

ESTUDIO FITOQUIMICO DEL ACONITUM LYCOCTONUM DE SIERRA
NEVADA.—Nota II: EXTRACCION, ESTUDIO CROMATOGRAFICO
DEL EXTRACTO, AISLAMIENTO Y SEPARACION DE LOS
ALCALOIDES (*)

por

E. MUÑOZ, A. VILLAR DEL FRESNO y J. CABO TORRES

Ars Pharm. XII, 71 (1971).

En una comunicación preliminar, presentada al IX Congreso Internacional de la Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino (1), resumíamos la labor realizada, referente al estudio cuantitativo de su contenido alcaloídico. Como consecuencia de los resultados obtenidos, llegábamos entonces a las siguientes conclusiones:

El contenido alcaloídico total del Aconitum Lycoctonum de Sierra Nevada (expresado en aconitina), sería:

Técnica de Ph. Helv. V ed. modificada 2.47%
Técnica de Hernauer-Flück (modificada para el acónito oficial). 0,98%

El estudio cromatográfico de los extractos finales obtenidos en las técnicas respectivas y la determinación de la alcalinidad arrastrada por destilación, sin que en el destilado se detecten alcaloides, hacía pensar que, durante el calentamiento realizado en la técnica de Hegnauer y Flück, parte de los alcaloides han sido destruidos hasta aminas sencillas o sales de amonio.

Tal hipótesis vino avalada por el hecho de que dicha alcalinidad volátil (expresada como aconitina 1,84%) se acerca a la diferencia obtenida entre las dos técnicas antes citadas.

* * *

En la presente comunicación se trata del estudio de la extracción de los alcaloides, comportamiento cromatográfico del extracto bruto obtenido, aislamiento de dichos alcaloides y estudio cromatográfico de los mismos por separado.

Antes de exponer nuestros resultados experimentales, pasemos una breve ojeada actual a la química de la fracción alcaloídica del Aconitum Lycoctonum de otras procedencias geográficas.

Hasta fecha relativamente reciente —1959— no se ha podido dar con seguridad la estructura de un alcaloide como la aconitina, conocido, aislado y cristalizado ya en el pasado siglo. Dicho honor le cupo al equipo de trabajo constituido entre otros por los profesores WISNER y BÜCHI (2).

(*) Resumen presentado al Primer Simposium de Farmacobotánica. Alicante, 23/25 abril 1970.

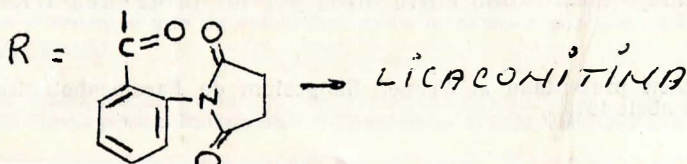
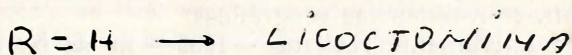
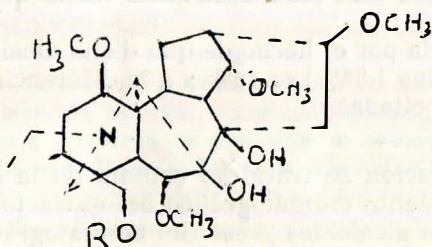
La complejidad de los alcaloides-esteres, de los géneros *Aconitum*, *Delyphinium* y *Garrya* ha conducido a un verdadero confusiónismo bibliográfico, de tal forma que no es infrecuente que un mismo alcaloide haya recibido nombres diferentes y, por otra parte, otros, considerados alcaloides originales de las plantas, no son sino productos secundarios como consecuencia de procesos hidrolíticos, bien durante la desecación del material a estudiar o durante los subsiguientes procesos extractivos.

Por otra parte, al ser estudiadas plantas procedentes de lugares diferentes, con dudosa clasificación e identificación botánica, ha hecho asimismo que este confusiónismo sea aún más profundo.

De nuestra revisión bibliográfica, de que el único alcaloide aislado con seguridad es el denominado licoconitina, base constituida por la alcalamina licoctonina, y cuya estructura se encuentra hoy perfectamente esclarecida (3), pues si bien es verdad que han sido descritos otros alcaloides, como la mioctonina (4), se nos presenta dudosa su real existencia como entidad química pura, por su elevado P.M. (1.325,50) (5) y el no haberse conseguido cristalizarla y por supuesto tampoco su fórmula estructural.

MARCHADIER, OREKHOV, entre otros, opinan que la planta objeto de nuestro estudio posee aconitina, aunque en cantidades minoritarias, idea en contraposición con lo reseñado en sus obras por YOUNGKEN (6) y PARIS (7) entre otros.

Por todo lo expuesto, basados en la bibliografía consultada, únicamente se puede dar como seguro en la especie *A. Lycoctonum*, el alcaloide licoctonina, perteneciente, junto con los restantes de otras especies de *Aconitum*, así como los de los antes citados géneros *Delphinium* y *Garrya*, al grupo de los alcaloides diterpénicos.



EXPERIMENTAL

A) EXTRACCION

Después de diversas pruebas en pequeñas cantidades de droga, para observar qué técnica de extracción era la más idónea sin que se alterasen los alcaloides (habíamos visto eran bastante lábiles) y para que el extracto bruto fuera lo más puro posible, nos decidimos a extraer en las siguientes condiciones:

Partimos de 200 gramos de droga, percolando (previa maceración durante 24 horas) con una solución 0,5 normal de ácido tartárico en alcohol de 96° hasta total agotamiento.

Al percolado se le añadió su volumen en agua y se eliminaron ceras, grasas y otras impurezas mediante repetidos lavados con éter sulfúrico, comprobándose que el éter de lavado no llevaba alcaloides

El percolado así lavado con éter en medio ácido, se alcalinizó con CO_3HNa y se extrajo tres veces con éter sulfúrico. Posteriormente se extrajo con cloroformo hasta agotamiento (la emulsión formada se rompió mediante centrifugación).

Los líquidos eteréo-clorofórmicos reunidos se evaporaron a vacío y temperatura no superior a 45° (en "Rotavapor")

B) ESTUDIO CROMATOGRAFICO DEL EXTRACTO BRUTO OBTENIDO

Se realizó del extracto bruto por técnica uni- y bidimensional según STAHL (8), en las siguientes condiciones generales:

Adsorbentes:

- Silicagel G Merck.
- Silicagel G Merck con fluoresceína.

Fases móviles:

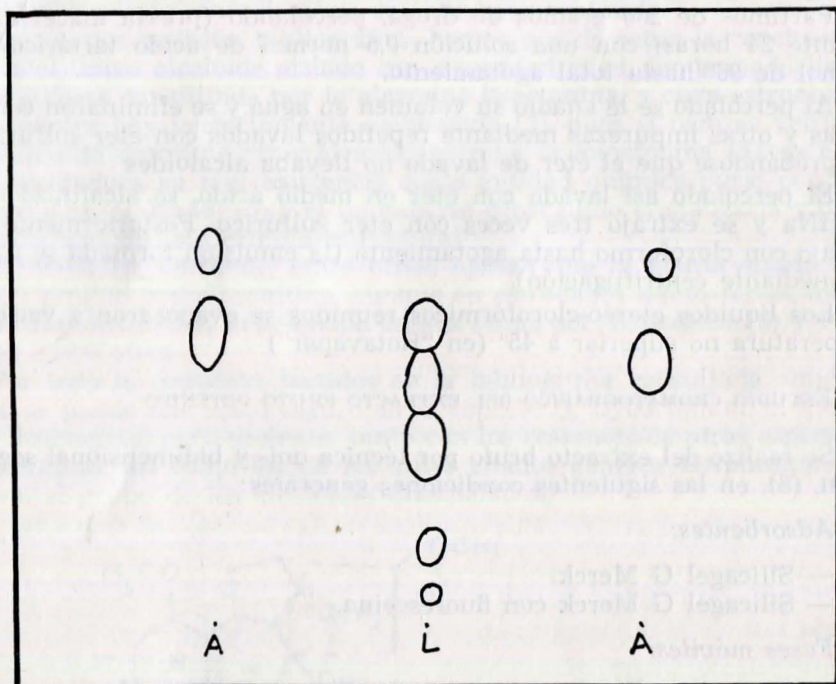
- I. Ciclohexano-cloroformo-dietilamina: (5/4/1).
- II. Benceno-acetato de etilo-dietilamina: (7/2/1).
- III. Cloroformo-metanol: (96/4).
- IV. Cloroformo-acetato de etilo-agua: (11,5/75/16,5).
(se decanta la parte superior)

Reveladores:

- Dragendorff modificado por MUNIER y MACHEBOEUF.
- Observación a la luz ultravioleta.
- Acido fosfórico.

De este estudio previo, se dedujo que el número de manchas alcaloides obtenidas del extracto de la raíz de *Aconitum Lycoctonum* por C.C.F. unidimensional eran cinco, y por bidimensional siete (esquemas 1 y 2 respectivamente).

ESQUEMA N.º 1



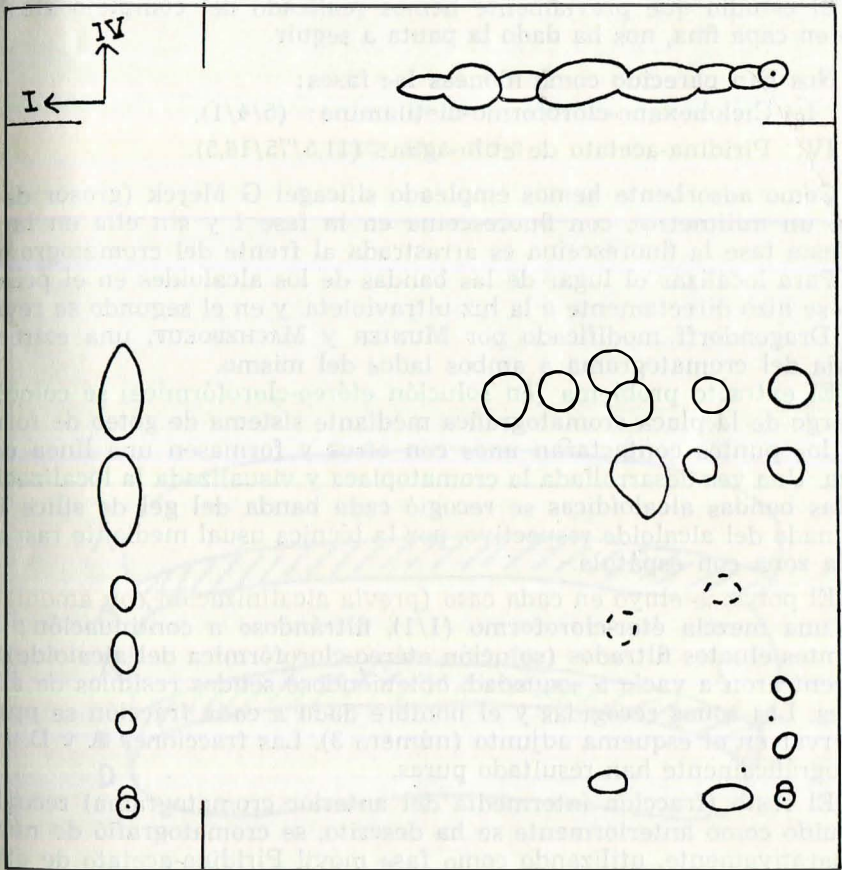
Adsorbente: Silicagel G Merck

Fase móvil: II (Benceno-acetato de etilo-diatilamina (7/2/1))

Productos cromatografiados: A. Aconitina, L. Extracto del A. Lycoctonum.

Revelador: Drangendorff.

ESQUEMA N.º 2



Adsorbente: Silicagel G Merck

Fases móviles { IV (Piridina-acetato de etilo-agua 11,5/75/16,5)
 I (Ciclohexano-cloroformo-dietilamina 5/4/1)

Productos cromatografiados: Extracto del A. Lycotomum

Revelador: Drangendorff.

C) AISLAMIENTO Y SEPARACION DE ALCALOIDES DEL EXTRACTO BRUTO

El estudio que previamente hemos realizado del complejo alcaloídico en capa fina, nos ha dado la pauta a seguir.

Nos han parecido como idóneas las fases:

I. Ciclohexano-cloroformo-dietilamina: (5/4/1).

IV. Piridina-acetato de etilo-agua: (11,5/75/16,5).

Como adsorbente hemos empleado silicagel G Merck (grosor de la capa un milímetro), con fluoresceína en la fase I y sin ella en la IV (en esta fase la fluoresceína es arrastrada al frente del cromatograma).

Para localizar el lugar de las bandas de los alcaloides en el primer caso se hizo directamente a la luz ultravioleta, y en el segundo se reveló con Dragendorff modificado por MUNIER y MACHEBOEUF, una estrecha franja del cromatograma a ambos lados del mismo.

El extracto problema (en solución etéreo-clorofórmica) se colocó a lo largo de la placa cromatográfica mediante sistema de goteo de forma que los puntos contactaran unos con otros y formasen una línea continua. Una vez desarrollada la cromatoplaque y visualizada la localización de las bandas alcaloídicas se recogió cada banda del gel de sílice impregnado del alcaloide respectivo, por la técnica usual mediante raspado de la zona con espátula.

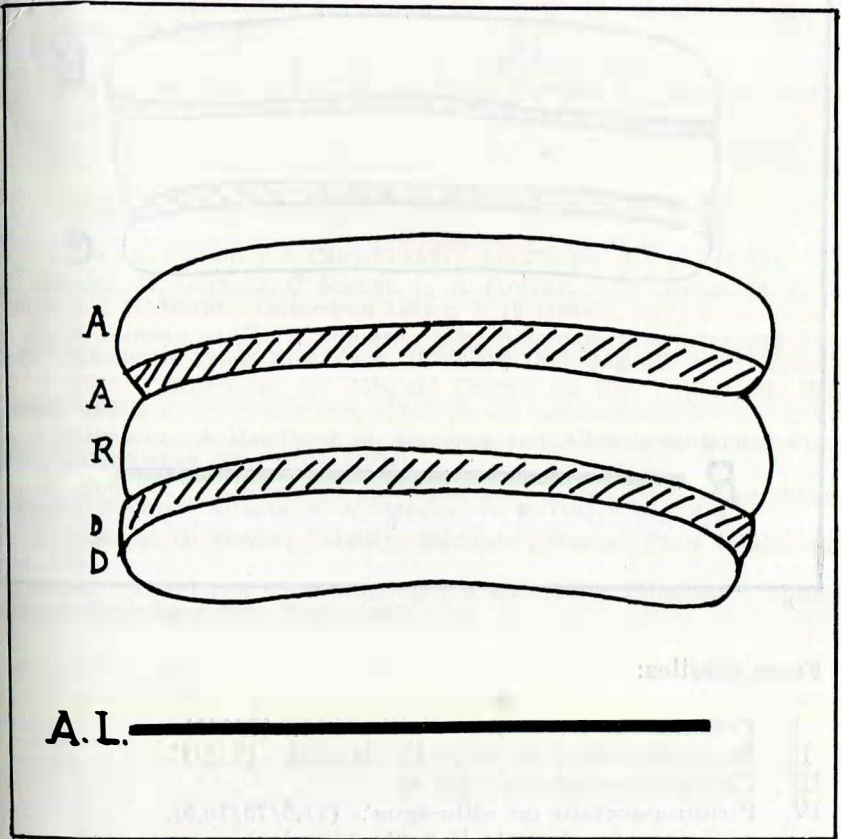
El polvo se eluyó en cada caso (previa alcalinización con amoníaco) con una mezcla éter-cloroformo (1/1), filtrándose a continuación; los distintos eluatos filtrados (solución etéreo-clorofórmica del alcaloide), se concentraron a vacío a sequedad, obteniéndose sendos residuos de alcaloides. Las zonas recogidas y el nombre dado a cada fracción se puede observar en el esquema adjunto (número 3). Las fracciones A y D, cromatográficamente han resultado puras.

El resto (fracción intermedia del anterior cromatograma) recogido y eluido como anteriormente se ha descrito, se cromatografió de nuevo preparativamente, utilizando como fase móvil Piridina-acetato de etilo-agua (11,5/75/16,5). De esta manera se lograron aislar dos alcaloides más que denominamos convencionalmente B y C. (Esquema n.º 4).

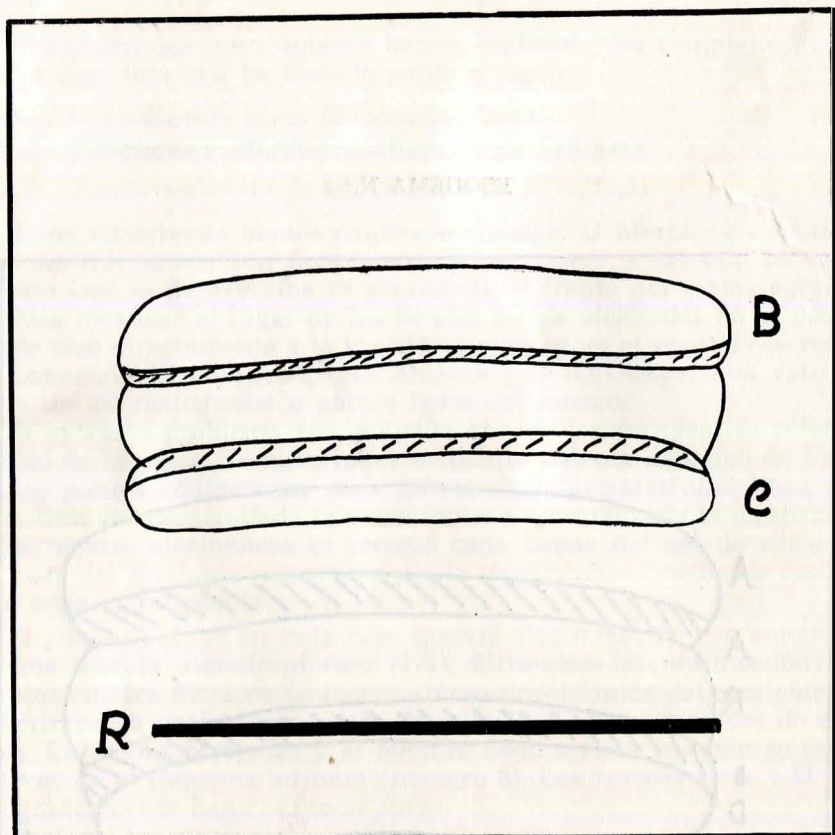
Se han aislado pues, de la forma anteriormente descrita, cuatro alcaloides, cuyo comportamiento cromatográfico en las fases móviles sistemáticamente empleadas en este trabajo es el que se describe en la siguiente tabla

Alcaloides	Rf × 100			
	I	II	III	IV
A	52	56	31	62
B	39	49	42	67
C	33	49	32	49
D	33	34	40	48

ESQUEMA N.º 3



ESQUEMA N.º 4



Fases móviles:

- I. Ciclohexano-cloroformo-dietilamina: (5/4/1).
- II. Benceno-acetato de etilo-dietilamina: (7/2/1).
- III. Cloroformo-metanol: (96/4)
- IV. Piridina-acetato de etilo-agua: (11,5/75/16,5).
(se decanta la parte superior)

Se ha observado que de las cinco manchas alcaloídicas, detectadas en la técnica monodimensional, una de ellas tiene un R_f semejante al de la aconitina-patrón en todas las fases móviles utilizadas. Sin embargo, al revelar con ácido fosfórico dicha mancha adquiere una intensa fluorescencia y no así el patrón de aconitina, lo cual nos hace concluir que en el *Aconitum Lycoctonum* estudiado no se encuentra dicho alcaloide.

RESUMEN - CONCLUSIONES

- La cromatografía en capa fina uni- y bi-dimENSIONAL nos ha permitido detectar claramente la presencia de siete manchas alcaloidicas.
- Por comparación de estas manchas con patrón de aconitina empleando diferentes fases móviles y distintos reveladores, se demuestra la no existencia de dicho alcaloide en el *Aconitum Lycoctonum* de Sierra Nevada.
- Se ha logrado aislar mediante técnica cromatográfica en capa gruesa y oportunas eluciones, cuatro de los alcaloides del complejo alcaloídico.
- De dichos cuatro alcaloides se han determinado los correspondientes valores de R_f en las fases móviles usuales en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—A. VILLAR DEL FRESNO y J. CABO TORRES: *Ars Pharm.*, XI, 551 (1970).
- 2.—K. WISNER, M. GÖTZ, D. C. SIMONE, L. R. FOWLER, F. W. BACHELER, R. F. C. BROW and G. BÜCHI: *Tetraedron Letter*, 2, 15 (19
- 3.—R. H. F. MANSKE and H. L. HOLMES: "The Alkaloids, Chemistry and Physiology", *Akademic Press, New York* (1970), vol. XII, pág. 18.
- 4.—G. H. BOIT: "Ergebnisse der Alkaloid Chemie bis 1960", *Akademie Verlag, Berlín* (1961).
- 5.—R. F. RAFFAUF: "A Handbook of Alkaloids and Alkaloid-containing Plants", *Wiley-Interscience, New York* (1970).
- 6.—H. W. YOUNGKEN: "Tratado de Farmacognosia" (Traducción de la sexta ed. inglesa), *Editorial Atlante, S. A., México, D. F.* (1951), pág. 418.
- 7.—R. R. PARIS et H. MOYSE: "Matière Médicale", *Masson, París* (1965), vol. II, pág. 144.
- 8.—E. STAHL: "Thin-Layer Chromatography a Laboratory Handbook", *Springer: Verlag, Heidelberg:New York* (1967).