

Adonitoxol, nový srdcový glykozid hlaváčka jarného (*Adonis vernalis* L.)

A. CSERÉP, L. MASLER, D. ŠIKL, Š. BAUER

*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, Oddelenie biochémie sacharidov,
Bratislava*

Z hlaváčka jarného sa izoloval adonitoxín a adonitoxol. Na základe chemického a fyzikálnochemického štúdia adonitoxol je L-ramnozido-adonitoxologenín.

Chemický výskum kardiotonických steroidov hlaváčka jarného (*Adonis vernalis* L.) začal r. 1936 W. Karrer [1], ktorý dokázal v hlaváčku prítomnosť dvoch srdcových glykozidov. Od toho času sa viacerí autori zaoberali kardi-tonicky účinnými látkami hlaváčka, z ktorého T. Reichstein izoloval cymarín [2] a adonitoxín [3, 4], D. G. Kolesnikov K-strofantín [5] a strofantidín [6] a J. Pitra 16-hydroxystrofantidín (strofadogenín) a acetyladonitoxín [7]. Posledne menovaný autor upozornil ť na prítomnosť 16-O-formylkardenolidov v hlaváčku [8]. Chromatografiou na papieri sa zistilo [9], že uvedené kardi-tonické steroidy predstavujú len malú časť glykozidickej zmesi drogy a že v droge okrem spomínaných kardenolidov je ešte 23 ďalších látok poskytujúcich pozitívnu reakciu na butenolidový kruh. Úlohou tejto práce bolo izolovať a identifikovať niektoré zložky glykozidickej zmesi hlaváčka jarného.

Z etanolových extraktov sušenej drogy sme protiprúdnym roztrepávaním a chromatografiou na Al_2O_3 získali dva kryštalické srdcové glykozidy, ktoré sme označili ako glykozid AV4 a glykozid AV6.

Glykozid AV4 $C_{29}H_{42}O_{10}$ má b. t. 245—258 °C, optickú otáčavosť $[\alpha]_D^{23} = -26,2^\circ$ ($c = 1,023$; metanol), dve maximá v ultrafialovom spektre (λ_{max} 220 nm, $\log \epsilon = 4,20$; 310 nm, $\log \epsilon = 1,46$), ako aj absorpčné pásy butenolidového kruhu (1630, 1740 a 1790 cm^{-1}) a absorpčný pás aldehydickej skupiny (1720 cm^{-1}) v infračervenom spektre.

Glykozid AV4 poskytol acetyláciou acetanhydridom v pyridíne tetra-O-acetylderivát $C_{37}H_{50}O_{14}$ s b. t. 148—150/224—232 °C a s $[\alpha]_D^{23} = -58,1^\circ$ ($c = 1,032$; chloroform).

Na základe uvedených fyzikálnochemických konštánt, zmesného bodu topenia, reakcie s koncentrovanou kyselinou sírovou, porovnania infračervených spektier a chromatografie na papieri s autentickou vzorkou sme glykozid AV4 identifikovali ako adonitoxín.

Glykozid AV6 $C_{29}H_{44}O_{10}$ mal b. t. 179—184 °C a v infračervenom spektre absorpčné pásy butenolidového kruhu pri 1620, 1750 a 1810 cm^{-1} . Jeho

acetyláciou v pyridíne sa získal penta-*O*-acetylderivát $C_{39}H_{54}O_{15}$ s b. t. 115 až 117 °C.

R_F hodnoty adonitoxínu a glykozidu AV6 v dvoch systémoch [10, 11] sú uvedené v tab. 1.

Tabuľka 1

R_F hodnoty glykozidu AV4 (adonitoxín) a glykozidu AV6 (adonitoxol)

Systém	R_F		Poznámky
	glykozid AV4 (adonitoxín)	glykozid AV6 (adonitoxol)	
toluén—butanol—voda (2 : 1 : 3)	0,56	0,42	impregnácia spodnou fázou, doba vyvíjania 8 hodín
izoamylalkohol—voda (1 : 1)	0,48	0,62	impregnácia hornou fázou, doba vyvíjania 24 hodín

Hydrolyzou podľa C. Mannicha a G. Siewerta [12] v dioxáne adonitoxín, ako aj glykozid AV6 poskytli ramnózu a dva aglykóny: adonitoxigenín a aglykón AV6 (adonitoxologenín), ktoré sme charakterizovali R_F hodnotami v dvoch systémoch [13] uvedených v tab. 2.

Tabuľka 2

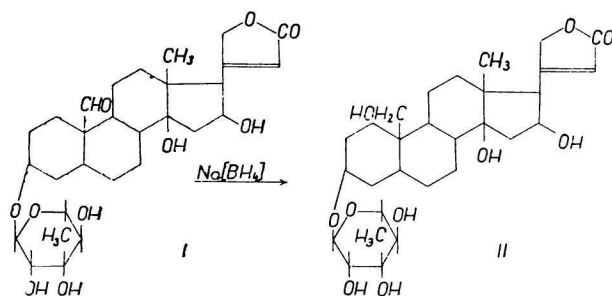
R_F hodnoty aglykónu AV4 (adonitoxigenín) a aglykónu AV6 (adonitoxologenín)

Systém	R_F		Poznámky
	aglykón AV4 (adonitoxigenín)	aglykón AV6 (adonitoxologenín)	
benzén—chloroform (2 : 3)	0,34	0,23	impregnácia formamid—metanol 1 : 1, doba vyvíjania 5 hodín
metyletylketón—xylén (1 : 1)	0,38	0,29	

Z výsledkov elementárnej analýzy, prítomnosti rovnakého sacharidu (L-ramnózy) v molekule obidvoch izolovaných glykozidov, z chýbajúceho absorpčného pásu pre aldehydickú skupinu v infračervenom spektre glykozidu AV6 a zo vzniku penta-*O*-acetylderivátu pri jeho acetylácii, ako aj z nižších R_F hodnôt glykozidu AV6 a jeho aglykónu voči R_F hodnotám adonitoxínu,

prípadne adonitoxigenínu sme usúdili, že glykozid AV6 je redukovaná, a preto polárnejšia forma adonitoxínu — adonitoxol.

Tento predpoklad sme si overili syntézou adonitoxolu (II) z adonitoxínu (I):



Redukciou adonitoxínu (I) tetrahydridboritanom sodným $\text{Na}[\text{BH}_4]$ sme pripravili adonitoxol (II) $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_{10}$ s týmito fyzikálnochemickými konštantami: b. t. $179\text{--}181\text{ }^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -11,2^\circ$ ($c = 0,978$; metanol). V ultrafialovom spektre má syntetický adonitoxol jedno maximum pri 219 nm ($\log \varepsilon = 4,20$). Acetyláciou adonitoxolu acetanhydridom v pyridíne sa získal penta-*O*-acetyl-adonitoxol s b. t. $115\text{--}117\text{ }^\circ\text{C}$ a s $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -15,7^\circ$ ($c = 0,994$; chloroform). Skúška s tetranitrometánom [14] bola negatívna.

Na základe fyzikálnochemických konštant, zmeného bodu topenia, po rovnania infračerveného spektra, reakcie s koncentrovanou kyselinou sírovou a chromatografie na papieri je syntetický glykozid totožný s glykozidom AV6 izolovaným z hlaváčka jarného a prislúcha mu štruktúra adonitoxologenínu- α -*L*-ramnozidu (II).

Experimentálna časť

Droga bola nazbieraná koncom apríla 1960 pri Devíne na západnom Slovensku.

Body topenia sa stanovili na Kofflerovom bloku a sú korigované.

Na meranie optickej otáčavosti a na elementárnu analýzu sa látky 3 hodiny sušili nad P_2O_5 pri $100\text{ }^\circ\text{C}$ a $0,3\text{ torr}$. Infračervené spektrá v KBr sa snímali na Zeissovom spektrofotometri UR 10, ultrafialové spektrá na univerzálnom spektrofotometri Zeiss.

Chromatografia na papieri sa robila na papieri Whatman 1 pri $20\text{ }^\circ\text{C}$. Na detekciu sa použilo Keddeho činidlo [15]. Nanášky boli v rozmedzí $70\text{--}150\text{ }\mu\text{g}$.

Protiprúdené roztrepávanie sa uskutočnilo na 200 člennej plnoautomatickej Craigovej aparátúre v usporiadaní podľa von F. A. Metzsch [16]. Adsorpčná prietoková chromatografia sa vykonala podľa T. Reichsteina [17].

Farebná reakcia kardenolidov sa robila s koncentrovanou kyselinou sírovou podľa [18].

Extrakcia drogy

2 kg suchého rozomletého hlaváčka jarného sa extrahovalo etanolom. Použilo sa

81,96 %, 3 × 61,70 % a 51,60 % etanolu. Spojené etanolové extrakty sa zahustili vo vákuovej odparke na 1,5 l (max. teplota 45 °C). Koncentrát sa vyzrážal 10 % roztokom octanu olovnatého a filtroval sa cez kremelinu. Z filtrátu sa nadbytočné ióny Pb^{2+} vyzrážali 10 % dihydrofosforečnanom sodným. Po odfiltrovaní a premytí zraženiny vodou sa filtrát zahustil na 400 ml a extrahoval sa:

1. 3 × 400 ml éteru. Éterové extrakty sa vytrepali 4 ml 10 % roztoku Na_2CO_3 a 4 ml vody, vysušili sa bezvodým Na_2SO_4 a vo vákuu sa odparili. Získalo sa 2,6 g tmavého olejovitého odparku;

2. 3 × 400 ml chloroformu. Extrakty sa spracovali podobne ako éterové. Zvyšok tvorilo 1,6 g svetlohnedej peny;

3. 5 × 400 ml zmesi chloroform—etanol (2 : 1). Extrakty sa spracovali ako v predchádzajúcich prípadoch. Zvyšok tvoril 10,5 g červenohnedého viskózneho oleja.

Protiprúdne roztrepávanie

10,5 g chloroform—etanolového extraktu (2 : 1) sa roztrepávalo v systéme rozpúšťadiel toluén—butanol—voda (2 : 1 : 3). Úskutočnilo sa 198 základných posunov hornej fázy a 50 posunov jednostranného odberu. Obsah jednotlivých roztrepávačiek sa analyzoval chromatografiou na papieri v systéme toluén—butanol—voda (2 : 1 : 3) a v systéme izoamylalkohol—voda (1 : 1) (obrátená fáza); posuny sa pospájali do 4 skupín: prvú skupinu tvoria veľmi silne polárne kardenolidy (roztrepávačky 1—12, odparok 4,45 g), druhú skupinu silne polárne kardenolidy (r. 13—28, odparok 2,13 g), tretiu skupinu polárne kardenolidy (r. 29—100, odparok 2,12 g) a štvrtú skupinu nepolárne kardenolidy (r. 101—198, odparok 1,28 g). Jednostranný odber (0,51 g) neobsahuje kardenolidy.

Izolácia adonitoxínu

2,12 g polárnych kardenolidov z protiprúdneho roztrepávania sa chromatografovalo na 60 g Al_2O_3 . Odoberali sa 200 ml frakcie. Výsledky chromatografie sú v tab. 3.

Tabuľka 3

Chromatografia polárnych kardenolidov z protiprúdneho roztrepávania na Al_2O_3

Frakcia	Eluent	Váha (g)	Keddeho reakcia
1—12	chloroform, chloroform—metanol 1 %, 2 %	0,08	—
13—18	chloroform—metanol 4 %	0,17	+
19—34	chloroform—metanol 8 %	1,45	++
35—38	chloroform—metanol 16 %, 30 %	0,28	++
39—42	chloroform—metanol 60 %	0,11	—

Po dvojnásobnej kryštalizácii z metanol—éteru sa z frakcií 19—34 získalo 512 mg adonitoxínu o b. t. 245—258 °C, $[\alpha]_D^{23} = -26,2^\circ$ ($c = 1,023$; metanol).

Pre $C_{29}H_{42}O_{10}$ ($M = 550,63$)

vypočítané: 63,25 % C, 7,69 % H;
zistené: 62,66 % C, 7,51 % H.

Reakcia s koncentrovanou kyselinou sírovou bola oranžová, tehlovočervená, karmínovočervená.

Príprava tetra-*O*-acetylodonitoxínu

50 mg adonitoxínu sa rozpustilo v 1,5 ml čerstvo predestilovaného pyridínu a pridalo sa 0,9 ml acetanhydridu. Roztok sa nechal 16 hodín stáť pri 20 °C. Potom sa dve hodiny zahrieval na vodnom kúpeli na 60 °C. Pyridín a acetanhydrid sa vákuove oddestilovali a zvyšky pyridínu sa odstránili viacnásobným vákuovým odparením s benzénom. Odparok sa rozpustil v 20 ml zmesi chloroform—éter (3 : 1), premyl sa malým množstvom 10 % HCl, 10 % Na₂CO₃ a vodou, vysušil sa bezvodým Na₂SO₄ a odparil sa. Odparok poskytol z acetón—éteru 55 mg tetra-*O*-acetylodonitoxínu s b. t. 148—150/224—232 °C a s $[\alpha]_D^{23} = -58,1^\circ$ ($c = 1,032$; chloroform).

Pre C₃₇H₅₀O₁₄ ($M = 718,77$)

vypočítané: 61,82 % C, 7,01 % H;
zistené: 61,42 % C, 7,05 % H.

Reakcia s koncentrovanou kyselinou sírovou bola oranžová, červenohnedá, karmínovočervená.

Izolácia adonitoxolu

2,13 g silne polárnych kardenolidov z protiprúdneho roztrepávania (r. 13—28) sa chromatografovalo na 60 g Al₂O₃. Odoberali sa 200 ml frakcie. Výsledky chromatografie sú uvedené v tab. 4.

Tabuľka 4

Chromatografia silne polárnych kardenolidov z protiprúdneho roztrepávania na Al₂O₃

Frakcia	Eluent	Váha (g)	Keddeho reakcia
1—16	chloroform, chloroform—metanol 1 %, 2 %	0,18	—
17—26	chloroform—metanol 4 %, 8 %	0,25	++
27—34	chloroform—metanol 8 %, 16 %	0,59	++
35—46	chloroform—metanol 16 %, 30 %	1,03	++

Z frakcií 27—34 vykryštalizovalo z metanol—éteru 53 mg kryštálikov o b. t. 179 až 184 °C.

Pre C₂₉H₄₄O₁₀ ($M = 552,64$)

vypočítané: 63,02 % C, 8,02 % H;
zistené: 62,49 % C, 8,24 % H.

Reakcia s koncentrovanou kyselinou sírovou bola žltá, oranžová, hnedočervená, krvavočervená.

Príprava penta-O-acetylodonitoxolu

20 mg glykozidu AV6 sa acetylovalo podobne ako adonitoxín. Získalo sa 21 mg acetylderivátu s b. t. 115—117 °C.

Pre $C_{39}H_{54}O_{15}$ ($M = 762,82$)

vypočítané:	61,40 % C,	7,13 % H;
zistené:	60,67 % C,	7,53 % H.

Reakcia s koncentrovanou kyselinou sírovou bola zelenožltá, žltá, oranžová, hnedočervená.

Hydrolyza adonitoxolu a adonitoxínu

15,1 mg adonitoxolu sa rozpustilo v 6 ml dioxánu a pridalo sa 0,06 ml koncentrovanej HCl. Zmes sa nechala 14 dní stáť v termostate pri 37 °C. Priebeh hydrolyzy sa sledoval chromatografiou na papieri. Potom sa pridalo 8 ml vody, roztok sa vákuove zahustil na 6 ml a extrahoval sa 4×10 ml zmesi chloroform—etanol (3 : 1). Extrakty sa premyli malým množstvom 10 % Na_2CO_3 a vody, vysušili sa bezvodým Na_2SO_4 a vákuove sa odparili. Zvyšok sa rozpustil v acetón—éteri a odstavil sa na kryštalizáciu. Keďže látka nekryštalizovala ani po dlhšom čase, vyzrážala sa z matečných lúhov petroléterom. Zrazenina sa odfiltrovala, premyla zmesou petroléter—éter (1 : 1) a vysušila sa. Zvyšok 4 mg sa použil pre chromatografiu na papieri (pozri tab. 2) a na reakciu s koncentrovanou kyselinou sírovou (žltá, oranžová, hnedočervená, krvavočervená).

Adonitoxín sa hydrolyzoval podobne ako v prípade adonitoxolu. Amorfný aglykón (5 mg) sa charakterizoval chromatografiou na papieri a farebnou reakciou s koncentrovanou kyselinou sírovou (oranžová, tehlovočervená, karmínovočervená).

Redukcia adonitoxínu tetrahydridoboritanom sodným

200 mg adonitoxínu sa rozpustilo v 40 ml 80 % metanolu. Počas 30 minút sa pridávalo po častiach 40 mg $Na[BH_4]$ v 14 ml 80 % metanolu a nechalo sa 22 hodín stáť pri laboratórnej teplote. Nato sa roztok vo vákuu zahustil na 14 ml a pridala sa po kvapkách 2 N- H_2SO_4 do kyslej reakcie na kongočerveň. Potom sa pridalo 14 ml metanolu, 300 mg D-manitu, varilo sa 30 minút na vodnom kúpeli pod spätným chladičom a roztok sa zahustil vo vákuu na 14 ml, zriedil sa 7 ml vody a $6 \times$ sa vytrepal 25 ml $CHCl_3$ — C_2H_5OH (2 : 1). Výtrepky sa premyli malým množstvom 10 % Na_2CO_3 a vodou, vysušili sa bezvodým Na_2SO_4 a odparili sa vo vákuu. Zvyšok poskytol z etanol—éteru 124 mg kryštálikov o b. t. 179—181 °C. Bod topenia sa nezmenil ani druhou kryštalizáciou; $[\alpha]_D^{23} = -11,2^\circ$ ($c = 0,978$; metanol).

Pre $C_{29}H_{44}O_{10}$ ($M = 552,6$)

vypočítané:	63,02 % C,	8,02 % H;
zistené:	62,68 % C,	7,86 % H.

Reakcia s koncentrovanou kyselinou sírovou bola žltá, oranžová, hnedočervená, krvavočervená.

Príprava penta-O-acetylodonitoxolu

48 mg adonitoxolu sa acetylovalo podobne ako adonitoxín. Získalo sa 49 mg amorfného acetylderivátu, ktorý sa chromatografoval na 1,5 g Al_2O_3 . Odoberali sa 10 ml frakcie. Výsledky chromatografie sú uvedené v tab. 5.

Tabuľka 5
Chromatografia penta-O-adonitoxolu na Al_2O_3

Frakci	Eluent	Váha (mg)	Poznámka
1—26	benzén, benzén—éter (1 : 1)		
27—31	éter, benzén—chloroform (1 : 3), chloroform chloroform—metanol (9 : 1)	15 32	olej pena

Odparok frakcie 27—31 poskytol z acetón—éteru 25 mg penta-O-acetylodonitoxolu s b. t. 115—117 °C a s $[\alpha]_D^{26} = -15,7^\circ$ ($c = 0,994$; chloroform).

Pre $\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{O}_{15}$ ($M = 762,82$)

vypočítané: 61,40 % C, 7,13 % H;
zistené: 61,08 % C, 6,96 % H.

Reakcia s koncentrovanou kyselinou sírovou bola zelenožltá, žltá, oranžová, hnedo-červená.

Hydrolyza syntetického adonitoxolu

Uskutočnila sa podobne ako hydrolyza adonitoxolu v mikromeradle. Papierovú chromatografiu hydrolyzátu pozri v tab. 2.

Reakcia s koncentrovanou kyselinou sírovou bola žltá, oranžová, hnedočervená, krvavočervená.

Ďakujeme prof. T. Reichsteinovi (Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel) za poskytnutie vzorky adonitoxínu.

Analýzy urobila A. Pufflerová v analytickom laboratóriu nášho ústavu. Infračervené spektrá snímala R. Justhová a ultrafialové spektrá M. Saliniová vo fyzikálnochemickom laboratóriu nášho ústavu.

АДОНИТОКСОЛ, НОВЫЙ СЕРДЕЧНЫЙ ГЛЮКОЗИД ИЗ *ADONIS VERNALIS* L.

A. Череп, Л. Маслер, Д. Шикл, Ш. Бауэр

Химический институт Словацкой академии наук, Отдел биохимии сахаридов,
Братислава

Из этаноловых экстрактов высушенного *Adonis vernalis* L. противоточным распределением по способу Крейга в системе толуол—бутанол—вода 2 : 1 : 3 и хроматографией на Al_2O_3 выделили авторы кристаллические сердечные гликозиды адонитоксин

и адонитоксол. Нашли, что адонитоксол ($C_{29}H_{44}O_{10}$) является L-рамнозидоадонитоксологенином. Установили, что структура адонитоксола, выделенного из натурального материала, аналогична структуре адонитоксола, полученного восстановлением адонитоксина натрийборгидридом.

Preložila T. Dillingarová

ADONITOXOL, A NEW CARDIAC GLYCOSIDE OF PHEASANT'S EYE
(*ADONIS VERNALIS* L.)

A. Cserép, L. Masler, D. Šikl, Š. Bauer

Institute of Chemistry, Department of Biochemistry of Saccharides, Slovak Academy of Sciences, Bratislava

Two crystalline cardiac glycosides, adonitoxin and adonitoxol have been isolated from the ethanol extracts of the dry plants of Pheasant's eye (*Adonis vernalis* L.) through counter-current distribution in the system toluene—butanol—water 2 : 1 : 3 and chromatography over alumina. Adonitoxol ($C_{29}H_{44}O_{10}$) was determined to be L-rhamnoside-adonitoxologenin. The structure of adonitoxol isolated from the natural material was proved by comparing analysis with adonitoxol prepared from adonitoxin by sodium borohydride reduction.

Preložila R. Mokrú

LITERATÚRA

1. Karrer W., *Festschrift für E. C. Barell*, 240. Basel 1936.
2. Reichstein T., Rosenmund H., *Pharm. Acta Helv.* **15**, 150 (1940).
3. Rosenmund H., Reichstein T., *Pharm. Acta Helv.* **17**, 176 (1942).
4. Katz A., Reichstein T., *Pharm. Acta Helv.* **22**, 437 (1947).
5. Kolesnikov D. G., Bugrim N. A., *Med. Prom. SSSR* [7] 27 (1960).
6. Kolesnikov D. G., Bugrim N. A., *Med. Prom. SSSR* [2] 19 (1960).
7. Pitra J., Čekan Z., *Collection Czech. Chem. Commun.* **26**, 1551 (1961).
8. Pitra J., *Českoslov. farm.* **11**, 518 (1962).
9. Pusz A., Büchner S., *Arzneimittel-Forsch.* **9**, 932 (1962).
10. Lichti H., Tamm Ch., Reichstein T., *Helv. Chim. Acta* **39**, 1933 (1956).
11. Tschesche R., Grimmer G., Seehofer S., *Chem. Ber* **86**, 1235 (1953).
12. Mannich C., Siewert G., *Chem. Ber.* **75**, 737 (1942).
13. Kaiser F., *Chem. Ber.* **88**, 556 (1955).
14. Reyle K., Reichstein T., *Helv. Chim. Acta* **35**, 98 (1952).
15. Kedde D. L., *Dissertation Leiden*, 1946.
16. von Metzsch F. A., *Chem. Ing. Techn.* **25**, 66 (1953).
17. Reichstein T., Shoppee C. W., *Discussions Faraday Soc.* **7**, 305 (1949).
18. von Euw J., Reichstein T., *Helv. Chim. Acta* **31**, 883 (1948).

Do redakcie došlo 20. 12. 1963

Adresa autorov:

Albín Cserép, inž. Ladislav Masler, C. Sc., inž. Dobroslav Šikl, C. Sc., dr. inž. Štefan Bauer, C. Sc., Chemický ústav SAV, Oddelenie biochémie sacharidov, Bratislava, Dúbravská cesta.