
|              | <hr/>    | <hr/> | <hr/> |
| promedio:    | 60.54    | 7.34  | 32.12 |

Infrarojo: (espectro similar al del acetato del glucósido A)

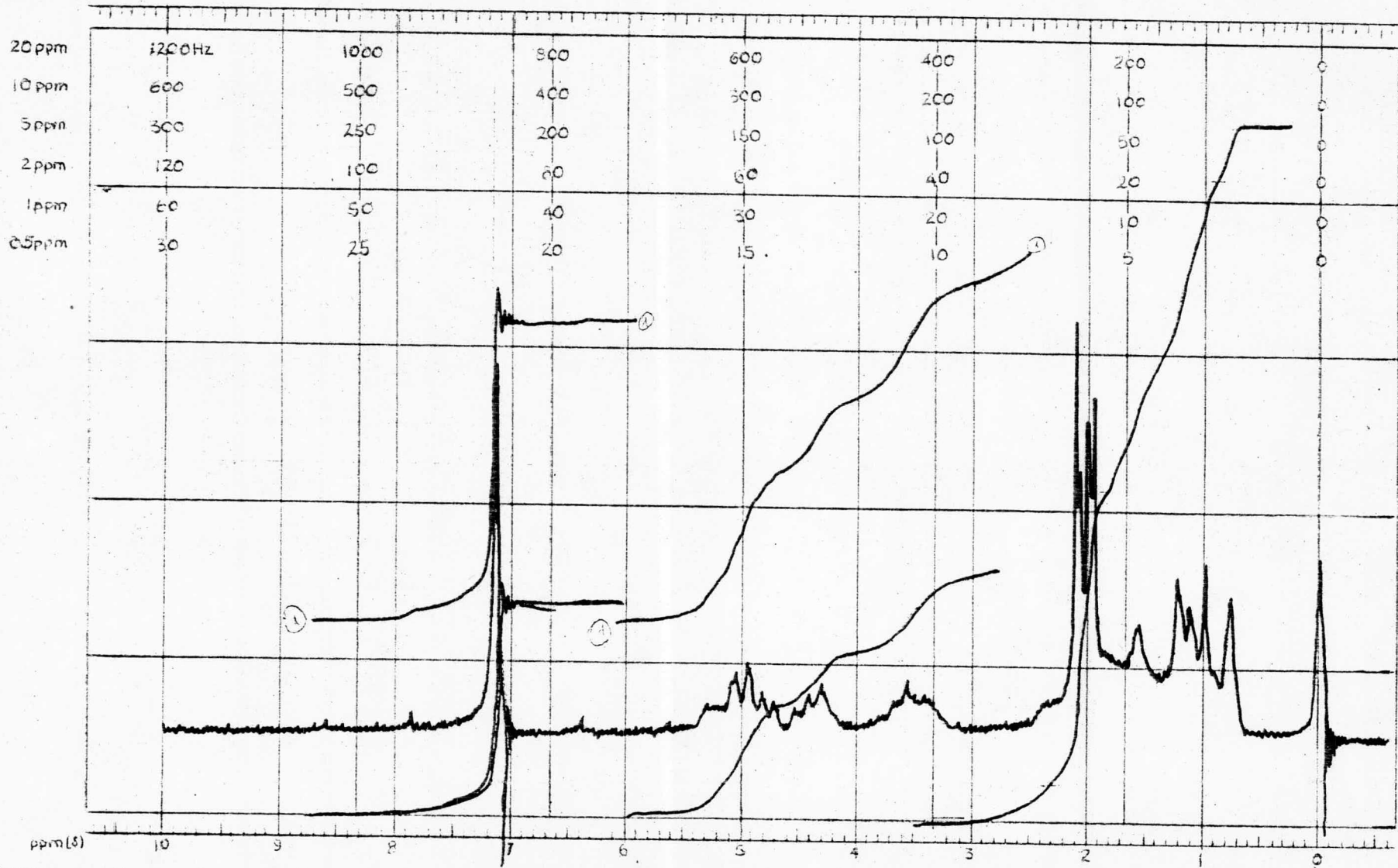
| bandas ( $cm^{-1}$ ) | correspondiente a: |
|----------------------|--------------------|
| 1750                 | carbonilo de éster |
| 1650                 | c = c              |
| 895 y 920            | isosapogenina      |

R.M.N.- H: (espectro N°12)

| bandas (ppm) | correspondiente a:   |
|--------------|--|
| 0.8 - 1.3    | metílos angulares  |
| 1.9 - 2.2    | 5 señales de acetatos que integran para 24 protones (8 acetatos) |
| 3.3 - 3.7    | -CH <sub>2</sub> -O-   |
| 4.2 - 5.5    | -O-H de azúcar   |
| 7.15         | señal de referencia interna (p-diclorobenceno)                   |

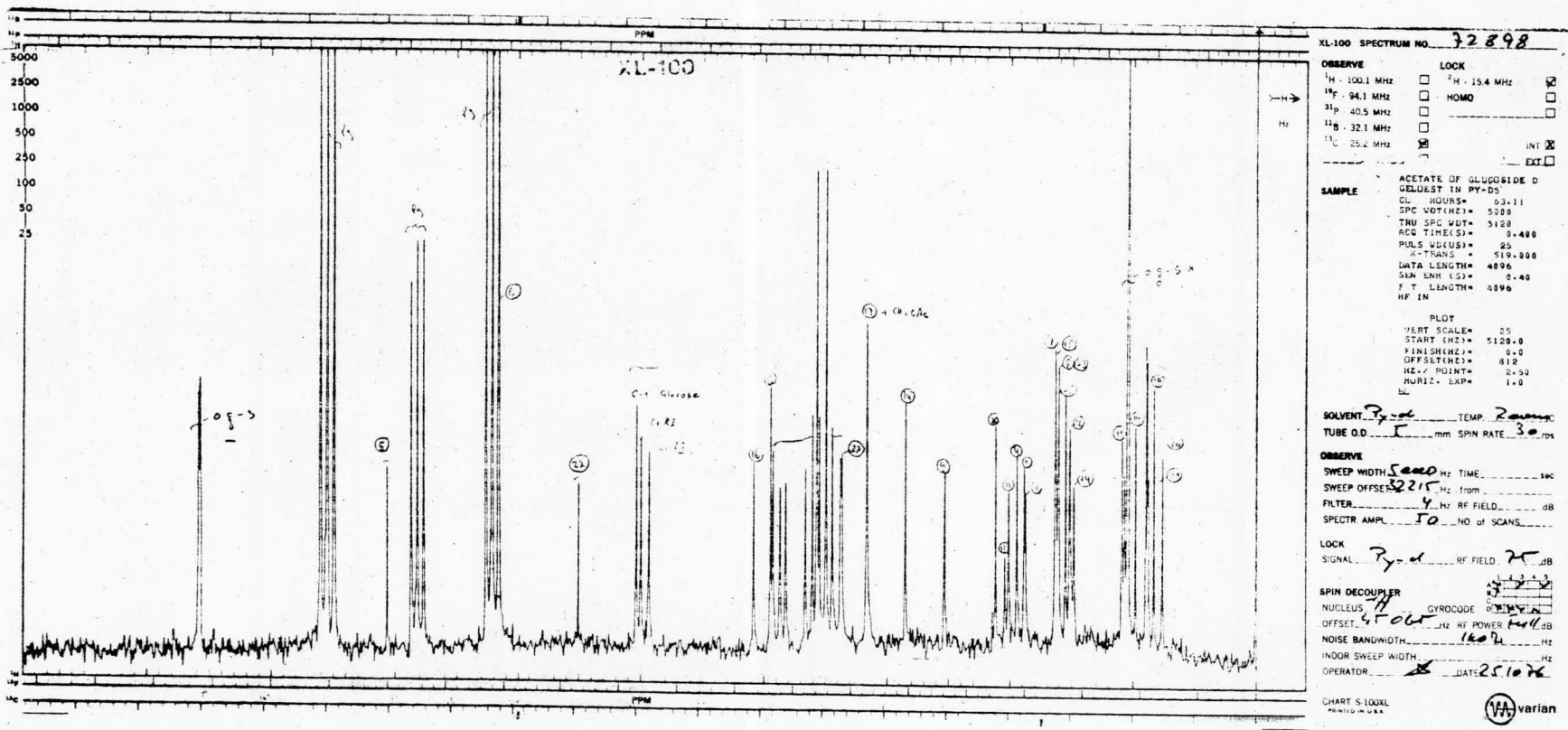
R.M.N.-<sup>13</sup>C: (espectro N°13 y 14)

Por carecer del espectro del homólogo inferior, del acetato del glucósido D sólo es posible hacer la asignación de las señales del aglucón (ver tabla N°2) y las correspondientes a los carbonos anoméricos que aparecen a 99.9, 99.3 y 98.0 ppm.



ESPECTRO N° 12

R.M.N. - H. GLUCOSIDO D PERACETILADO



XL-100 SPECTRUM NO. **32898**

OBSERVE LOCK  
<sup>1</sup>H - 100.1 MHz  <sup>2</sup>H - 15.4 MHz   
<sup>19</sup>F - 94.1 MHz  HOMO   
<sup>31</sup>P - 40.5 MHz   
<sup>13</sup>C - 32.1 MHz  INT   
<sup>13</sup>C - 25.2 MHz  EXT

SAMPLE ACETATE OF GLUCOSIDE D  
 GELUSET IN PY-D5  
 CL. HOURS = 03-11  
 SPC VOT(HZ) = 5000  
 TRU SPC VOT = 5128  
 ACC TIME(S) = 0.480  
 PULS WDG(S) = 25  
 P-TIME(S) = 519.000  
 DATA LENGTH = 4896  
 SEN ENH(S) = 0.40  
 F T LENGTH = 4396  
 RF IN

PLOT  
 VERT SCALE = 55  
 START (HZ) = 5128.0  
 FINISH(HZ) = 0.0  
 OFFSET(HZ) = 419  
 HZ - POINTS = 2.53  
 HORIZ. EXP = 1.0  
 BL

SOLVENT Py-d5 TEMP. Room  
 TUBE O.D. 5 mm SPIN RATE 30 rps

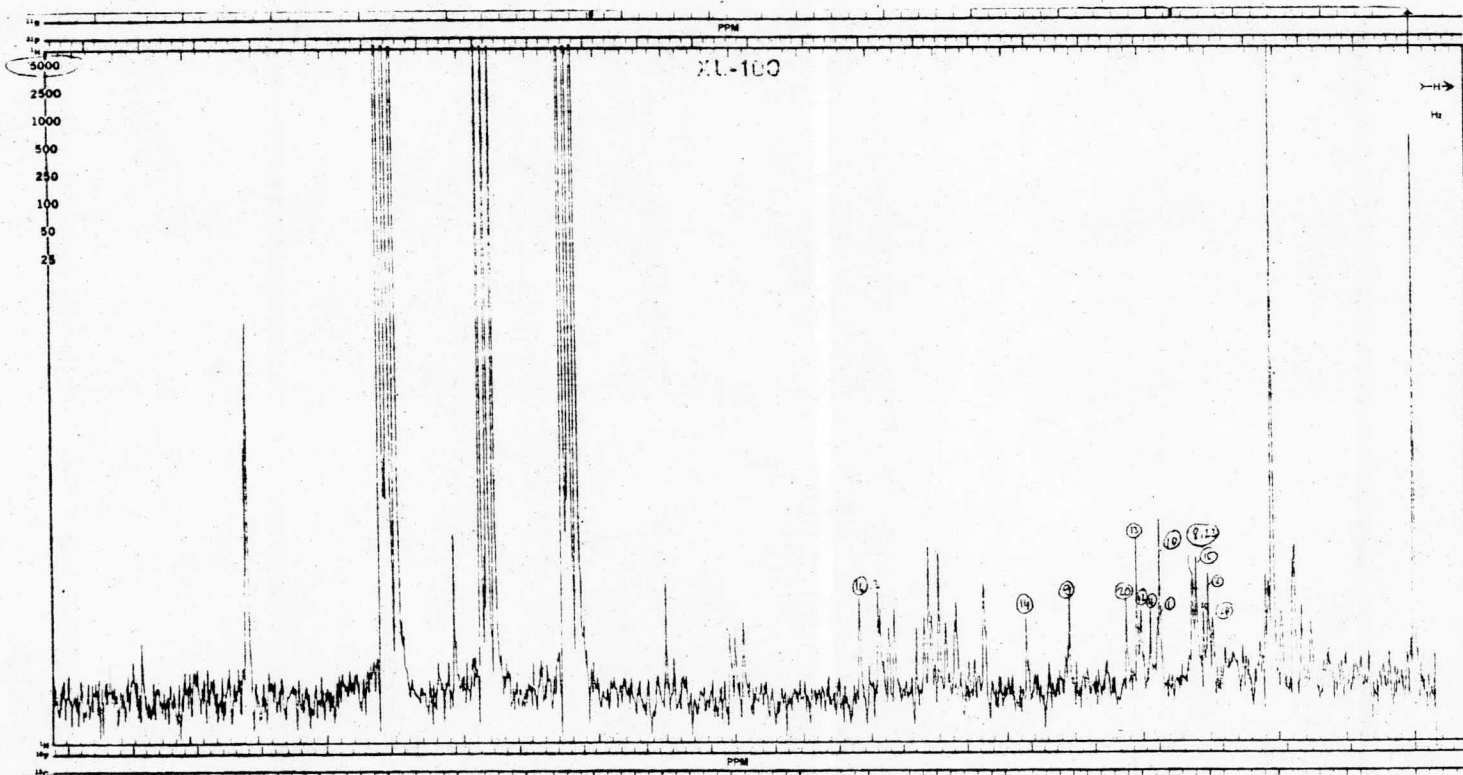
OBSERVE  
 SWEEP WIDTH 5000 Hz TIME \_\_\_\_\_ SEC  
 SWEEP OFFSE 5221 Hz FROM \_\_\_\_\_  
 FILTER 4 Hz RF FIELD \_\_\_\_\_ dB  
 SPECTR. AMPL. 10 NO. OF SCANS \_\_\_\_\_

LOCK  
 SIGNAL Py-d RF FIELD 25 dB

SPIN DECOUPLER  
 NUCLEUS H GYROCODE 1  
 OFFSET 4706 Hz RF POWER full dB  
 NOISE BANDWIDTH 1600 Hz  
 INDR SWEEP WIDTH \_\_\_\_\_ Hz  
 OPERATOR X DATE 25/10/76

CHART S-100KL  
 PRINTED IN U.S.A.

ESPECTRO N° 13  
 R.M.N. <sup>13</sup>C GLUCOSIDO D PERACETILADO



XL-100 SPECTRUM NO. 73094

OBSERVE LOCK  
 1H - 100.1 MHz  2H - 15.4 MHz   
 13C - 94.1 MHz  HOMO   
 31P - 40.5 MHz   
 11B - 32.1 MHz   
 12C - 25.2 MHz  INT B

SAMPLE ...

SOLVENT P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> TEMP. 7  
 TUBE O.D. 5 mm SPIN RATE 20 rpm

OBSERVE  
 SWEEP WIDTH 5000 Hz TIME \_\_\_\_\_ sec  
 SWEEP OFFSET 32215 Hz from \_\_\_\_\_  
 FILTER \_\_\_\_\_ Hz RF FIELD \_\_\_\_\_ dB  
 SPECTR. AMPL. 50 NO. OF SCANS \_\_\_\_\_

LOCK  
 SIGNAL P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> RF FIELD 7 dB

SPIN DECOUPLER  
 NUCLEUS 13C CYROCODE \_\_\_\_\_  
 OFFSET 5500 Hz RF POWER Fwd dB  
 NOISE BANDWIDTH 1600 Hz  
 INDR SWEEP WIDTH \_\_\_\_\_ Hz  
 OPERATOR B DATE 24/01/77

ESPECTRO N° 14

R.M.N. <sup>13</sup>C GLUCOSIDO D PERACETILADO POR "GATED DECOUPLING"

A.7.- Descomposición de azúcares en condiciones ácidas: 2.5 mg de glucosa y ramnosa y 5 mg de la mezcla 1:1 de éstos dos disueltos cada uno en 1 ml de etanol se trabajan en condiciones de hidrólisis con 0.5 ml de  $H_2SO_4$  1N a reflujo por 6 hrs. De esta forma la glucosa dá en capa fina una mancha rosa mientras que la ramnosa dá una mancha amarilla con un  $R_f=75$  en el sistema de disolventes N°2.

## B.- Glucósidos Furostánicos

Fueron obtenidos a partir de rizomas de barbasco fresco -- (Dioscorea composita) recolectado el 21 de febrero de 1975 en un acahual de 10 años en la "Estación de Biología tropical Los Tuxtlas", Veracruz.

B.1.- Prueba piloto de extracción: Fue hecha en un extractor -- Soxhlet con 80 g de barbasco fresco cortado en trozos pequeños y 500 ml de metanol. El rendimiento de saponinas después de -- 14 hrs. de extracción es de 7.9g y que representan el 9.87% en -- base húmeda; a éste extracto se le denominó FI.

B.1.a.- Composición de FI: el número de glucósidos furostánicos que componen este extracto fue determinado por cromatografía en capa fina eluyendo con:

Diclorometano, Metanol, Agua 70:29:1

y revelando 1° con reactivo de Ehrlich (solución alcohólica al 1% de p-dimetil-amino-benzaldehido) y vapores de HCl - los furostanos revelan de color rojo característico<sup>(31)</sup> - para después sobre la misma placa revelar con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5N revelando así los espirostanos que no lo hacen en el primer revelado. De esta forma se detectan 5 furostanos y 1 espirostando que corresponde al glucósido D tanto en el eluyente antes mencionado como en el N° 2 y que representa el 70% aproximadamente de la mezcla total.

B.2.- Extracción final: 2.2182 Kg de rizomas frescos cortados en trozos pequeños fueron extraídos con 5 l de metanol calentando a reflujo por 16 hrs. El rendimiento de saponinas es de 32.8 g a las que se les denominó FII.

Presenta la misma composición de FI.

B.2.a.- Hidrólisis ácida total de FII: 100 mg de la mezcla total disueltos 6.6 ml de etanol fueron hidrolizados con 0.3 ml de HCl concentrado a reflujo por 6 hrs. Como productos de hidrólisis se detectan: diosgenina, glucosa y ramnosa.



B.3.- Revelado del extracto A de espirostanos con reactivo de Erhlich: eluyendo en placa con el sistema de disolventes N°2 y revelando de la forma antes mencionada se detectan 2 furostanos a los que se les denominó furostanol A y B que aparecen inmediatamente antes de los espirostanos A y B respectivamente en concentraciones muy bajas.

B.3.a.- Aislamiento de los furostanos A y B: La purificación fue hecha en placa preparativa aplicando 20 mg de una mezcla de glucósidos que contiene a estos 2 furostanos y al espirostano B que forma la mayor parte (aproximadamente el 95%). Sólo se logró aislar al furostano A el cual al extraer en caliente se hidroliza dando como producto el espirostano A y probablemente -- por transglucosidación algo del furostano B.



## C.- Glucósidos de Pennogenina

El material utilizado fué un clon especial de *D. composita* rico en Penogenina proporcionado por los laboratorios STEROMEX, S.A.

C.1.- Extracción: Los rizomas fueron divididos en 3 partes - - - para su extracción. La primera consta de las regiones jóvenes del rizoma y se le llamó Barbasco de Penogenina joven (BPJ); la segunda está formada por las regiones viejas denominándosele como Barbasco de Penogenina Viejo (BPV) y la tercera es una porción de BPV puesta a fermentar por lo que se le dió el nombre de Barbasco de Penogenina Viejo y Fermentado (BPVF).

Las partes BPJ (1.034 kg) y BPV (2 kg) fueron cortadas en trozos pequeños para ser extraídas por maceración con 1.5 y 2 l de metanol respectivamente a temperatura ambiente durante 2 semanas renovando el disolvente y agitando manualmente. Por precipitación fraccionada - al concentrar - se obtienen las fracciones BPJ I-IV con un peso total de 38.74 g y las BPV I-V que pesan en conjunto 24.0 g.

La composición de las fracciones BPJ es la misma de las FI y FII y sólo la BPJ IV posee mayor concentración de furostanoles. Las BPV además presentan trazas del heterósido C.

El material clasificado como BPVF fue almacenado - para ser fermentado - en un recipiente de poliuretano durante 3 días a temperatura ambiente al cabo de los cuales fue secado al sol dando un peso de 480.45 g. Se extrajo con dos porciones de metanol de 2 l c/u durante 1 semana agitando manualmente. Al concentrar se obtienen por precipitación fraccionada 5 fracciones que en el sistema de disolventes N°2 presentan la misma composición de la mezcla total de espirostanoles sólo que la Diosgenina y los heterósidos A, B y C se encuentran en trazas. El peso total de las fracciones

BPVF I-V es de 74.1 g.

C.2.- Sapogeninas libres: La presencia de sapogeninas se determinó por cromatografía en capa fina de gel de sílice eluyendo con una mezcla de Benceno: AcEt 80:20, revelando con  $H_2SO_4$  5N y usando muestras puras de Diosgenina y Penogenina como patrones. Resultado: las fracciones BPJ y BPV no presentan sapogeninas libres; en cambio las BPVF presentan trazas de Penogenina y trazas de otra mancha poco polar no identificada.

C.3.- Hidrólisis ácida total: 10 mg de c/u de las fracciones BPJ y BPV disueltos en 1.5 ml de EtOH fueron hidrolizados con 0.5 ml de  $H_2SO_4$  1N a reflujo durante 4 hrs. y 15 hrs. a temperatura ambiente con 0.1 ml de HCl concentrado. Resultado: todas las fracciones muestran como aglucón en capa fina eluyendo con Benceno - AcEt 80:20 una mezcla de Diosgenina y Penogenina en una proporción 1:1 aproximadamente aunque la BPJ IV presenta mayor cantidad de Penogenina; además aluyendo con el sistema de disolventes N°2 se identifica - - dieno de diosgenina y otra mancha ligeramente más polar no identificada (probablemente dieno de penogenina) así como glucosa y ramnosa.

C.4.- Hidrólisis ácida total de BPVF: 5 mg de la mezcla de glucósidos disueltos en 1 ml de EtOH fueron hidrolizados con 0.5 ml de HCl concentrado a reflujo por 6 hrs. y a temperatura ambiente por 20 hrs. Por capa fina se detectan los mismos productos que en C.3.

## 5. CONCLUSIONES

- 1.- No existen azúcares libres en los extractos metanólicos de rizomas fermentados y secos de Dioscorea composita (barbasco).
- 2.- El porcentaje de sapogeninas libres (mezcla de Diosgenina y Penogenina) en el extracto de barbasco fermentado es de 1.35% de las cuales la mayor proporción corresponde a Diosgenina.
- 3.- En el extracto de barbasco fresco y en las de las partes jóvenes y viejas de un clon especial de D. composita rico en Penogenina no se identifican sapogeninas libres.
- 4.- En el extracto metanólico de las partes viejas y fermentadas del clon especial antes mencionado se identifican trazas de Penogenina libre y trazas de otra sapogenina no identificada.
- 5.- Se confirma la estructura del glucósido A como: (ver estructura I, pág.32)  
Diosgenina -3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido
- 6.- Se establece la estructura 3a. y 4a. del glucósido B como: (ver estructura II, pág.33)  
Diosgenina -3-O- ( $\alpha$ -L-ramnopiranosil 1-4)- $\beta$ -D-glucopiranosido
- 7.- Al glucósido C se le identifica preliminarmente como: (ver estructura III, pág.34)  
Diosgenina -3-O-( $\alpha$ -L-ramnopiranosil 1-2)- $\beta$ -D-glucopiranosido  
por un método de hidrólisis parcial en capa fina.
- 8.- Al glucósido D se le identifica como a un triglucósido con la estructura: (ver estructura IV, pág.35).  
Diosgenina -3-O-bis( $\alpha$ -L ramnopiranosil 1-2,1-4)- $\beta$ -D-glucopiranosido.
- 9.- Los extractos metanólicos del clon especial de D. composita es tan constituidos por glucósidos de Diosgenina y Penogenina como lo demuestran los experimentos de hidrólisis total.
- 10.- En el extracto de barbasco fresco se encuentran los furostanoles precursores de los glucósidos de barbasco fermentado (espirostanoles)
- 11.- Se identifica en forma preliminar al furostanol A como el precursor del glucósido A. Ver estructuras V y VI
- 12.- El extracto de barbasco fermentado tiene como componente mayoritario el glucósido B ( $\sim$ 50% de la mezcla total) en tanto que en los extractos de material fresco lo es el glucósido D ( $\sim$ 70%).

## 6. B I B L I O G R A F I A

- 1.- Tsukamoto, T. and Y. Ueno J. Pharm. Soc.(Jap.) 56, 135 (1936).  
Fujii, K. and K. Matsukawa, J. Pharm. Soc.(Jap.) 56,408 (1936).
- 2.- Marker, R.E. J. Am. Chem. Soc. 62, 2543 (1940). íbid, 2525  
(1940).
- 3.- Grove, D.C., G.L. Jenkins and M.P. Thomson. J. Am. Pharm.  
Assoc. 27, 457 (1938).
- 4.- Bite, P. and M.M. Shabana, Acta Chem. Acad. Sci. Hung. 62 (3),  
283 (1969).
- 5.- Hoyer, G.A., W. Sucrow and D. Winkler, Phytochemistry, 14, 539  
(1975).
- 6.- Tsukamoto, T., T. Kawasaki and T. Yamauchi, Chem. Pharm. Bull.  
4, 35 (1956).
- 7.- Jung Cook Helgi: Contribución al Estudio de los glucósidos de  
Dioscorea composita. Tesis. Facultad de Química. 1975.
- 8.- Lawrence, H.M. : "Taxonomy of Vascular Plants" The Mac Millan  
Co. New York. 1951.
- 9.- Primer Simposium Internacional Sobre Dioscoreas. Publ. Esp.  
Inst. Nal. Invest. México 8. 1970 pág.31.
- 10.- The Carbohydrates. W. Pigman Ed. Academic Press Inc. 1957.
- 11.- Ballou , C.E. Advances in Carbohydrate Chem. 9,59 (1954).
- 12.- Dische, Z., Met h. Biochem. Analysis II, 313 (1967).
- 13.- Marker, R.E. J. Am. Chem. Soc.69, 2167 (1947)
- 14.- Rothman, E.S.; M.E.Wall and H.A. Walens, J. Am. Chem. Soc.74,  
5791 (1955).
- 15.- Wall, M.E.; S. Serota and L.P. Witanaver, J.Am. Chem. Soc. 77,  
3080 (1955)
- 16.- Okanishi, T. and M. Togami, Chem. Pharm. Bull, 17 (2), 315  
(1969).
- 17.- Nelson, N., J. Biol. Chem. 153,375 (1944).
- 18.- Criege, R.; L. Kraft and B. Rank,Ann. 507, 159 (1933).

- 19.- Waters, W.A., Trans. Faraday Soc. 42, 184 (1946).
- 20.- Fischer, M. und O. Kandler, Phytochemistry 14, 2629 (1975).
- 21.- Kasai, R.; et al. Tetrahidron Letters 2, 175 (1977); Tori, K.; et al.; íbid 2, 179.
- 22.- Lemieux, R.U. and S. Koto, Tetrahedron 30,1933 (1974).
- 23.- Stothers, J.B.: "Carbon-13 NMR Spectroscopy" Academic Press, New York (1972).
- 24.- Klyne, W., Biochem. J. 47, XII (1950).
- 25.- Kawasaki, T. and T-Yamauchi, Chem. Pharm. Bull. 10,703 (1962).
- 26.- Castillo, Bocanegra Rafael: "Aislamiento e Identificación de un Acompañante de Diosgenina". Tésis.Facultad de Química (1970).
- 27.- Jones, N. et al.; J. Am. Chem. Soc. 75, 158(1953)
- 28.- Eggert, H. and C. Djerassi, Tetrahedron Letters 42,3635 (1975).
- 29.- Calle Alvarez Jairo: "Estudio Químico y Farmacológico de la madera del Enterolobium cyclocarpum (jacq) Griseb". Tésis de maestría. Facultad de Química. 1976.
- 30.- Brown, P.; F. Bruschiweiler: G.R. Pettit and T. Reichstein, Org. Mass Spectrometry 5, 573 (1971)
- 31.- Kiyosawa, S. and M. Hutoh, Chem. Pharm. Bull. 16 (6), 1162 (1968).
- 32.- Krider, M.M.; M.E. Wall, J. Am. Chem. Soc. 74, 3201 (1952).
- 33.- Krider, M.M.; M.E. Wall, J.Am. Chem. Soc. 76, 2938 (1954).
- 34.- Wall, M.E.; M.M.Krider, E. S. Rothman and C.R. Eddy, J. Biol. Chem. 198,533 (1952).
- 35.- Kawasaki, T. and T. Yamauchi, Chem. Pharm. Bull. 16(6), 1070 (1968).