
Marija Todorović

Dokazivanje kardi toničnih heterozida u različitim vrstama roda *Digitalis* L.

Ispitivano je prisustvo kardi toničnih glikozida u podzemnim i nadzemnim organima četiri vrste roda *Digitalis*. Obradene su vrste: *Digitalis lanata* Ehrh., *D. ferruginea* L., *D. ambigua* Murr. i *D. laevigata* W.K. Korišćene su dve metode: standardne bojene hemijske reakcije za dokazivanje kardi toničnih heterozida i metoda tankoslojne hromatografije. Standardnim bojenim hemijskim reakcijama je utvrđeno prisustvo kardi toničnih heterozida u ispitivanim vrstama roda *Digitalis*. Istom metodom je utvrđeno da pored listova (u dostupnoj literaturi listovi *Digitalis*-a važe kao osnovni izvor kardi toničnih heterozida) kardi tonične heterozide sadrže i cvetovi svih i stabla *Digitalis lanata* Ehrh. i *Digitalis laevigata* W.K., a ne sadrže korenovi ni jedne od ispitivanih vrsta. Zaključeno je da pored listova takođe i cvetovi svih i stabla nekih od ispitivanih *Digitalis*-a mogu poslužiti kao još jedan važan izvor kardi toničnih heterozida. Metodom tankoslojne hromatografije je pokazana varijabilnost prisustva primarnih i sekundarnih glikozida, kao i aglikona u različitim vrstama roda *Digitalis*.

Uvod

Izučavanje hemijskog sastava biljaka je od velikog značaja za proizvodnju lekovitih sredstava na bazi biljnih sastojaka. Među najvažnije lekove koji vode direktno poreklo od biljaka spadaju i kardi tonični heterozidi. Ova jedinjenja pojačavaju snagu kontrakcije srčanog mišića i normalizuju rad srca, pa se lekovi napravljeni od njih koriste u terapiji mnogih srčanih oboljenja. Prevelike doze kardi toničnih droga (dugotrajno primenjivane) dovode do fenomena kumulacije i ispoljavaju toksični efekat koji se manifestuje nepravilnim kontrakcijama i ubrzanjem ritma rada srca, što se ponekad završava smrću.

S obzirom da su kardi tonični heterozidi veoma efikasni, to je njihova upotreba veoma raširena u terapiji. To su organska jedinjenja koja u svom sastavu imaju dve komponente: šećernu komponentu – glikon i

Marija Todorović
(1979), Niš,
Jeronimova 33,
učenica 2. razreda
Gimnazije „Bora
Stanković u Nišu

MENTOR:
Dr Nada Kovačević,
Farmaceutski fakultet,
Beograd

nešećernu komponentu – aglikon. Specifično lekovito dejstvo vezano je za aglikonsku komponentu, a šećerna komponenta ga upotpunjava u pogledu resopcije i transporta do mesta delovanja. Steroidno jezgro i 2,6-didezoksišećeri, koji se kao šećerne komponente dokazuju Keller-Killiani reakcijom, karakteristični su za kardiionične heterozide jer se kao specifični šećeri nalaze u molekulima ovih heterozida. Nezasićeni petočlani laktonski prsten, koji se kao deo aglikonske komponente dokazuje Baljetovom reakcijom, veoma je bitan za delovanje ovih heterozida, jer sve promene u njemu dovode do smanjenja ili gubitka dejstva.

Kardiionični heterozidi zastupljeni su u biljkama rodova: *Digitalis*, *Strophanthus*, *Convalaria*, *Helleborus* itd. Najvažniji izvori droga sa kardiioničnim heterozidima su listovi vrsta *Digitalis* i to: *Digitalis purpurea* L. i *Digitalis lanata* Ehrh. (Volavišek 1996, Lukić 1993b). Korisna dejstva biljaka sa kardiioničnim heterozidima kod srčanih aritmija opisao je Withering (1775), koji je opisao upotrebu naprstka (*Digitalis* sp.). Po njemu naprstak ima dominantno i izuzetno povoljno dejstvo na srčane kontrakcije do stupnja još neprimećenog kod bilo kog drugog leka u to vreme.

Od šest vrsta koliko je zastupljeno u flori Srbije u radu su obrađene četiri vrste roda *Digitalis*, i to: *Digitalis lanata* Ehrh., *D. ferruginea* L., *D. ambigua* Murr. i *D. laevigata* W.K.

Digitalis lanata Ehrh. je biljka koja sadrži veliki broj heterozida, od kojih su najznačajniji primarni-lanatozid A, B, C. Razgradnjom primarnih dobijaju se sekundarni heterozidi koji su, izuzev jedne acetilne grupe na jednoj šećernoj komponenti (acetil-digitoksoza), indentični sekundarnim heterozidima purpurnog digitalisa (*D. purpurea* L.). Lišće ove biljke sadrži steroidne saponine, neaktivne steroidne heterozide, flavonoide, tanine, razne kiseline, mineralne soli i enzime.

Digitalis ambigua Murr. sadrži glikozide digitalin, digitoksin i gitalin kao najvažnije komponente. Lišće *Digitalis ferruginea* L. sadrži lanatozide A, B, C kao primarne i digitoksin, gitoksin i digoksin kao sekundarne glikozide. Listovi *Digitalis laevigata* W.K. sadrže lanatozid A kao dominantni primarni glikozid. Upravo zbog toga, javlja se sve veće interesovanje za ovu biljku radi upotrebe u terapijske svrhe.

Naspram još uvek nedovoljno proučene *D. laevigata*, *D. lanata* se uspešno gaji kod nas i u farmaceutskoj industriji se koristi sve više umesto purpurnog digitalisa. Upotrebljava se za izradu kardiioničnih lekova, ali u slučaju unošenja većih količina produkata njenog lišća pojavljuju se simptomi trovanja. U terapijskim dozama glikozidi *D. ambigua*-e su takođe kardiionici. Po karakteru dejstva na srce preparati *D. ambigua*-e su slični preparatima purpurnog digitalisa s tim što imaju izraženija kumulativna dejstva. Lišće *D. ferruginea*-e i *D. ambigua*-e koristi se u Rusiji kao sirovina za izradu novogalenskih preparata.

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi zastupljenost kardiotoničnih heterozida u podzemnim i nadzemnim organima vrsta roda *Digitalis*. Ujedno, cilj rada je bio i izdvajanje šećera i aglikona iz listova ovih biljaka, kao i uočavanje razlika u razdvojenim jedinjenjima kod različitih biljnih vrsta.

Materijal i metode

Biljke koje su analizirane su skupljane u dva navrata. Prvi deo materijala sakupljan je od 1. do 29. juna 1996. godine i to sa sledećih lokaliteta: okolina Niša, Stara planina, okolina Petnice i dolina reke Gradac, dok je drugi deo materijala uzet takođe iz okoline Niša i sa Stare planine u periodu od 5. do 30. avgusta 1996. U okolini Niša je materijal sakupljan sa plantažnih uzgajališta farmaceutskog kombinata „Zdravlje“, Leskovac. U okolini Petnice i u dolini reke Gradac je materijal (*D. ferruginea* i *D. lanata*) sakupljen na krčevinama po retkim šumama, dok je na Staroj planini materijal (*D. ambigua* i *D. laevigata*) uziman sa livada šumskog pojasa, kamenitih padina i šumskih sečina.

Za ispitivanje prisustva kardiotoničnih heterozida svih biljnih organa korušćena su standardne bojene hemijske reakcije (Ph. Jug.), s tim što su prethodno svi biljni delovi smrvljeni u prah da bi se mogli iskoristiti za dokazne reakcije. Obradeno je ukupno 12 uzoraka i to po tri uzorka svake biljne vrste roda *Digitalis*.

Pojava odgovarajuće boje je bila potvrda prisustva, a intezitet dobijene boje je iskorišten za orijentacione zaključke o količini prisutnih heterozida. U tabelama je znakom „-“ označeno odsustvo pozitivne reakcije, a znakom „+“ dovoljna zastupljenost kardiotoničnih heterozida, dok je sa „++“ označena veća zastupljenost u odnosu na prethodnu reakciju. Prilikom izvođenja Baljetove reakcije, intenzivno narandasta boja je označena sa „++“, svetlije narandasta sa „+“, dok izraženo žuta boja, koja se ne razlikuje od boje natrijum-piktrata, označavana je sa „-“. Kod Keller-Killiani reakcije, obojenost dodirne površine sa gornje strane plavo zelenom bojom, a sa donje smeđe crvenom i pojava tamnog prstena, označavana je kao pozitivna reakcija (+) dok pojava žuto zelene boje i odsustvo tamnog prstena kao negativna reakcija (-).

U cilju veće pouzdanosti, na materijalu sakupljenom u avgustu analiza je ponovljena dva puta.

Metodom tankoslojne hromatografije analizirane su biljke: *Digitalis lanata* Ehrh., *D. ferruginea* L. i *D. laevigata* W.K., sakupljane u junu u okolini Petnice, u dolini reke Gradac, kao i u okolini Niša. Analiza nije urađena na uzorku *D. ambigua* Murr. zbog nedostatka materijala.

Sprašena droga (1 g) zagrevana je sa 20 ml 50%-tnog etanola 15 minuta. U rastvor je dodato 10 ml 10%-tnog olovoacetata. Rastvor jr filtriran.

U filtrat je dodato malo (kap-dve) sirćetne kiseline i potom je rastvor ekstrahovan dihlormetanom (3×15 ml). Sjedinjeni rastvor dihlormetana je filtriran preko bezvodnog natrijumsulfata i uparen do suva. Suvi ostatak je rastvoren u maloj količini dihlormetana i metanola (1 : 1) i nanet na hromatogram. Korišćene su gotove ploče Si-gela (DC-Alufolien Kieselgel 254 mm fluks). Kao mobilna faza korišćena je smeša rastvarača: etilacetat-metanol-voda (81 : 11 : 8). Za vizualizaciju razdvojenih mrlja hromatogram je prskan rastvorom antimontrihlorida (20%-tni rastvor u hloroformu).

Rezultati i diskusija

Rezultati dobijeni standardnim bojenim hemijskim reakcijama za identifikaciju kardiotioničnih heterozida

Standardnim bojenim hemijskim reakcijama utvrđeno je, u saglasnosti sa očekivanjima, prisustvo kardiotioničnih heterozida u nadzemnim organima, za razliku od korena gde nije bilo pozitivne reakcije.

Kod vrste *Digitalis lanata* Ehrh., rezultati su bili u saglasnosti sa očekivanjima. Njegovi listovi predstavljaju, kao što je već utvrđeno (Volavišek 1996, Lukić 1993 a, b) najvažniji izvor kardiotioničnih heterozida. Međutim, ne i jedini. Rezultati pokazuju zastupljenost kardiotioničnih heterozida u cvetu kao i u stablu ove biljne vrste, dok u korenu nisu identifikovani (tabela 1).

Tabela 1. Zastupljenost kardiotioničnih heterozida u *Digitalis lanata* Ehrh.

Biljni organ	Jun			Avgust		
	NPL	DŠ	SJ	NPL	DŠ	SJ
Cvet	+	+	+	+	+	+
List	++	+	+	+	+	+
Stablo	+	+	+	+	+	+
Koren	-	-	-	-	-	-

NPLP – nezasićeni petočlani laktonski prsten, DŠ – 2,6-didezoksi šećeri, SJ – steroidno jezgro; iste skraćenice su korišćene i u ostalim tabelama.

Listovi vrste *Digitalis ambigua* Murr., takođe pokazuju najveći sadržaj kardiotioničnih heterozida od svih organa biljke. Za razliku od *Digitalis lanata* Ehrh. ovde je još samo u cvetu uočeno prisustvo ovih jedinjenja, dok u stablu i korenu nije bilo pozitivne reakcije (tabela 2).

Tabela 2. Zastupljenost kardiotioničnih heterozida u *Digitalis ambigua* Ehrh.

Biljni organ	Jun			Avgust		
	NPL	DŠ	SJ	NPL	DŠ	SJ
Cvet	+	+	+	+	+	+
List	++	+	+	+	+	+
Stablo	-	-	-	-	-	-
Koren	-	-	-	-	-	-

U listovima *Digitalis ferruginea* L. takođe je uočeno prisustvo kardiotioničnih heterozida. Ispitivanja obavljena u avgustu pokazuju da cvetovi ove vrste mogu poslužiti kao još jedan važan izvor kardiotioničnih heterozida, za razliku od stabla i korena, gde kao i kod *D. ambigua* Murr. nije bilo pozitivne reakcije (tabela 3).

Tabela 3. Zastupljenost kardiotioničnih heterozida u *Digitalis ferruginea* L.

Biljni organ	Jun			Avgust		
	NPL	DŠ	SJ	NPL	DŠ	SJ
Cvet	/	/	/	+	+	+
List	++	+	+	+	+	+
Stablo	-	-	-	-	-	-
Koren	-	-	-	-	-	-

Listovi *Digitalis laevigata* W.K., koja je do danas još uvek slabo hemijski ispitana, pokazuju prisustvo kardiotioničnih heterozida kao i sve prethodno ispitane vrste. Kod cvetova je, u saglasnosti sa očekivanjima, takođe konstatovano njihovo prisustvo, dok kod korena nije bilo pozitivne reakcije. Stablo pokazuje neznatno prisustvo ovih organskih jedinjenja. Naime, vrste uzete u periodu od 1. do 29. juna ukazuju na prisustvo kardiotioničnih heterozida u njihovim stablima, dok kod biljaka uzetih u periodu od 5. do 30. avgusta 1996. godine nije bilo pozitivne reakcije (tabela 4). Ovakve promene najverovatnije zavise od vremena branja, klimatskih uslova i staništa sa koga je vrsta uzeta.

Tabela 4. Zastupljenost kardiotioničnih heterozida u *Digitalis laevigata* W.K.

Biljni organ	Jun			Avgust		
	NPL	DŠ	SJ	NPL	DŠ	SJ
Cvet	+	+	+	+	+	+
List	++	+	+	+	+	+
Stablo	+	+	+	-	-	-
Koren	-	-	-	-	-	-

Rezultati dobijeni metodom tankoslojne hromatografije

Na osnovu rezultata dobijenih metodom tankoslojne hromatografije, izvršena je detekcija razdvojenih jedinjenja kod *Digitalis lanatae folium*, *D. laevigatae folium* i *D. ferrugineae folium*. Uočena je razlika u pogledu primarnih i sekundarnih glikozida kod sve tri vrste *Digitalis*-a.

Na hromatogramu se hlorofili A i B pojavljuju kao dve zelene trake, a nekoliko žutih traka potiče od razdvojenih flavonoida.

Tamno ljubičaste trake kod *Digitalis lanatae folium* predstavljaju nje-gove primarne glikozide-lanatozide A, B, C, koji cepanjem prelaze odgovarajuće sekundarne glikozide i, kasnije, aglikone: digitoksin, gitoksin i digoksin koji su predstavljeni slabim ljubičasto plavim zonama. Lanatozid A formira glavnu zonu u koloniji, dok su lanatozidi B i C zastupljeni u nižim koncentracijama. Slobodni aglikoni kardi-toničnih heterozida koji su prisutni u ekstraktu kreću se sa frontom rastvarača (imaju najveće R_f vrednosti) i na hromatogramu se vide kao svetlo-ljubičaste trake.

Kod *Digitalis ferrugineae folium* primarni glikozidi-lanatozidi A, B, C predstavljeni su sa slabije izraženim ljubičastim trakama u odnosu na *Digitalis lanatae folium*. Lanatozid A formira glavnu zonu, dok su lanatozidi B i C zastupljeni u nižim koncentracijama. Prisutni su i odgovarajući aglikoni, gitoksin i digitoksin, predstavljeni slabim plavo-ljubičastim trakama.

Kod *Digitalis laevigatae folium* može se uočiti dominantni primarni glikozid-lanatozid A, predstavljen svetlo ljubičastom trakom, koji cepanjem prelazi u sekundarni glikozid. Slobodni aglikon – digitoksin, kreće se za frontom rastvarača brže u odnosu na *Digitalis lanatae folium* i na hromatogramu je predstavljen slabo izraženom ljubičasto-plavom trakom.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da je zastupljenost kardi-toničnih heterozida prilično neravnomerna. Naime, u dostupnoj literaturi, listovi digitalisa važe kao najvažniji izvor kardi-toničnih heterozida kod ovih biljaka. Rezultati dobijeni u ovom radu govore da je pored listova prisutnost ovih jedinjenja konstantovana i u cvetovima svih i u stablima nekih od ispitanih vrsta, kao što su: *Digitalis lanata* Ehrh. i *Digitalis laevigata* W.K. Ovim rezultatima su dati potpuniji podaci o zastupljenosti kardi-toničnih heterozida i u ostalim biljnim delovima, što sugeriše i njihovu širu primenu za ekstrakciju kardi-toničnih heterozida i izradu lekova za lečenje srčanih oboljenja. Ujedno, rezultati ovih ispitivanja su prilog boljem poznavanju hemijske strukture vrsta roda *Digitalis*, koje su hemijski još uvek nedovoljno proučene.

Literatura

- [1] Volavišek, B. 1996. *Simpozij o digitalisu*. Ljubljana: Lek-Ljubljana.
- [2] Ph. Jug. 1984. *Ph. Jug.*, IV. Beograd: Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu.
- [3] Ivanić, R., Vićentijević, Lj. 1991. *Farmakognozija za treći razred medicinske škole*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva.
- [4] Kojić, M., Janjić, V. 1991. *Otrovne biljke*. Beograd: Naučna knjiga.
- [5] Lukić, P. 1983a. *Vežbe iz farmakognozije*. Beograd: Farmaceutski fakultet.
- [6] Lukić, P. 1993b. *Farmakognozija*. Beograd: Farmaceutski fakultet.
- [7] Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M. 1995. *Pharmacology*. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- [8] Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M. 1984. *Phont Drug Analysis*. Berlin: Springer-Verlag.

Marija Todorović

Indication of Cardiotonic Heterozides in Diferent Species of Genus *Digitalis*

The presence of cardiotonic glycosides in underground and overground organs of four species of genus *Digitalis* has been researched. The following species were studied: *Digitalis lanata* Ehrh., *D. ferruginea* L., *D. ambigua* Murr. i *D. laevigata* W.K. There were two methods used: a standard method for indication of cardiotonic heterozides and a method of thin-layer chromatography. By the standard method for indication of cardiotonic heterozides the presence of cardiotonic heterozides has been found in up to now, less studied and less known species of genus *Digitalis*. The presence of cardiotonic heterozides in their overground organs has been found and their lack in the radix of all the researched species. It was concluded that flowers of all the *Digitalis* species and trunks of some of them may represent one more significant source of cardiotonic heterozides besides the leaves, as already known source of these organic compounds. The method of thin-layer cromatography indicates the variability of the primary and secondary glycosides and as well as aglycons presence in different species of genus *Digitalis*.

