

Oszillographische Beobachtung der Spaltung des Laktonringes und der Isomerisation der kardioaktiven Glykoside (I) Kardenolide

L. MOLNÁR, K. MOLNÁROVÁ

*Pharmakologisches Institut, Tschechoslowakische Akademie der Wissenschaften,
Bratislava*

Oszillographisch wird die Spaltung des fünfgliedrigen Laktonringes und die nachfolgende Isomerisation der Kardenolide verfolgt. Die gewonnenen Ergebnisse beweisen die irreversible Isomerisation der Kardenolide im alkoholischen alkalischen Medium. Im gegebenen Falle kann die quantitative oszillographische Polarographie auch zu reaktionskinetischen Messungen und zur Bestimmung der Konstanten der verlaufenden Spaltreaktionen ausgenutzt werden. Im weiteren erwies sich diese Methodik günstig auch zur analytischen Kontrolle der Stabilität der Kardenolidlösungen.

Die oszillographische Methode erwies sich unter anderem als sehr günstige Methode auch zur Beobachtung der organisch-chemischen Reaktionen und wir haben sie mit Erfolg zum Studium der Spaltung des Laktonringes mancher Alkaloide benützt [1]. Beim polarographischen und oszillographischen Studium der kardioaktiven Glykoside haben wir ebenfalls die von uns entwickelte Methode [1] zur Beobachtung der Spaltung des Laktonringes der Kardenolide benützt.

Bei 14-Hydroxy- $\Delta^{20(22)}$ -Kardenoliden kommt es im alkalischen Medium zur Spaltung des Laktonringes, der in β -Orientation durch C_{17} auf das Steroidskelett gebunden ist. Die übereinstimmende β -Orientation des ungesättigten $\Delta^{20(22)}$ -Laktonringes und der 14-Hydroxygruppe bewirkt nach Spaltung des ungesättigten Laktonringes in alkoholischer Lauge die nachfolgende Isomerisation und die Bildung des Isoderivats, wobei die verlaufende Reaktion irreversibel ist. Den Mechanismus dieser Reaktion haben H. Kiliani [2], W. A. Jacobs [3], A. Windaus [4], T. Reichstein [5, 6] und andere von chemischem Standpunkt gründlich studiert und beim Digitoxin festgestellt, daß nach Spaltung des fünfgliedrigen Laktonringes intermediär Salz der $3\beta,14$ -dihydroxy-21-oxo- $5\beta,14\beta$ -24-Norcholansäure gebildet wird, aus welcher nach Versäuerung freie Säure abgelöst wird, welche nicht existenzfähig ist und schnell auf den gesättigten Lakton zyklisiert. In unserer Arbeit haben wir als Modell Helvetikosid (β - β D-Digitoxoso-Strophanthidin), Convallatoxin (3,1'-Rhamnosido-Strophanthidin) und ihr gemeinsames Aglikon Strophanthidin benützt. A. J. V. Šostenko und J. F. Uralova [7] verfolgten polarographisch die Isomerisation des Strophanthidins in der Lösung von quartären Basen und

bewiesen die Bildung des Isoderivats durch das Verschwinden des Diffusionsstromes, der durch die Reduktion der Doppelbindung im fünfgliedrigen Laktoring hervorgerufen wurde. Das oszillopolarographische Verhalten der Kardenolide haben wir an anderer Stelle beschrieben [8] und gerade ihr besonderes Verhalten im alkalischen Medium hat uns veranlaßt sich mit dieser Frage eingehender zu befassen.

Experimenteller Teil und Ergebnisse

Die Experimente wurden an derselben Einrichtung durchgeführt, wie in unseren vorhergehenden Arbeiten [9]. Das Potential der gemessenen Einschnitte wurde in Volt gegen den GKE angegeben und die Messung mit der üblichen Methode durchgeführt [10].

Die als Modelle benützten Glykoside, wie Helvetikosid, Convallatoxin und ihr Aglikon Strophanthidin wurden im Chemischen Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften von der Arbeitsgruppe Dr. Bauers aus der slowakischen Pflanzenbasis isoliert und zubereitet.

Der als Grundlektrolyt benützte Natriumhydroxid und auch die anderen Chemikalien waren von analytischer Reinheit, Ethanol-Merck von spektraler Reinheit.

Versuch A

In den 3 ml 1 N-NaOH Grundlektrolyt wurde 0,05 ml ethanolische Helvetikosidlösung mit der Endkonzentration des Glykosids 10^{-4} M zugegeben. Gleich nach Zugabe des Glykosids erscheint am Oszillogramm des Grundlektrolyts ein tiefer kathodischer Einschnitt beim Potential $-1,60$ V (Abb. 1a). Die Tiefe dieses primären Einschnittes wird allmählich kleiner unter gleichzeitiger Bildung eines positiveren sekundären Einschnittes bei $-1,40$ V, der sich mit der Zeit vertieft (Abb. 1b—d). Nach 10 Minuten bleibt nur eine Andeutung des primären Einschnittes (Abb. 1e—h), der nach Verlauf von 15 Minuten völlig verschwindet und es bleibt nur der beständige sekundäre Einschnitt (Abb. 1i). Wir suchten eine Erklärung für den ganzen Verlauf des oszillopolarographisch verfolgten Vorganges und auf Grunde unserer früheren Erfahrungen sind wir

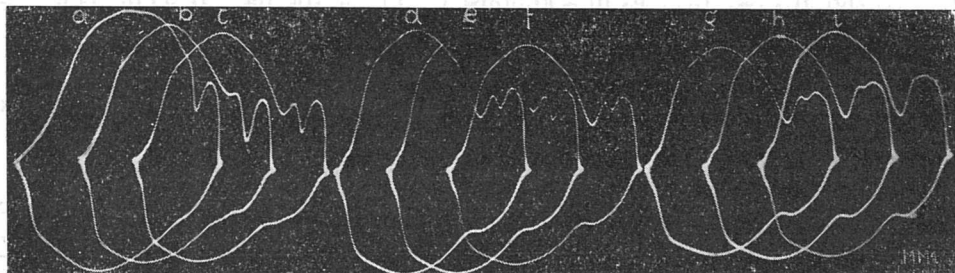


Abb. 1. $dE/dt = f(E)$ Kurven von $5 \cdot 10^{-4}$ M Helvetikosid in 1 M-NaOH.

a) sofort nach der Zugabe; b) nach 2 Minuten; c) nach 3 Minuten; d) nach 5 Minuten; e) nach 8 Minuten; f) nach 10 Minuten; g) nach 12 Minuten; h) nach 14 Minuten; i) nach 15 Minuten.

zum Ergebnis gekommen, daß es auch in diesem Falle um die Spaltung des fünfgliedrigen ungesättigten Laktonringes des Kardenolids im alkalischen Medium geht. Zum Beweis unserer Voraussetzung haben wir die Relaktonisation versucht und die Eigenschaften des durch die nachfolgende Reaktion entstandenen Isoderivats untersucht.

Versuch B

Wir haben den Elektrolyt mit dem Glykosid aus dem Versuch A, wovon wir annehmen, daß sich darin das Glykosid mit dem geöffneten Laktonring befindet, mit Salzsäure neutralisiert und in so gebildeten NaCl Elektrolyt ein Oszillogramm bekommen, wo der kathodische Einschnitt beim Potential $-1,40$ V lag (Abb. 2c). Das Oszillogramm

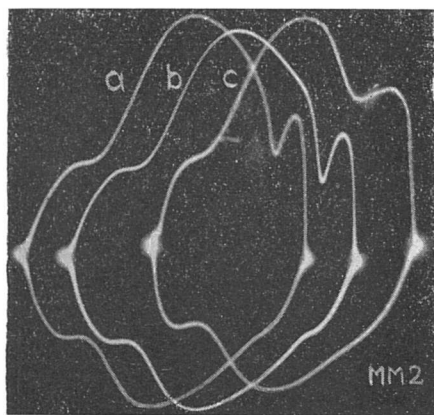


Abb. 2. $dE/dt = f(E)$ Kurven von $5 \cdot 10^{-4}$ M Helvetikosid.

a) nach der Laktonringeröffnung in 1 M wäßrigem NaOH und nach der Versäuerung mit HCl, geprüft in neutralisiertem Elektrolyt als Grundlösung; b) $5 \cdot 10^{-4}$ M Helvetikosid in 1 M-NaCl; c) nach der Laktonringeröffnung und nach der Neutralisierung mit HCl auf pH 7,0 (ohne Säureüberschuß), geprüft in neutralisiertem Elektrolyt als Grundlösung.

unterscheidet sich vom Oszillogramm des Helvetikosids im 1 N-NaCl Elektrolyt, wo das Helvetikosid einen Einschnitt bei $-1,60$ V gab (Abb. 2b). Im weiteren haben wir die geprüfte Lösung versäuert auf pH 2,0 und bei 20°C 30 Minuten stehen lassen. Dann haben wir sie wieder der oszillopolarographischen Analyse im 1 N-NaOH Elektrolyt unter ähnlichen Bedingungen unterzogen, wie im Versuch A. Wir gewannen den ursprünglichen primären Einschnitt beim Potential $-1,60$ V (Abb. 2a), und der nach seinem allmählichen Verschwinden entstandene sekundäre Einschnitt besetzte das Potential $-1,40$ V und blieb beständig.

Versuch C

Wir wiederholten den Versuch A mit dem Unterschied, daß nach Zugabe von Helvetikosid in den Grundelektrolyt die Lösung auf Wasserbad 10 Minuten bei 100°C erhitzt wurde. In diesem Falle gelang es uns nicht den Versuch B durchzuführen, das heißt, daß wir nach Versäuerung auf pH 2,0 und nach wiederholtem Untersuchen im 1 N-NaOH Elektrolyt nur einen sekundären Einschnitt beim $-1,40$ V gewonnen haben.

Versuch D

Wir wiederholten den Versuch A mit dem Unterschied, daß wir anstatt 1 N wäßriges NaOH 1 N methanolisches NaOH benützten. Wir beobachteten ähnlichen Verlauf wie im Versuch A (Abb. 3a) und haben dieselben Potentialwerte abgemessen, sowohl für den primären, wie auch für den sekundären Einschnitt. Nach Durchführung des Ver-

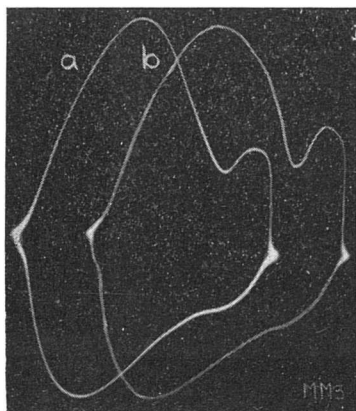


Abb. 3. $dE/dt = f(E)$ Kurven von $5 \cdot 10^{-4}$ M Helvetikosid.

a) nach der Laktoneffnung in methanolischem NaOH; b) nach der Versäuerung auf pH 2,0 (30 Minuten stehen lassen) und geprüft im überschüssigen 1 M-NaOH.

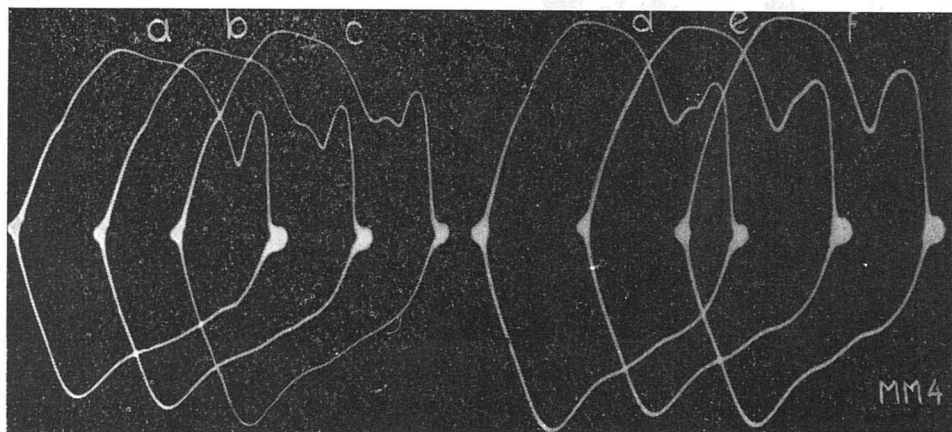


Abb. 4. $dE/dt = f(E)$ Kurven von $7 \cdot 10^{-4}$ M Strophanthidin in 1 M-NaOH.

a) sofort nach der Zugabe . . . f) nach 15 Minuten.

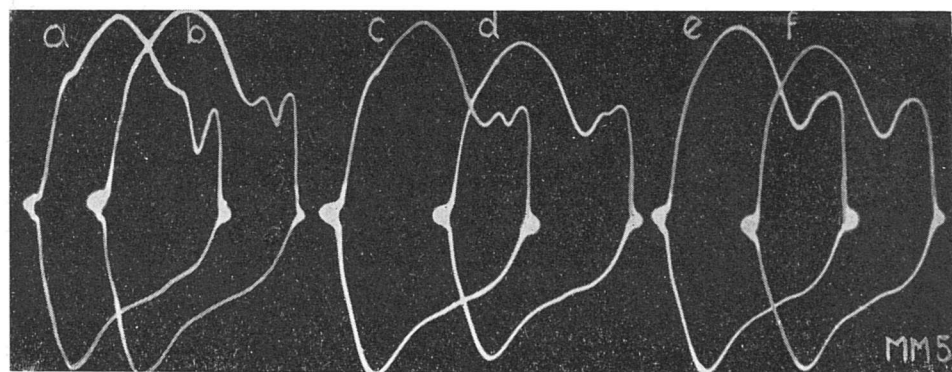


Abb. 5. $dE/dt = f(E)$ Kurven von $7 \cdot 10^{-4}$ M Convallatoxin in 1 M-NaOH.

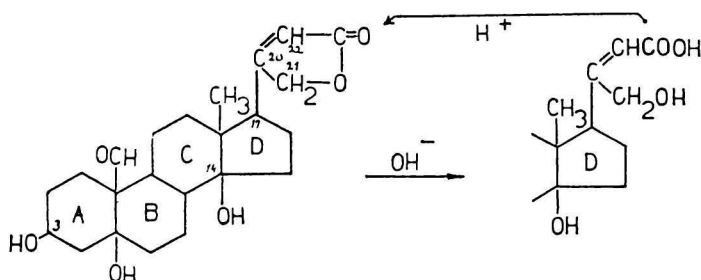
a) sofort nach der Zugabe . . . f) nach 12 Minuten.

suches *B* und nach Neutralisieren des Grundelektrolytes mit HCl und wiederholtem Untersuchen im 1 *N*-NaOH konnten wir die Gegenwart des sekundären Einschnittes feststellen. Doch nach Versäuerung und Stehenlassen der Lösung wie im Falle *B* haben wir nicht mehr den primären Einschnitt des ursprünglichen Glykosids gewonnen, sondern nur einen sekundären Einschnitt beim Potential $-1,4$ V (Abb. 3b).

Die oben angeführten Versuche haben wir auch mit Convallatoxin (Abb. 5) und mit dem Aglikon Strophanthidin (Abb. 4) durchgeführt. Der Verlauf der Reaktion war ähnlich, die Form der gewonnenen Oszillogramme jedoch verschieden, die Einschnitte im 1 *N*-NaOH hatten beim Convallatoxin die Werte $-1,62$ V und $-1,42$ V, beim Strophanthidin $-1,64$ V und sek. $-1,45$ V.

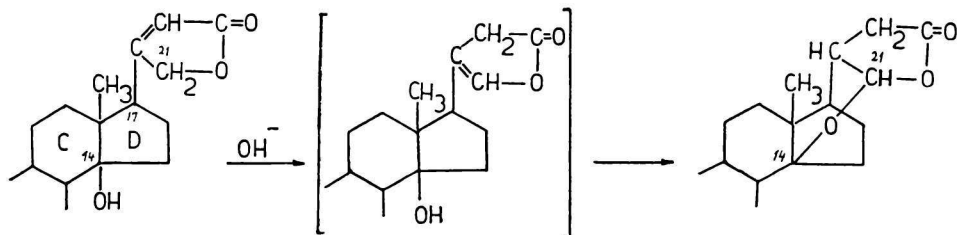
Diskussion

Den Verlauf der oszillographisch beobachteten Reaktion erklären wir durch die Spaltung des Laktonringes des Glykosids mit nachfolgender Isomerisation, gemäß der Versuche *A* und *B* kommt es im wäßrigen, alkalischen Medium im kalten Zustand zur Spaltung des fünfgliedrigen Laktonringes und zur Bildung von Salzen der Hydroxysäure nach dem Reaktionsschema:



Diese Reaktion ist reversibel und nach Versäuerung kommt es zur Relaktonisierung. Sie verläuft nur im wäßrig-alkalischen Medium im kalten Zustand. Durch das Erhitzen oder in alkoholischer Lösung kommt es zur Isomerisation, wie aus Versuchen *C* und *D* ersichtlich ist.

Der Versuch *D* beweist die schon lange festgestellte Tatsache der nachfolgenden Isomerisation des Laktonringes in alkoholischer Lauge nach der vorausgesetzten chemischen Reaktion:



Die Isomerisation ist gerade durch die übereinstimmende 17- β -Orientation des ungesättigten fünfgliedrigen Laktonringes und die 14- β -Orientation der Hydroxygruppe erleichtert. Die verlaufende Reaktion ist irreversibel und darum können wir im Sinne des Versuches *D* auch nach Versäuerung nur dem Isoderivat entsprechenden sekundären Einschnitt beobachten.

Zum Beweis der Bildung und der Gegenwart des Isoderivats benützten wir einerseits den Legal-Test der sich negativ erwies, anderseits untersuchten wir die UV-Spektren des ursprünglichen Glykosids und des Isoderivats.

Wie an der Abbildung 6 zu sehen ist, bietet Strophanthidin in methanolischer Lösung im UV-Bereich des Absorptionsspektrums ein typisches Maximum bei 217 nm, welches für das Butenolid-System charakteristisch ist (obene Kurve). Iso-strophanthidin absorbiert bei dieser Wellenlänge nicht, es kommt zur hypsochromen Verschiebung des Maximums, das beim Isoderivat bei 210 nm liegt (untere Kurve).

Beim Untersuchen des Charakters des primären und sekundären Einschnittes haben wir festgestellt, daß es sich um Kapazitätseinschnitte handelt. Diese Feststellung steht im Einklang mit der Behauptung anderer Autoren, die bei der Polarographie einiger Kardenolide im alkalischen Elektrolyt bei $E_{1/2}$ —1,70 V [11] und —1,55 V [12] Adsorptionswellen gewonnen haben. Die in der Polarographie beobachteten Reduktionswellen der Kardenolide, die durch Reduktion der Doppelbindung des fünfgliedrigen ungesättigten Laktonringes hervorgerufen sind, liegen beim negativen Potential über —2,0 V und treten in der oszillographischen Polarographie nicht zum Vorschein. Im Falle des sekundären Einschnittes handelt es sich um Isoderivat, welches keine reduzierbare Gruppe besitzt und der durch ihn gebotene Einschnitt kann nur Kapazitätscharakter haben.

Mit Hilfe der quantitativen oszillographischen Polarographie können wir den Reaktionsverlauf auch kvantitativ verfolgen. Durch Messen der Verflachung des primären Einschnittes, oder Vertiefung des sekundären Einschnittes in der Zeitfunktion können wir reaktionskinetische Messungen durchführen. Die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten sind im Einklang mit den Werten, die

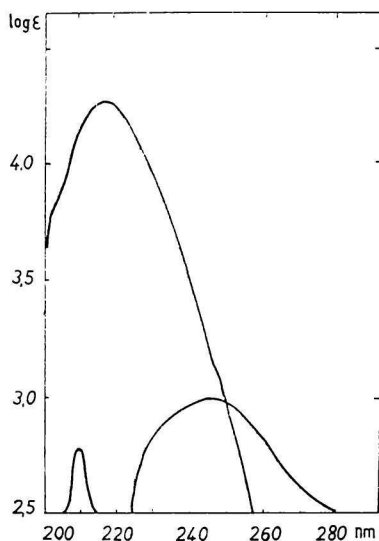


Abb. 6. UV-Spektren.

Obene Kurve: $5 \cdot 10^{-4}$ M Strophanthidin in 20 % Methanol; untere Kurve: $5 \cdot 10^{-4}$ M Iso-strophanthidin in 20 % Methanol. Schichtdicke 5 mm.

in der Literatur angegeben sind und die mit Hilfe anderer Methoden gemessen wurden.

Zum Schluß können wir feststellen, daß die beschriebene oszillographische Methode zur Beobachtung der Spaltung des Laktonringes der Kardenolide, zum Beweis der nachfolgenden Isomerisation im alkalischen Medium und zur Berechnung der kinetischen Konstanten der verlaufenden Reaktion benützt werden kann. Dies ist durch die polarographische Methode nicht möglich, da die untersuchten Stoffe nur bei extrem negativen Potentialen polarographische Wellen aufweisen. Die beschriebene Methode kann auch in analytischer Richtung ausgenützt werden zur Beobachtung der Stabilität der Kardenolide in ungepufferten und gepufferten Lösungen, wie wir es schon an anderer Stelle angeführt haben [13].

Die Autoren danken Herrn Dr. Ing. Š. Rauer, C. Sc., für die freundliche Weise zur Verfügung gestellten Glykosidproben und Herrn Ing. J. Suchý, C. Sc., für die Bereitwilligkeit bei der Messung der UV-Spektren.

OSCILOPOLAROGRAFICKÉ SLEDOVANIE ŠTIEPENIA LAKTÓNOVÉHO KRUHU A NASLEDUJÚCEJ IZOMERIZÁCIE KARDIOAKTÍVNYCH GLYKOZIDOV (I) KARDENOLIDY

L. Molnár, K. Molnárová

Farmakologický ústav, Československá akadémia vied,
Bratislava

Opisuje sa oscilopolarografické sledovanie štiepenia a nasledujúca izomerizácia päťčlenného laktónového kruhu kardenolidov. Výsledky poukazujú na nevratnú izomerizáciu kardenolidov v alkoholickom alkalicom prostredí. Kvantitatívnu oscilografickú polarografiu v danom prípade možno použiť na reakčnokinetické merania a zisťovania rýchlostných konštánt štiepných reakcií. Opísaná metodika je vhodná na analytickú kontrolu stability roztokov kardenolidov.

ОСЦИЛЛОПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РАСЩЕПЛЕНИЯ ЛАКТОННОГО КОЛЬЦА II ИЗОМЕРИЗАЦИИ КАРДИОТОНИЧЕСКИХ ГЛЮКОЗИДОВ (I) КАРДЕНОЛИДЫ

Л. Мольнар, К. Мольнарова

Фармакологический институт, Чехословацкая академия наук,
Братислава

Описывается осциллополярографическая методика исследования раскрытия лактонного кольца и следующей изомеризации кardenolidов. Полученные результаты можно использовать для доказательства необратимой изомеризации кardenolidов в алкоголь-

но-щелочной среде. Количественная осциллографическая полярография в данном случае может быть использована для реакционно-кинетических измерений и для определения констант протекающих реакций. Методика оказалась пригодной для аналитического контроля устойчивости растворов карденолидов.

Preložil I. Smoler

LITERATUR

1. Molnárová K., Molnár L., *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **18**, 93 (1959).
2. Kiliani H., *Arch. Pharm.* **237** 452 (1899).
3. Jacobs W. A., Gustus E. L., *J. Biol. Chem.* **78**, 573 (1928).
4. Windaus A., Stein G., *Ber.* **61**, 2436 (1928).
5. Reichstein T., *Pharm. Acta Helv.* **24**, 113 (1949).
6. Schindler O., Reichstein T., *Helv. Chim. Acta* **39**, 1876 (1956).
7. Šostenko J. V., Uralova J. F., *Ž. obšč. chim.* **21**, 143 (1951).
8. Molnár L., Molnárová K. (im Druck).
9. Molnár L., Molnárová K., *Chem. zvesti* **10**, 227 (1956).
10. Heyrovský J., Kalvoda R., *Oszillographische Polarographie mit Wechselstrom*, 90. Akademie-Verlag, Berlin 1960.
11. Zuman P., Šantavý F., *Chem. listy* **46**, 393 (1952).
12. Ondrašíková A., *Diplomarbeit*. Pharmazeutische Fakultät der Komenský-Universität, Bratislava 1963.
13. Zathurecký L., Bauerová O., Somoskeöy G., Molnár L., Suchý J., *Čs. farm.* **12**, 171 (1963).

Eingegangen am 18. September 1963