

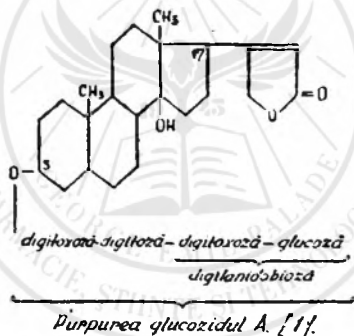
DETERMINAREA GLICOZIZILOR DIGITALEI PRIN METODA CU XANTHIDROL

Soós P., Virf L., Biazsek A.

I.

În ultimul timp determinarea cantitativă chimică a glicozizilor digitali se întrebunțează din ce în ce mai frecvent în practica farmaceutică, din cauză că determinările biologice sînt greoaie, de multe ori dau rezultate eronate, pe cînd reacțiile chimice de culoare se pot efectua cu multă ușurință și cu nenumărați reactivi. Dezavantajul metodelor biologice constă și în faptul că aceste metode pun în evidență acțiunea cardiotoxică și nu cea cardiotonică, acțiune care în schimb stă la baza utilității terapeutice.

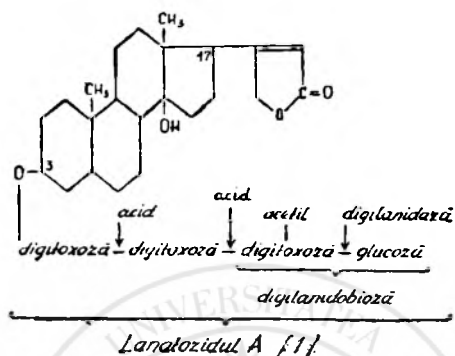
Determinarea cantitativă chimică a glicozizilor cardiaci se bazează pe faptul că gruparea lactonică a glicozizilor sau partea gluconică, digitoxoză, reacționează cu diferiți reactivi, dînd naștere la colorații specifice.



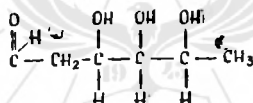
După cum reiese din formulă la funcția hidroxil ce se găsește pe al treilea atom de carbon din nucleul sterinic, se leagă patru molecule de zahăr, dintre care trei de digitoxoză și una de glucoză. Molecula de glucoză cu o moleculă de digitoxoză formează un dizaharid numit digilanidobioză. Purpurea glicozidul A, numit glicozid primar, care se găsește atît în planta verde, cit și în drogul proaspăt, în urma unei hidrolize enzimatică, pierde molecula de glucoză și se transformă în digitoxină, un glicozid secundar, care conține doar trei molecule de digitoxoză.

La al 17-lea atom de carbon se leagă inelul nesaturat lactonic, care se caracterizează prin dubla legătură dintre atomii de carbon alfa și beta.

În *Digitalis lanata* se găsesc trei glicozifi primari și anume lanatoziii A, B, și C, a căror structură se deosebește de structura purpura glicozizilor A, B, și C, prin aceea că la molecula digitoxozei din digilanidobioză, se atașează o funcțiune acetil. În urma unei hidrolize enzimatică, se comportă exact ca și glicoziii purpura.



Digitoxoză, care se găsește în glicoziii din *digitalis purpurea*, *digitalis lanata* și *digitalis ambigua*, este un desozizahar cu șase atomi de carbon:



Cu partea agluconică a digitalinei dau reacții de culoare următorii reactivi (2): nitroprusiatul de sodiu, acidul picric, m.-dinitrobenzenul, nitronaftalina, acidul 3, -5 dinitrobenzoic, vanilină, naftochinon -4 - sulfonatul de sodiu, acidul triclor-acetic (3), clorura stibioasă (4) etc. Cei mai cunoscuți reactivi sînt acidul picric utilizat de către Baljet și nitroprusiatul de sodiu, așa numitul reactiv Legal. Sub acțiunea razelor ultraviolete, acidul triclor-acetic și clorura stibioasă produc fluorescențe colorate, specifice glicozizilor.

Pe cît sînt de numeroși reactivii care se combină cu partea agluconică, pe atît sînt de puțini reactivii care produc reacții de culoare cu partea gliconică a glicozidului. Avînd în vedere că la glicoziii digitalici se leagă digitoxoză, un zahăr reducător specific, pentru glicoziii digitalici vor fi specifice numai acele metode de dozare, care dau o reacție de culoare cu zahărul.

Pentru determinarea digitoxozei pînă în prezent ne stau la dispoziție doi reactivi: clorura ferică în soluție de acid acetic glacial (Keller-Kiliani) și xanthidrolul (Arriguine-Pasquale) (5).

Autorii argentinieni mai sus amintiți au întrebuițat în anul 1945 pentru prima dată xanthidrolul (dibenzo-gama-piranolul) la determinarea glicozizilor digitalici. Autorul francez M. Pesz (6) a lărgit posibilitatea de întrebuițare a xanthidrolului și pentru determinarea celorlalți glicozizi cardiaci, iar Bayer, (7) autor maghiar, întrebuițează xanthidrolul în determinarea cantitativă a digitoxinci și preparatelor lanatozidice din comerț.

În lucrarea de față ne vom ocupa cu dozarea cantitativă a digitoxinei din plantele *digitalis* și unele preparate indigene, prin metoda xanthidrolului.

Principiul metodei constă în faptul că xanthidrolul, în mediu de acid acetic

glacial care conține 1% acid clorhidric, prin încălzire pe baie de apă, produce cu moleculele de digitoxoză a glicozizilor digitali, o reacție de culoare roșie intensă. Am determinat concentrația în substanță activă pe cale fotometrică și colorimetrică din intensitatea colorației.

Metoda de dozare cu ajutorul xanthidrolului are multe avantaje față de metodele folosite până în prezent (Keller-Kiliani, Baljet etc.). Așa de pildă, reacția de culoare roșie-violetă intensă, pe care o obținem, se pretează foarte bine la determinări colorimetrice, respectiv fotocolorimetrice, putându-se pune în evidență cantități de digitoxină sub 1 gama/ml, sensibilitatea reacției fiind aproximativ de zece ori mai mare decât în cazul metodei Baljet.

II.

Am aplicat cu succes metoda cu xanthidrol la determinarea cantitativa a digitoxinei atât din preparatele din digitale, cât și din droguri. Cu privire la determinarea drogurilor, în literatură am găsit numai un scurt articol, publicat de Pesez (6). Noi am modificat această metodă și am ajuns la concluzii care nu sînt menționate în literatură.

Determinările au fost executate fotocolorimetric, dar am aplicat metoda și pe cale colorimetrică, lucru foarte important în practica farmaceutică deoarece rezultatele obținute au fost concordante.

În afara metodei fotocolorimetrice și colorimetrice, am elaborat și o metodă a scării colorate cu ajutorul azotatului de cobalt; cu toate că nu necesită nici un fel de aparatură optică, ea dă rezultate multumitoare.

La determinare se întrebuițează:

1. xanthidrolul 0,1% în acid acetic glacial, proaspăt preparat.

2. acidul acetic glacial care conține 1% acid clorhidric și

3. soluția etalon de digitoxină dizolvată în alcool (1 ml = 500 gama-dig:toxină), preparată din digitoxină Merck.

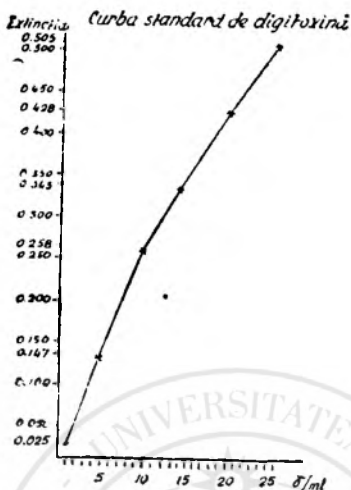
Determinarea a fost executată cu ajutorul unui fotocolorimetru Lange, într-un strat de 2 cm, fără filtru. Curba etalon se construiește avînd în vedere că alcoolul nu poate fi prezent decît într-o cantitate bine determinată și anume 0,7 ml alcool la 25 ml acid acetic clorhidric, deoarece o cantitate mai mare de alcool ar duce la slăbirea intensității colorației, iar cantitatea de xanthidrol trebuie astfel adăugată ca pentru fiecare gama digitoxină să revină 0,25 ml de reactiv.

Literatura nu ia în considerare cantitatea necesară de alcool și xanthidrol în mediul de lucru, fapt care, după părerea noastră, duce la erori destul de mari.

La cantitatea bine determinată de digitoxină, se adaugă cantitatea calculată de xanthidrol și alfit acid acetic glacial clorhidric, încît volumul final să fie de 25 ml. Soluțiile se introduc pentru trei minute în apă clocotită, apoi, pentru stabilizarea colorației obținute, se vor răci în apă cu gheață. Extincțiile se determină fotocolorimetric. Drept soluție de compensație, se va folosi acidul acetic glacial clorhidric.

După delimitarea extincțiilor se trece la construcția curbei standard (vezi graficul alăturat) cu ajutorul căreia se poate citi direct valoarea în digitoxină a drogurilor sau preparatelor de digitalină.

Avînd în vedere că dintre glicozizii digitalei purpura numai digitoxina are importanță terapeutică, (8) extragerea a fost executată după metoda Soós (9, 10) prin care gitoxina fără importanță terapeutică deosebită rămîne în frunze, iar digitoxina trece în soluție. Se procedează în felul următor: 1 g frunze uscate și fin pulverizate, se amestecă cu puțină apă și se freacă pînă la obținerea unei paste omogene. Se adaugă apoi 20 ml apă și se lasă în repaus cinci ore la temperatura ambiantă. La această temperatură digitoxina trece în soluție, pe cînd gitoxina care se dizolvă numai în apă fierbinte, rămîne nedizolvată. Pasta se trece apoi cantitativ cu apă într-un balon cotat de 100 ml în așa fel ca după spălare volumul să nu treacă de 50 ml. Proteinele prezente se precipită cu 10 ml acetaț de plumb 10%, prin agitare perfectă. Excesul de plumb se precipită cu 10 ml fosfat disodic 10%. Se agită din nou, se completează



soluția cu apă pînă la semn și se filtrează cu filtru uscat. Primii 25 ml. se îndepărtează, iar din restul filtratului se scot 50 ml. parte care apoi se extrage de patru ori cu cîte 20 ml. cloroform. Extractele cloroformice se adună, se tratează cu 2 g sulfat de sodiu anhidru și se lasă în repaus o noapte. Filtrăm, spălăm sulfatul de sodiu de trei ori cu cloroform și trecem la distilarea cloroformului. Reziidul se reia cu 5 ml alcool 96%. Din această soluție se iau pentru determinare 0,7 ml, 2,1 ml reactiv de xanthidrol și 22,2 ml acid acetic glacial clorhidric și se procedează ca la construcția curbei. Din extincția obținută se citește direct de pe curbă conținutul în digitoxină a preparatului sau a frunzelor.

În cele ce urmează dăm conținutul în digitoxină al plantelor colectate din diferite regiuni și anotimpuri, cercetate de noi:

Digitalis lanata	339,2— 285,7	— 188,5 mg%
Digitalis purpurea	285,6— 275,0	— 141,4 „
Digitalis ambigua	175,7— 171,4	— „
Tablete folia Digitalis purpurea (Plafar 1953)	292,8— 239,2	— „

Valoarea digitalei lanata a fost exprimată tot în digitoxina, deoarece lanatozidul nu ne-a stat la dispoziție.

Pentru a da o mai largă utilizare metodei cu ajutorul xanthidrolului, prezentăm în cele ce urmează și o aplicare colorimetrică. În acest scop am pregătit o serie de soluții din azotat de cobalt în eprubete Jena, a căror colorație corespunde cu anumite concentrații de digitoxină. Eprubetele au fost închise la flacără și am obținut o scară foarte stabilă. Tabloul de mai jos ilustrează confecționarea scării colorate de cobalt.

Această scară de cobalt dă posibilitate ca în mod simplu și rapid să se determine chiar în farmacii, cu rezultate mulțumitoare, conținutul de digitoxină al drogurilor și preparatelor galenice. Determinarea cu ajutorul scării colorate de cobalt se execută după metoda expusă. Se face extragerea digitoxinei, dizolvîndu-se extractul în 5 ml alcool, apoi se tratează 0,7 ml extract cu xanthidrol și acid acetic glacial clorhidric, în proporțiile mai sus amintite. Soluția galbenă obținută se ține 3 minute în apă fierbinte și apoi se răcește în apă cu gheață. Colorația roșie violetă se compară cu una dintre eprubetele standard ale scării și se citește direct rezultatul.

Scara colorată de cobalt are un rol important și în determinarea colorimetrică a digitoxinei, pe care o descriem în cele ce urmează. Colorația dată de digitoxină în prezența xanthidrolului nu respectă perfect legea lui Beer și de aceea determinarea colo-

Co (NO ₃) ₂ 10% ml	Apă ml	Valoare scării în digitoxină (gama)
0,12	3,38	2,5
0,25	3,25	5,0
0,5	3,0	10,0
1,0	2,5	15,0
1,37	2,13	20,0
1,75	1,75	25,0
2,0	1,50	30,0
2,5	1,0	35,0
3,0	0,5	40,0
3,5	—	45,0
3,5	—	50,0
Co (NO ₃) ₂ 15%		

rimetrică se poate executa numai dacă soluția standard are o concentrație în digitoxină apropiată de cea a drogului sau preparatului de analizat. În consecință, în primul rând se va determina aproximativ concentrația de digitoxină, cu ajutorul scării colorate de cobalt și numai după aceea vom proceda la prepararea standardului. Cantitățile luate în lucru corespund cu cantitățile de reactiv descrise mai înainte.

Dăm rezultatele obținute în acest caz:

Digitalis lanata	382,0—362,1—347,3—325,0—317,2—297,4 mg%
Digitalis purpurea	328,1—240,6—234,3—189,1—184,0
Digitalis ambigua	314,0—312,5—297,4—291,3—220,0—189,1 ..
Tablete folia Digitalis purpurea (Plafar 1953).	265,0—218,6—236,7 mg%

„Digitalis“ CIF 110,0 mg% (Acest preparat după determină
rile CIF trebuie să conțină 100 mg% substanță activă).

Pentru a controla exactitatea metodei am lucrat cu cantități cunoscute de digitoxină și în tabelul alăturat se vede că am obținut cantitățile introduse în analiză, fapt care dovedește justetea metodei.

Cantitatea de digitoxină introdusă în analiză gama	Valoarea reprimită după analiză (gama digitoxină)	Diferențe gama
2,0	1,94	—0,06
5,0	5,08	—0,08
7,0	7,51	—0,51
10,0	10,0	0,00
15,0	15,9	—0,9
20,0	19,8	—0,2
25,0	26,0	—1,0
30,0	29,0	—1,0
40,0	41,0	—1,0
50,0	49,7	—0,3

Recapitulând rezultatele obținute, constatăm următoarele:

1. Am reușit să aplicăm metoda xanthidrolului în determinarea cantitativă a drogurilor și preparatelor de digitală pe trei căi: fotocolorimetrică, colorimetrică și prin metoda scării colorate de cobalt.

2. Am determinat cantitatea optimă de alcool, care nu influențează reacția de culoare și în același timp, cantitatea de xanthidrol necesară reacției.

3. Pentru practica zilnică a farmaciilor, am elaborat o metodă rapidă și simplă a scării colorate de cobalt, fără a avea nevoie de nici un fel de aparatură optică.

Primită la redacție în ziua de 15 iulie 1955.

Bibliografie

1. *Sacipirov și colectivul*: Naperstianca. 1954. 106—154.;
 2. *M. P. Bellett*: Annales pharm. francaises 1950. 1./471;
 3. *Vastagh G., Tuzon P.*: Magyar kémiai folyóirat. 1952. Nr. 8.;
 4. *Lawday*: Nature 170, 1952;
 5. *Arreguine-Pasquale*: Chemical abstract 1946/103;
 6. *M. Pesez*: Ann. Pharm. Franc. 10., 104., 1952;
 7. *Bayer I.*: Acta pharmaceutica Hungarica 1953.X.;
 8. *W. Kussner*: Merck's J. ber. 63, 5—14, 1949;
 9. *E. Soós*: Arch. Pharm. 1952, 285/17;
 10. *Prof. A. Teitel — D. Constantinescu*: Farmacia, 1954. Nr. 1.
-