

University of Groningen

Stabilisatie en samenstelling van het glycosidenmengsel van *Folia digitalis*

Tattje, Derk Hendrik Evert

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
1952

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Tattje, D. H. E. (1952). *Stabilisatie en samenstelling van het glycosidenmengsel van Folia digitalis*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

Na een korte inleiding wordt een omschrijving van het begrip stabilisatie gegeven en besproken hoe deze stabilisatie, dit is het irreversibel inactiveren van de enzymen, in het algemeen tot stand kan worden gebracht. Tevens wordt nagegaan of ook door verschillende oplosmiddelen reeds bij gewone temperatuur een vermindering van de enzymwerking kan worden verkregen. Afgezien van het feit, dat een zekere remming kan ontstaan door het minder oplosbaar zijn van de enzymen wordt op deze wijze geen stabilisatie bereikt.

Hierna worden besproken de meest gebruikelijke stabilisatiemethoden; dit zijn de methode van *Bourquelot*, die van *Arnould* en *Goris*, waarbij onder druk met waterdamp wordt gestabiliseerd, en de methode van *Perrot* en *Goris*, waarbij op overigens soortgelijke wijze van alcohol gebruik wordt gemaakt. Ook behoren hiertoe de methoden van het onderdompelen in kokend water en het gedurende korte tijd verhitten op 100° C. De voor- en nadelen van bovengenoemde werkwijzen worden besproken.

Voor het in dit proefschrift behandelde onderzoek worden als stabilisatiemethoden gebruikt: de behandeling van Digitalisblad met alcohol- of waterdamp onder druk en de verhitting op 100° C in een droogstoof gedurende een bepaalde tijd. Vervolgens werd nagegaan, wat in de literatuur over het stabiliseren en drogen van Folia Digitalis bekend is. Het bleek al spoedig, dat de meningen over de verkregen resultaten niet geheel gelijklopend zijn. Dit is voor een groot deel toe te schrijven aan de verschillende methoden van waardebepaling, zowel fysiologisch als chemisch. Meestal wordt aanbevolen het Digitalisblad bij 55-60° C te drogen; bij een temperatuur van 100° C of hoger treedt een daling op in het gehalte aan werkzame bestanddelen, terwijl onder invloed van stabilisatie de samenstelling van het glycosidenmengsel geheel anders is geworden. Hieruit bleek tevens de noodzaak om een andere methode van waardebepaling te zoeken, waardoor het mogelijk wordt een betere differentiatie te krijgen in de samenstelling van het glycosidenmengsel.

Hoofdstuk IV geeft eerst een overzicht van de voornaamste in Folia Digitalis aanwezige bestanddelen, met aansluitend daarop een korte samenvatting van de vele bestaande fysiologische en chemische waardebepalingen. In het bijzonder wordt dan besproken de toepassing van de reactie van *Baljet*, dit is het gebruik van een alkalische pikraatoplossing voor de quantitative bepaling van de Digitalisglycosiden. De met dit reagens verkregen oranjerode kleur kan het best worden gemeten met een colorimeter, voorzien van een lichtfilter dat een maximale doorlaatbaarheid bij ongeveer 5000 Å heeft. Op deze wijze wordt dan de hoeveelheid aglycon bepaald. Door ons zelf werd gebruikt een golflengte van 4930 tot 5030 Å.

Een andere reactie op hartglycosiden, welke berust op het aantonen van digitoxose in het glycosidemolecuul, werd uitgevoerd met het reagens van

Lindewald, een modificatie van het reagens van *Keller-Kiliani*. Hiermee wordt alleen het glycoside bepaald en niet het in vrije toestand aanwezige aglycon. Het verschil in uitkomst van beide bepalingen geeft het gehalte aan aglyconen.

De vooral van Amerikaanse zijde aanbevolen methode van *Bell* en *Krantz* met behulp van het reagens van *Baljet* bleek te hoge uitkomsten te geven. Een ook bij de methode van *Soos* toegepaste zuivering met chloroform werd daarom ingeschakeld, terwijl de metingen met behulp van een filter, waarvan het doorgelaten spectraalgebied klein is of met een monochromator werden uitgevoerd.

Verder blijkt duidelijk, dat het schijnbare glycosidegehalte van helften van bladeren waarvan de ene helft gewoon gedroogd en de andere helft gestabiliseerd was, volgens de bepaling van *Bell* en *Krantz* ongeveer gelijk is. Volgens de bepaling van *Soos*, waarbij op de verdampingsrest de reactie van *Lindewald* is toegepast, worden geheel andere uitkomsten verkregen. Het gehalte van het gestabiliseerde blad is ongeveer $\frac{1}{3}$ tot $\frac{1}{4}$ van dat van het gewoon gedroogde blad. Door ons werd bewezen, dat de oorzaak van dit verschijnsel gezocht moet worden in de aanwezigheid van primaire glycosiden. Deze aanwezigheid kon vrij eenvoudig worden aangetoond door waardebepalingen te verrichten, nadat het bladpoeder kortere of langere tijd met water in aanraking is geweest. Bij het gedroogde blad loopt de uitkomst op tot een bepaalde maximale waarde; bij het gestabiliseerde blad treedt geen verhoging op, wel echter indien „enzympoeder” hieraan is toegevoegd. Hiermee is de aanwezigheid van primaire glycosiden, ook in gedroogd blad aangetoond.

Tevens werd bewezen, dat indien genuïne glycosiden voorkomen de uitkomsten van de gewone waardebepaling onjuist zijn. Door de slechte oplosbaarheid in chloroform wordt maar een deel, naar bij de waardebepaling gebleken is 35 %, hiervan uit de waterige oplossing uitgeschud. Bovendien blijkt het purpureaglycoside, indien hieraan het reagens van *Lindewald* wordt toegevoegd, slechts met 2 van de 3 aanwezige digitoxosemoleculen te reageren. Bij de splitsing in het sterk zure milieu wordt nl. een biose gevormd, genoemd digilanidobiose bestaande uit 1 mol. digitoxose en 1 mol. glucose, welke met het reagens van *Lindewald* geen kleur geeft. Door deze beide oorzaken wordt bij de waardebepaling volgens *Soos* bij aanwezigheid van primaire glycosiden een zeer ernstige fout gemaakt, omdat maar ongeveer $\frac{1}{4}$ deel van deze purpureaglycosiden wordt meebepaald.

Het is echter mogelijk gebleken, door het enzym digipurpidase gelegenheid te geven zijn werking op de genuïne glycosiden uit te oefenen, een bevredigende oplossing te vinden waarbij bovengenoemde fouten worden vermeden. Dit ferment is in het gewoon gedroogde blad nog in actieve vorm aanwezig, terwijl aan gestabiliseerd blad een volgens *Stoll* en *Kreis* bereid „enzympoeder” wordt toegevoegd, waardoor de beoogde werking zij het in een trager tempo ook wordt verkregen.

Nadat het enzym zijn volledige werking heeft uitgeoefend zijn in de waterige vloeistof aanwezig digitoxine, gitoxine en de twee aglyconen. Door op dit tijdstip een waardebepaling uit te voeren, nadat het maceraat is gezuiverd met loodacetaat, kunnen nu wel alle in het blad aanwezige glycosi-

den en aglyconen met chloroform worden uitgeschud. Na drogen met uitgedroogd natriumsulfaat wordt de chloroform over twee van te voren gewogen kolfjes verdeeld en op de verdampingsresten de reacties van resp. *Baljet* en *Lindewald* uitgevoerd. Het verschil tussen deze beide bepalingen geeft de hoeveelheid aglycon aan. Door combinatie met de waarden, verkregen door de waardebepaling na 1 uur schudden uit te voeren is het met behulp van een berekening mogelijk de gehele samenstelling van het glycosidenmengsel in het blad, uitgedrukt in primaire en secundaire glycosiden en aglyconen, op te geven.

Dit is het principe van de door ons gebruikte waardebepaling. Nagegaan werd de tijd, welke nodig is om de enzymwerking volledig te doen plaats vinden. Om temperatuurswisselingen te voorkomen kan het beste gebruik worden gemaakt van een broedstoof. Voor gewoon gedroogd blad is een temperatuur van 30° C, voor gestabiliseerd blad waaraan „enzym-poeder” is toegevoegd een temperatuur van 40° C voldoende om de duur van de bepaling binnen redelijke grenzen te houden. Bij een temperatuur van 80° C wordt een geheel ander verschijnsel waargenomen. Nadat het enzym korte tijd zijn invloed heeft kunnen doen gelden, wordt de werking hiervan al spoedig stopgezet. Het resultaat is dat de waardebepalingen uitgevoerd na 1/2, 1, 2, 4 of 8 uur eenzelfde uitkomst opleveren. Langzamerhand wordt daarna een chemische reactie merkbaar. Hierdoor worden zowel de purpurea- als de secundaire glycosiden gesplitst.

De door ons voorgestelde waardebepaling werd toegepast op een aantal monsters, welke op verschillende wijze werden behandeld. In het algemeen kan worden gezegd, dat het gehalte van bladeren verzameld van het bloeiende kruid aanmerkelijk lager is dan van bladeren afkomstig van wortelrozetten. In gestabiliseerd blad blijkt het gehalte aan primaire glycosiden veel groter te zijn dan van het gewone, dit is bij 40° C gedroogde blad. Trouwens ook in het laatste geval kan de hoeveelheid genuine glycosiden betrekkelijk groot zijn, namelijk tot 50 % van het totaal. Het maakt voor de stabilisatie, welke geschiedde in een kleine autoclaaf onder druk, niet uit of dit plaats heeft met alcohol of dat water wordt gebruikt. Bij de stabilisatie heeft enig verlies plaats t.o.v. blad, dat normaal gedroogd is. Belangrijk is dat geconstateerd werd, dat het eindresultaat er niet door wordt beïnvloed of het blad enige tijd in de schaduw in een dunne laag blijft liggen. In bijna alle monsters blijkt een geringe hoeveelheid vrij aglycon voor te komen.

De enzymatische ontleding heeft alleen betrekking op de omzetting van primaire tot secundaire glycosiden. We kunnen zeggen, dat indien in een preparaat na verloop van tijd een omzetting heeft plaats gevonden van secundaire glycosiden tot vrije geninen dit een gevolg is van een chemische ontleding en niet van fermentwerking.

Bij een drietal series monsters werd nogmaals nagegaan, hoelang het blad kon blijven liggen voor de enzymwerking zijn invloed deed gelden. Bij een van deze series bleek daarbij het blad in 10 dagen practisch luchtdroog te zijn geworden. Met behulp van de hierop volgende analyse werd bewezen, dat bij gewone temperatuur weinig fermentwerking plaats heeft.

Bij de hierna volgende proeven werden enige methoden van behandeling met elkaar vergeleken, nl. stabilisatie met alcohol en het drogen bij resp.

100° C, 80° C en 40° C. Hoewel bij het gestabiliseerde product het gehalte aan primaire glycosiden het hoogst is, blijkt het totaal glycosidengehalte het laagst te zijn. De waarschijnlijke reden, nl. extractie werd al genoemd. Van de drie droogtemperaturen blijkt die van 100° C de slechtste resultaten op te leveren. Het totaal glycosidengehalte is ook iets lager dan van het blad, dat bij 40° C of 80° C gedroogd is en ook de hoeveelheid primaire glycosiden is het kleinst. Het materiaal gedroogd bij 80° C blijkt van de drie gedroogde monsters het hoogste gehalte aan primaire glycosiden op te leveren, terwijl het totale gehalte minstens gelijk is aan dat van het bij 40° C gedroogde blad. Dit verschijnsel werd in de laatste proeven bevestigd; tevens werd daarbij gevonden, dat het geen voordeel biedt of het blad eerst korte tijd bij 80° C en daarna verder gedroogd werd bij 40° C.

De conclusie uit al deze proeven is, dat het met behulp van een nieuwe waardebepalingsmethode gelukt is aan te tonen, dat in Digitalisblad bij gewone temperatuur geen omzetting van de primaire glycosiden plaats vindt. Bij het drogen bij 40° C treedt sterke enzymwerking op, in tegenstelling met het drogen op 80° C.

Voor het verkrijgen van een gedroogd product, dat zoveel mogelijk primaire glycosiden bevat is het nodig, dit drogen zo kort mogelijk te doen plaats vinden bij een temperatuur van waarschijnlijk 60-70° C. De enzymwerking is daardoor zo veel mogelijk uitgeschakeld, zonder dat de temperatuur een schadelijke invloed kan uitoefenen. Het gestabiliseerde product heeft vrijwel een maximumgehalte aan genuine glycosiden, terwijl het totaal glycosidengehalte iets lager is dan van gedroogd blad.

Voor zover door pharmacologische proeven nog niet geheel is uitgemaakt of purpureaglycosiden een betere werking hebben op het menselijk hart dan de secundaire glycosiden, kan niet worden vastgesteld aan welke methode van conservering van Digitalisblad de voorkeur moet worden gegeven.