

DETERMINACION DE DIGITOXINA Y DIGOXINA EN MATERIAL BIOLÓGICO

Resumen del Trabajo de Tesis presentado por GLADYS LLANO G. y DORA MENDOZA M., para optar al Título de Químico - Farmacéutico.

Presidente de Tesis: DR. FERNANDO VELASCO P.

INTRODUCCION

Fue nuestro objetivo obtener un método rápido para determinar digitoxina y digoxina en sangre y orina, en cantidades del orden de microgramos, comprobar su eficiencia para su uso con fines químicos, toxicológicos y clínicos, y hallar una correlación entre nuestros resultados, los datos clínicos y el informe electrocardiográfico.

METODOS DE EXTRACCION DE LOS HETEROSIDOS

A lo largo de nuestras consultas bibliográficas encontramos diferentes métodos para extraer los heterósidos cardiotónicos presentes en la sangre y en la orina de pacientes y animales tratados con estas drogas.

Para determinar cuál de estos métodos era el más conveniente, teniendo en cuenta la estabilidad, el rendimiento y la pureza del extracto final, resolvimos verificarlos todos y para ello procedimos de la siguiente manera:

A 10 ml. de sangre y a la orina recogida en 24 horas, de una persona sana no medicada, le adicionamos 2 mg. de la droga (di-

gitoxina y digoxina patrones) y efectuamos los métodos de extracción que a continuación enunciamos:

A) SANGRE

1. Tratar 10 ml. de sangre con 80 ml. de alcohol de 80%, agitar por una hora y luego filtrar. Agitar nuevamente el sedimento con 40 ml. de alcohol de 80% y filtrar. Reunir los filtrados, transferirlos a una cápsula de porcelana y concentrar por calentamiento en baño maría y con corriente de aire sobre la superficie del líquido (la temperatura del líquido no debe pasar de 30°C). Diluir la solución remanente (cerca de 20 ml.) a 60 ml. con agua destilada y extraer continuamente con cloroformo durante 2 horas. Evaporar el extracto clorofórmico a un pequeño volumen y guardarlo para cromatografía.

2. A 10 ml. de sangre previamente heparinizada añadir 100 ml. de etanol de 95% para precipitar las proteínas. Luego centrifugar a 2.500 r.p.m. durante 10 minutos. Remover el líquido sobrenadante claro y evaporarlo a sequedad. Disolver luego este residuo en 4 ml. de etanol de 95% y guardarlo para cromatografía.

3. A 10 ml. de sangre añadir 25 ml. de éter de petróleo para la extracción, transferir esta mezcla a un embudo de separación y agitar durante algún tiempo, separar el residuo sanguíneo y agitarlo nuevamente con otra porción igual de éter de petróleo; repetir esta operación hasta que no aparezca coloración en el éter. Mezclar las fracciones de éter de petróleo en una cápsula de porcelana y evaporar hasta sequedad; disolver este residuo con 2,5 ml. de alcohol de 95% y decantar. Usar el extracto así obtenido para cromatografía. (1), (2), (3).

B) ORINA

1. Ajustar la orina de las 24 horas a un pH entre 4 y 5 con ácido acético glacial; añadir lentamente y con agitación una solución de acetato de plomo al 40% hasta que no se forme más precipitado. Centrifugar y lavar el precipitado 2 veces con pequeños volúmenes de agua destilada, que se mezclan con el líquido primi-

tivo, extraer en forma continua por una hora, con 100 ml. de cloroformo. Evaporar el extracto clorofórmico a un pequeño volumen y usarlo para cromatografía.

2. Recolectar la orina de las 24 horas, agregarle 50 ml. de n-heptano y guardarla en un refrigerador.

Dentro de los tres días siguientes a la recolección de las muestras, a temperatura ambiente ajustar la orina a un pH de 4 con ácido sulfúrico 1 N. Agitar la mezcla con un total de 1.500 ml. de cloroformo en un embudo de separación, separar la emulsión resultante y agitar el extracto clorofórmico con porciones de 50 ml. de una solución de NaOH 1N por tres veces y a continuación lavar con porciones de 50 ml. de agua destilada por tres veces. Evaporar el extracto clorofórmico a sequedad a una temperatura no mayor de 30°C. Disolver el residuo en 25 ml. de una solución cloroformo-metanol (1:1) y utilizarlo para cromatografía. (4) (5), (6).

A continuación expondremos los métodos de extracción para sangre y para orina escogidos por nosotras, a los cuales les hicimos algunas modificaciones importantes.

A) SANGRE

A los 10 ml. de sangre recogidos en frascos que contenían 0,2 ml. de una solución anticoagulante ácida de citrato y dextrosa U. S. P., añadir 10 g. de polvo de vidrio previamente tratado con HCl, NaOH, lavado y desecado, agitar durante 15 minutos con el fin de romper los glóbulos presentes en la sangre; luego agregar 80 ml. de alcohol de 95%, agitar durante una hora, dejar decantar y filtrar. Agitar nuevamente el sedimento con 40 ml. de alcohol de 95% durante media hora y filtrar sobre el mismo filtro, lavando con 10 ml. más de alcohol. Reunir los filtrados en una cápsula de porcelana y concentrar a una temperatura no mayor de 30°C aplicando corriente de aire; lavar este residuo por 2 veces con porciones de 10 ml. de tetracloruro de carbono (para extraer lípidos) y decantar. Disolver el residuo en 60 ml. de agua destilada caliente y luego someter a extracción continua con 80 ml. de cloroformo durante 2 horas. Evaporar el extracto clorofórmico a un pequeño volumen y guardarlo en el refrigerador para determinación de los heterósidos.

Modificaciones al método A-1.

1. Extracción previa de los lípidos en el extracto alcohólico seco, con tetracloruro de carbono.

2. Utilización de polvo de vidrio para romper los glóbulos sanguíneos.

B) ORINA

Agregar a la orina de las 24 horas 50 ml. de n-heptano y guardarla en un refrigerador hasta el momento de ser procesada. Sacar la muestra del refrigerador y evaporarla en un baño maría aplicando corriente de aire, (a temperatura no mayor de 30°C) hasta tener un volumen aproximado de 50 ml.; ajustar a un pH de 4 con ácido sulfúrico 1N y extraerla en Soxhlet durante 2 horas con 100 ml. de cloroformo. Pasar la mezcla resultante a un embudo de separación, agitar vigorosamente la fase clorofórmica con tres porciones de 50 ml. de NaOH 1N.; luego lavar con tres porciones de 50 ml. de agua destilada hasta neutralidad al tornasol. Evaporar el extracto clorofórmico (casi incoloro y completamente transparente) a un pequeño volumen y utilizarlo para determinación de los heterósidos.

Modificaciones al método B-2.

1. Evaporación previa de la orina en baño maría y con corriente de aire (a temperatura no mayor de 30°C), a un pequeño volumen.

2. Extracción continua con 100 ml. de cloroformo en un Soxhlet, por dos horas.

DETERMINACION CUALITATIVA
DE LOS HETEROSIDOS

METODOS CROMATOGRAFICOS

Con el fin de determinar el Rf correspondiente a cada heterósido y purificarlos por métodos cromatográficos, se corrieron cromatogramas sobre papel y sobre capa delgada.

1. — CROMATOGRAFIA ASCENDENTE SOBRE PAPEL

Partiendo de los extractos clorofórmicos de sangre y de orina obtenidos por los métodos ya enunciados, se corrieron cromatogramas ascendentes sobre papel.

Como adsorbente se usaron tiras de papel Whatman Nº 1 y Nº 4 de 6 cm. de ancho por 21 cm. de largo, con un recorrido de 12 cm. Como cámaras cromatográficas se usaron frascos de vidrio de 1.000 ml. de capacidad, con cierre hermético (7) (8).

Se usaron diferentes sistemas de solventes según datos bibliográficos.

Usamos varios reveladores para determinar cuál de ellos era el más indicado, teniendo en cuenta su sensibilidad y el tiempo de duración de la coloración de las manchas.

I — (9, 10)

Solución A: Metadinitro-benceno	5 g.
Benceno	100 ml.
Solución B: Hidróxido de sodio	20 g.
agua destilada c. s. p.	100 ml.

II — (11)

Yodo	1 g.
Cloroformo	50 ml.
Metanol	50 ml.

III — (12, 13)

Acido tricloroacético	33 g.
Cloroformo	100 ml.

IV — (14, 15)

Solución A: Metadinitro-benceno	2,5 g.
Cloroformo	100,0 ml.
Solución B: Hidróxido de potasio	5,0 g.
Metanol c. s. p.	100,0 ml.

Revelada la tira se determinó el Rf.

SISTEMAS
DE SOLVENTES USADOS

Sistema Nº 1. (10, 17)

Cloroformo	78 ml.
Benceno	12 ml.
Butanol	5 ml.
Saturado con formamida	
(Papel impregnado con formamida).	

Sistema Nº 2. (9, 10)

Cloroformo	60 ml.
Acetato de etilo	20 ml.
Benceno	20 ml.
(Saturado con agua).	

Sistema N° 3. (9)

Etil hexanol	6 ml.
Pentanol	2 ml.
Formamida	4 ml.
Agua	1 ml.

Sistema N° 4. (14)

Cloroformo	85 ml.
Benceno	12 ml.
Formamida	3 ml.

Sistema N° 5. (14)

Cloroformo	40 ml.
Agua	20 ml.
Metanol	20 ml.

Sistema N° 6. (14)

Benceno	5 ml.
Cloroformo	35 ml.
Metanol	10 ml.

Sistema N° 7. (14, 16)

Metil isobutil cetona	8 ml.
Isopropil éter	2 ml.
Formamida	2 ml.

Sistema N° 8. (14)

Benceno	15 ml.
Acetato de etilo	15 ml.
Cloroformo	70 ml.

Sistema N° 9. (10)

Cloroformo	88 ml.
Benceno	12 ml.
(Saturado con formamida; papel impregnado con for- mamida y metanol).	

Sistema N° 10. (12)

Metil isobutil cetona	40 ml.
Isopropil éter	10 ml.
Tetrahidro furano	15 ml.
Formamida	15 ml.
(Papel impregnado con for- mamida al 30% en acetona).	

Sistema N° 11. (12)

Xileno	10 ml.
Metil etil cetona	10 ml.
Metanol	4 ml.
Formamida	0,4 ml.
(Papel impregnado de for- mamida al 10% en acetona).	

Sistema N° 12. (24)

Alcohol amílico	2 ml.
Etil hexanol	6 ml.
Agua	2 ml.
Formamida	2 ml.
(Papel impregnado de for- mamida).	

Sistema N° 13. (24)

Alcohol amílico	25 ml.
Agua	25 ml.
(Papel impregnado de for- mamida).	

Sistema N° 14. (22)

Benceno	5 ml.
Metanol	4 ml.
Agua	2 ml.

Sistema N° 15. (18)

Etil hexanol	6 ml.
Alcohol amílico	2 ml.
Agua	1 ml.
Formamida	4 ml.
(Papel impregnado de for- mamida).	

Sistema N° 16. (23)

Cloruro de metileno	80 ml.
Metanol	19 ml.
Formamida	1 ml.

Sistema N° 17. (22)

Benceno	8 ml.
Acetato de etilo	5 ml.
Agua	4 ml.

Sistema N° 18. (23)

Cloroformo	88 ml.
Metanol	12 ml.

Sistema N° 19. (22)

Acetato de etilo	86 ml.
Benceno	14 ml.
Etanol	2 ml.
Agua	50 ml.

Sistema N° 20. (21)

Cloruro de metileno	90 ml.
Metanol	9 ml.
Formamida	1 ml.

Sistema N° 21. (18).

Tetrahidro furano	50 ml.
Cloroformo	50 ml.
(Saturado con formamida).	

Sistema N° 22. (18)

Cloroformo	100 ml.
Formamida	3 ml.
(Papel impregnado con formamida al 3% en acetona).	

Sistema N° 23. (20)

Cloroformo	80 ml.
Benceno	20 ml.
Agua	50 ml.

Sistema N° 24. (20)

Cloroformo	20 ml.
Benceno	80 ml.
Agua	50 ml.

Sistema N° 25. (18)

Etil hexanol	6 ml.
Alcohol amílico	2 ml.
Agua	8 ml.
Formamida	2 ml.

Sistema N° 26. (18)

Benceno	78 ml.
Cloroformo	12 ml.
Butanol	10 ml.
(Saturado con formamida).	

Sistema N° 27. (19)

Cloroformo	92 ml.
Metanol	8 ml.
(Saturado con agua).	

Los cromatogramas obtenidos a partir de los sistemas 1, 3, 9, 10, 11, 21 se secaron en la estufa a una temperatura de 100°C durante 10 minutos y luego fueron atomizados con la solución de metadinitro-benceno en benceno al 5%, seguidos de una solución acuosa de hidróxido de sodio al 20%.

Aparecen unas manchas de color rojo violeta, coloración que desaparece rápidamente.

Los cromatogramas obtenidos a partir de los sistemas 2, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 22 se secaron en la estufa a una temperatura de 90°C durante 15 minutos y luego se atomizaron con la solución de ácido tricloroacético al 33% en cloroformo y nuevamente fueron calentados en la estufa a la misma temperatura por 10 minutos. Aparecen unas manchas verde azulosas bastante intensas y persistentes.

Los cromatogramas obtenidos a partir de los sistemas 4, 5, 6, 20, 23, 27 inmediatamente sacados del solvente se atomizaron con la solución de yodo al 1% en cloroformo-metanol. Aparecen unas manchas de color pardo amarillento que desaparecen rápidamente.

Los cromatogramas obtenidos a partir de los sistemas 7, 8, 16, 18, 24, 25, 26 se secaron en la estufa a una temperatura de 100°C durante 10 minutos y luego fueron atomizados con la solución de metadinitro-benceno al 2,5% en cloroformo seguidos de la solución alcohólica de hidróxido de potasio. Aparecen unas manchas de color rojo violeta muy tenues y de poca duración.

En todos los casos la cantidad de solvente utilizado fue de 50 ml., dejando saturar las cámaras por 1 hora.

En cada cámara se colocaron 2 tiras de papel, una de ellas con muestra del extracto clorofórmico obtenido, ya sea de orina o de sangre, y la otra con la solución clorofórmica de 0,08 mg. de la droga por ml. de solvente que sirvió como solución patrón.

La siguiente tabla indica los valores de los Rf. dados por cada uno de los solventes anteriores.

TABLA NUMERO 1

<i>Solvente</i>	<i>Rf. DOX patrón</i>	<i>Rf. DOX problema</i>	<i>Rf. DTX patrón</i>	<i>Rf. DTX problema</i>	<i>Tiempo de desarrollo Minutos</i>
1	0,936	0,912	0,954	0,937	31
2	0,518	0,510	0,267	0,260	107
3	0,520	0,510	0,476	0,475	65
4	0,831	0,820	0,910	0,900	38
5	0,902	0,900	0,940	0,930	55
6	0,940	0,935	0,962	0,958	40
7	0,542	0,540	0,315	0,310	28
8	0,635	0,630	0,680	0,560	57
9	0,845	0,832	0,927	0,915	12
10	0,290	0,295	0,709	0,700	104
11	0,400	0,405	0,768	0,708	25
12	0,480	0,470	0,140	0,135	122
13	0,731	0,722	0,853	0,847	144
14	0,910	0,894	0,936	0,926	35
15	0,755	0,750	0,819	0,810	131
16	0,715	0,710	0,640	0,640	40
17	0,906	0,897	0,954	0,945	30
18	0,959	0,950	0,972	0,970	44
19	0,949	0,945	0,970	0,969	35
20	0,857	0,853	0,780	0,768	37
21	0,972	0,972	0,973	0,975	13
22	0,926	0,915	0,940	0,928	30
23	0,580	0,570	0,650	0,650	31
24	0,635	0,630	0,520	0,512	34
25	0,470	0,470	0,125	0,130	150
26	0,864	0,860	0,982	0,971	12
27	0,972	0,970	0,954	0,955	37

Nota: DOX = digoxina.
DTX = digitoxina.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Las manchas observadas en estos cromatogramas presentan casi todas formas alargadas y ovoides, nunca redondas.

En los sistemas de solventes 10, 11, 12 y 25 se observa la mejor separación de los heterósidos digoxina y digitoxina. En los demás solventes las manchas suben casi a la misma altura del solvente y sus Rf. son muy cercanos; en algunos casos se observó que no hay separación alguna de estos compuestos.

De preferencia usamos como revelador la solución de ácido tricloroacético al 33% en cloroformo, por presentar manchas bastante nítidas y persistentes aún con pequeñísimas fracciones de estos heterósidos. El tiempo de la duración de la coloración de estas manchas fue aproximadamente de 48 horas.

Adicionando una gota de agua oxigenada a este revelador momentos antes de ser atomizado sobre las tiras de papel y desarrollada la coloración como se dijo anteriormente, se observó una mancha amarilla naranja fluorescente para la digitoxina y azul fluorescente para la digoxina, al examinar el cromatograma bajo la luz ultravioleta, a 254 m μ .

La reacción es debida a la hidrólisis del heterósido producida por el ácido tricloroacético en caliente y a la formación de un grupo cromóforo por la oxidación posterior con agua oxigenada. Las experiencias hechas así lo demuestran, no importa el orden en que se agreguen los reactivos (ácido tricloroacético y agua oxigenada) siempre se observa fluorescencia con luz ultravioleta.

2. — CROMATOGRAFIA SOBRE CAPA DELGADA

Para esta cromatografía se utilizaron también los extractos clorofórmicos de sangre y de orina obtenidos por los métodos ya enunciados.

Se usaron placas de vidrio de 10 por 20 cm. perfectamente lavadas. Se empleó Sílica Gel G Merck, que es la recomendada según datos bibliográficos. Como cámaras cromatográficas se utilizaron recipientes de vidrio de forma rectangular con cierre hermético. En todos los casos la cantidad de solvente utilizado fue de 100 ml. dejando saturar las cámaras por 12 horas.

TECNICA CROMATOGRAFICA

Los cromatogramas se efectuaron de la siguiente manera: la placa ya activada se dividió en cuatro bandas: En la primera ban-

da a una distancia de 2 cm. del borde inferior se colocó con una micropipeta gota a gota 0,1 ml. del extracto clorofórmico de sangre; en la segunda banda 0,1 ml. de una solución patrón de digitoxina en cloroformo en una concentración de 80 mcg. por ml. de solvente; en la tercera banda 0,1 ml. de una solución que contiene una mezcla de digitoxina y digoxina y en la cuarta banda 0,1 ml. de una solución patrón de digoxina en cloroformo - metanol (65:35) en una concentración de 80 mcg. por ml. de solvente.

Una vez desarrollado el cromatograma, se secan las placas en la estufa a una temperatura de 90°C durante 15 minutos y se atomizan con la solución reveladora de ácido tricloroacético al 33% en cloroformo; nuevamente se calientan por 10 minutos a la misma temperatura y aparecen las manchas de color verde azulado. El ácido tricloroacético fue el revelador escogido por nosotras por presentar mayores ventajas.

Para el extracto de orina se procedió en igual forma. (25).

SISTEMAS
DE SOLVENTES UTILIZADOS

Sistema N° 1. (26)

Benceno	78 ml.
Cloroformo	12 ml.
Butanol	5 ml.
(Saturar con formamida).	

Sistema N° 2. (27)

Tetrahidrofurano	1 ml.
Cloroformo	1 ml.
(Saturar con formamida).	

Sistema N° 3. (27, 33)

Cloroformo	100 ml.
Formamida	3 ml.

Sistema N° 4. (28)

Benceno	12 ml.
Cloroformo	78 ml.
Butanol	5 ml.
(Saturar con formamida).	

Sistema N° 5. (28, 29)

Benceno	20 ml.
Cloroformo	60 ml.
Acetato de etilo	20 ml.
(Saturar con agua).	

Sistema N° 6. (28)

Benceno	12 ml.
Cloroformo	88 ml.
(Saturar con formamida).	

Sistema N° 7. (30)

Xileno	10 ml.
Metanol	4 ml.
Metil etil cetona	10 ml.
Formamida	0,4 ml.

Sistema N° 8. (31)

Alcohol amílico	1 ml.
Agua	1 ml.

Sistema N° 9. (32)

Cloroformo	44 ml.
Metanol	6 ml.

Sistema N° 10. (33)

Benceno	25 ml.
Agua	10 ml.
Butanol	20 ml.

Sistema Nº 11. (34)

Benceno	4,5 ml.
Acetato de etilo	28,5 ml.
Etanol	16,5 ml.
Agua	0,6 ml.

Sistema Nº 12. (35)

Cloroformo	92 ml.
Metanol	8 ml.

TABLA NUMERO 2

Valores de los Rf. correspondientes a la digitoxina y digoxina.

<i>Solvente</i>	<i>Digitoxina</i>	<i>Digoxina</i>	<i>Tiempo de desarrollo horas - minutos</i>
1	0,27	0,10	1 - 00
2	0,74	0,62	1 - 30
3	0,32	0,60	0 - 45
4	0,04	0,74	1 - 30
5	0,15	0,59	1 - 30
6	0,46	0,63	0 - 45
7	0,73	0,64	0 - 35
8	0,53	0,40	3 - 35
9	0,20	0,11	1 - 10
10	0,60	0,40	1 - 30
11	0,86	0,84	1 - 00
12	0,17	0,06	1 - 15

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

El mejor sistema de solvente es el número 10 porque nos dá manchas redondas, de Rf. lejanos y bastante separadas del punto de partida.

Al atomizar algunas placas con la solución reveladora de metadinitro - benceno seguida de la solución acuosa de hidróxido de sodio al 20% se produce un levantamiento de la capa de sílica, tal vez ocasionado por la alta concentración del álcali.

Igual que en la cromatografía ascendente sobre papel, utilizamos como revelador la solución de ácido tricloroacético al 33% en cloroformo. Las manchas verde - azulosas que se observan son más intensas y persistentes que las que aparecen en la cromatografía sobre papel.

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LOS HETEROSIDOS

Ya determinado el mejor sistema de solvente y efectuados los cromatogramas se procedió a su determinación cuantitativa por el método espectrofotométrico.

Encontramos diversos métodos y en vista de que los diferentes investigadores recomiendan el seguido por cada uno de ellos, resolvimos ensayarlos todos para así escoger el más sensible y el más estable.

Para ello tomamos como referencia soluciones patrón de digoxina en cloroformo - metanol (65:35) en concentración de 8 mcg. por ml. de solvente y digitoxina en cloroformo en concentración igual a la anterior. En todos los casos tomamos una alícuota de 1 ml. de la solución patrón de digoxina y digitoxina, respectivamente.

Los métodos ensayados fueron los siguientes:

- a) Determinación con el metadinitro - benceno alcalino (36, 37).
- b) Determinación con el xantidrol (38, 39, 40).
- c) Determinación con el óxido férrico (41).
- d) Determinación con el ácido 3,5 dinitrobenzoico (42).
- e) Determinación con el ácido pícrico (43, 44, 45).
- f) Determinación con el reactivo de Keller - Kiliani (46).

De los ensayos hechos sacamos las siguientes conclusiones:

1. En las determinaciones espectrofotométricas hechas, observamos que el método más estable y más sensible era el del xantidrol, por lo tanto fue este el usado.

Entre las tres variaciones de tal método, empleamos finalmente la que usa xantidrol en concentración de 30 mcg.% en ácido acético glacial, con calentamiento y lectura en los primeros 30 minutos de desarrollada la coloración, ya que esta permanece estable durante este tiempo.

2. La variación del método en la que se deja en la oscuridad sin calentamiento, aunque parece la más estable, no se aplicó por exigir lecturas después de las 2 horas de iniciada la reacción.

3. Los métodos con metadinitro - benceno alcalino son poco sensibles y la coloración rosada - violeta desaparece en 5 minutos.

4. Con el reactivo Keller - Kiliani se obtiene una absorbancia menor que con el reactivo de xantidrol; la coloración amarillo-verdosa era estable durante media hora.

5. El método del picrato sólo es sensible a concentraciones mayores de 8 mcg/ml. de estos heterósidos.

6. Los demás métodos no presentan resultados estables y su sensibilidad es muy reducida.

7. La máxima absorbancia con el método empleado del xantidrol se presenta para la digoxina a 522 milimicras y para la digitoxina a 525 milimicras.

8. Las reacciones hechas sobre extractos de sangre y de orina de pacientes no medicados no fueron positivas con ninguno de los reactivos nombrados.

TECNICA ESPECTROFOTOMETRICA

En la placa ya activada y a lo ancho de esta, se colocaron con una micropipeta gota a gota 3 ml. del extracto clorofórmico de sangre o de orina con la droga; las placas se corrieron usando el sistema de solvente: benceno - agua - butanol (25:10:20). Una vez terminado su recorrido se secaron en la estufa a una temperatura de 90°C por 15 minutos y se atomizaron con la solución de ácido tricloroacético, se calentaron luego a 90°C por 10 minutos. Los heterósidos (digoxina y digitoxina) aparecen como manchas verde-azulosas. Para determinar el Rf. de las manchas se reveló con ácido tricloroacético solamente la primera mancha, pues interfiere el revelador con la coloración final en la determinación espectrofotométrica.

Se raspó la zona correspondiente a las otras manchas, se pasó la Sílica Gel G a un tubo de 50 ml. y se añadieron 5 ml. del reactivo de xantidrol (30 mg. de xantidrol en 100 ml. de ácido acético) y 0,1 ml. de ácido clorhídrico concentrado, se calentó a baño maría por 3 minutos y luego se enfrió en un baño de hielo y agua por 5 minutos. A continuación se centrifugó a 2.500 r.p.m. durante 10 minutos y en el líquido sobrenadante se determinó su absorbancia en relación a un blanco preparado a un mismo tiempo.

Como la furosemida (Lasix[®]) fue la única droga ensayada que dió coloraciones similares a las de los heterósidos digoxina y digitoxina, con los reactivos de Mandelin, Fröhde, Lafon y Keller -

Kiliani, hicimos todo el proceso con dicha droga: adición al material biológico (in vitro), extracción, cromatografía y espectrofotometría, no habiendo obtenido coloración alguna con el ácido tricloroacético, ni absorbancia con el reactivo de xantidrol; en estas condiciones no se obtuvo gráfica ni espectro posible.

NUEVO METODO ABREVIADO PARA DETERMINACION DE DIGOXINA EN SANGRE Y EN ORINA

Como uno de los objetivos de nuestra tesis es hallar un método corto para determinar el nivel de uno de los heterósidos en la sangre y su porcentaje de eliminación en la orina, pensamos que la determinación espectrofotométrica podría hacerse directamente sobre los extractos sin purificación cromatográfica previa, pues eran transparentes, casi incoloros y no interferían sus componentes naturales en el método usado.

Para confirmar esta opinión verificamos pruebas paralelas: una, con absorción y elución cromatográfica y otra, omitiendo estos pasos.

Como resultados observamos que no solamente se empleaba menos tiempo sino que había menores pérdidas de heterósidos haciendo lecturas directamente sobre los extractos ya que la absorbancia era mayor en este caso.

Además en la comparación de los espectros con los de los patrones en cloroformo - metanol, se observaron los picos en iguales longitudes de onda. (522 milimicras).

Dentro del método comprobamos que en la evaporación a sequedad de los extractos clorofórmicos a temperaturas no mayores de 30°C no se destruían los heterósidos.

Determinaciones sobre muestras de sangre y orina hechas a las 24 horas y a los 15 días de tomadas, mostraron una destrucción total del heterósido en sangre y una baja del 75% de su contenido en la orina, al cabo de los 15 días.

SINOPSIS DEL METODO ABREVIADO

1. *Recolección de las muestras.*

Se tomaron de pacientes adultos de sexo femenino, en el Hospital Universitario de San Juan de Dios.

A) *Sangre*: 10 ml. en frascos de 20 ml., con 0,5 ml. de solución anticoagulante ACD (U.S.P. XV), esterilizados en autoclave (20 minutos, 8 libras y 105°C). Agitar y guardar en refrigerador a 2°C.

B) *Orina*: Muestras de 24 horas en frascos de 1.000 ml. con 50 ml. de n - heptano. Guardar en refrigerador.

2. *Extracción.*

La descrita anteriormente.

3. *Determinación de los heterósidos.*

Tomar una alícuota exactamente medida del extracto cloro-fórmico, evaporar a sequedad a una temperatura no mayor de 30°C, adicionar 5 ml. de la solución reactivo de xantidrol recientemente preparada y 0,1 ml. de ácido clorhídrico concentrado, agitar fuertemente y calentar en un baño maría a la ebullición por 3 minutos, enfriar en un baño de hielo y agua por 5 minutos, trasferir a una celda de cuarzo y después de 5 minutos determinar su absorbancia frente a un blanco preparado en iguales condiciones.

En vista del bajo nivel de la droga en la sangre y de que el aparato no era sensible a cantidades tan pequeñas, resolvimos hacer una titulación por retroceso y para ello adicionamos a todas las muestras 0,5 ml. de una solución de digoxina patrón (B. P.) en metanol-cloroformo (35:65) en una concentración de 8 mcg. por ml. de solvente. Primero determinamos la absorbancia para esta concentración y luego determinamos la de la muestra y hallamos la diferencia entre las absorbancias de estas dos determinaciones. La absorbancia obtenida corresponderá a la de la muestra problema, la que interpolamos luego en la curva de calibración para determinar su concentración.

Nota: Por no ser posible hallar pacientes tratados con digi-toxina, solo se hicieron determinaciones de digoxina en sangre y orina.

ANALISIS DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES DEL HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS

Se utilizó un espectrofotómetro Beckman DB.

Se obtuvieron extractos de sangre y de orina, de muestras de una persona sana no medicada, y con ellos preparamos patrones agregando digoxina en la sangre y en la orina en proporciones de 4, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56 y 64 mcg. de digoxina por ml., a los que determinamos su absorbancia frente a un blanco de extracto de sangre y extracto de orina, respectivamente.

Con los datos obtenidos trazamos una curva de calibración para digoxina en sangre y otra para digoxina en orina, las que corregimos por el método de los mínimos cuadrados.

Obtenidos los datos de absorbancia de las muestras de sangre y de orina de los pacientes, los interpolamos en las curvas de calibración respectivas para calcular su concentración. Hicimos luego el cálculo para hallar el nivel de la droga en los 10 ml. de sangre y su eliminación en la orina de las 24 horas.

TABLA NUMERO 5

Curva de calibración para la digoxina en sangre.

<i>Concentración mcg./ml.</i>	<i>% Transmitancia</i>	<i>Absorbancia</i>
4	87,6	0,057
8	78,0	0,108
16	61,8	0,209
24	56,5	0,248
32	41,8	0,379
40	30,5	0,516
48	27,8	0,556
56	19,8	0,703
64	17,5	0,757

TABLA NUMERO 6

Curva de calibración para la digoxina en sangre corregida por los mínimos cuadrados.

<i>Concentración mcg./ml.</i>	<i>Absorbancia</i>
4	0,071
8	0,117
16	0,209
24	0,301
32	0,393
40	0,484
48	0,576
56	0,668
64	0,760

TABLA NUMERO 7

Curva de calibración para la digoxina en orina.

<i>Concentración mcg./ml.</i>	<i>% Transmitancia</i>	<i>Absorbancia</i>
4	84,7	0,072
8	72,8	0,138
16	57,9	0,237
24	43,8	0,359
32	32,0	0,495
40	23,8	0,623
48	20,2	0,695
56	12,0	0,921
64	8,0	1,097

TABLA NUMERO 8

Curva de calibración para la digoxina en orina corregida por los mínimos cuadrados.

<i>Concentración mcg./ml.</i>	<i>Absorbancia</i>
4	0,061
8	0,125
16	0,253
24	0,381
32	0,509
40	0,637
48	0,765
56	0,893
64	1,021

TABLA NUMERO 9

Valoración de digoxina en sangre.

<i>Nº</i>	<i>% T Muestra + 0,5 ml. de soluc. patrón</i>	<i>As. Muestra + 0,5 ml. de soluc. patrón</i>	<i>Absor- bancia final</i>	<i>Conc/mcg. DOX ml. de suero</i>	<i>Nº cama</i>
1	00,00	0,000	0,000	0,00	622
2	68,20	0,166	0,058	0,31	625
3	58,10	0,236	0,128	0,89	627
4	70,30	0,153	0,045	0,20	631
5	65,30	0,185	0,076	0,45	635
6	69,00	0,161	0,052	0,23	634
7	65,00	0,187	0,078	0,46	635
8	00,00	0,000	0,000	0,00	641
9	46,00	0,337	0,229	1,80	643
10	59,50	0,226	0,117	0,80	649
11	66,50	0,177	0,068	0,37	653

Nº	% T Muestra + 0,5 ml. de soluc. patrón	As. Muestra + 0,5 ml. de soluc. patrón	Absor- bancia final	Conc/mcg. DOX ml. de suero	Nº cama
12	66,90	0,175	0,067	0,39	701
13	00,00	0,000	0,000	0,00	701*
14	67,00	0,174	0,066	0,38	706
15	67,40	0,171	0,063	0,35	706
16	71,20	0,148	0,040	0,16	707
17	65,50	0,184	0,076	0,47	707**
18	46,50	0,333	0,224	1,73	708
19	66,40	0,178	0,070	0,42	712
20	71,50	0,146	0,038	0,18	713
21	70,00	0,155	0,046	0,18	715
22	70,30	0,153	0,045	0,20	716
23	66,80	0,175	0,067	0,39	748
24	67,20	0,173	0,065	0,37	urg. 48125
0,5 ml.	77,80		0,109		
Sol. patrón					

Nota: * La mitad de la muestra determinada a los 15 días.

** La muestra tiene doble dosis.

TABLA NUMERO 10

Datos correspondientes al nivel
de concentración plasmática de digoxina.

Nº	% T Muestra + 0,5 ml. de soluc. patrón	As. Muestra + 0,5 ml. de soluc. patrón	Absor- bancia final	Conc/mcg. DOX ml. de suero	Tiempo
1	65,30	0,185	0,076	0,45	5 min.
2	62,80	0,202	0,093	0,69	15 min.
3	55,50	0,256	0,147	1,06	30 min.
4	61,80	0,209	0,099	0,64	60 min.
5	45,60	0,341	0,234	1,82	12 hr.
6	42,20	0,375	0,266	2,10	24 hr.
7	65,00	0,187	0,078	0,46	72 hr.

TABLA NUMERO 11

Valoración de digoxina en orina.

Nº	% Transmitancia	Absorbancia	Concentración mcg. DOX/orina 24 hr.	Nº cama
1	86,7	0,062	52,5	622
2	50,1	0,300	116,4	625
3	35,5	0,450	120,0	627
4	69,2	0,160	122,4	631
5	46,8	0,330	161,3	634
6	75,0	0,125	120,0	635
7	60,0	0,222	140,0	635
8	77,3	0,112	45,0	641
9	35,5	0,450	120,0	643
10	77,5	0,111	176,8	649
11	45,5	0,342	171,5	653
12	71,0	0,149	190,0	701
13	87,0	0,061	50,0	701*
14	51,0	0,292	184,0	706
15	77,2	0,112	190,0	706
16	84,5	0,073	72,4	707
17	20,2	0,695	264,5	707**
18	67,2	0,173	71,6	708
19	22,4	0,650	253,0	712
20	85,0	0,071	99,5	713
21	60,80	0,215	99,3	715
22	30,50	0,516	115,7	716
23	36,70	0,435	195,5	748
24	72,70	0,139	177,6	urg. 48125

Nota: * La mitad de la muestra determinada a los 15 días de tomada.

** A la paciente 707 se le administró el doble de la dosis.

ASPECTOS CLINICOS

Las muestras de sangre y de orina fueron tomadas de pacientes afectadas de cardiopatías, internadas en el Hospital Universitario San Juan de Dios, Sección de Cardiología.

Las determinaciones se hicieron sobre muestras tomadas a 20 pacientes, de sexo femenino, cinco (5) de ellas con edad entre 18 y 37 años y quince (15) entre 45 y 73 años.

Todas estaban en tratamiento con digoxina (Lanicor^(R)) 0,250 mg. al día, vía oral. El mismo día en que se tomaron las muestras, se les hizo su correspondiente electrocardiograma.

En una paciente (H. C. N^o 580929) de 46 años se hicieron valoraciones de digoxina en sangre a los 5, 15, 30 y 60 minutos después de haber recibido 0,250 mg. de la droga por vía endovenosa. Se observó una máxima concentración de la droga a los 30 minutos. Se hicieron determinaciones a las 12, 24 y 72 horas, habiendo recibido la paciente nuevas dosis intravenosas y orales de 0,250 mg. de digoxina a las 8, 16, 40 y 64 horas. En la Tabla N^o 12 se anota un resumen de la historia clínica de esta paciente junto con los datos de laboratorio.

CONCLUSIONES

1. El método in vitro permite una recuperación de digoxina en sangre del 95% y en la orina del 93,5%.

2. El método propuesto para determinar digoxina en sangre y en orina se puede efectuar en tres horas, en comparación con las doce horas del método citado por Jelliffe (48).

3. En un caso se observó que la máxima concentración de digoxina en la sangre se obtiene a la media hora, después de administrar 0,250 mg. por vía I. V.

4. Con una dosis de 0,250 mg. diarios de digoxina administrada a los pacientes que no presentaban síntomas de intoxicación, la eliminación urinaria de las 24 horas varía entre 71,6 mcg. y 122,4 mcg. La variación en la sangre de 0,20 a 0,31 mcg. por ml. de suero no es muy indicativa por no haberse podido tomar las muestras de sangre al mismo tiempo.

TABLA NUMERO 12

<i>Nº H. C.</i>	<i>Dosis mcg./d.</i>	<i>Vol. orina 24 horas</i>	<i>Edad</i>	<i>Nivel de DOX por ml. suero</i>	<i>Elim. DOX orina 24 h.</i>	<i>Diagnóstico de entrada</i>	<i>Diagnóstico de salida</i>	<i>Informe electrocardiográfico</i>
580929	250 mcg.	1.160 cc.	46	0,46 mcg.	140,0 mcg.	<ol style="list-style-type: none"> 1) Diabetes melitus. 2) Falla cardiaca descompensada. 3) Moniliasis cutánea. 4) Infección urinaria. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Diabetes melitus controlada. 2) I.C.C. compensada. 3) Derrame pleural residual. 4) Edema maleolar residual. 	1-25/71 Persistencia de la configuración de bloqueo de rama izquierda. La pequeña que aparece en V5 y V6, DI y aVL sugiere la posibilidad de un infarto anteroseptal.

5. Las pacientes que habían dejado de recibir digoxina 10 y 12 días antes de la toma de las muestras, eliminaban aún por la orina aproximadamente un 20% de la última dosis (0,250 mgr./día). En la sangre no fue detectable.

6. Al doblar la dosis a una de las pacientes aumentó tanto su concentración sanguínea como su eliminación urinaria.

Los puntos 5 y 6 están de acuerdo con lo expuesto por Friedman, Shirley y Bine (47) quienes encontraron que después de haber suspendido en las pacientes la administración de digoxina, se requería un período de 2 a 3 semanas para su completa eliminación y que esta aumentaba en relación con la dosis administrada.

7. Las pacientes intoxicadas, según electrocardiograma, tenían concentraciones mayores de 0,35 mcg./ml. de suero y mayores de 150 mcg. en la orina de las 24 horas.

8. En casos de oliguria con igualdad de dosis la concentración de digoxina es mayor.

9. Las pacientes intoxicadas según electrocardiograma, con oliguria e hipertensas, tenían una concentración sanguínea mayor de 0,8 mcg/ml. de suero. Lógicamente en las pacientes con disfunción renal la dosis de digoxina debe ser menor.

10. Hallamos en la orina cantidades muy superiores a las reportadas por Roger W. Jelliffe (48) probablemente debido a la mayor efectividad de nuestro método.

11. El método propuesto se verificó, in vitro, con solución clorofórmica de digitoxina pura. No se determinó su concentración en pacientes puesto que no se utiliza esta droga en el Hospital Universitario de San Juan de Dios.

12. Es importante verificar las determinaciones dentro de las 72 horas posteriores a la toma de las muestras para evitar la degradación de la droga.

RESUMEN

En búsqueda del método analítico más eficaz por su grado de certeza y rapidez, para dosificar en sangre y en orina la digoxina, se ensayaron diversas reacciones químicas cualitativas y cuantita-

tivas de los digitálicos y de los medicamentos asociados, llegando finalmente a desarrollar un método de dosificación de digoxina en sangre que puede llevarse a cabo en corto tiempo.

Se tomaron los espectros IR y se elaboraron curvas de calibración, tanto de la sustancia pura como de la extraída.

Los trabajos fueron hechos sobre varios pacientes del Hospital Universitario San Juan de Dios de Bogotá y se obtuvieron resultados de orden químico y clínico sobre 19 de ellos.

SUMMARY

Several chemical reactions of the digitalic glycosides were studied in order to set a precise and rapid method for their qualitative and quantitative analysis in blood and urine.

The IR spectra and the standard curves for the pure sample and the recovered compound were registered.

The work was done using 19 patients of the University Hospital San Juan de Dios, in Bogota and some chemical and clinical results were obtained.

RÉSUMÉ

Nous avons effectué une étude critique de diverses méthodes pour déterminer qualitativement et quantitativement les alcaloïdes de la digitale dans l'urine et dans le sang.

Les divers essais nous ont permis d'élaborer une méthode spectrophotométrique satisfaisante pour le dosage de la digoxine dans le sang. La méthode a été contrôlée sur un certain nombre de patients de l'Hôpital Universitaire San Juan de Dios et on a obtenu des conclusions chimiques et cliniques pour dix-neuf d'entre eux.

BIBLIOGRAFIA

1. BROWN, B. T., SHEPHEARD, K. E. y WRIGHT, S. G., J. Pharmacol Exper. Therap., 118: 39, (1956).
2. FRIEDMAN, M. y BINE, R. JR., J. CLIN. Investig. 39: 1.578, (1970).
3. HILTON, J. G. Science, 110: 526, (1949).
4. SHEPHEARD, K. E., THORP, R. y WRIGHT, S. E., J. Pharmacol. Exper. Therap., 12: 133, (1954).
5. BROWN, B. T., RANGER, D. y WRIGHT, S. E. J. Biol. Chem., 232: 315 (1958).
6. JELLIFFE, R. W. J. Lab. Clin. Investig. Med., 67: 694, (1966).
7. VIELAR PALASI, V. "Cromatografía sobre papel". Instituto Español de Fisiología. (1952).
8. FRIEDMAN, C. "Cromatografía sobre papel". Ed. Beta (Buenos Aires), 1958.
9. BROWN, B. T., SHEPHEARD, K. E. y WRIGHT, S. E., J. Pharm. Exper. Therap., 118: 39, (1956).
10. SHEPHEARD, K. E., THORP, R. H. y WRIGHT, S. E., J. Pharm. Exper. Therap., 112: 133, (1954).
11. WHITE, F. J. Pharm. Assoc. 51: 62, (1962).
12. HENSSER, P. Deutsche Apotheker Zeitung, 19.8.65/105, 33: 1.001.
13. BROWN, B. T., RANGER, D. y WRIGHT, S. T., J. Pharmacol. Exper. Therap., 113: 1: 955, (1955).
14. FRIEDMAN, M. y BINE, R. JR., J. CLIN. Invest. 39: 1.578 - 1.583, (1960).
15. GISVOLD, O. y WRIGHT, S. E., J. Am. Pharm. Assoc., 18: 217, (1959).
16. SCHINDLER y REICHSTEIN, SVENDEEN y JENSEN, B. K., J. Biol. Chem., 194: 703, (1952).
17. DOHERTY, J. E., PERKINGS, W. H. y LITTLE, R. American Heart Journal 63: 528, (1962).
18. ASHEY, I. J., BROWN, B. T. y WRIGHT, S. T., J. Biol. Chem., 232: 315 (1958).
19. BENETT, D. y HOFMAN, E. Journal of Chromatography, 12: 245, (1963).
20. SELLWOOD, E. G., J. Pharm. and Pharmacol., 9: 92, (1957).
21. JELLIFFE, R. W., J. Lab. Clin. Med., 67: 694, (1966).
22. STAHL y KALTENBACH, U. Journal of Chromatography, 20: 672, (1967).
23. TATJANA BIRAN, FIESTER y JURAF MERKAS. Journal of Chromatography, 41: 1, (1966).

24. JENSEN y TEUNCE., J. Pharm. and Pharmacol., 7: 334, (1955).
25. ZECHMEISTER, L. y CHOLNOKG, L. "Principles and Practice of Chromatography", John Wiley and Sons, Inc., New York., 42, (1943).
26. COX, E. y WRIGHT, S. E., J. Pharmacol. Exper. Therap., 126: 117, (1959).
27. ASHLEY, I. J., BROWN, B. T., OKITA, G. T. y WRIGHT, S. E., J. Pharmacol. Exper. Therap., 112: 133, (1954).
28. SEWOOD, E. G. B., J. Pharm. and Pharmacol., 9: 997, (1957).
29. HENSER, D., Deutsche Apotheker Zeitung, 19: 865/105, 33: 1.101 - 1.102, (1967).
30. BRIGGS, E. G., LINDSAY, H. Chemical Abstracts, 2: 924, (1965).
31. JENSEN, B. K. y TEUNCE., J. Pharmacol. and Pharm., 7: 334, (1955).
32. TATJANA BIRAN., FISTER y JURAJ MERKAS, J. of Chromatography 41: 1, (1969).
33. FIESCHER, C. S., SJOEDSNA, A. y JOHNSON. This Journal, 112: 133, (1954).
34. STAHL y KALTENBACH, U., J. of Chromatography, 20: 672, (1965).
35. BENNET, D. y HEFTMAN, E., J. of Chromatography, 12: 245, (1963).
36. GISVOLD, O. y WRIGHT, S. E., J. Am. Pharm. Assoc., 18: 217, (1959).
37. COX, E. y WRIGHT, S. E., J. Pharmacol. Exper. Therap., 126: 177, (1959).
38. JELLIFFE, R. W., J. Lab. Clin. Med., 67: 694 - 708, (1966).
39. SEWOOD, E. G. B., J. Pharm. and Pharmacol., 9: 997, (1957).
40. HENSER, D., Deutsche Apotheker Zeitung, 19: 865/105, 33: 1.101, (1967).
41. BRIGGS, E. G., LINDSAY, H. Chemical Abstracts, 2: 924, (1965).
42. WHITE, F., J. Pharmacol. Exper. Therap., 51: 62, (1962).
43. BELL, F. K. y KRAUTZ, J. C. JR., J. Am. Pharm. Assoc., 37: 297, (1948).
44. SELLWOOD, E. G. B., J. Pharm. and Pharmacol., 10: 48 - 577, (1958).
45. FISCHER, S. C., Chemical Abstracts, 48: 11005f, (1945).
46. PESEZ, M. N., J. Am. Pharm. Assoc., 42: 635, (1953).
47. BROWNWALD, E., POOL, P. E. "Conceptos Modernos sobre Enfermedades Cardiacas", Mecanismos de Acción de los Glucósidos Digitálicos. Vol. XXXVII, Nov.- Dic./68. N° 11 - 12.
48. JELLIFFE, R. W. con la asistencia técnica de Jackson, D. y Morgan, S. J., J. Lab. Clin. Med., 67: 694, (1966).