

DETERMINACION DE GITOXINA Y DIGITOXINA EN LAS HOJAS DE *Digitalis purpurea* RECOLECTADA EN DOS SITIOS DEL DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA

Jairo Calle A.*
Norberto Orjuela*
Edgar Moreno**

RESUMEN

A partir de las hojas de *Digitalis purpurea* provenientes de dos sitios diferentes, y mediante la extracción con disolventes adecuados, se logró establecer que en los ejemplares de los dos sitios de recolección el porcentaje de heterósidos crudos es de 0.5% a 0.7%. Mediante la cromatografía en capa delgada se determinó la presencia de seis heterósidos cardiotónicos, dos de los cuales se aislaron y se identificaron como digitoxina y gitoxina, los heterósidos se cuantificaron por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), obteniéndose los siguientes resultados para cada una de las dos muestras: Digitoxina: 16.95 y 24.35 mg/100 g de hoja seca y Gitoxina: 166.25 y 182.82 mg/100 g de hoja seca.

SUMMARY

The glycosides of leaves of *Digitalis purpurea*, collected in two different places, were extracted with the appropriate solvents and assayed. The result showed content of glycosides ranging from 0.5% to 0.7%. By means of thin layer chromatography six cardiotonic glycosides were detected. Two of them were isolated and identified as digitoxin and gitoxin. These glycosides were quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results for the two samples were respectively: 16.95 and 24.35 mg of digitoxin in 100 g of dried leaves and 166.25 and 182.82 mg of gitoxin in 100 g of dried leaves.

INTRODUCCION

La *Digitalis purpurea* ha sido investigada durante muchos años en diversas partes del mundo por su contenido en glicósidos cardíacos, por el valor terapéutico que estas sustancias representan en la medicina.

* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Apartado Aéreo 14490. Bogotá, Colombia.

** Sección de Química Orgánica y Análisis. Laboratorio para Química del Café. Federación Nacional de Cafeteros. Bogotá, Colombia.

En Colombia esta planta se desarrolla espontáneamente en los páramos y partes frías con alturas que van desde 2800 m. hasta 3000 m. de altura sobre el nivel del mar. También se propaga abundantemente en los barbechos y se le conoce con los nombres vulgares de "Dedalera" o "Guarguerones" (1). Se introdujo en nuestro país como planta de adorno específicamente en Bogotá por ingenieros ingleses, alrededor del año 1856. Esta es la primera vez que se hace un análisis del contenido de glicósidos cardíacos de la *Digitalis purpurea* que crece en nuestro país.

PARTE EXPERIMENTAL

El material vegetal utilizado en esta investigación se recolectó en dos sitios del Departamento de Cundinamarca, con alturas promedio de 2800 m sobre el nivel del mar. Se clasificó como *Digitalis purpurea*; un ejemplar de esta planta se encuentra depositado en el Herbario Nacional Colombiano bajo el No. 30412. Inmediatamente después de recolectada la planta, se sometió a secado en un horno de aire circulante a 50°C, luego se molió y desengrasó con éter de petróleo (P.E. 40-60°C), 200 g. de material seco y desengrasado se extrajeron calentando al reflujo con etanol de 96° (500 ml x 4), se reunieron los extractos, se filtraron y concentraron hasta un tercio de su volumen, se agregó el doble de agua destilada y se extrajeron con una mezcla de éter de petróleo- acetato de etilo. A la fase acuosa se le agregó solución saturada de subacetato de plomo hasta que no dió más precipitado, se filtró y el precipitado se lavó con agua caliente, se reunieron los filtrados; éstos se extrajeron con una mezcla de cloroformo- metanol (90 - 10) hasta que no se obtuvo reacción positiva con el reactivo de Kedde. Se filtró la parte orgánica sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró obteniéndose de esta manera los glicósidos cardíacos crudos.

El análisis de los glicósidos, una vez extraídos y purificados, se hizo por cromatografía en capa delgada con gel de sílice y como eluyentes mezclas de cloroformo acetato de etilo (70-30), metanol cloroformo (90-10), haciendo doble recorrido con cada uno de los

eluyentes. Se utilizaron patrones de digitoxina, gitoxina y digoxina. Este doble recorrido hace que la separación y visualización de las manchas, una vez reveladas con el reactivo de Kedde (2), sean bastante nítidas e impide que las clorofilas y otras sustancias amarillas interfieran en el proceso de separación cromatográfica. Siguiendo este procedimiento se pudo establecer, la presencia de seis manchas de coloración azul y violeta correspondientes a seis glicósidos cardíacos. Los resultados fueron iguales para las muestras de los dos sitios en donde se recolectó la planta. La comparación del Rf y color de las manchas del extracto con los de los patrones permitió descartar la presencia de digoxina en los extractos y se confirmó la existencia de digitoxina y gitoxina. El aislamiento y purificación de estos dos heterósidos a partir de los extractos se hizo por cromatografía en columna con gel de sílice, tamaño de partícula (0.063-0.2 mm), utilizando un gradiente de elución con mezclas de éter de petróleo-acetato de etilo y de cloroformo-metanol; se colectaron muestras de 50 ml. El control de la columna se hizo por cromatografía en capa delgada y se reunieron las fracciones 60-66 y 67-74, que contenían digitoxina y gitoxina, respectivamente. La purificación de estos dos grupos de fracciones se hizo por cromatografía preparativa en capa delgada.

Los dos heterósidos aislados se recrystalizaron de una mezcla de cloroformo-metanol y se obtuvieron cristales blancos. Los primeros con un punto de fusión de 278°C, igual al del patrón de digoxina. A los compuestos aislados se les hizo una cromatografía en capa delgada en gel de sílice con un sistema solvente cloroformo-acetato de etilo metanol (84-14-2). Como revelador se usó el reactivo de Kedde. Para ambas sustancias se obtuvo una sola mancha de color azul con Rf = 0.8 para la digitoxina y RF = 0.6 para la macha de color violeta igual a la gitoxina.

La cuantificación de estos dos glicósidos en las hojas de *Digitalis* se hizo por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa. Para la elec-

ción del solvente en esta cromatografía se ensayaron varias mezclas y finalmente se escogió el sistema acetonitrilo-agua (39-61), con el cual se logró una buena separación de los componentes del extracto. Las dos sustancias a cuantificar no interfieren con los demás componentes del extracto. Primero se establecieron las condiciones de calibración para obtener una buena separación y resolución. En seguida se procedió a establecer las curvas de calibración para los patrones digitoxina y gitoxina, graficando el área bajo la curva contra la cantidad de patrón inyectado. Las concentraciones de patrón en las soluciones utilizadas para la curva de calibración fueron: 1.1 mcg/ml de digitoxina y 0.6 mcg/ml de gitoxina. En las curvas de calibración se graficó la cantidad de glicósido inyectada en el cromatógrafo contra el área bajo la curva. Se tomaron seis puntos en ambos casos. Las cantidades empleadas fueron entre 0.6 y 4.8 mcg para gitoxina y entre 1.1 y 8.8 mcg para digitoxina. La concentración de las muestras se calculó en las curvas de calibración, midiendo el área bajo la curva de la alícuota inyectada y haciendo el cálculo correspondiente de acuerdo con las diluciones hechas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados cualitativos obtenidos con las dos muestras (de diferentes sitios) fueron iguales. Los resultados cuantitativos fueron de 16.95 y 24.35 mg de digitoxina/100 g de hojas secas y 166.25 y 182.82 mg de gitoxina/ 100 g de hojas secas.

De acuerdo con la revisión bibliográfica, estos resultados muestran que la *Digitalis purpurea* que crece en la Sabana de Bogotá es comparable en cuanto al contenido de digitoxina con la que crece en Rusia y Europa (2). Mientras que la gitoxina se encuentra en cantidad significativamente superior a la reportada por investigadores en otras partes del mundo (3).

BIBLIOGRAFIA

1. A. PEREZ. Plantas útiles de Colombia. Contraloría General de la República 1a. edición. 1947, pp. 457-458.
2. D. HEUSSER. Deut. Apotheker-ztg 105, 1101 (1965).
3. Y. FUJII, H. FUJII, M. YAMAZAKI. J. Chrom. 258, 147 (1983)