

IZOLÁCIA SRDCOVÝCH GLYKOZIDOV Z ČEMERICE PURPUROVEJ
(*HELLEBORUS PURPURASCENS* w. A. K.) (II)
ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA HELEBRÍNU NA DEZGLUKOHELEBRÍN

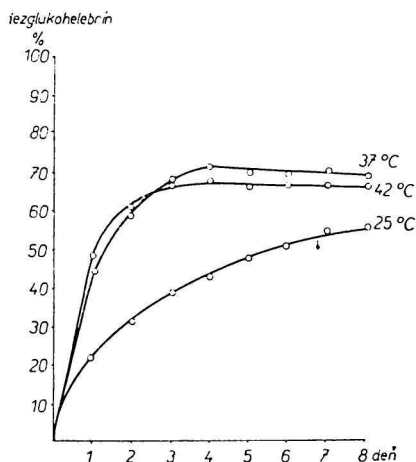
D. ŠIKL, Š. BAUER, L. MASLER

ČSAV, Chemický ústav Slovenskej akadémie vied v Bratislave

Pri izolácii srdcových glykozidov z čemerice purpurovej (*Helleborus purpurascens* w. a. k. — *Ranunculaceae*) [1—3] sa okrem helebrínu [4, 5] izoloval aj dezglukohelebrín [5]. Možno predpokladať, že dezglukohelebrín v koreňoch čemerice purpurovej vzniká z helebrínu pôsobením enzýmov obsiahnutých v koreňoch drogy. Tento predpoklad je v zhode s obdobným priebehom tvorby napríklad helvetikozidu (strofantidín-3- β -*d*-digitoxozidu) [6] autofermentatívnym odbúraním v rastline prítomného eryzimozidu (strofantidín-3- β -*d*-digitoxozo-*d*-glukozidu) [7], pôsobením enzýmov prítomných v nadzemnej časti trýzela vetvistého (*Erysimum canescens* ROTH. — *Brassicaceae*). Aktivita β -glukozidázy v nadzemnej časti hlaváčka jarného (*Adonis vernalis* L. — *Ranunculaceae*) je príčinou toho, že okrem monoglykozidov [8, 9] sa dosiaľ nepodarilo izolovať genuínne glykozidy.

V našej práci sme sledovali možnosť enzymatického odbúrania helebrínu na dezglukohelebrín, vplyv teploty a času na výťažok dezglukohelebrínu. Použili sme jednak metódu autofermentatívneho odbúrania, jednak metódu fermentatívneho odbúrania účinkom enzýmového preparátu pripraveného zo suchej nadzemnej časti trýzela vetvistého.

Po autofermentácii odtučnených koreňov čemerice purpurovej sa obsah dezglukohelebrínu podstatne nezvýšil. Táto skutočnosť dokazuje nízku aktivitu β -glukozidázy v suchých koreňoch. Na prípravu dezglukohelebrínu sme preto použili enzýmový preparát pripravený zo suchej nadzemnej časti trýzela vetvistého. Preparát sa pripravil obdobným spôsobom, ako opisujú A. Stoll a spolupracovníci [10] pri príprave enzýmových preparátov z listov *Digitalis lanata* EHRH. a *Digitalis purpurea* L. Na grafe 1 je uvedené percentuálne množstvo vzniknutého dezglukohelebrínu po fermentácii pri teplote 25 °C, 37 °C a 42 °C po dobu 8 dní. Optimálny výťažok dezglukohelebrínu (70,8 %) sa získa po štvordňovej fermentácii pri teplote 37 °C.



Graf 1.

Experimentálna časť

Všetky body topenia sú stanovené na Koflerovom bloku a sú korigované. Látky pred elementárnou analýzou sa 2 hodiny sušili pri teplote 100 °C a vákuu 0,2 mm Hg.

Autofermentácia koreňov

5 kg suchých jemne rozomletých koreňov čemerice purpurovej sa odtučnilo petroléterom a do odtučnenej drogy sa pridalo 30 l destilovanej vody, suspenzia sa zaliala 200 ml toluénu a nechala sa za občasného miešania stáť 20 dní pri teplote 37 °C. Po tomto čase sa droga odsala a extrahovala sa 3 × 20 l 70 % vodného metanolu. Spojené extrakty sa vákuove odparili a 160 g odparku sa spracovalo predtým opísaným spôsobom [3]. Získalo sa 2 g (t. j. 0,04 %, počítané na váhu suchej drogy) kryštalického helebrínu o b. t. 283—284 °C (kryštalovaný zo 60 % vodného metanolu), $[\alpha]_D^{25} = -23,6 \pm 3^\circ$ ($c = 1,100$ v 60 % vodnom metanole).

Analýza

Pre $C_{38}H_{52}O_{15}$ ($M = 724,7$)

| | | |
|------------|-------------|------------|
| vypočítané | C = 59,65 % | H = 7,23 % |
| zistené | C = 59,75 % | H = 7,30 % |

Ďalej sa izolovalo 0,005 g (t. j. 0,001 %, počítané na váhu suchej drogy) dezglukohelebrínu o b. t. 237—244 °C (kryštalovaný zo zmesi metanol—éter 1 1), ktorý sa identifikoval zmesným bodom topenia a porovnávacou papierovou chromatografiou s autentickým dezglukohelebrínom.

Príprava enzýmového preparátu

2,5 kg sušenej jemne rozomletej nadzemnej časti trýzela vetvistého sa extrahovalo za laboratórnej teploty trepaním 4 × vždy 15 l destilovanej vody, 2 × 15 l 60 % vodného etanolu a 1 × 15 l 85 % etanolu. Po každej extrakcii sa droga odsala a nakoniec sa premyla 3 × 10 l acetónu, ktorý sa odstránil dôkladným premytím destilovanou vodou. Takto pripravený enzýmový preparát sa priamo použil na fermentatívnu hydrolýzu helebrínu.

Enzymatická hydrolýza helebrínu

Do sady 1,5 l prachovnice sa navázilo vždy po 800 mg kryštalického helebrínu, rozpustilo sa v 1 litri destilovanej vody a do roztoku sa pridalo 120 g vlhkého enzýmového preparátu. Jednotlivé vzorky pri sledovaní hydrolýzy helebrínu sa spracovávali vždy po 24 hodinách. Enzýmový preparát sa odsal, premyl destilovanou vodou a spojené vodné filtráty sa vákuove odparili. Odparok sa podrobil prietokovej adsorpčnej chromatografii vždy na 20 g Al_2O_3 o aktivite II stanovenej podľa H. Brockmanna [11]. Odparky frakcií 16 % metanol v chloroforme poskytli kryštalizáciou zo zmesi metanol—éter 1 1 dezglukohelebrín o b. t. 237—244 °C, $[\alpha]_D^{25} = -26,8 \pm 3^\circ$ ($c = 0,930$ v 60 % vodnom metanole).

Analýza

Pre $C_{30}H_{42}O_{10}$ ($M = 562,6$)

| | | |
|------------|-------------|------------|
| vypočítané | C = 64,79 % | H = 7,36 % |
| zistené | C = 64,40 % | H = 7,36 % |

Z jednotlivých vzoriek enzymatickej hydrolýzy helebrínu sa získali množstvá dezglukohelebrínu uvedené v tab. 1.

Tabuľka 1

| Deň | Dezglukohelebrín po fermentácii pri | | | | | |
|-----|-------------------------------------|------|-------|------|-------|------|
| | 25 °C | | 37 °C | | 42 °C | |
| | mg | % | mg | % | mg | % |
| 1 | 131 | 21,0 | 281 | 45,2 | 297 | 47,8 |
| 2 | 192 | 30,9 | 364 | 58,6 | 378 | 60,8 |
| 3 | 235 | 37,8 | 420 | 67,6 | 416 | 66,9 |
| 4 | 265 | 42,6 | 440 | 70,8 | 417 | 67,1 |
| 5 | 294 | 47,4 | 438 | 70,5 | 415 | 66,8 |
| 6 | 320 | 51,5 | 435 | 70,0 | 414 | 66,6 |
| 7 | 340 | 54,7 | 436 | 70,2 | 416 | 66,9 |
| 8 | 339 | 54,5 | 430 | 69,2 | 413 | 66,5 |

Ďakujeme inž. C. Peciarovi, vedúcemu analytického laboratória Chemického ústavu SAV, za vykonanie analýzy.

Súhrn

Vykonala sa fermentatívna hydrolýza helebrínu na dezglukohelebrín. Zistilo sa, že sušené korene čemerice purpurovej (*Helleborus purpurascens* w. a k. — *Ranunculaceae*) neobsahujú β -glukozidázu, a preto sa na získanie dezglukohelebrínu nedá použiť metóda autofermentácie. Hydrolýzu helebrínu možno v 70,8 % výťažku uskutočniť pôsobením enzymatického preparátu získaného zo sušenej nadzemnej časti trýzela vetvistého (*Erysimum canescens* Roth. — *Brassicaceae*) počas 4 dní pri teplote 37 °C.

ИЗОЛЯЦИЯ СЕРДЕЧНЫХ ГЛЮКОЗИДОВ ИЗ МОРОЗНИКА КРАСНОВАТОГО (*HELLEBORUS PURPURASCENS* W. И К.) (II) ЭНЗИМАТИЧЕСКОЕ РАССЦЕПЛЕНИЕ ГЕЛЛЕБРИНА НА ДЕЗГЛЮКОГЕЛЛЕБРИН

Д. ШИКЛ, Ш. БАУЭР, Л. МАСЛЕР

ЧСАН, Химический институт Словацкой академии наук в Братиславе

Провелось ферментативное расщепление геллебрина на дезглюкогеллебрин. Определось, что сухие корни морозника красноватого (*Helleborus purpurascens* w. и к. — *Ranunculaceae*) не содержат β -глюкозидазу и поэтому для получения дезглюкогеллебрина невозможно применить метод автоферментации. Расщепление геллебрина возможно с 70,8 % выходом провести действием enzymaticкого препарата приобретенного из сушеной надземной части желтушника серого (*Erysimum canescens* Roth. — *Brassicaceae*) в течении 4 суток при температуре 37°.

Поступило в редакцию 15. 7. 1961 г.

ISOLIERUNG VON HERZGLYKOSIDEN AUS DER RÖTLICHEN
NIESSWURZ (*HELLEBORUS PURPURASCENS* W. U. K.) (II)
ENZYMATISCHE HYDROLYSE DES HELLEBRINS
ZU DESGLUCOHELLEBRIN

D. ŠIKL, Š. BAUER, L. MASLER

ČSAV, Chemisches Institut an der Slowakischen Akademie der Wissenschaften
in Bratislava

In dieser Arbeit haben die Autoren die fermentative Hydrolyse des Hellebrins zu Desglucohellebrin durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass die getrockneten Wurzeln der Rötlichen Niesswurz (*Helleborus purpurascens* W. U. K. — *Ranunculaceae*) keine β -Glucosidase enthalten, weshalb zur Gewinnung des Desglucohellebrins die Methode der Autofermentation nicht benutzt werden kann. Die Hydrolyse des Hellebrins lässt sich dagegen mit einer 70,8 %-igen Ausbeute durch Einwirkung eines enzymatischen Präparats, erhalten aus dem oberirdischen Teil des Graublättrigen Hederichs (*Erysimum canescens* ROTH. — *Brassicaceae*), während 4 Tagen bei einer Temperatur von 37 °C durchführen.

In die Redaktion eingelangt den 15. 7. 1961

LITERATÚRA

1. Tropp M. J., Ž. obšč. chim. 26, 1786 (1956). — 2. Horák F., Horáková O., Bargár M., *Sborník I. konferencie o kardiovaskulárne účinných látkach*, Bratislava 1959. — 3. Šikl D., Bauer Š., Masler L., *Planta Medica* 9, 64 (1961). — 4. Karrer W., *Helv. Chim. Acta* 26, 353 (1943). — 5. Schmutz J., *Pharm. Helv. Acta* 22, 373 (1947). — 6. Nagata W., Tamm Ch., Reichstein T., *Helv. Chim. Acta* 10, 41 (1957). — 7. Maslenikova V. A., Christulas F. S., Abubakirov N. K., *Dokl. Akad. nauk SSSR* 124, 822 (1959). — 8. Katz A., Reichstein T., *Pharm. Acta Helv.* 22, 437 (1947). — 9. Rosenmund H., Reichstein T., *Pharm. Acta Helv.* 17, 176 (1942). — 10. Stoll A., Hoffmann A., Kreis W., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 235, 249 (1935). — 11. Brockmann H., Schodder H., *Chem. Ber.* 74, 73 (1941).

Do redakcie došlo 15. 7. 1961

Adresa autorov:

Inž. Dobroslav Šikl, C. Sc., dr. inž. Štefan Bauer, C. Sc., inž. Ladislav Masler,
Bratislava, Mlynské nivy 37, Chemický ústav SAV.