

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXVIII, 1

SECTIO D

1973

Zakład Farmacji Stosowanej. Instytut Analizy i Technologii Farmaceutycznej.  
Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: prof. dr farm. Henryk Nerlo

Krystyna KOZIEJOWSKA

**Chromatograficzna ocena naparu i maceratu z *Folium Digitalis lanatae***

Хроматографическая оценка настоя и мацерации из *Folium Digitalis lanatae*

A Chromatographic Evaluation of Infusion and Maceration with *Folium Digitalis lanatae*

Spośród roślinnych surowców nasercowych, szczególną uwagę badaczy w ostatnim dziesięcioleciu zwraca naparstnica wełnista — *Digitalis lanata* Ehrh. Kompleks kardenolidowy, wyizolowany przez Kaisera (6, 13) ze świeżych liści, zawiera około 60 związków o różnej sile działania terapeutycznego, zdolności resorbowania i kumulowania się w organizmie. Zawartość lanatozydów A, B, C oraz głównych glukozydów wtórnych w surowcu różnego pochodzenia oznaczyli Hauser, Kartnig, Verdino (4). Ocena surowca uprawianego w Indiach zajmowali się Singli i Handa (10). Enzymatyczny proces rozkładu lanatozydu A śledzili Pitra, Poláková, Kolářová (9), lanatozydu C — Bruyn i Hall (1). Żurkowska i współpr. (14) opracowali metodę ilościowego oznaczania lanatozydu C, przydatną do oceny liści naparstnicy wełnistej w skali technicznej. Ilościową metodę oznaczania zespołu kardenolidów i lanatozydu C w liściach tego surowca zaproponowali Elbanowska i Kaczmarek (3).

Przedmiotem naszej pracy jest badanie zespołu kardenolidowego wytrawionego w naparze i maceracie, sporządzonych z liści naparstnicy wełnistej w oparciu o przepisy FP IV. Napary z surowców nasercowych są oficynalną postacią leku nie tylko w FP IV, ale również w szeregu innych aktualnych farmakopeach — Ph. Helv. VI, Ph. Hung. VI, PhBs III, Ph. Ital. VII, GF SSSR X, DAB 7. W przepisach poszczególnych farmakopei stwierdza się różnice w sposobie przygotowywania naparów. Polegają one najczęściej na dłuższym lub krótszym czasie ekstrakcji, wyższej lub niższej temperaturze wytrawiania. Macerację z liści naparstnicy wełnistej wykonano celem stwierdzenia, jaki wpływ wywiera temperatura podczas ekstrakcji wodnej na skład kompleksu kardenolidowego.

Część doświadczalna

Według przepisów FP IV sporządzono po 200 g naparu i maceratu z liści naparstnicy wełnistej — *Digitalis lanata* Ehrh. w stosunku 1 : 100.

Otrzymane ciecze uwolniono od chlorofilu (7), wytrząsając je z czterochlorkiem węgla ( $1 \times 70$  ml i  $2 \times$  po 35 ml). Zespół glukozydów ekstrahowano z roztworu wodnego pięciokrotnie chloroformem i mieszaniną chloroformowo-etanolową w stosunku objętościowym 1 : 1, biorąc każdorazowo po 50 ml rozpuszczalnika. Połączone wyciągi chloroformowe i chloroformowo-etanolowe osuszono bezwodnym siarczanem sodu, przesączono przez zwitek waty, przemywając kolbę z pozostałym siarczanem sodu kilkakrotnie chloroformem. Po odparowaniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze nie przekraczającej  $40^{\circ}\text{C}$ , pozostałość roztarto pistlem z 1 g żelu krzemionkowego „S e r v a” Heidelberg. Całość wysuszono w temperaturze poniżej  $40^{\circ}\text{C}$  do zaniku zapachu chloroformu, wymieszano dokładnie homogenizując z 1 g wody destylowanej, a następnie przeniesiono na górną powierzchnię uprzednio przygotowanej kolumny chromatograficznej.

Kolumnę chromatograficzną stanowiła rurka szklana o długości 300 mm, średnicy 10 mm, z doszlifowanym korkiem w zwężonej części dolnej oraz napełniona do  $\frac{2}{3}$  wysokości żelem krzemionkowym „S e r v a” zmieszany z równą ilością wagową wody destylowanej. Kolumnę osadzono w kolbce ssawkowej, w której umieszczono odbieralnik. Zwężony dolny koniec rurki tkwił w odbieralniku, co zapobiegało rozpryskiwaniu się wycieku z kolumny. Po podłączeniu niewielkiego podciśnienia, kolumnę przemywano rozpuszczalnikami o rosnącej sile elucyjnej w następującej kolejności: I — benzen; II, III, IV — benzen : octan etylu 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2; V, VI — octan etylu; VII—XVI — octan etylu z dodatkiem 2, 5, 10, 15, 20% etanolu, zbierając poszczególne frakcje. Czas zbierania jednej frakcji wynosił 15—20 minut, przy stałej szybkości przepływu rozpuszczalnika. Frakcje oznaczono cyframi rzymskimi od I do XVI. Rozpuszczalnik z każdej frakcji usunięto w temperaturze nie przekraczającej  $40^{\circ}\text{C}$ , a pozostałość rozpuszczono w 1 ml mieszaniny chloroformowo-metanolowej w stosunku objętościowym 1 : 1.

Otrzymane roztwory przebadano przy pomocy chromatografii cienko-warstwowej w dwóch układach rozwijających:

I) octan etylu — metanol — woda 80 : 5 : 5 (11),

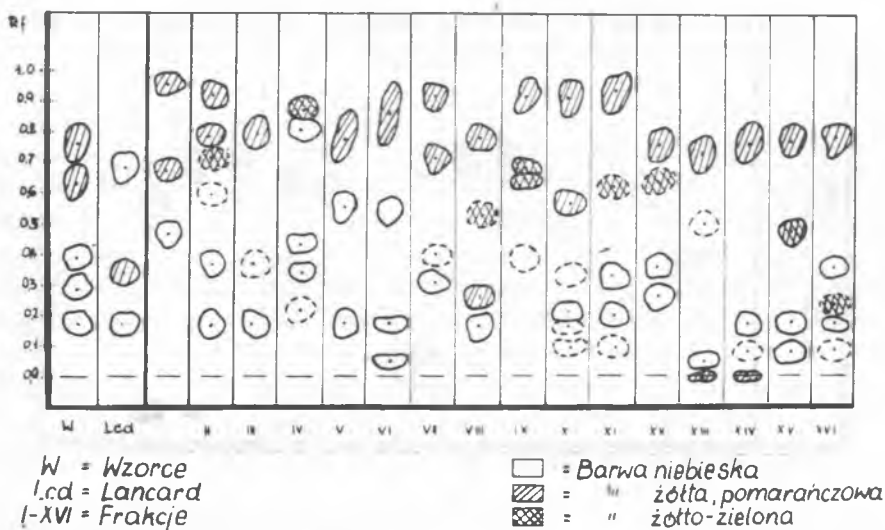
II) octan etylu — chloroform — metanol — 0,9% NaCl (10 : 5 : 3,5 : 1,5/2,8).

Stosowano płytki szklane o wymiarach  $15 \times 20$  cm, pokryte żelem krzemionkowym „Serva” o grubości warstwy 0,6 mm i aktywowane w temperaturze  $110^{\circ}\text{C}$  przez 30 minut. Na płytce w odległości 2 cm od dolnej ich krawędzi nanoszono każdorazowo po 250  $\mu\text{l}$  chloroformowo-metanolowego roztworu badanej frakcji w postaci odcinka o długości 1 cm, oraz po 10  $\mu\text{l}$  (= 25  $\mu\text{g}$  substancji) roztworów chloroformowo-metanolowych czystych glukozydów: lanatozydu C, dezacetylanatozydu C,

digoksyny, digitoksyny i acetyldigitoksyny. Ponadto z powodu braku czystego glukozydu z grupy B, chromatografowano jednocześnie chloroformowo-metanolowy wyciąg z preparatu handlowego „Lanacard” krople, zawierającego w swoim składzie lanatozyd B. Roztwory substancji wzorcowych nanoszono na tą samą płytkę, obok roztworu badanej frakcji.

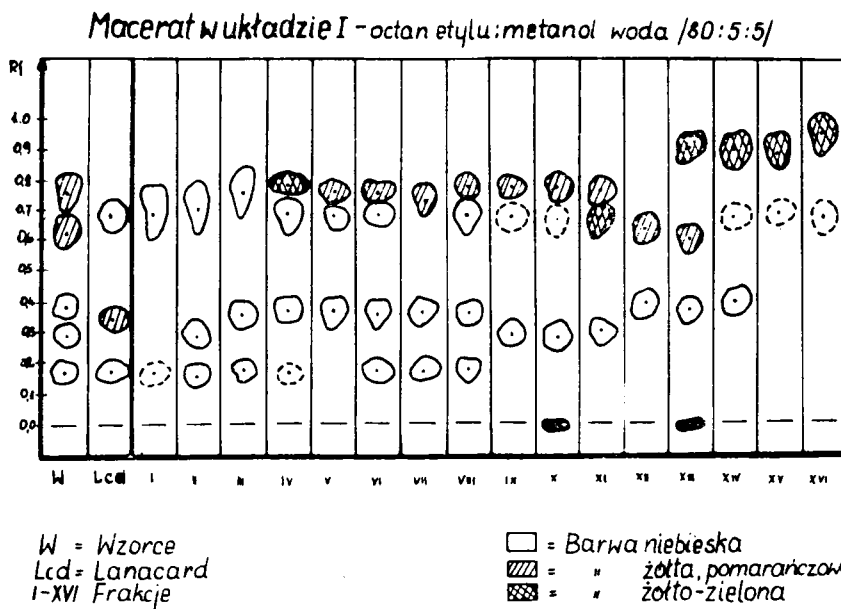
Chromatogramy rozwijano w komorach o szerokości 20 cm, długości 20 cm i wysokości 30 cm, w temperaturze pokojowej, na dystansie 12 cm od linii startu. Trzy boczne ściany komór wyłożono od wewnątrz bibułą i po nalaniu na dno fazy ruchomej pozostawiono je szczelnie nakryte do wysycenia na przeciąg 24 godzin. Płytki po wstawieniu do komór zanurzone były w fazie ruchomej na wysokość 1/2 cm. Czas rozwijania w układzie I wynosił 60 minut, w układzie II — 80 minut. Rozwinięte chromatogramy suszono na powietrzu, po czym uwidaczniiano plamy spryskując płytki świeżo przygotowanym 25% etanolowym roztworem kwasu trójchlorooctowego z dodatkiem 3% wodnego roztworu chloraminy w stosunku objętościowym 15 : 1 (5) i ogrzewając je w ciągu 10 minut w temperaturze 120°C. Chromatogramy oglądano w świetle dziennym i UV. Badanie każdej frakcji przeprowadzono dwukrotnie. Uzyskane wyniki przedstawiono na ryc. 1—4.

*Napar w układzie I - octan etylu : metanol : woda / 80 : 5 : 5/*



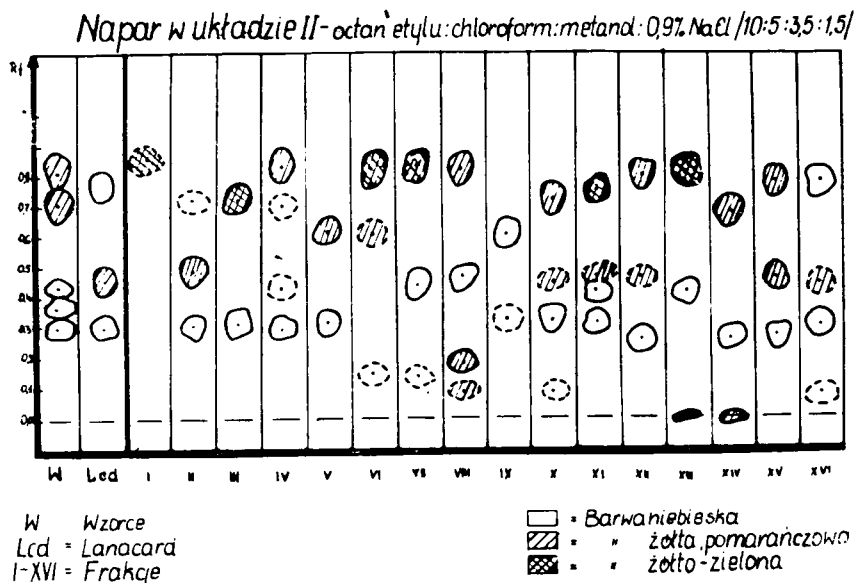
Ryc. 1. Chromatogram cienkowarstwowy naparu w układzie rozwijającym: octan etylu — metanol — woda 80 : 5 : 5

Thin-layer chromatogram of infusion in the developing system: ethyl acetate — methanol — water 80 : 5 : 5



Ryc. 2. Chromatogram cienkowarstwowy maceracji w układzie rozwijającym: octan etylu — metanol — woda 80 : 5 : 5

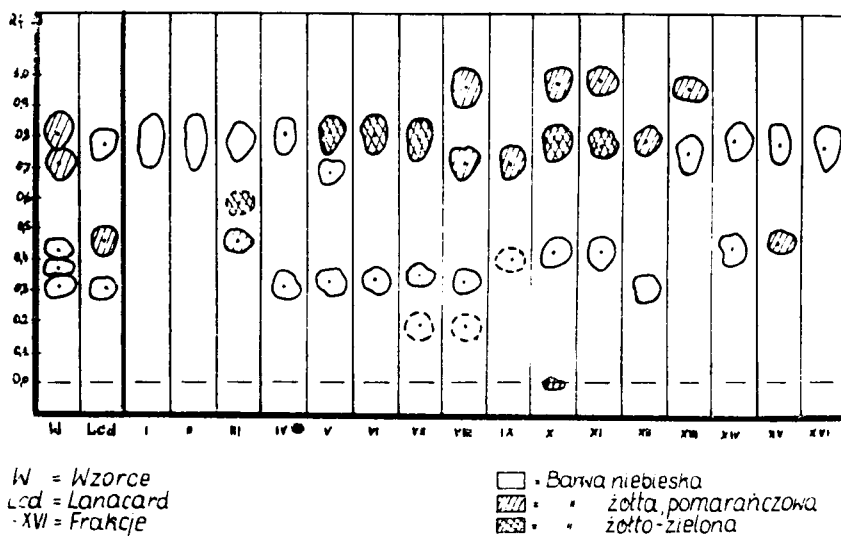
Thin-layer chromatogram of maceration in the developing system: ethyl acetate — methanol — water 80 : 5 : 5



Ryc. 3. Chromatogram cienkowarstwowy naparu w układzie rozwijającym: octan etylu — chloroform — metanol — 0.9% NaCl 10 : 5 : 3.5 : 1.5

Thin-layer chromatogram of infusion in the developing system: ethyl acetate — chloroform — methanol — 0.9% NaCl 10 : 5 : 3.5 : 1.5

## Macerat w układzie II- octan etylu:chloroform:metanol:0,9% NaCl /10:5:3,5:1,5/



Ryc. 4. Chromatogram cienkowarstwowy maceracji w układzie rozwijającym: octan etylu — chloroform — metanol — 0.9% NaCl 10 : 5 : 3.5 : 1.5  
Thin-layer chromatogram of maceration in the developing system: etyl acetate — chloroform — methanol — 0.9% NaCl 10 : 5 : 3.5 : 1.5

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

Napar i macerat z *Folium Digitalis lanatae*, sporządzone w oparciu o przepisy FP IV, zawierają wieloskładnikowy zespół kardenolidów (ryc. 1—4), którego nie da się rozdzielić prostymi metodami chromatograficznymi. Kompleks ten rozdzielono połączoną techniką chromatografii kolumnowej i cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym i dla każdej z badanych postaci leku otrzymano inny obraz chromatograficzny. Chromatogram naparu (ryc. 1) rozwijany w układzie octan etylu — metanol — woda 80 : 5 : 5 wykazuje w poszczególnych frakcjach 2—6 związków o zróżnicowanej wartości  $R_F$  i barwie w świetle UV. W poszczególnych frakcjach maceratu badanego w powyższym układzie (ryc. 2) widoczne są 2—4 plamy. Wartości  $R_F$  czystych glikozydów mieszczą się w granicach: lanatozyd C 0,16—0,18, dezacetylanatozyd C 0,27—0,30, digoksyna 0,36—0,40, digitoksyna 0,62—0,67, acetyldigitoksyna 0,75—0,78.

Napar w układzie octan etylu — chloroform — metanol — 0,9% NaCl 10 : 5 : 3,5 : 1,5 (ryc. 3) uwidoczniał 1—4 związków. W wymienionym układzie niektóre frakcje maceratu zawierają mniejszą ilość związków aniżeli odnośne frakcje naparu (ryc. 4). Wartości  $R_F$  wzorców oznaczone po chro-

matografowaniu tą fazą ruchomą wahają się w granicach: lanatozyd C 0,29—0,30, dezacetylanatozyd C, 0,34—0,40, digoksyna 0,38—0,45, digitoksyna 0,69—0,73, acetyldigitoksyna 0,78—0,83. Różnice w składzie kompleksu kardenolidowego naparu i maceratu zaobserwowane w obu układach rozwijających spowodowane są odmienną temperaturą, w jakiej przebiegała ekstrakcja. Wytrawianie surowca w naparze odbywa się w temperaturze podwyższonej (70°C—90°C), w maceracie ekstrakcja przebiega w temperaturze pokojowej (około 20°C). Pozostałe parametry — czas wytrawiania, stopień rozdrobnienia surowca, sposób oddzielenia płynu wyciągowego — zachowano stałe.

Plamy glukozydów na chromatogramach, po wywołaniu etanolemowym roztworem kwasu trójchlorooctowego z chloraminą są koloru szaro-zielonego w świetle dziennym. Oglądane w świetle UV wykazują barwną fluorescencję. Glukozydy z grupy digitoksygeniny fluoryzują żółto, żółto-pomarańczowo-brunatno, pochodne gitoksygeniny — jasno-niebiesko, pochodne digoksygeniny — stalowo-niebiesko. Żółto-zielona barwa niektórych plam może być wynikiem tej samej szybkości migracji dwóch związków, co w efekcie powoduje nałożenie się jednej plamy na drugą, niebieskiej na żółtą. Plamy zakreślone na ryc. 1—4 linią przerywaną są niewidoczne w świetle dziennym, a ukazują się dopiero w świetle UV. Czułość reakcji zależna jest od warunków obserwacji. Minimalna średnia ilość kardenolidu dająca reakcję barwną z zastosowanym odczynnikiem, widoczną w świetle dziennym wynosi 0,2  $\mu\text{g}$ , w świetle UV — 0,01  $\mu\text{g}$  (12). Mniejsze rozbieżności między wartościami  $R_F$  uzyskiwano w układzie I. W czasie półgodzinnej ekstrakcji napar wytrawia z liści naparstnicy wełnistej więcej kardenolidów aniżeli macerat, przy tym znaczną ilość pochodnych digitoksygeniny.

### W n i o s k i

1. Stosując połączoną technikę chromatografii kolumnowej i cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym, rozdzielono zespół glukozydów wytrawiony w naparze i maceracie z liści naparstnicy wełnistej.

2. Napar i macerat z *Fol. Digitalis lanatae*, sporządzone w oparciu o przepisy FP IV, zawierają wieloskładnikowy kompleks kardenolidowy. W obu preparatach stwierdzono obecność glukozydów pochodnych digitoksygeniny, gitoksygeniny i digoksygeniny.

3. Podwyższona temperatura 70°C—90°C w czasie sporządzania naparu, ułatwia wytrawianie z surowca pochodnych digitoksygeniny (na chromatogramach duża liczba plam fluoryzujących w świetle UV żółto, żółto-pomarańczowo-brunatno).

4. W układzie octan etylu — metanol — woda 80 : 5 : 5, chromatogramy naparu i maceratu wykazały większą liczbę plam aniżeli odnośne chromatogramy rozwijane w układzie octan etylu — chloroform — metanol — 0,9% NaCl 10 : 5 : 3,5 : 1,5.

#### PIŚMIENICTWO

1. Bruyn J. W., Hall J. G.: Pharm. Weekbl. 97, 657, 1962.
2. Elbanowska A.: Biul. Inst. Roś. Leczn. 9, 102, 1963.
3. Elbanowska A., Kaczmarek F.: Herba polon. 12, 173, 1966.
4. Hauser W., Kartnig Th., Verdino G.: Sci. Pharm. 37, 149, 1969.
5. Kaiser F.: Chem. Ber. 88, 556, 1955.
6. Kaiser F.: Arch. Pharmaz. 299, 263, 1966.
7. Ligeti G.: Pharmazie 12, 433, 1957.
8. Nerlo H., Wieluńska Z.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Sec. D 24, 61, Lublin 1969.
9. Pitra J., Poláková H., Kolářová: Českoslov. farm. 14, 418, 1965.
10. Singli T., Handa K. L.: Ind. J. Pharm. 26, 107, 1964.
11. Sjöhlm I.: Svensk. Farm. Tidskr. 66, 321, 1962.
12. Sonanini D.: Acta Pharm. Helv. 39, 673, 1964.
13. Schaumann W., Kaiser F.: Arzneimittel — Forsch. 17, 1264, 1967.
14. Żurkowska J., Samuła K., Adamiec A.: Herba polon. 17, 68, 1971.

Otrzymano 5 I 1973

#### РЕЗЮМЕ

Благодаря применению комбинированной техники колоночной и тонкослойной хроматографий было осуществлено разделение карденолидов, вытравленных в настое и мацерации, которые были изготовлены согласно предписаниям ПФ IV из *Folium Digitalis lanatae*.

В качестве последовательных растворителей применялись бензол, уксусноэтиловый эфир, этиловый спирт и их смеси, а в качестве сорбента — силикагель.

Разделенные на колонке фракции исследовались на пластинках в двух проявительных системах. Хроматограммы проявляли трихлоруксусной кислотой с хлорамином.

Разделенные соединения идентифицировались в свете УФ по сравнению с чистыми веществами ланатозида и дезацетилланатозида С, дигоксина, дигитоксина и ацетилдигитоксина, а также по сравнению с комплексом ланатозидов ABC, изолированных из специфика „Lanacard”.

Для каждого из исследованных медикаментов была получена совершенно другая хроматографическая картина.

В обеих проявительных системах хроматограмма настоя имела больше пятен, чем хроматограмма мацерации.

В настое по сравнению с мацерацией было обнаружено больше соединений — производных дигитоксина.

#### S U M M A R Y

The application of column and thin — layer chromatographic techniques is shown to make possible the separation of cardenolides isolated from *Folium Digitalis lanatae* in infusion and maceration processes according to Polish Pharmacopoeia IV procedures. Benzene, ethyl acetate and ethanol separately and in mixtures, were used as solvent systems.

The particular column fractions were assayed on silica gel in two developing systems using trichloroacetic acid with chloramine as a colour reagent. The spots are rendered visible by UV light and compared against the following reference substances: lanatoside C, deacetyllanatoside C, digoxin, digitoxin, acetyldigitoxin and ABC lanatoside complex isolated from the preparation „Lanacard”.

Each of assayed forms of the drug displayed distinct chromatogram. In both developing systems infusion chromatograms developed more spots than maceratio ones. In the infusion more derivatives of digitoxigenin than in the maceration were detected.