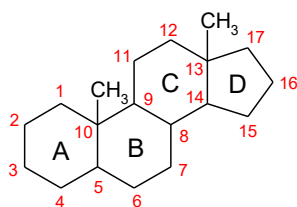


1.1.KARDIOAKTIVNÍ GLYKOSIDY

Kardioaktivní glykosidy jsou přírodní látky se specifickým účinkem na srdeční sval. Jejich aglykon se řadí do skupiny přírodních steroidů. Biogeneticky jsou odvozeny od kyseliny mevalonové a jejich tvorba vychází z biosyntézy triterpenů. Přímým prekurzorem kardioaktivních glykosidů je cholesterol. Nositelům kardioaktivního účinku je aglykon, derivát cyklopentanoperhydrofenanthrenu, který má v polohách C-10 a C-13 methylové skupiny, další substituenty jsou na C-3, C-14 a C-17.

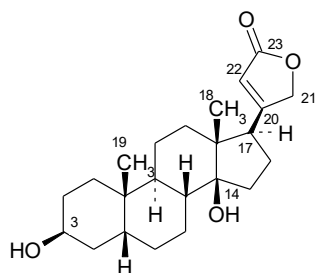


Pro farmakologickou účinnost musí aglykon splňovat několik požadavků:

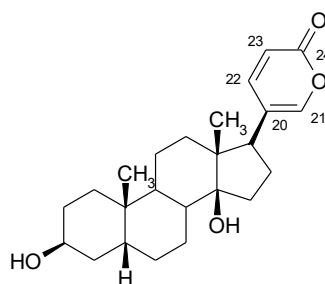
- *cis*-anelace kruhů A/B, *trans*-anelace kruhů B/C a *cis*-anelace kruhů C/D,
- hydroxylová skupina na C-3 a C-14 musí být orientovaná β ,
- nenasycený laktonový kruh na C-17 musí být orientovaný β .

Podle charakteru laktonového kruhu rozlišujeme dva typy kardioaktivních glykosidů:

1. Kardenolidy s pětičlenným nenasyceným laktonovým kruhem; nejčastěji se nachází v čeledích Liliaceae, Ranunculaceae, Apocynaceae, Asclepiadaceae a Plantaginaceae (digitalis dříve řazený do Scrophulariaceae).
2. Bufadienolidy se šestičlenným dvojnásobně nenasyceným laktonovým kruhem; jsou přítomné v *Urginea maritima* a v žlázách některých druhů ropuch rodu *Bufo*.



kard-20,22-enolid



bufa-20,22-dienolid

Cukerná složka (převážně oligosacharid) je obvykle vázána přes hydroxylovou skupinu na C-3. Vedle běžných monosacharidů D-glukosy a L-rhamnosy jsou přítomné cukry specifické pouze pro tyto glykosidy, např. D-digitoxosa, D-cymarosa, D-digitalosa. Sacharidová část molekuly ovlivňuje zejména rychlost účinku, toxicitu a kumulaci kardioaktivních glykosidů v organismu.

1.1.1. KVALITATIVNÍ REAKCE KARDIOAKTIVNÍCH GLYKOSIDŮ

Při důkazu kardioaktivních glykosidů je nutné vodné nebo ethanolové extrakty zbavit balastních látek jako je chlorofyl, třísloviny, saponiny a pod., které by ztěžovaly identifikaci. K tomu se používají tři základní postupy:

- adsorpční chromatografie;
- srážení tříslovin a barviv roztoky solí kovů;
- roztřepávání mezi nemísitelné fáze.

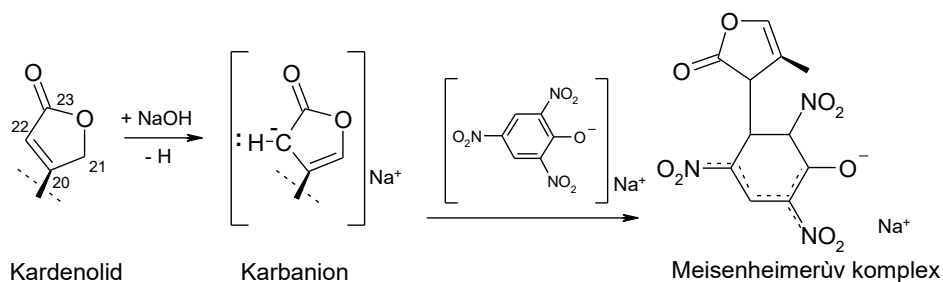
Reakce používané k identifikaci kardioaktivních glykosidů lze rozdělit do tří skupin:

1.1.1.1. Reakce typické pro kardenolidy

Jsou podmíněny přítomností dvojných vazeb v laktonovém kruhu aglykonové části molekuly. Reakce probíhají v alkalickém prostředí a neposkytují je bufadienolidy. Řadíme sem tyto reakce:

Baljetova reakce

S alkalickým roztokem kyseliny pikrové vzniká světle oranžové až temně červené zbarvení. Vlivem hydroxidu dochází k odštěpení protonu na C-21 laktonového kruhu kardenolidů, přičemž se vytváří karbanion, který se nukleofilně aduje na kyselinu pikrovou. Vzniká Meisenheimerův barevný komplex, který má absorpční maximum při vlnové délce 491 nm, a proto můžeme reakci použít i ke kvantitativnímu stanovení. Reakci ruší přítomnost acetonu.



Raymondova reakce

Využívá místo kyseliny pikrové *m*-dinitrobenzen. Laktonový kruh kardenolidů reaguje v zásaditém prostředí s polynitroaromáty za vzniku již uvedeného Meisenheimerova komplexu. S *m*-dinitrobenzenem vzniká fialově modré zbarvení.

Keddeho reakce

Využívá kyselinu 3,5-dinitrobenzoovou v ethanolu za vzniku červenofialového komplexu.

Legalova reakce

S nitroprusidem sodným vzniká oranžově červené zbarvení. Tato reakce je založena na vzniku barevného komplexu při reakci nitroprusidu sodného s laktonovým kruhem.

1.1.1.2. Reakce vázáné na cukernou složku

Při hydrolyze kyselinou dochází k uvolnění cukerné složky, která reaguje s některými zkoumadly (xanthydrolem, vanilinem, anthronem, Fehlingovým zkoumadlem, *p*-dimethylaminobenzaldehydem) za vzniku barevných produktů.

Keller-Kilianiho reakce

Roztokem chloridu železitého a kyselinou sírovou se dokazují především 2-deoxycukry (D-digitoxosa, D-cymarosa), někdy též aglykon. Cukry se barví kyselinou sírovou modrozeleně až modře a aglykon tvoří hnědý prstenec. Mechanismus této reakce není zcela znám, pozitivní barevná změna nastane pouze v přítomnosti volné digitoxosy. Předpokládá se, že působením kyseliny cukr přejde na derivát furfuralu a působením železitých iontů se mění na malondialdehyd nebo acetaldehyd. Tím je umožněn kondenzační a polymerační průběh reakce.

Reakce s xanthydrolem

S čerstvě připraveným roztokem xanthydrolu reagují 2-deoxycukry za vzniku stabilního vínově červeného zbarvení. Reakce se používá i při kvantitativním stanovení kardioaktivních glykosidů.

1.1.1.3. Reakce charakteristické pro steroidy

Jsou založeny na dehydrataci aglykonu, jeho izomerizaci a vzniku barevných produktů.

Liebermann-Burchardova reakce (reagují také steroidy a triterpenoidy).

Reakce s anhydridem kyseliny octové a koncentrovanou kyselinou sírovou. Vlivem kyseliny sírové dochází k dehydrataci a dehydrogenaci steroidního skeletu, vznikají karbeniové ionty a

sloučeniny s konjugovanými dvojnými vazbami. Zabarvení vzniklé ihned po reakci se může změnit vlivem izomerizace dvojných vazeb v molekule steroidu.

Rosenheimova reakce

Provádí se s 90 - 98% kyselinou trichloroctovou. Tato reakce je charakteristická pro steroidy, jež ve své molekule mají systém konjugovaných dvojných vazeb nebo pro aglykony, které ho mohou vytvořit (bufadienolidy).

1.1.2. KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ KARDIOAKTIVNÍCH GLYKOSIDŮ

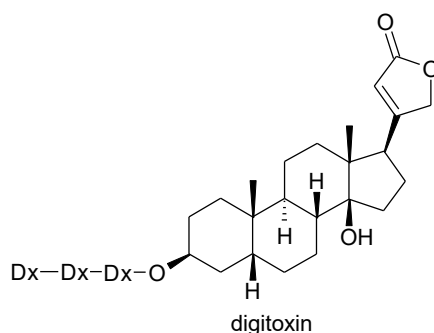
Pro kvantitativní vyhodnocení se v současnosti používá nejčastěji kolorimetrická metoda. Základem je izolace glykosidů a aglykonů vodou nebo ethanolem, přečištění extraktu a kyselá hydrolyza glykosidů. Aglykony se stanovují reakcí s kyselinou pikrovou (viz Baljetova reakce). Vzniklý barevný komplex má absorpční maximum při vlnové délce 491 nm a měří se proti Baljetovu zkoumadlu jako porovnávacímu roztoku.

1.1.3. DROGY S OBSAHEM KARDIOAKTIVNÍCH GLYKOSIDŮ

1.1.3.1. *Digitalis purpureae folium* – List náprstníku červeného (ČL 2009)

Je to usušený list druhu *Digitalis purpurea* L., náprstník červený, Plantaginaceae (dříve Scrophulariaceae).

Obsah: Nejméně 0,3 % kardenolidů, vyjádřeno jako digitoxin, počítáno na vysušenou drogu.



Zkoušky totožnosti:

- 1 g práškované drogy se povaří s 15 ml vody a po vychladnutí se odvar zfiltruje vatou. Filtrát se rozdělí na 2 díly:
 - a) K prvnímu dílu se přidává po kapkách roztok octanu olovnatého, až nevzniká další sraženina. Zfiltruje se. K filtrátu se přidává roztok hydrogenfosforečnanu sodného tak

dlouho, až nevzniká sraženina. Poté se zfiltruje a k filtrátu se přidá stejný objem čerstvě připraveného Baljetova zkoumadla (9,5 ml 1 % roztoku kyseliny pikrové se smíchá s 0,5 ml 10% roztoku NaOH. Před použitím se ředí s methanolem v poměru 1:1). Do 20 minut se roztok barví červenooranžově.

b) K druhému dílu se přidá 5 ml chloroformu, 1 ml diethyletheru a 1 ml ethanolu a protřepe se. Chloroformová vrstva se na porcelánové misce odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 1,5 ml koncentrované kyseliny octové, přidá se 1 kapka 0,1% roztoku chloridu železitého a ve zkumavce se podvrství 1,5 ml kyseliny sírové. Na styku obou vrstev se vytvoří barevný prstenec na spodině hnědočervený – digitaligeniny, v horní části zpočátku nazelenalý, později modrý (digitoxosa, Keller-Kilianiho reakce).

2. Důkaz steroidní složky: 0,5 g práškové drogy se 2 minuty vaří s 10 ml ethanolu 50% a 5 ml roztoku octanu olovnatého 10%. Po ochlazení se směs přefiltruje. Filtrát se vytřepe do 15 ml chloroformu, chloroformový roztok se vysuší bezvodým síranem sodným a přefiltruje. 3 ml chloroformového extraktu se odpaří do sucha. Ke zbytku se přidá 1 ml směsi 50 ml anhydridu kyseliny octové a 1 ml koncentrované kyseliny sírové a protřepe se. Po několika minutách vzniká hnědošedé zbarvení (steroidní skelet, Liebermann-Burchardova reakce).
3. Důkaz cukerné složky: 0,5 g práškové drogy se smíchá s 5 ml čerstvě připraveného xanthydrolového zkoumadla. 3 minuty se zahřívá na vodní lázni a potom se chladí 5 minut. Po dalších 10 minutách při pokojové teplotě se objeví vínově červené zbarvení (digitoxosa).

4. Tenkovrstvá chromatografie:

Zkoušený roztok: 1,0 g práškové drogy se smíchá s 20 ml ethanolu 50% (V/V) a 10 ml octanu olovnatého. Vaří se 2 minuty, nechá se ochladit a odstředí se. Supernatantní tekutina se protřepe dvakrát 15 ml chloroformu; je-li třeba, vrstvy se oddělí odstředěním. Spojené chloroformové vrstvy se vysuší síranem sodným bezvodým a zfiltrují se. 10 ml filtrátu se odpaří na vodní lázni do sucha, odparek se rozpustí v 1 ml směsi stejných objemových dílů chloroformu a methanolu.

Porovnávací roztok: 5 mg purpureaglykosidu A, 2 mg purpureaglykosidu B, 5 mg digitoxinu a 2 mg gitoxinu se rozpustí ve směsi stejných objemových dílů chloroformu a methanolu a zředí se stejnou směsí na 10 ml.

Stacionární fáze: Deska s vrstvou silikagelu G pro TLC.

Mobilní fáze: Směs objemových dílů vody, methanolu a ethyl-acetátu (7,5 : 10 : 75).

Nanášení: 20 µl, do proužků.

Vyvíjení: Po dráze 10 cm.

Sušení: Do odpaření rozpouštědel.

Detekce: Postříká se směsí objemových dílů roztoku chloraminu T (10 g/l) a roztoku kyseliny trichloroctové (250 g/l) v ethanolu 96% (2 : 8), pak se 10 minut zahřívá při 100 °C až 105°C. Pozoruje se v ultrafialovém světle při 365 nm.

Hodnocení: Na chromatogramu porovnávacího roztoku je v dolní části světla modře fluoreskující skvrna (purpureaglykosid B), těsně nad ní hnědožlutě fluoreskující skvrna (purpureaglykosid A), ve střední části chromatogramu světla modře fluoreskující skvrna (gitoxin) a nad ní hnědožlutě fluoreskující skvrna (digitoxin). Skvrny na chromatogramu zkoušeného roztoku odpovídají polohou, zbarvením a velikostí skvrnám na chromatogramu porovnávacího roztoku. Na chromatogramu zkoušeného roztoku mohou být další fluoreskující skvrny (digitoxigenin a jeho glykosidy fluoreskují žlutě, gitoxigeniny a jeho glykosidy jasně modře a digoxigeniny a jeho glykosidy ocelově modře).

Stanovení obsahu:

0,250 g práškované drogy se protřepává 1 h s 50,0 ml vody. Pak se přidá 5,0 ml roztoku octanu olovnatého (150 g/l), protřepe se a po několika minutách se přidá 7,5 ml roztoku hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu (40 g/l), zfiltruje se přes skládaný filtr. 50,0 ml filtrátu se vaří 1 h pod zpětným chladičem na vodní lázni s 5 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (150 g/l HCl). Roztok se převede do dělicí nálevky; baňka se promyje dvakrát 5 ml vody; spojené tekutiny se protřepávají třikrát 25 ml chloroformu. Spojené chloroformové vrstvy se vysuší síranem sodným bezvodým a roztok se zředí chloroformem na 100,0 ml. 40,0 ml tohoto roztoku se odpaří do sucha, odparek se rozpustí v 7 ml ethanolu 50% (V/V). Přidají se 2 ml kyseliny dinitrobenzoové a 1 ml hydroxidu sodného 1 mol/l. Současně se připraví porovnávací roztok následujícím způsobem: 50,0 mg digitoxinu se rozpustí v ethanolu 96% a zředí se jím na 50,0 ml. 5,0 ml roztoku se zředí ethanolem 96% na 50,0 ml. K 5,0 ml tohoto roztoku se přidá 25 ml vody a 3 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (150 g/l HCl). Vaří se 1 h pod zpětným chladičem na vodní lázni; dále se postupuje výše uvedeným způsobem. Absorbance obou roztoků se měří při 540 nm několikrát v průběhu 12 minut tak, aby bylo dosaženo maxima. Jako kontrolní tekutina se použije směs 7 ml ethanolu 50% (V/V), 2 ml kyseliny dinitrobenzoové a 1 ml hydroxidu sodného 1 mol/l.

Z naměřených hodnot absorbancí a koncentrací roztoků se vypočítá obsah kardenolidů

v procentech, vyjádřeno jako digitoxin.

1.1.3.2. **Digitalis lanatae folium – List náprstníku vlnatého**

Je to usušený list druhu *Digitalis lanata* L., náprstník vlnatý, Plantaginaceae (dříve Scrophulariaceae).

Obsah: Nejméně 0,5 % kardenolidů, vyjádřeno jako digitoxin, vyjádřeno na vysušenou drogu.

Stanovení obsahu:

4,00 g jemně práškové drogy se přelije (v předem zvážené) 250 ml zábrusové baňce 50 ml 70% horkého ethanolu a vaří pod zpětným chladičem 15 minut na vodní lázni. Nechá se ochladit na 20 °C. Doplní se 70% ethanolom na původní hmotnost. Přidá se 110 ml vody a promíchá se. Přidá se 50 ml 15% octanu olovnatého a znovu se řádně promíchá. Vzniklá sraženina se po krátkém usazení zfiltruje. Ke 160 ml čirého filtrátu (=3,2 g drogy) se přidá 48 ml roztoku hydrogenfosforečnanu sodného 10%. Dobře se promíchá a opět se zfiltruje. 162,5 ml filtrátu (odpovídá 2,5 g drogy) se nalije do dělicí nálevky na 300 ml. Postupně se vytřepává s 50, 40, 40 a 40 ml chloroformu. Spojené chloroformové extrakty se odpaří na rotační vakuové odparce do sucha. Odparek se postupně po částech rozpustí ve směsi chloroform-methanol (1:1) na celkový objem 25 ml. 2 ml tohoto extraktu (200 mg drogy) se odpaří do sucha, odparek se rozpustí v 35 ml methanolu. 5 ml methanolového roztoku se smíchá s 5 ml Baljetova zkoumadla. Po 30 minutách stání se měří absorbance barevného roztoku při

494 nm proti porovnávacímu roztoku (5 ml methanolu + 5 ml Baljetova zkoumadla). Procento celkového množství glykosidů, počítaných jako lanatosid C, se vypočítá podle vzorce:

$$\% = A \times 3,41$$

A – naměřená absorbance

Digitalis purpureae folium a **Digitalis lanatae folium** jsou surovinami pro izolaci strukturou definovaných kardioaktivních glykosidů:

1.1.3.3. **Digitoxinum – Digitoxin (ČL 2009), Digoxinum – Digoxin (ČL 2009)**

Zkoušky totožnosti jsou založeny:

1. na infračervené absorpční spektrofotometrii
2. na tenkovrstvé chromatografii a reakcích výše popsanych (s kyselinou

dinitrobenzoovou v alkalickém prostředí a s chloridem železitým a kyselinou sírovou).

1.1.3.4. **Ouabainum octahydricum – Ouabain oktahydrát (ČL 2009) dříve: g-Strophanthin**

Strukturou definovaný kardioaktivní glykosid, který se izoluje z drogy Strophanthi semen – Strofantové semeno.

Matečnou rostlinou je *Strophanthus gratus* (Wall. et Hook. ex Benth.) Baill., krutikvět cenný, Apocynaceae. Je to stromovitá liana obsahující průzračný nebo bílý latex. Zploštělá semena jsou podobná semenům ovsa. Jsou opatřena charakteristickou pérovitou osinou.

Ouabain se získává také ze dřeva stromu *Acokanthera schimperi* Oliv., akokantera Schimperova, Apocynaceae, rostoucího v jihovýchodních oblastech Afriky.

Zkoušky totožnosti:

1. K 1 g práškové drogy (Strophanthi semen) se přidá 10 ml vody, povaří se a odvar se po vychladnutí zfiltruje. Chromatograficky na tenké vrstvě silikagelu G porovnáním se standardem. Vyvíjí se po dráze 13 cm směsí objemových dílů vody, methanolu, dimethylsulfoxidu a chloroformu (4 : 15 : 15 : 70). Vrstva se suší 30 minut v odvětrávané sušárně při 140 °C. Nechá se ochladit. Postříká se kyselinou sírovou v ethanolu a zahřívá se 15 minut při 140 °C. Posuzuje se poloha a zbarvení skvrn.
2. 2 mg ouabainu se rozpustí ve 2 ml kyseliny sírové; vzniká růžové zbarvení, které rychle přechází v červené. Roztok má v ultrafialovém světle zelenou fluorescenci.
3. Asi 1 mg ouabainu se rozpustí v 1 ml dinitrobenzenu a přidá se 0,2 ml hydroxidu sodného zředěného; vzniká intenzivní modré zbarvení.
4. 0,1 g se rozpustí v 5 ml roztoku kyseliny sírové (150 g/l) a několik minut se vaří. Roztok zežloutne a zakalí se. Zfiltruje se. K filtrátu se přidá 5 ml roztoku hydroxidu sodného (120 g/l), 3 ml vinanu měďnatého a zahřeje se; vznikne červená sraženina.

1.1.3.5. **Convallariae herba – Konvalinková nat'**

Usušené celé nebo řezané eliptické dlouze řapíkaté listy druhu *Convallaria majalis* L., konvalinka vonná, Convallariaceae (dříve Liliaceae).

Obsah: Nejméně 0,2 % konvallatoxinu.

Zkoušky totožnosti

2 g drogy se povaří s 25 ml vody, odvar se po vychladnutí zfiltruje vatou.

1. K 10 ml filtrátu se přidá 10 ml chloroformu, 2 ml diethyletheru a 2 ml ethanolu 95% a důkladně se protřepe. Chloroformová vrstva se odpaří na porcelánové misce do sucha, odparek se rozpustí ve 3 ml kyseliny octové koncentrované, přidá se 1 kapka 0,1% roztoku chloridu železitého a roztok se ve zkumavce navrství na 3 ml kyseliny sírové. Na styku obou vrstev se vytvoří červenohnědý prsteneček, vrstva kyseliny octové se barví zeleně.
2. K 10 ml filtrátu se přidává po kapkách roztok octanu olovnatého, až nevzniká další sraženina a pak se zfiltruje. K filtrátu se po kapkách přidává roztok hydrogenfosforečnanu sodného, až nevzniká sraženina a opět se zfiltruje. K filtrátu se přidá stejný objem čerstvě připraveného trinitrofenolátu sodného (Baljetovo zkoumadlo). Do 30 minut se roztok zbarví červeně oranžově.

Stanovení obsahu:

3,00 g jemně práškované drogy se přelije 50 ml ethanolu 70% a vaří se pod zpětným chladičem 15 minut na vodní lázni. Nechá se 15 minut stát a pak se ochladí na 20 °C. Přidá se 70 ml vody a 20 ml octanu olovnatého 20% a řádně se promíchá. Vzniklá sraženina se po krátkém usazení zfiltruje. Ke 100 ml čirého filtrátu se přidá 25 ml hydrogenfosforečnanu sodného 10%. Dobře se promíchá a opět zfiltruje. 100,0 ml filtrátu (odpovídá 2,0 g drogy) se vpraví do dělicí nálevky na 200 ml. Postupně se vytřepává 60 ml a třikrát 35 ml chloroformu. Spojené chloroformové extrakty se odpaří na rotační vakuové odparce do sucha při teplotě nepřesahující 50 °C. Odparek se rozpustí v 10 ml methanolu a roztok se přefiltruje. 1 ml roztoku se doplní methanolem na 10 ml. 5 ml tohoto roztoku se smíchá s 5 ml Baljetova zkoumadla. Po 15 minutách stání se měří absorbance barevného roztoku při 494 nm proti porovnávacímu roztoku (5 ml methanolu + 5 ml Baljetova zkoumadla). Procento celkového množství glykosidů, počítaných jako konvallatoxin se vypočítá podle vzorce

$$\% = A \times 0,625$$

A - naměřená absorbance