

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

ESTUDIO MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE LA ESENCIA DE THYMUS LONGIFLORUS BOISS

J. Cabo Torres, M. M. Cabo Cires, T. Cruz García y J. Jiménez Martín

RESUMEN

Basándonos en la técnica de Cromatografía en Capa Fina, se ha conseguido la detección y posterior identificación de varios de los componentes de la esencia de *Thymus Longiflorus* Boiss. Asimismo se ha llevado a cabo la cuantificación de aquellos componentes que se presentaban en mayor proporción.

SUMMARY

Fine Layer Chromatography was used to achieve the separation and subsequent identification of a series of components of the essential oil of *Thymus Longiflorus* Boiss. Those components obtained in largest amounts were also quantified by photodensitometry.

INTRODUCCION

Este trabajo se engloba en una de las líneas de investigación del Departamento: Plantas aromáticas (1,2,3). Nos centramos en el estudio del *Thymus longiflorus* Boiss, por tratarse de una especie escasamente estudiada y que además es endémica de ciertas zonas del Levante y del Sureste español.

Empleamos la técnica de Cromatografía en Capa Fina por ser un método clásico de detección, tanto de componentes esenciales, como de otro tipo de principios (4). Resulta una técnica muy válida dada su reproductibilidad, rapidez y sencillo utillaje.

Además la Cromatografía en Capa Fina nos resulta particularmente útil porque servirá como base para la cuantificación de aquellos componentes de la esencia que

resulten más interesantes por su mayor abundancia en la misma. La cuantificación se realizó por fotodensitometría (5,6,7,8), técnica muy interesante y sin embargo aún poco utilizada en el campo concreto de las esencias.

MATERIAL Y METODOS

Muestra.- *Thymus longiflorus* Boiss, recolectado en época de floración (junio), en la Subestación de Tablate (Granada).

La extracción de la esencia se realizó por el método de Clevenger (9), obteniéndose un rendimiento medio de 0,72 %.

Análisis cualitativo por Cromatología en Capa Fina.

—Extensor: Desaga (manual).

—Placas: 20 x 20 cm, capa de 250 micras de espesor de Silicagel G Merck.

—Activación: a 110° C durante 30 minutos, previa desecación a temperatura ambiente y enfriadas en desecador sobre Silicagel con indicador de humedad.

—Fase móvil:

·Benceno / Eter 85/15

·N-heptano N-hexano / Eter 85/15

—Desarrollo: 10 cm unidimensional ascendente en cubetas "Desaga" a saturación.

—Revelador: solución etanólica de vainilla al 3%. A 100 ml de esta solución se le adicionan 4 ml de ácido sulfúrico concentrado en el momento de su empleo.

—Visualización: mediante nebulizador fino de vidrio, controlando la cantidad de reactivo (aproximadamente 25 ml por placa). Posterior calentamiento en estufa a 110° C durante unos 7 minutos.

Análisis cuantitativo por Fotodensitometría

Utilizamos un fotodensitómetro Shimadzu High-speed thin-layer Chromato Scanner (model CS-920). Las lecturas se realizaron a 520 nm, sobre placas de Silicagel G Merc, con 250 micras de espesor. La fase móvil seleccionada fue Benceno/Eter 85/15. El revelado se realizó con vainillina alcohólica adicionada de ácido sulfúrico al 4% y posterior calentamiento en estufa a 110° C, durante 7 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Fase móvil.- En el apartado "Material y Métodos", citábamos las fases móviles que habían resultado más idóneas como resultado de una serie de ensayos previos.

Tras el estudio crítico comparativo de estas fases, adoptamos Benceno/Eter 85/15 como fase única por estimar que se aprecia en ella:

- Mayor número de componetes detectados y mejor separación de los mismos.
- Mejor resolución de los principios utilizados.

Identificación de componentes.- Los valores absolutos de Rf de las manchas cromatográficas que por su intensidad parecían corresponder a los principales componentes de la esencia de *Thymus longiflorus* Boiss, no tienen, por supuesto más valor que el meramente orientativo, aunque se basa en una aceptable coincidencia con

los obtenidos anteriormente en condiciones similares. Tal orientación, es sin embargo útil, para buscar una ratificación más sólida seleccionando los posibles componentes, al estado puro, que es aconsejable contrastar con los de la esencia. Dichos componentes son: borneol, cineol, terpinen-4-ol, acetato de terpenilo y α -terpineol.

La pauta seguida para su ratificación previa identificación ha sido:

- Esencia
- Esencia enriquecida en un determinado componente C
- Componente C

Los resultados obtenidos mediante la metodología detallada anteriormente, quedan reflejados en las fotografías 1,2 y 3. Su estudio minucioso y razonado, adecuadamente discutido en pro y en contra, nos lleva a sugerir que en la esencia de *Thymus longiflorus* Boiss están presentes: Cineol (Tabla I), Borneol (Tabla I), Terpinen-4-ol (Tabla II), Acetato de terpenilo (Tabla II) y α -terpineol (Tabla III).

De los cinco componentes identificados en principio por Cromatografía en Capa Fina, y dado que tres de ellos (α -terpineol, borneol y terpinen-4-ol) son los que presentan manchas cromatográficas de mayor superficie, nos centramos en el estudio de los mismos mediante la técnica fotodensitométrica.

Las muestras utilizadas para esta técnica fueron:

- Dilución al 5% de esencia de *Thymus longiflorus* Boiss
- Dilución de cineol al 1,7% y 2%
- Dilución de α -terpineol al 0,06% y 0,3%
- Dilución de terpinen-4-ol al 0,05% y 0,2%

En todos los casos los depósitos fueron de 2 μ l.

En primer lugar se procedió a la construcción de las curvas patrón correspondientes a cineol, α -terpineol y terpinen-4-ol; para ello se emplearon concentraciones muy próximas entre sí y perfectamente conocidas de cada uno de estos componentes, representándose posteriormente concentración frente a número de cuentas absolutas que proporcionaba el fotodensitómetro para cada una de las concentraciones, así pudimos llegar al conocimiento de cuál era el margen de concentración con el cual debíamos trabajar para la cuantificación de la muestra problema.

Una vez conocidos los márgenes de concentración adecuados, se llevaron a cabo numerosas lecturas de la muestra en estudio. Los resultados obtenidos en forma de "cuentas absolutas" se reflejan en las Tablas IV, V y VI.

Por último y aplicando un método de interpolación (5), se llegó a la determinación de los porcentajes absolutos de los tres componentes estudiados en la esencia de *Thymus longiflorus* Boiss:

- Cineol: 37,2% \pm 0,043
- α -terpineol: 3,44% \pm 0,0265
- terpinen-4-ol: 2,62% \pm 0,00216

Aplicando esta metodología hemos obtenido resultados concordantes, incluso comparando los obtenidos con placas diferentes, como lo revelan los cálculos estadísticos. Ello permite concluir que instrumental y técnica empleados son adecuados para este tipo de análisis cuantitativo de compuestos presentes en esencias.

Tabla I

	Rf x 100					
1.- Esencia	28	33	39	52	61	70
2.- Esencia + Terpinen-4-ol	28	33	39	52	61	70
3.- Terpinen-4-ol			39			
4.- Esencia	28	33	39	52	61	70
5.- Esencia + Terpinen-4-ol	28	33	39	52	61	70
6.- Terpinen-4-ol			39			
7.- Esencia	28	33	39	52	61	70
8.- Esencia + Acet. terpenilo	28	33	39	52	61	70
9.- Acet. terpenilo					61	
10.- Esencia	28	33	39	52	61	70
11.- Esencia+Acet. terpenilo	28	33	39	52	61	70
12.- Acet. terpenilo					61	

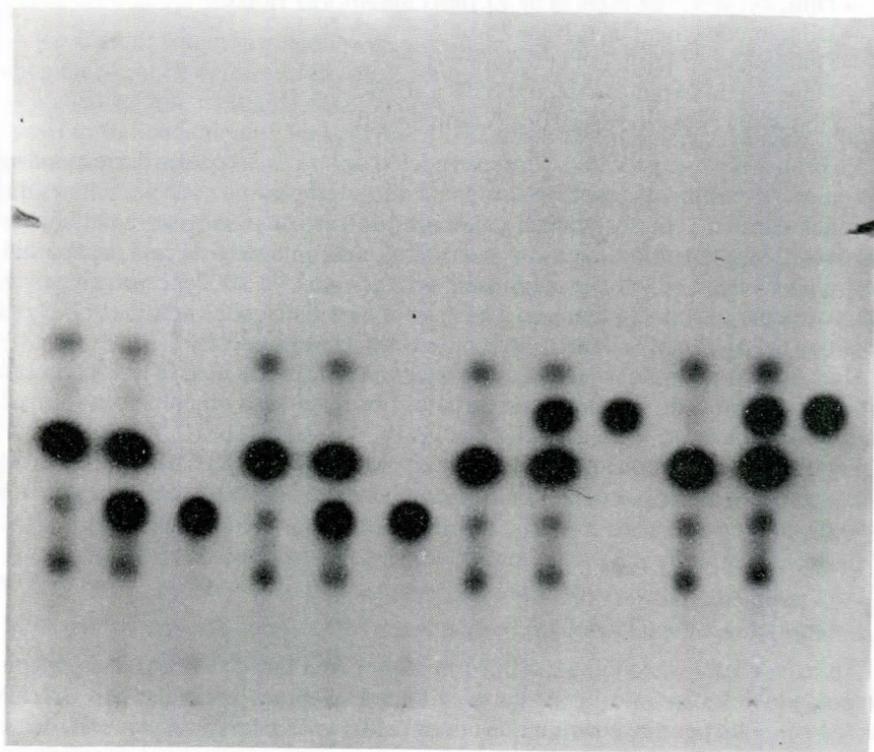


Tabla II

Rf x 100

1.- Esencia	28	33	39	53	61	70
2.- Esencia + Cineol	28	33	39	52	61	70
3.- Cineol			39			
4.- Esencia	28	33	39	52	61	70
5.- Esencia + Cineol	28	33	39	52	61	70
6.- Cineol			39			
7.- Esencia	28	33	39	52	61	70
8.- Esencia + Borneol	28	33	39	52	61	70
9.- Borneol					61	
10.- Esencia	28	33	39	52	61	70
11.- Esencia + Borneol	28	33	39	52	61	70
12.- Borneol		33				

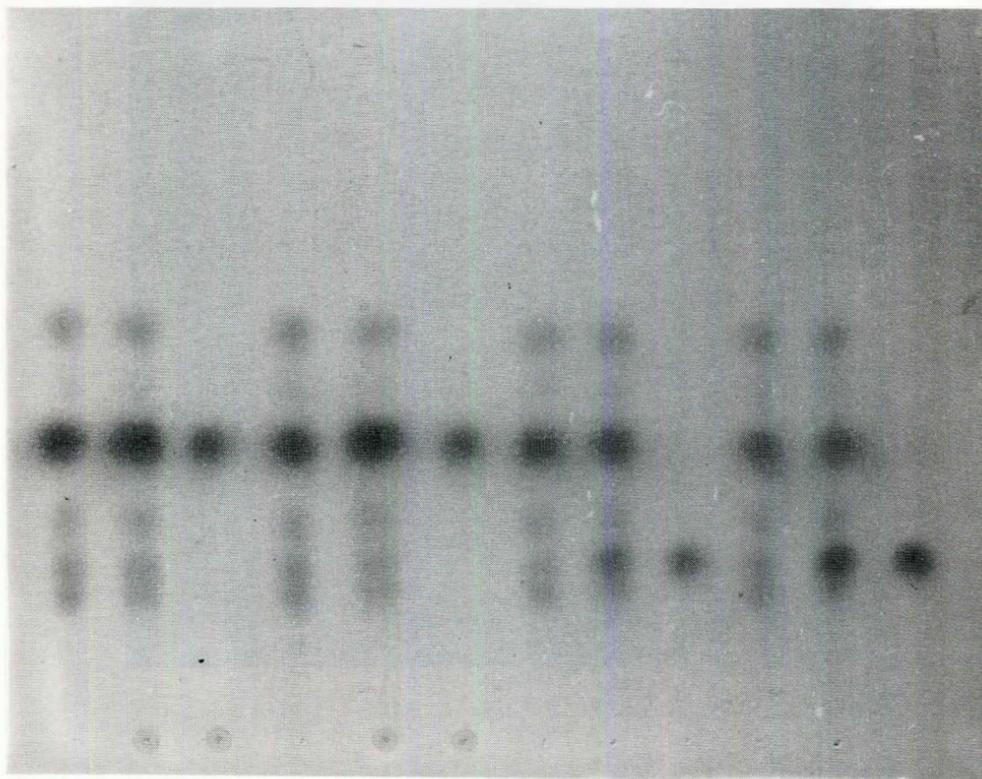


Tabla III

	Rf x 100					
1.- Esencia	29	33	40	53	61	69
2.- Esencia + α -Terpineol	29	33	40	53	61	69
3.- α -Terpineol	29					
4.- Esencia	29	33	40	53	61	69
5.- Esencia + α -Terpineol	29	33	40	53	61	69
6.- α -Terpineol	29					

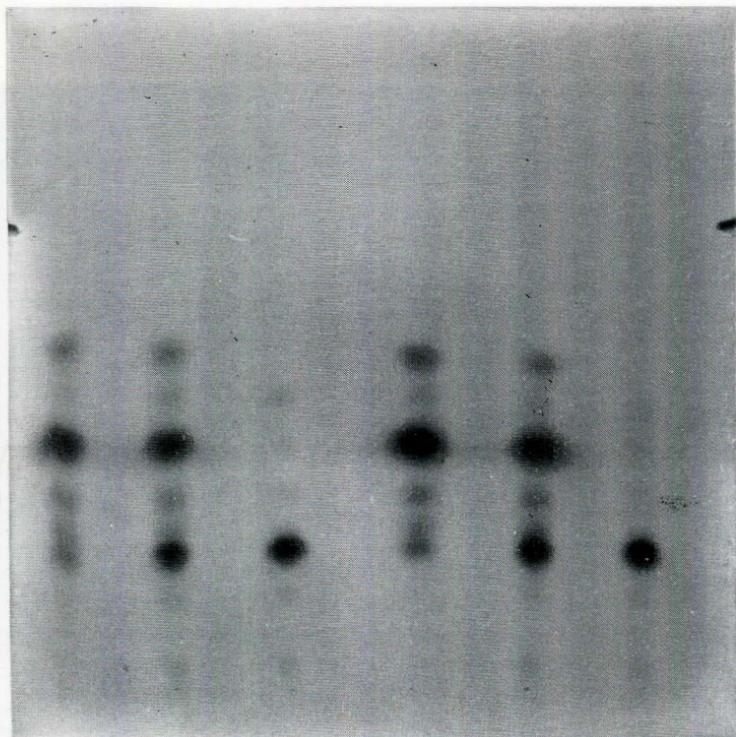


Tabla IV

Esencia *Thymus longiflorus* al 5 % (100 γ /2 μ l). Cineol al 1,7 % (34 γ /2 μ l). Cineol al 2 % (40 γ /2 μ l)

Lectura fotodensitométricas ("cuentas absolutas")

PLACA	Cin (34 γ)	Es (100 γ)	Cin (40 γ)	Cin (34 γ)	Es (100 γ)	Cin (40 γ)
n° 1	20034	23241	25324	20322	23060	25498
	20370	23018	25427	20374	22983	25279
	20349	22597	25028	20213	22937	25164
	20318	22829	25138	20319	22852	25137
n° 2	20389	22938	25158	20374	22888	25135
	20095	22869	25122	20122	22773	25301
	20312	22773	25264	19967	22886	25104
	20365	22893	25129	20085	22796	25304

Tabla V

Esencia *Thymus longiflorus* al 5 % (100 γ /2 μ l). α -terpineol al 0,06 % (1,2 γ /2 μ l). α -terpineol al 0,3 % (6 γ /2 μ l)

Lecturas fotodensitométricas ("cuentas absolutas")

PLACA	α -ter (1,2 γ)	Es(100 γ)	α -ter(6 γ)	α -ter(1,2 γ)	Es(100 γ)	α -ter(6 γ)
n° 3	1384	2859	4331	1329	2716	4330
	1345	2718	4322	1317	2711	4315
	1317	2720	4408	1323	2741	4367
	1293	2742	4323	1292	2704	4336
n° 4	1300	2273	3640	1337	2697	4330
	1299	2703	4343	1304	2737	4344
	1297	2716	4348	1311	2722	4361
	1315	2716	4365	1306	2748	4364

Tabla VI

Esencia *Thymus longiflorus* al 5 % (100 γ / 2 μ l). Terpinen-4-ol al 0,05 % (1 γ / 2 μ l)

Lecturas fotodensitométricas ("cuentas absolutas")

PLACA	Ter (1 γ)	Es (100 γ)	Ter (4 γ)	Ter (1 γ)	Es (100 γ)	Ter (4 γ)
nº 5	1275	2585	3692	1239	2568	3696
	1262	2586	3715	1265	2577	3713
	1246	2588	3728	1264	2592	3735
	1266	2592	3735	1266	2610	3741
nº 6	1288	2614	3764	1300	2642	3807
	1288	2629	3776	1295	2630	3772
	1261	2631	3772	1276	2635	3791
	1273	2637	3811	1289	2647	3818

BIBLIOGRAFIA

- (1) CABO TORRES, J.; CABO CIRES, M. M.; CRESPO GIL, M. E.; JIMENEZ MARTIN, J.; NAVARRO MOLL, C. "Thymus granatensis Boiss. I.- Etude qualitative et quantitative de son huile essentielle". *Plantes med. et phytother.* 20 (1), 18-24, (1986).
- (2) CABO TORRES, J.; BRAVO DIAZ, L.; JIMENEZ MARTIN, J.; NAVARRO MOLL, C. "Thymus hiemalis Lange. Etude quali et quantitative de son huile essentielle par C. G.". *Planta méd.* 39, 270 (1980).
- (3) GOMIS HURTADO, E. "Thymus serpylloides subesp. Gadorensis: Estudios farmacognósticos". Tesina, Granada, (1987).
- (4) GAMEZ MONTALVO, E. "Metodología sencilla para la preliminar detección de fármacos en orina. Tranquilizantes". Tesis Doct., Granada (1986).
- (5) CABO CIRES, M. M. "Cromatografía cuantitativa en capa fina (Densitometría) aplicada al estudio de aceites esenciales". Tesis Doct., Granada (1978).
- (6) SHIBATA, K. "Meth. Biochem. Anal.", 7, 77 (1959). A través de SHELLARD, E. J. "Quantitative paper and thin layer chromatography". Ed. Academic Press, pág. 70, Londres (1968).
- (7) DALLAS, M. S. J. "Reproducible Rf values in thin layer Adsorption Chromatography". *J. Chromatog.*, 17, 267 (1965).
- (8) SHELLARD, E. J.; ALAM, M. Z.; "The quantitative determination of some mitragyna oxindole alkaloids after separation by thin layer Chromatography. III. Densitometry". *J. Chromatog.*, 33 (2), 347-369 (1968).
- (9) CABO TORRES, J.; PARDO GARCIA, P. "Guía de Prácticas de Farmacognosia y Farmacodinamia". 4 ed., 242-247, Granada (1974).