

135. Scillarenin- β -D-glucosid, ein neues Herzglykosid aus der roten Meerzwiebel

52. Mitteilung über Herzglykoside [1]¹⁾

von **Albert von Wartburg**

(15. V. 64)

Aus der roten Varietät der Meerzwiebel, *Scilla* (= *Urginea*) *maritima* (BAKER) L., konnten STOLL & RENZ [2] die drei herzaktiven Glykoside Scillirosid (I), Scillaren A (II) und Scilliglaucosid (= Scillaren F) (III) gewinnen. Scillirosid, das ratizide Prinzip der Droge [3], wurde bisher nur in der roten *Scilla* gefunden, während Scillaren A und Scilliglaucosid auch in der medizinisch wertvollen *weissen* Varietät der Meerzwiebel vorkommen [4]. Der chemische Bau der drei Wirkstoffe ist heute genau bekannt: es handelt sich um Bufadienolide, die als gemeinsames Strukturelement eine zusätzliche Doppelbindung an C-4 des Steroidgerüsts tragen (Formeln I-III) [5] [6] [7].

Neben den angeführten Hauptkomponenten enthält die rote Meerzwiebel eine Reihe noch nicht untersuchter Begleitstoffe. Im Dünnschichtchromatogramm der Rohglykosid-Fraktion fällt speziell ein unbekanntes Glykosid (V) auf, das eine etwas kürzere Laufstrecke als Scillirosid zeigt. Wir berichten im folgenden über die Isolierung und Konstitutionsermittlung dieses neuen Scillastoffes.

Isolierung des neuen Glykosids. Getrocknete rote Meerzwiebeln wurden mit Methanol extrahiert, die vereinigten Methanolauszüge mit Wasser verdünnt und einer Bleifällung unterworfen. Das nach Abtrennung der Bleisalze anfallende Filtrat konzentrierte man im Vakuum und schüttelte anschliessend mit Chloroform und Chloroform-Butanol-(7:3) aus. Die Dünnschichtchromatogramme der beiden Auszüge zeigten, dass der neue Stoff und die übrigen Glykoside fast ausschliesslich im Chloroform-Butanol-Extrakt enthalten waren. Die Rohglykoside konnten durch mehrfache Chromatographie an Kieselgel in Proscillaridin A (IV) [4]²⁾, das neue Glykosid (V), Scillirosid (I) und Scillaren A (II) aufgetrennt werden³⁾.

Konstitution von V: Die neue *Scilla*-Komponente, $C_{30}H_{42}O_9$, kristallisiert aus abs. Alkohol in feinen farblosen Prismen vom Smp. 208–212°; $[\alpha]_{20}^D = -54,2^\circ$ (in Methanol). Die nahe chemische Verwandtschaft zu den Hauptglykosiden ging aus dem für Bufadienolide typischen UV.-Maximum bei 298 m μ ($\log \epsilon = 3,76$) sowie aus den markanten IR.-Banden bei 1705, 1630 und 1535 cm^{-1} hervor. Mit Essigsäureanhydrid lieferte V ein kristallisiertes Tetraacetylderivat, $C_{38}H_{50}O_{13}$ (VI). Durch schonende Verseifung mit $KHCO_3$ in wässrigem Methanol liess sich aus VI das Glykosid V regenerieren.

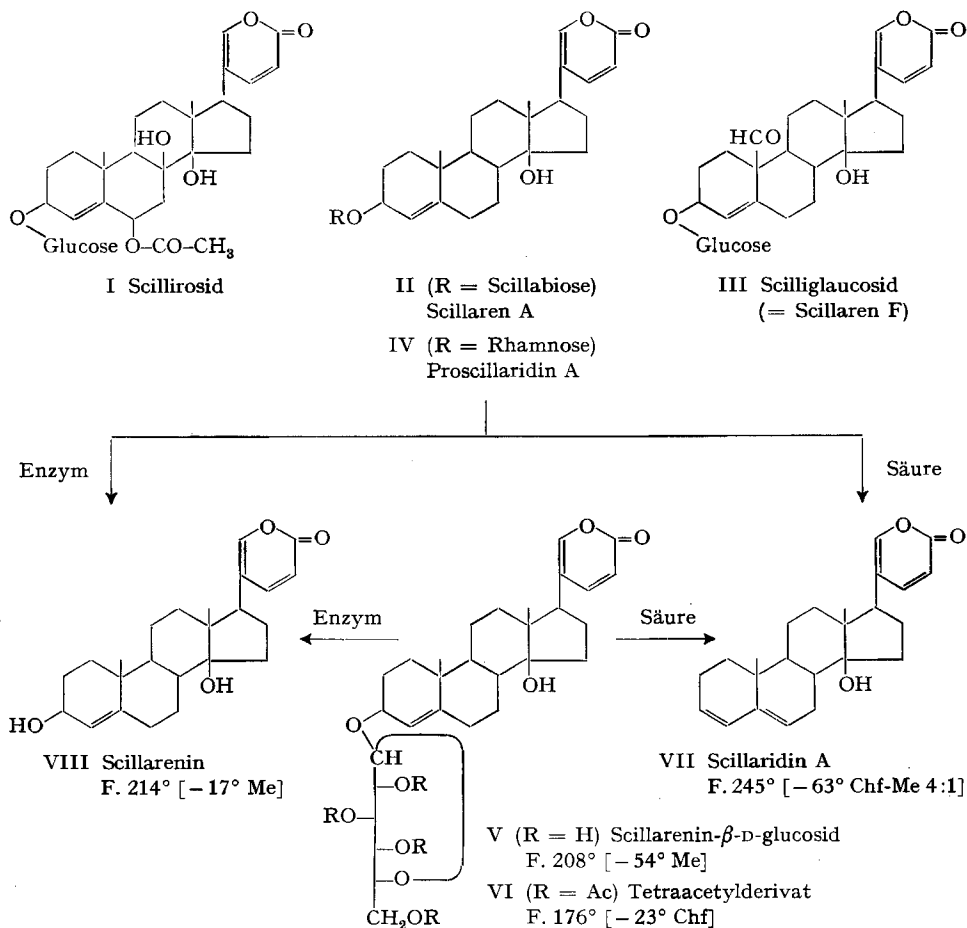
Die Einzelheiten des chemischen Aufbaus ergaben sich aus den Spaltungsreaktionen: Erwärmen mit verdünnter Schwefelsäure in Methanol zerlegte das Glykosid V

¹⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 1233.

²⁾ Proscillaridin A (IV) wurde nicht in Substanz isoliert, sondern lediglich dünnschichtchromatographisch nachgewiesen.

³⁾ Das früher in grösserer Menge auftretende Scilliglaucosid (III) [2] liess sich in der jetzigen *Scilla*-Charge nur in Spuren nachweisen.

in ein Anhydroaglykon $C_{24}H_{30}O_3$ vom Smp. 226–248°; $[\alpha]_D^{20} = -63,5^\circ$ (in Chloroform-Methanol-4:1), das sich mit Scillaridin A (VII) [4] als identisch erwies (Vergleich der IR.-Spektren: Fig. 1). Die Zuckerkomponente verhielt sich im Papier- und Dünnschichtchromatogramm wie D-Glucose und wurde durch Überführung in α -Methyl-D-glucosid- $\langle 1,5 \rangle$ charakterisiert.

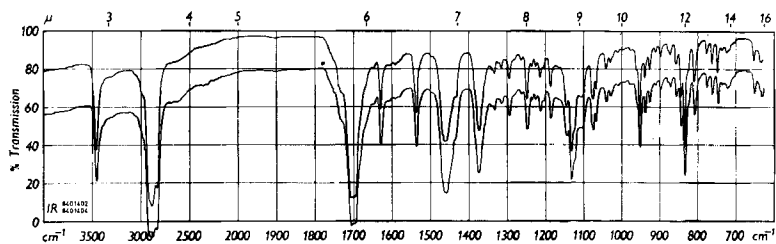


Die enzymatische Hydrolyse des Glykosids V mit einem käuflichen Pilzferment⁴⁾ führte in guter Ausbeute zu einem primären Genin $C_{24}H_{32}O_4$ vom Smp. 215–236°; $[\alpha]_D^{20} = -20,3^\circ$ (in Methanol). Die physikalischen Konstanten des Aglykons, insbesondere die Laufstrecken im Dünnschichtchromatogramm und das IR.-Spektrum (Fig. 2), stimmten mit den Eigenschaften des bekannten Scillarenins (VIII) [9] überein.

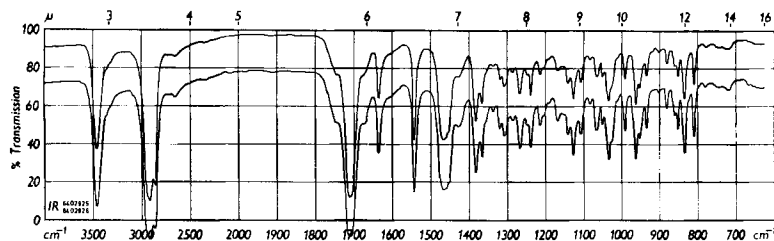
⁴⁾ Dieses Pilzferment (Präparat C 1290) erhielten wir vor Jahren ohne Provenienzangaben von der Firma Lab. Dr. WEBER, Küsnacht-Zürich. Das Fermentpräparat entwickelt bei Herzglykosiden mit β -glykosidisch verknüpften Glucoseeinheiten eine hohe Aktivität. Die Spaltungsquoten betragen z. B. beim Scillirosid praktisch 100%, bei Desacetyllanatosid A ca. 50%, bei Altosid ca. 40% und bei Scillaren A ca. 30% (vgl. [8]).

IR-Absorptionsspektren in Nujol

(Auf einem PERKIN-ELMER-IR-Spektrophotometer, Mod. 21, aufgenommen)

Fig. 1. *Scillaridin A*

obere Kurve: aus Scillaren A – untere Kurve: aus Glykosid V

Fig. 2. *Scillarenin*

obere Kurve: aus Proscillaridin A – untere Kurve: aus Glykosid V

Mit den angeführten Reaktionen ist die neue Scilla-Komponente V als D-Glucosid des Scillarenins definiert. Die Zuckereinheit ist erwartungsgemäss mit dem sekundären Hydroxyl an C-3 verknüpft, wie u. a. aus der Bildung des *Tetra*-acetylderivates VI hervorgeht.

Als Abschluss der Strukturermittlung war noch die Konfiguration der Zuckerbindung in V zu bestimmen. Die Berechnung des molekularen Drehungsbeitrags der D-Glucose lieferte einen ersten Hinweis für die nach der KLYNE'schen Regel [10] abzuleitende β -glykosidische Verknüpfung; der gefundene $[\alpha]_D$ -Wert = -225° geht allerdings weit über die normale Fehlergrenze hinaus. Entscheidend für die Zuordnung der β -Konfiguration war der experimentelle Befund, wonach das oben erwähnte Pilzferment bisher nur β -D-Glucoside zu spalten vermochte⁴⁾; so wird z. B. das als α -D-Glucosid erkannte Scilliglaucosid nicht angegriffen [8].

Mit den vorliegenden Resultaten ist die Konstitution des Glykosids V als *Scillarenin*- β -D-glucosid weitgehend gesichert.

Tabelle 1. *Toxizität von Scillarenin-Glykosiden*

Glykosid	Zucker	LD nach HATCHER mg/kg
Proscillaridin A	L-Rhamnose	0,125
Scillarenin- β -D-glucosid	D-Glucose	0,112
Scillaren A	L-Rhamnose-D-Glucose	0,145
Glucosillaren A	L-Rhamnose-D-Glucose-D-Glucose	0,175

Pharmakologische Wirkung. Scillarenin- β -D-glucosid (V) erwies sich an der Katze als hochwirksam⁵⁾. In Tab. 1 sind die Aktivitäten der bekannten Glykoside, die sich vom Scillarenin (VIII) ableiten, aufgeführt. Dabei ist die Feststellung interessant, dass Scillarenin- β -D-glucosid (V) stärker wirkt als Proscillaridin A (= Scillarenin- α -L-rhamnosid). Wie schon früher – speziell an Cardenoliden – beobachtet wurde, ist auch in diesem Fall der Ersatz eines Desoxyzuckers durch D-Glucose mit einer Aktivitätssteigerung verbunden [11].

Experimenteller Teil⁶⁾

Isolierung von Scillarenin- β -D-glucosid (V). – a) *Extraktion:* Frische rote Meerzwiebeln (Ernte 1963) wurden in Scheiben geschnitten und im warmen Luftstrom bei 60° rasch getrocknet. 500 g Drogenschnitzel zerkleinerte man unter Zugabe von 4 l Methanol und presste den erhaltenen Brei ab. Der Drogenrückstand wurde noch zweimal mit je 1 l Methanol ausgerührt. Die vereinigten tiefrot gefärbten Methanolextrakte engte man im Vakuum bei 60° auf 1 l ein, verdünnte mit dem gleichen Volumen Wasser und versetzte mit 150 ml 30-proz. Bleiacetatlösung. Durch Zutropfen von 25 ml 2N wässrigem Ammoniak wurde der pH-Wert der Lösung auf 6,3 eingestellt und anschliessend die ausgefällten gelbroten Bleisalze abfiltriert. Das hellgelbe Filtrat dampfte man im Vakuum unter Einsaugen von ca. 200 ml Wasser auf 750 ml ein. Das rein wässrige Konzentrat wurde zuerst zweimal mit je 100 ml Chloroform und dann, nach Sättigen mit Butanol, 5mal mit Chloroform-Butanol-(7:3) ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung wurde verworfen. Die jeweils mit Wasser gewaschenen und über Na₂SO₄ getrockneten Auszüge lieferten nach dem Eindampfen 101 mg Chloroform-Extrakt und 1190 mg Chloroform-Butanol-Extrakt. Das extrahierte Drogenpulver wog nach dem Trocknen 422 g.

Dünnschichtchromatographische Bestimmungen (Kieselgel, Flm: Methylenchlorid-Methanol-Wasser 75:23:2) zeigten, dass die Glykoside fast ausschliesslich im Chloroform-Butanol-Extrakt vorlagen. Der Chloroformauszug wurde deshalb nicht weiter untersucht.

Das oben beschriebene Verfahren wurde in der «Pilot plant» mit 15 kg getrockneter Droge wiederholt, wobei rund 30 g Chloroform-Butanol-(7:3)-Extrakt anfielen. Der Extrakt zeigte im Dünnschichtchromatogramm die gleiche Glykosidzusammensetzung wie der im Laborversuch gewonnene Chloroform-Butanol-Auszug.

b) *Chromatographie des Chloroform-Butanol-Extraktes:* In eine Lösung von 10 g Glykosidfraktion in 20 ml Methanol wurden 20 g Kieselgel (MERCK, Korngrösse 0,05–0,2 mm) eingetragen.

Tabelle 2. Vortrennung der Rohglykoside (10 g)

Fr.	mg	Glykosidkomponenten
1–4	318	Aglykone + andere wenig polare Anteile
5–6	209	Proscillaridin A + unbekannte Begleitstoffe
7–9	422	Scillarenin-glucosid + unbekannte Begleitstoffe
10–12	819	Scillarenin-glucosid
13	255	Scillarenin-glucosid + Scillirosid
14–20	4348	Scillirosid + wenig unbekannte Begleitstoffe
21–26	1545	Scillaren A + stärker polare Anteile

⁵⁾ Die Bestimmung des HATCHER-Wertes wurde von Herrn Dr. W. SCHALCH in unserer medizinisch-biologischen Forschungsabteilung (Leitung Dr. A. CERLETTI) ausgeführt.

⁶⁾ Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt. Zur Messung der optischen Drehwerte wurden die Substanzen bei 80° im Hochvakuum getrocknet. Die Dünnschichtchromatogramme wurden auf Kieselgel-Platten ausgeführt und die Bufadienolid-Komponenten durch Besprühen mit einer 20-proz. Lösung von SbCl₃ in Chloroform oder mit einer 1-proz. Lösung von Cer-(IV)-ammoniumnitrat in 50-proz. Schwefelsäure und anschliessendes Erwärmen auf 90–100° sichtbar gemacht. Mit dem Cer-Reagens zeigt Scillirosid eine leuchtend gelbe Farbreaktion, Scilligluosid wird grünlich, Proscillaridin A, Scillaren A und das neue Glykosid V werden blau angefärbt. – Abkürzung: Flm = Fliessmittel.

Anschliessend verdampfte man das Lösungsmittel im Vakuum bei 60° und verbrachte das derart imprägnierte Pulver auf eine nach DUNCAN [12] bereitete Säule (Durchm. 45 mm) aus 400 g Kieselgel. Zur Elution dienten je 400 ml wassergesättigter Essigester + 5% Methanol; ab Fraktion 20 wurde der Methanolzusatz auf 10% erhöht. Die Glykosidkomponenten jeder Fraktion wurden im Dünnschichtchromatogramm bestimmt (Kieselgelplatten; Flm: Methylchlorid-Methanol-Wasser 75:23:2) (Tab. 2).

In gleicher Weise wurden noch zwei weitere Chromatographien mit je 10 g Glykosidfraktion ausgeführt. Die Fraktionen 10–12 der drei Chromatogramme wurden vereinigt und lieferten 2,66 g rohes Scillarenin-glycosid. Zweimalige Nachfraktionierung dieses Präparates an je 400 g Kieselgel ergaben schliesslich 1,74 g einheitliches Glykosid V; Ausbeute ca. 0,12⁰/₁₀₀ bezogen auf getrocknete Droge. – Scillarenin-β-D-glycosid kristallisierte aus Methanol-Wasser in feinen Prismen vom Smp. 179–186° oder aus abs. Alkohol in Prismen vom Smp. 208–212°; $[\alpha]_D^{20} = -54,2^\circ$ ($c = 0,508$ in Methanol). IR.- und UV.-Spektren: siehe theoretischer Teil. LIEBERMANN-Reaktion: rosa-lila-blau-blaugrün-grün.

$C_{30}H_{42}O_9, 0,5H_2O$ (555,66) Ber. C 64,9 H 7,8 O 27,4% Gef. C 65,0 H 7,6 O 27,9%

Nach dem Trocknen im Hochvakuum bei 120°:

$C_{30}H_{42}O_9$ (546,64) Ber. C 65,9 H 7,8 O 26,4% Gef. C 65,7 H 8,1 O 26,7%

Scillarenin-tetra-O-acetyl-β-D-glycosid (VI). Eine Lösung von 600 mg Scillarenin-glycosid (V) in 6 ml abs. Pyridin wurde mit 6 ml Essigsäureanhydrid versetzt und unter Feuchtigkeitsabschluss über Nacht stehengelassen. Nach Eindampfen der Lösungsmittel im Vakuum bei 60° wurde der Rückstand in Chloroform aufgenommen und der Reihe nach mit 2N Salzsäure, gesättigter KHCO₃-Lösung und Wasser ausgeschüttelt. Die über Na₂SO₄ getrocknete Chloroformphase lieferte 751 mg rohe Acetylverbindung, die durch Chromatographie an Aluminiumoxid gereinigt wurde. Das Spitzenpräparat (535 mg) kristallisierte aus Aceton-Äther in farblosen Nadeln vom Smp. 176–178°; $[\alpha]_D^{20} = -22,7^\circ$ ($c = 0,507$ in Chloroform).

$C_{38}H_{50}O_{13}$ (714,81) Ber. C 63,9 H 7,1 O 29,1% Gef. C 63,9 H 7,0 O 29,4%

Desacetylierung von VI: 200 mg kristallisiertes Tetraacetylglucosid VI wurden in 40 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 8 ml 2,5-proz. KHCO₃-Lösung 10 Tage bei 20° stehengelassen. Dann konzentrierte man die Lösung im Vakuum bei 40° Badtemperatur auf ca. 8 ml und schüttelte erschöpfend mit Chloroform-Isopropanol-(4:1) aus. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Man gewann 146 mg rohes Scillarenin-glycosid, das wie oben beschrieben durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt wurde. Das Spitzenpräparat (109 mg) kristallisierte aus Methanol-Wasser in farblosen Prismen vom Smp. 176–186°; $[\alpha]_D^{20} = -52,6^\circ$ ($c = 0,523$ in Methanol). Die Identität des Präparates mit Scillarenin-β-D-glycosid wurde durch Misch-Smp., Vergleich der IR.- und UV.-Spektren und durch das Verhalten im Dünnschichtchromatogramm gesichert.

Hydrolyse von Scillarenin-β-D-glycosid (V). – a) *Mit verdünnter Schwefelsäure*: Eine heisse Lösung von 250 mg Scillarenin-glycosid in 15 ml Methanol wurde mit 15 ml vorgewärmter Schwefelsäure versetzt. Aus der anfänglich klaren Hydrolysenlösung schieden sich beim Erhitzen unter Rückfluss sofort glitzernde Kristalle ab. Nach 20-minütigem Kochen verdünnte man mit 10 ml Wasser und engte dann die Reaktionslösung im Vakuum auf 15 ml ein. Die Aglykonfraktion wurde abfiltriert (155 mg) und das Filtrat mit Chloroform ausgeschüttelt. Aus den Chloroformauszügen gewann man noch weitere 10 mg rohes Aglykon. Die verbleibende saure wässrige Phase wurde zur Entfernung des Chloroforms im Vakuum konzentriert, mit Bariumcarbonat neutralisiert und nach Abfiltrieren der Bariumsalze eingedampft. Als Rückstand gewann man 102 mg farblosen Zuckersirup, der im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgelplatte; Flm: Chloroform-Alkohol 4:6, Sichtbarmachung mit Benzidin-Natriummetaperjodat-Reagens) die gleiche Laufstrecke wie D-Glucose zeigte.

Scillaridin A: 155 mg Aglykonfraktion lieferten aus abs. Alkohol farblose, stark lichtbrechende Prismen vom Smp. 226–248° (ab 210° Gelbfärbung); $[\alpha]_D^{20} = -63,5^\circ$ ($c = 0,473$ in Chloroform-Methanol 4:1).

$C_{24}H_{30}O_8$ (366,50) Ber. C 78,7 H 8,3 O 13,1% Gef. C 78,4 H 8,1 O 13,3%

Das Aglykon stimmte völlig mit Scillaridin A⁷⁾ überein. Vergleich der IR.-Spektren: Fig. 1. Dünnschichtchromatographie: Kieselgelplatten; Flm: Chloroform + 4% Methanol.

D-Glucose: 102 mg Zuckersirup wurden über P_2O_5 getrocknet und durch 20-stdg. Erwärmen mit 15 ml 1N methanolischer Salzsäure in das Methylglykosid übergeführt. Übliche Aufarbeitung lieferte 39 mg kristallisiertes α -Methyl-D-glucosid-(1,5) vom Smp. 167,5–168,5°; $[\alpha]_D^{20} = +164,9^\circ$ ($c = 0,543$ in Methanol).

b) *Mit Pilzferment*: 300 mg Scillarenin-glucosid, teilweise gelöst in 10 ml abs. Alkohol, wurden mit der Lösung von 600 mg käuflichem Pilzferment C 1290⁴⁾ in 200 ml 0,02M Acetatpuffer (pH = 4,9) versetzt und die Suspension 72 Std. bei 37° gerührt. Anschliessend schüttelte man die trübe, mit feinen Kristallen durchsetzte Lösung sechsmal mit je 20 ml Chloroform aus. Die mit Wasser gewaschenen und über Na_2SO_4 getrockneten Chloroformphasen lieferten nach dem Eindampfen 245 mg Aglykonfraktion. Die Fermentlösung wurde mit Butanol gesättigt und dreimal mit je 20 ml Chloroform-Butanol-(2:1) ausgezogen. Aus dem Chloroform-Butanol-Extrakt gewann man 8 mg amorphes Material. Die dünnschichtchromatographische Prüfung (Kieselgelplatten; Flm: Chloroform-Methanol-Wasser-70:25:5 oder Chloroform + 6% Methanol) zeigte, dass im Chloroformauszug ein Aglykon mit der Laufstrecke des Scillarenins (VIII) vorlag, während der Chloroform-Butanol-Extrakt ein Gemisch des Aglykons mit nicht umgesetztem Glykosid V bildete. Die Aglykonfraktion wurde zuerst an Aluminiumoxid und dann an Kieselgel chromatographiert und ergab 156 mg einheitliches Scillarenin (Spaltungsquote ca. 74% d. Th.). Aus Aceton charakteristische Polyeder vom Smp. 215–236°; $[\alpha]_D^{20} = -20,3^\circ$ ($c = 0,517$ in Methanol)⁸⁾. IR.-Spektrum: Fig. 2.

$C_{24}H_{32}O_4$ (384,50) Ber. C 75,0 H 8,4 O 16,7% Gef. C 74,8 H 8,1 O 16,6%

SUMMARY

The isolation of scillarenin- β -D-glucoside, a hitherto unknown glycoside from the red variety of squill (sea onion, *Scilla maritima* (BAKER) L.), is described. The structure of the new compound has been elucidated by acid hydrolysis to D-glucose and the anhydrogenin scillaridin (VII), and by enzymatic degradation to the true aglycone scillarenin (VIII).

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien
SANDOZ AG., Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 51. Mitt.: A. V. WARTBURG, *Helv.* **46**, 591 (1963).
- [2] A. STOLL & J. RENZ, *Helv.* **25**, 43 (1942).
- [3] E. ROTHLIN & W. SCHALCH, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **10**, 427 (1952).
- [4] A. STOLL, E. SUTER, W. KREIS, B. B. BUSSEMAKER & A. HOFMANN, *Helv.* **76**, 703 (1933); A. STOLL & W. KREIS, *Helv.* **34**, 1431 (1951).
- [5] A. STOLL, J. RENZ & A. BRACK, *Helv.* **35**, 1934 (1952).
- [6] A. STOLL, A. VON WARTBURG & J. RENZ, *Helv.* **36**, 1531 (1953).
- [7] A. VON WARTBURG & J. RENZ, *Helv.* **42**, 1620, 1643 (1959).
- [8] H. LICHTI & A. VON WARTBURG, *Helv.* **43**, 1666 (1960).
- [9] A. STOLL, J. RENZ & A. BRACK, *Helv.* **34**, 2301 (1951).
- [10] W. KLYNE, *Biochem. J.* **47**, XLI (1950).
- [11] L. F. FIESER & M. FIESER, *Steroids*, Reinhold Publishing Corp., New York (N.Y.) 1959, p. 799, 802; W. W. ZORBACH, S. SAEKI & W. BÜHLER, *J. medicinal Chemistry* **6**, 298 (1963).
- [12] G. R. DUNCAN, *J. Chromatography* **8**, 37 (1962).

7) STOLL und Mitarb. [4] gaben für Scillaridin A an: Smp. 245–250° (unscharf, ab 205° Gelbfärbung); $[\alpha]_D^{20} = -62,7^\circ$ in Chloroform-Methanol-4:1.

8) STOLL *et al.* [5] fanden für Scillarenin den Smp. 214–234°; $[\alpha]_D^{20} = -16,5^\circ$ in Methanol.