

“ESTUDIOS SOBRE TABACOS DE ELABORACION NACIONAL
(ESPAÑOLES). IV. ESTUDIO CUALI Y CUANTITATIVO DE LA
FRACCION ALCALOIDICA DE LOS TABACOS HEBRA RUBIOS”

CABO, J.; NAVARRO, C.; RISCO, S.

I.—INTRODUCCION

De acuerdo con la línea de investigación ya existente en nuestro Departamento, hemos continuado nuestros estudios sobre la determinación tanto cuali como cuantitativa de los alcaloides contenidos en los tabacos de elaboración nacional (1, 2, 3, 4, 5).

En el presente trabajo nos ocuparemos en particular del estudio de las muestras de tabaco hebra rubio de elaboración nacional (española).

II.—PARTE EXPERIMENTAL

II.1.—MATERIAL Y METODOS

II.1.1.—Muestras: Las muestras estudiadas por nosotros corresponden a las nueve labores de tabacos hebra rubios (cigarrillos), elaborados por Tabacalera Española, Sociedad Anónima.

II.1.1.a.—Denominación

Como ya quedó dicho en notas anteriores, la letra que precede a la numeración romana, corresponde a la ciudad en que

está situada la factoría donde se elaboraron las muestras respectivas. En este caso, todas las labores proceden de Tarra-gona (T).

<u>Clave</u>	<u>Marca comercial</u>
T-I	n.º 1
T-II	n.º 2
T-III	n.º 3
T-X	n.º 4
T-XI	n.º 4
T-XII	n.º 5
T-XIII	n.º 5
T-XV	n.º 6
T-LXXVI	n.º 7

II.1.1.b.—Preparación: las muestras han llegado a nosotros en la forma en que se encuentran en el mercado, es decir, como cigarrillos.

Siguiendo las normas del muestreo, se han tomado al azar veinte cigarrillos a los que se ha desprovisto del papel y, en los casos en que lo tuvieran, del filtro. El material obtenido en cada caso, se ha almacenado en recipientes herméticamente cerrados, que se conservaron a una temperatura comprendida entre 18 y 25°C. No ha sido necesario el proceder en ninguno de estos casos a la molturación de las muestras, puesto que, según pusieron de manifiesto J. CABO TORRES y G. TENA NUÑEZ (6), el dividir las pequeñas hebras en partículas de tamaño inferior, no influía en el rendimiento de la fracción alcaloídica obtenida por destilación directa del tabaco.

II.1.2.—Determinación de humedad

El método seguido por nosotros ha sido el gravimétrico, por deshidratación de la droga a 100-105°C (7), con lo que realmente se determinan conjuntamente humedad y sustancias volátiles a dicha temperatura.

II.1.2.a.—Resultados

Las cifras que siguen son la media de cinco determinaciones:

TABLA I

<u>Muestra</u>	<u>% humedad</u>
T-I	12,5
T-II	13,5
T-III	11,5
T-X	12,0
T-XI	10,5
T-XII	13,5
T-XIII	12,0
T-XV	10,5
T-LXXVI	12,0

II.1.2.b.—Discusión de resultados

Las humedades determinadas en la totalidad de las muestras han oscilado entre el 10,5% (T-XI y TXV) y el 13,5% (T-II y T-XII), siendo la media de humedad de los cigarrillos hebra rubios de elaboración nacional del 12% \pm 1,1.

II.1.3.—Estudio cualitativo

II.1.3.a.—Estudio comparativo

En este apartado hemos realizado un estudio comparativo de la fracción alcaloídica en las nueve labores de tabaco hebra rubio. El método que seguimos en este estudio comparativo ha sido el de C.C.F. según describimos anteriormente (2).

Para la elaboración de los extractos alcaloídicos a cromatografiar hemos procedido según la técnica ya descrita en anterior ocasión (1), partiendo como entonces de un gramo de tabaco, extrayendo en medio alcalino (NH₄OH) con mezcla etéreo-clorofórmica (1:1).

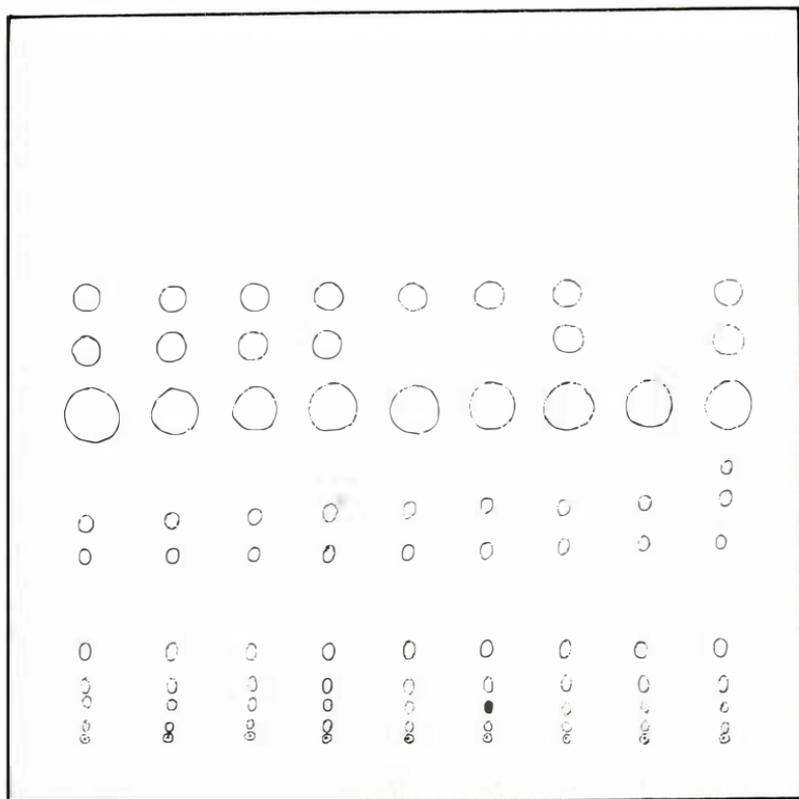
II.1.3.a.1.—Condiciones de trabajo

Trabajamos con placas de 20 × 20 cm de 250 μ de Silicagel G (Merck), empleando como fase móvil Cl₃CH/CH₃OH (5:1) y revelando con reactivo de Dragendorff (mod. Munier-Macheboeuf (8) y con reactivo de König (9), con las demás especifi-

caciones que oportunamente se detallaron en comunicación anterior (1).

II.1.3.a.2.—Resultados

El presente apartado está constituido por la representación de los cromatogramas realizados con los extractos etéreo-clorofórmicos de las nueve muestras objeto de nuestro estudio.



II.1.3.a.3.—Discusión de resultados

Como se puede observar, las imágenes cromatográficas que presentan los extractos obtenidos a partir de las nueve muestras de tabaco hebra rubio, son bastante similares entre sí. Se detectan, con desigual intensidad 10 manchas como término medio, excepto en T-XI, T-XII y T-XV.

El componente mayoritario es el de $Rf_{100} = 59,0$.

En cuanto a tamaño e intensidad, le siguen a esta mancha principal en todos los cromatogramas, los dos componentes de la fracción de "cola" de $Rf_{100} = 20,0$ y $30,0$, cuya identidad no se ha podido hallar debido a que no se corresponden con ninguno de los patrones de alcaloides piridinicos de que disponemos.

El componente de Rf_{100} comprendido entre 8 y 9, ha presentado intensidad variable, siendo sin embargo mayor el número de muestras que lo poseen en cantidad apreciable con respecto a las otras manchas que conforman la fracción de "cola", que el de las muestras que lo poseen en cantidad mínima.

De las manchas con valores de Rf_{100} 0,00-2,00y 5,00, la que presenta mayor intensidad y tamaño, es la citada en último lugar, siendo la de menor intensidad la que coincide con el punto de deposición de muestra ($Rf_{100} = 0,00$).

La mancha de $Rf_{100} = 14,00$, ha presentado muy poca intensidad en la mayoría de los tabacos.

Hay que señalar que en la muestra designada como T-LXXVI, se detecta un nuevo componente que no aparece en los otros tabacos. Este componente, de $Rf_{100} = 42,0$, posee pequeño tamaño y es de intensidad poco apreciable, si bien ha sido detectado con los dos reveladores utilizados.

En lo concerniente a la fracción de "cabeza", las manchas observadas han sido dos (aparece una tercera mancha si los extractos se cromatografían en un tiempo superior a siete días a partir de la fecha de su obtención); estas dos manchas han presentado tamaños fijos, siendo sin embargo muy variable su intensidad de color. Los valores de Rf_{100} medios hallados para ellas han sido de 70,0 y 79,0, respectivamente, observándose por regla general mayor intensidad de coloración en la de Rf superior. Estas manchas han sido mejor detectadas en todos los casos mediante el reactivo de König.

El componente de $Rf_{100} = 70,0$ se ha logrado detectar con el reactivo de König en las muestras I y XIII. No es detectada con ninguno de los dos reveladores en las muestras T-XI, T-XII y T-XV.

Sin embargo, la de $Rf_{100} = 79,0$, se observa tanto con el empleo de Munier-Macheboeuf como del reactivo de König en todas las muestras estudiadas, a excepción de la T-XV en que no se detecta con ninguno de los dos reveladores citados.

II.1.3.b.—Identificación de componentes

II.1.3.b.1.—Condiciones de trabajo

Hemos llevado a cabo nuestras experiencias en las siguientes condiciones de trabajo:

- Sustancias cromatografiadas.....Extracto etereo-clorofórmico obtenido a partir de la muestra T-II (por ser una de las que dan el máximo de manchas cromatográficas), así como los patrones puros (nicotina, nornicotina, nicotirina y anabasina) en solución etéreo-clorofórmica.
- Reveladores.....Además de los dos empleados anteriormente se han utilizado:

- 1) Reactivo de quinhidrona (específico de anabasina y nornicotina) (10).
- 2) Reactivo isatina-ác. tánico (específico de nornicotina) (11).

— Fases móviles:

- | | |
|--|----------------|
| I: $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{CH}_3\text{OH}$ | (50/10) |
| II: $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$ | (75/25) (12) |
| III: $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3$ conc. | (60/10/1) (13) |

En todos los casos, los puntos depositados en la placa, lo fueron en el siguiente orden:

- 1.—15 microlitros de extracto etéreo-clorofórmico de T-II
- 2.—15 microlitros de extracto etéreo-clorofórmico de T-II + Sol. etéreo-clorofórmica del patrón puro
- 3.—Sol. etéreo-clorofórmica del patrón puro (nicotina, nornicotina, anabasina o nicotirina).

II.1.3.b.2.—Resultados

Los resultados obtenidos son resumidos en las siguientes tablas:

Fase móvil III

TABLA IV

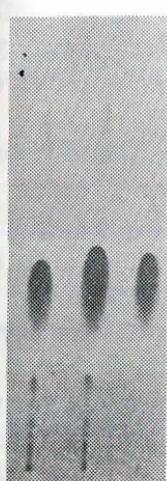
Productos	Componentes (Rf100)									
Ext.°	0	2	9	19	38	43	51	58	69	76
Ext.° nic.	0	2	9	18	38	43	52	59	70	77
Nicotina									70	
Ext.°	0	2	9	18	37	43	51	59	71	77
Ext.° anab.	0	2	9	18	37	43	51	59	69	76
Anabasina							52			
Ext.°	0	2	9	18	37	43	51	58	69	76
Ext.° norn.	0	2	9	18	37	43	52	59	70	77
Nornicotina					37					
Ext°	0	2	9	18	37	43	51	59	70	77
Ext.° nicr.	0	2	9	18	37	43	52	59	70	77
Nicotirina										77

TABLA V

Reveladores		<i>Nicotina</i>	<i>Anabasina</i>	<i>Nornicotina</i>	<i>Nicotirina</i>
		Dragendorff König	Dragendorff König Quinhidrona	Dragendorff König Isatina	Dragendorff König
Rf100	F.m.I	59	14	8	88
	F.m.II	57	17	7	86
	F.m.III	71	56	38	77

F.m. I: $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/10)F.m. II: $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$ (75/25)F.m. III: $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3$ conc. (60/10/1)

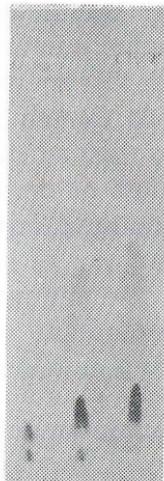
A continuación incluimos la reproducción fotográfica de algunos de los cromatogramas realizados.



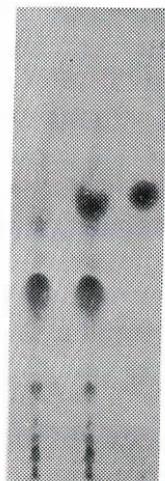
Nicotina
F.m. II
Rev.: M-M



Anabasina
F.m. III
Rev.: König



Nornicotina
F.m. II
Rev.: Isatina



Nicotirina
F.m. I
Rev.: König

II.1.3.a.3.—Discusión de resultados

— Nicotina: Su presencia se hace patente con las tres fases móviles empleadas. Como ya sospechábamos, se corresponde con la mancha de mayor tamaño e intensidad, en las tres fases móviles ensayadas.

En general, la nicotina ha sido detectada con mayor intensidad cuando el revelado se ha realizado con reactivo de Munier-Macheboeuf que con el de König. Con este último, ha mostrado en todos los casos una coloración violeta.

— Anabasina: Su presencia se ha puesto de relieve con las tres fases móviles empleadas por nosotros, si bien hay que indicar que se encuentra en pequeña cantidad en las muestras objeto de este trabajo.

La cantidad de extracto que ha de depositarse en la placa cuando el revelado se realiza con el reactivo a la quinhidrona, es tres veces superior (45 microlitros) que cuando el revelado se lleva a cabo con el de Munier-Macheboeuf o el de König. Sin

embargo, dada la mayor especificidad de la quinhidrona para la anabasina, la identificación de este componente es mucho más segura que con los otros reactivos empleados.

— Nornicotina: Se encuentra presente en mayor o menor cantidad en todos los tabacos, hecho que por otra parte, ya había sido constatado por nosotros mediante la aplicación de la sencilla técnica de Cortés Muñoz (14).

La cantidad de nornicotina detectada en los tabacos hebra rubios de elaboración nacional, es siempre superior a la de la anabasina, pero inferior a la de nicotina.

Hay que señalar que el reactivo isatina-ác. tánico, dada su especificidad, es el que mejores resultados nos ha ofrecido en la detección de la nornicotina (aparece coloración azul tras revelado con el reactivo y calentamiento en estufa a 105°C).

— Nicotirina: Si bien la observación aislada de los resultados obtenidos con la fase móvil III indicarian una levisima presencia de nicotirina, los datos obtenidos cuando el desarrollo se realiza con las fases móviles I y II, muestran que la nicotirina no se encuentra presente en estas labores. No obstante, no podemos dejar de señalar que, cuando cromatografiamos un extracto de tabaco en un tiempo que exceda en siete días al de su fecha de obtención, y a pesar de conservar este extracto en nevera, en la imagen cromatográfica del mismo, cualquiera que sea la fase móvil empleada para su desarrollo, se detecta la presencia de nicotirina, la cual se formaría a expensas de los otros alcaloides que se encuentran inicialmente en el extracto etéreo-clorofórmico.

II.1.4.—Estudio cuantitativo

Para la determinación cuantitativa de la fracción alcaloídica de las muestras que integran nuestro trabajo, hemos seleccionado los siguientes métodos por las razones ya expuestas en anteriores comunicaciones:

- 1.—Volumetría tras precipitación pícrica, modificada por Cabo Torres y Tena Núñez (15).
- 2.—Fotocolorimetría (Reacción de König) (16, 17).

En ambos casos, la técnica elegida por nosotros para la extracción de la fracción alcaloídica de nuestras muestras, ha

sido la de destilación directa (Cabo Torres y Tena Núñez) (15), debido a la obtención de resultados similares a los de la técnica de destilación en corriente de vapor, según demostraron sus autores (18), así como a la mayor sencillez de la técnica en sí, la cual, por otra parte, ha sido puesta a punto en el Laboratorio donde se ha llevado a cabo el presente trabajo.

II.1.4.1.—Resultados

II.1.4.1.a.—Volumetría tras precipitación pícnica

Resumimos los resultados obtenidos en la tabla que incluimos a continuación:

TABLA VI

	%	σ	$\sigma\%$	ϵ	$\epsilon\%$	$\% \pm \sigma$
T-I	1,43	$\pm 0,02$	1,40	0,008	0,559	1,41 - 1,45
T-II	1,73	$\pm 0,03$	1,73	0,012	0,694	1,70 - 1,76
T-III	2,14	$\pm 0,02$	0,94	0,008	0,374	2,12 - 2,16
T-X	1,79	$\pm 0,03$	1,68	0,012	0,670	1,76 - 1,82
T-XI	1,86	$\pm 0,03$	1,61	0,012	0,645	1,83 - 1,89
T-XII	1,90	$\pm 0,03$	1,58	0,012	0,652	1,87 - 1,93
T-XIII	1,84	$\pm 0,03$	1,63	0,012	0,632	1,81 - 1,87
T-XV	1,82	$\pm 0,03$	1,65	0,012	0,659	1,79 - 1,85
T-LXXVI	1,36	$\pm 0,04$	3,17	0,016	1,268	1,32 - 1,40

TABLA VII

DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS SEGUN SU CONTENIDO
ALCALOIDICO ENTRE 1,25-2,25 ($\Delta = 0,25\%$)

% nicotina	n.º muestras	% del total de muestras
1,25 - 1,50	2	22,2
1,51 - 1,75	1	11,1
1,76 - 2,00	5	55,6
2,01 - 2,25	1	11,1

II.1.4.1.b.—Fotocolorimetría

Los resultados obtenidos con la técnica fotocolorimétrica quedan resumidos en la tabla VIII.

TABLA VIII

	%	σ	$\sigma\%$	ϵ	$\epsilon\%$	% $\pm \sigma$
T-I	1,41	$\pm 0,03$	2,13	0,012	0,851	1,38 - 1,44
T-II	1,99	$\pm 0,02$	1,01	0,008	0,402	1,97 - 2,01
T-III	2,10	$\pm 0,03$	1,43	0,012	0,571	2,07 - 2,13
T-X	1,87	$\pm 0,02$	1,07	0,008	0,428	1,85 - 1,89
T-XI	1,79	$\pm 0,02$	1,12	0,008	0,447	1,77 - 1,81
T-XII	1,92	$\pm 0,02$	1,04	0,008	0,417	1,90 - 1,94
T-XIII	1,88	$\pm 0,03$	1,60	0,012	0,638	1,85 - 1,91
T-XV	1,89	$\pm 0,02$	1,06	0,008	0,423	1,87 - 1,91
T-LXXVI	1,52	$\pm 0,01$	0,93	0,004	0,382	1,51 - 1,53

TABLA IX

DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS SEGUN SU CONTENIDO
ALCALOIDICO ENTRE 1,25-2,25 ($\Delta = 0,25\%$)

% nicotina	n.º muestras	% del total de muestras
1,25 - 1,50	1	11,1
1,51 - 1,75	1	11,1
1,76 - 2,00	6	66,7
2,01 - 2,25	1	11,1

II.1.4.2.—Discusión de resultados

Los resultados alcaloídicos obtenidos por ambos métodos para la primera marca comercial, presentan diferencias insignificantes para las dos muestras que se consideran.

Las dos muestras correspondientes a la segunda denominación comercial, no presentan diferencia alguna en los valores detectados por ambas técnicas.

Con respecto a las cinco marcas comerciales restantes, representadas cada una por una sola muestra, cabe señalar que los resultados obtenidos mediante la volumetría tras precipitación picrica, se encuentran comprendidas entre 1,36% (T-LXXVI) y el 2,14% de T-III, estando las halladas mediante la técnica fotocolorimétrica entre el 1,41% de T-I y el 2,10% de T-III.

Las diferencias más altas entre las riquezas alcaloidicas determinadas mediante las técnicas citadas, las ofrecen las muestras T-II (13,06%) y T-LXXVI (10,53%), siendo inferiores al 5% para T-X, T-XI y T-XV y nula para el resto de las muestras.

Las nueve muestras de cigarrillos hebra rubio estudiadas, poseen contenidos alcaloidicos comprendidos entre 1,25 y 2,25%, según las dos técnicas cuantitativas empleadas, siendo por tanto prácticamente total la concordancia de los resultados.

Esto sitúa a las labores nacionales de cigarrillos "rubios" por encima de las labores de tabacos negros que, según comprobamos en nuestros anteriores trabajos, fluctuaban entre el 0,76% y el 1,75%.

III.—CONCLUSIONES

1.º—Las nueve muestras de cigarrillos rubios (correspondientes dos de ellas a una misma denominación comercial, dos a otra y las cinco restantes a otras tantas marcas comerciales diferentes), presentan, desde el punto de vista cualitativo, una imagen cromatográfica común, a excepción de las designadas como T-XI, T-XII, en las cuales no se aprecia el componente de $Rf_{100} = 70,0$, así como la T-XV en la cual no se observan los componentes de $Rf_{100} = a 70,0$ y $79,0$. En cuanto a la T-LXXVI, si bien presenta la imagen cromatográfica común, se detecta en ella un nuevo componente de $Rf_{100} = 42,0$.

2.º—Cabe afirmar que en todas las muestras se encuentran presentes la nicotina (muy abundante), anabasina y nornicotina, siendo negativa la presencia de nicotirina.

3.º—Las nueve muestras estudiadas, poseen contenidos nicotínicos comprendidos entre 1,25 y 2,25%, según las dos técnicas cuantitativas empleadas, si bien cabe concluir después de un

detallado estudio de los resultados, que la gran mayoría de los tabacos hebra rubio, poseen un contenido alcaloídico comprendido entre límites muy cercanos: 1,5 y 2% (89% de las muestras por volumetría y 78% por fotocolorimetría).

IV.—BIBLIOGRAFIA

- 1.—CABO, J., MALDONADO, R., NAVARRO, C.—“Sobre la determinación de los alcaloides en tabacos elaborados”. *Pharm. Med.*, X, 343-360 (1974).
- 2.—CABO, J., NAVARRO, C., VILLAR, A.—“Contribución al estudio de la fracción alcaloídica de tabacos nacionales (españoles) mediante Tas-cromatografía y cromatografía en capa fina”. Trabajo presentado al XII Congreso internacional de la Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo Latino, Messina, 1976. (En prensa en los Anales del Congreso).
- 3.—CABO, J., BRAVO, L., FERNANDEZ, de la fracción alcaloídica del humo del tabaco de diferentes muestras de elaboración nacional”. Trabajo presentado al XIII C.I.S.F.M.L., Toulouse, 1978. (En prensa en los Anales del Congreso).
- 4.—CABO, J., AYUSO, M.^a J., JIMENEZ, J., NAVARRO, C.—“Estudios sobre tabacos de elaboración nacional (españoles). II. Determinación del contenido alcaloídico expresado en nicotina de los tabacos hebra negros”. Trabajo presentado al XIII C.I.S.F.M.L., Toulouse, 1978. (En prensa en los Anales del Congreso).
- 5.—CABO, J., MARHUENDA, E., NAVARRO, C., TORO, M.^a V.—“Estudios sobre tabacos tipo (cualitativo) por C.C.F. del contenido alcaloídico de los tabacos hebra negros”. Trabajo presentado al XIII C.I.S.F.M.L., Toulouse, 1978. (En prensa en los Anales del Congreso).
- 6.—CABO, J., TENA, G.—“Sobre la determinación de nicotina. IV. Técnica de valoración de nicotina en hoja de tabaco por destilación directa”. *Sci. Pharm.*, 1, 473 (1966).
- 7.—CABO, J., PARDO, P.—“Prácticas de Farmacognosia y Farmacodinamia”, 4.^a ed., Granada, 1974, pág. 215.
- 8.—Opus cit. (7), pág. 116.
- 9.—FEJER-KOSSEY, O.—“Studies of the alkaloids content in certain species and hybrids of *Nicotiana*. I”. *Acta Biol. Hung.*, 15, 251 (1964).
- 10.—PAECH, K., TRACEY, M. V.—“Modern methods of plant analysis”, Springer Verlag, Heidelberg, 1955, IV, pág. 489.
- 11.—STEPHENS, R. L., WEYBREW, J. A.—“Isatin: A color reagent for nornicotine”. *Tobacco US*, 148, (15), 22 (1959). A través de Coresta, (4), ref. 2881, (1959).
- 12.—DE PASQUALE, A., DE PASQUALE, R.: “La *Nicotiana glauca* della Sicilia. Ricerche cromatografiche”. *Lav. Ist. Farmacol. Farmacog. Univ. Messina*, 5, (1967-1969).
- 13.—FURUYA, T., KOJIMA, K., SYONO, K.—“Regulation of nicotine biosynthesis by auxins in tobacco callus tissues”. *Phytochem.*, 10, 1529, (1971).

- 14.—CORTES, V.—“La determinación de nornicotina en el tabaco”. Bol. Inst. Nac. Inv. Agr., 63, 129, (1970).
- 15.—CABO, J., TENA, G.—“Sobre la determinación de nicotina. I. Determinación del alcaloide en soluciones puras y en extractos comerciales de uso insecticida”. Ars Pharm., 4, (4-5), 1, (1963).
- 16.—KAKAC-VEJDELEC.—“Handbuch der Kolorimetrie”. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1962, I, pág.
- 17.—FABRE, R., TRUHAUT, R., BONDENE, C.—“Dosage de petites quantites de nicotine dans les atmospheres et les milieux biologiques animaux du vegetaux. Applications a l'étude de l'absorption et de l'elimination de l'acaloide chez les sujets expcses”. Ann. Pharm. Franç., 10, 579, (1952).
- 18.—CABO, J., TENA, G.—“Sobre la determinación de nicotina. III. Pcsibilidad del arrastre cuantitativo de nicotina en el tabaco por destilación directa”. Ars Pharm.. 5, (4-5), 1, (1964).