

- [6] R. A. BAXTER & F. S. SPRING, J. chem. Soc. 1945, 229; A. WAHL & M. DOLL, Bull. Soc. chim. France [4], 13, 468 (1913).
 [7] Vgl. G. M. BADGER & J. W. CLARK-LEWIS in P. DE MAYO (ed.), Molecular Rearrangements, Bd. I, S. 617, Interscience Publ., New York 1963.
 [8] H. DAHN & H. HAUTH, Helv. 42, 1214 (1959).
 [9] H. P. FISCHER, C. A. GROB & E. RENK, Helv. 45, 2539 (1962); A. HASSNER, W. A. WENTWORTH & I. H. POMERANTZ, J. org. Chemistry 28, 304 (1963).
 [10] A. HASSNER & I. H. POMERANTZ, J. org. Chemistry 27, 1760 (1962).
 [11] A. HASSNER & W. A. WENTWORTH, Chem. Comm. 1965, 44.
 [12] B. C. PLATT & T. M. SHARP, J. chem. Soc. 1948, 2129; F. J. WOLF, R. H. BEUTEL & J. R. STEVENS, J. Amer. chem. Soc. 70, 2572 (1948).
 [13] A. DORNOW & H. THEIDEL, Angew. Chem. 66, 605 (1954).
 [14] O. HINSBERG, Liebigs Ann. Chem. 292, 249 (1896).
 [15] A. WAHL, Bull. Soc. chim. France [3], 33, 486 (1905).
 [16] L. CLAISEN & J. SHADWELL, Ber. deutsch. chem. Ges. 11, 1563 (1878).

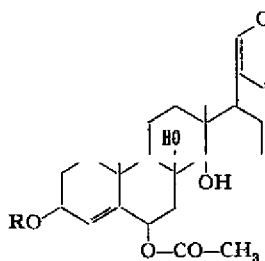
6. Die Herzglykoside der roten Meerzwiebel (*Scilla maritima*): Scillirubrosid

54. Mitteilung über Herzglykoside [1]

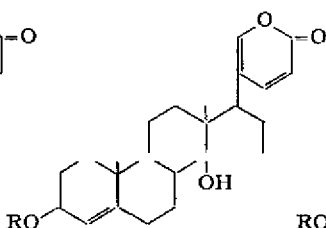
von **Albert von Wartburg**

(11. IX. 65)

Die rote und die weisse Varietät der Meerzwiebel, *Scilla* (= *Urginea*) *maritima* (BAKER L.), unterscheiden sich morphologisch geringfügig voneinander, differieren jedoch signifikant in der physiologischen Wirkung ihrer wichtigsten Inhaltsstoffe. Beide Drogen enthalten herzaktive Steroidglykoside vom Scilla-Bufo-Typ [2] [3] [4]; aber nur die rote Meerzwiebel zeigt die seit langem bekannte spezifische Toxizität der *Scilla* gegen Ratten und andere Nagetiere [2] [5]. Als Träger dieser Wirkung konnte das Scillirosid (I), das Hauptglykosid der roten Varietät, erkannt werden [5]. Seine Begleiter, Scillaren A (IV) [2] (= Hauptglykosid der weissen Varietät [4]), Scilliglaukosid (V) [2] und Scillarenin- β -D-glucosid (II) [3], sowie die übrigen bekannten



I (R = Glucose)
Scillirosid [6]



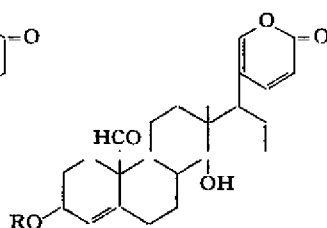
II (R = Glucose)
Scillarenin- β -D-glucosid [3]

III (R = Rhamnose)

Proscillaridin [7]

IV (R = Scillabiose)

Scillaren A [7]



V (R = Glucose)
Scilliglaukosid [8]
(= Scillaren F)

Scillaglykoside aus der weissen Meerzwiebel [4] sind zwar cardiotonisch hochaktiv, besitzen aber keine rattiziden Eigenschaften. Die spezifisch konvulsive Wirkung des Scillirosids steht somit in keiner direkten Beziehung zu seiner Herzaktivität, sondern muss auf besonderen Eigenarten seines chemischen Baus beruhen. Aus den Konstitutionsformeln I–V geht hervor, dass Scillirosid im Vergleich zu den andern Scillaglykosiden zwei zusätzliche Strukturelemente enthält, nämlich an C-8 eine weitere tertiäre Alkoholfunktion und eine Acetoxygruppe an C-6 [6]. Es ist zu vermuten, dass diese charakteristischen Substituenten die rattiziden Eigenschaften des Scillirosids bedingen [9].

Wir berichten im folgenden über die Isolierung und Konstitutionsermittlung eines weiteren Nebenglykosids aus der roten Meerzwiebel. Diese neue Komponente, die wir als Scillirubrosid (VI) bezeichnen, nimmt strukturell eine Mittelstellung zwischen Scillirosid (I) und den Scillarenin-Glykosiden (II–IV) ein. Das Verhalten des Scillirubrosids bei der orientierenden pharmakologischen Prüfung lieferte ergänzende Informationen über die oben diskutierten Struktur-Wirkungsbeziehungen.

Isolierung von Scillirubrosid. 65 kg getrocknete rote Meerzwiebeln wurden nach früheren Angaben [3] mit Methanol extrahiert und die vereinigten Methanolauszüge einer Bleifällung unterzogen. Der von den Bleisalzen geklärte Extrakt wurde durch Einengen im Vakuum unter Einsaugen von Wasser vom Methanol befreit und das anfallende wässrige Konzentrat der Reihe nach mit Chloroform, Chloroform-Butanol-(9:1), Chloroform-Butanol-(7:3) und reinem Butanol ausgeschüttelt. Die Analyse der einzelnen Extrakte mittels Dünnschichtchromatographie zeigte, dass die Glykoside zur Hauptsache in den Chloroform-Butanol-Auszügen vorlagen. Neben noch unbekanntem Stoffen liessen sich hier Proscillaridin A (III), Scillirosid (I), Scillarenin- β -D-glucosid (II), Scilliglaucosid (V), Scillaren A (IV) und das neue Glykosid VI erkennen. Scillirubrosid (VI), das eine *minim* kürzere Laufstrecke als Scillarenin-glucosid (II) besitzt, erzeugt mit Cer(IV)-Reagens (s. exp. Teil) eine beständige Blaufärbung¹⁾ und hebt sich dadurch deutlich von den übrigen Glykosiden ab.

Im Chloroform-Auszug konnten mindestens 16 verschiedene Stoffe²⁾ nachgewiesen werden, von denen lediglich Proscillaridin A in Substanz isoliert und eindeutig identifiziert wurde.

Der Butanol-Auszug, der nur geringe Mengen Scillaren A und ein unbekanntes, stärker polares Glykosid enthielt, wurde vorläufig nicht weiter untersucht.

Die präparative Isolierung der Glykoside erfolgte wie früher [3] durch Chromatographie der rohen Extrakte an Kieselgel, wobei in diesem Fall wassergesättigte Chloroform-Methanol-Gemische³⁾ als Elutionsmittel dienten.

Die Fraktionierung, die laufend dünnschichtchromatographisch verfolgt wurde, ergab zunächst eine Vortrennung der Rohglykoside in unpolare Anteile, reines Scillirosid (I), Mischfraktionen von II + VI und stärker polare Anteile (V, IV und unbe-

¹⁾ Im Gegensatz zu den Scillarenin-Glykosiden II–IV, die mit Cer-Reagens ebenfalls eine anfänglich blaue, später aber in lila übergehende Farbreaktion zeigen, bleibt beim Scillirubrosid die blaue Färbung über längere Zeit erhalten.

²⁾ Darunter finden sich die Aglykone Scillarenin, Scillirosidin und Scilliglaucosidin.

³⁾ Mit diesem System werden die Glykoside in einer andern Reihenfolge eluiert als mit dem früher [3] verwendeten Gemisch wassergesätt. Essigester + 5% Methanol (vgl. exp. Teil).

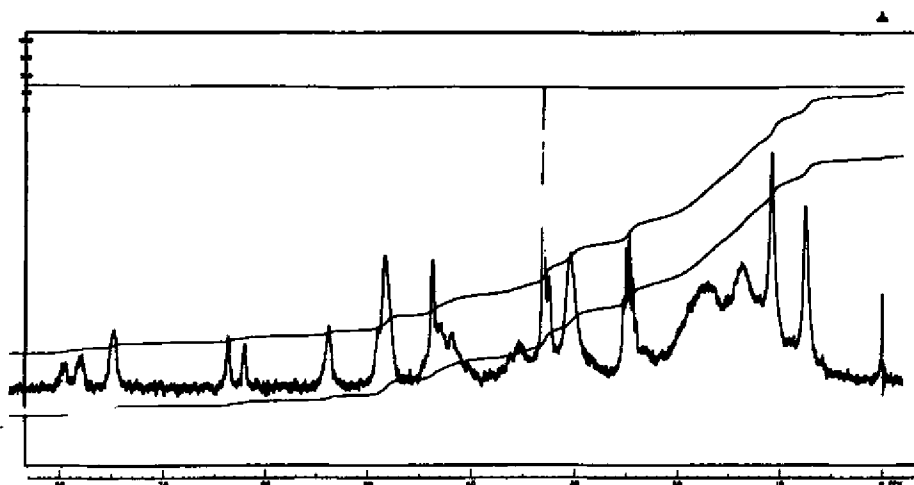
Tabelle 1. Ausbeuten an Reinstoffen (bez. auf getrocknete Droge)

Glykoside	aus Chf-BLN- 9:1-Extrakt	aus Chf-BLN- 7:3-Extrakt	Totalausbeute
Scillirosid (I)	84,8 g	18,6 g	103,4 = 0,159%
Scillarenin- β -D-glucosid (II)	11,3 g	5,8 g	17,1 = 0,0263%
Scillirubrosid (VI)	3,5 g	2,7 g	6,2 = 0,0095%
Scilliglaucosid (V)	- ⁴⁾	0,3 g	- ⁴⁾

kannte Stoffe). Mehrfache, systematische Nachchromatographien der einzelnen Glykosidkomplexe lieferten schliesslich die in der Tab. 1 aufgeführten Reinpräparate.

Die diesjährige Droge (Ernte 1964) lieferte rund doppelt soviel Scillarenin- β -D-glucosid (II) als die früher verwendete Charge (Ernte 1963) [3]; der Gehalt an Scilliglaucosid war wiederum sehr gering [2] [3].

Konstitution des Scillirubrosids. Scillirubrosid kristallisiert aus Methanol in farblosen Nadeln vom Smp. 200–207°, $[\alpha]_D^{20} = -40,3^\circ$ (in Methanol), und besitzt nach den Elementaranalysen und dem NMR.-Spektrum (Fig. 1) die Bruttoformel $C_{30}H_{42}O_{10}$. Das Glykosid zeigt im UV. das charakteristische Absorptionsmaximum des doppelt ungesättigten Lacton-Sechsrings bei 298 nm ($\log \epsilon = 3,72$) und im IR. entsprechende Banden bei 1710, 1632 und 1540 cm^{-1} (Fig. 2). Im NMR.-Spektrum (Fig. 1) sind bei 0,73 und 1,07 ppm (je 3H) die Singlette von 2 angulären Methylgruppen und bei 5,37 ppm (1 H) das Signal eines Vinylprotons einer tentativ an C-4 formulierten Doppelbindung zu erkennen. Leicht aufgespaltene Dublette bei 7,87 ppm (1 H; $J = 10$ cps bzw. 2 cps) und 6,27 ppm (1 H; $J = 10$ cps) sowie ein ebenfalls schwach gespal-

Fig. 1. NMR.-Spektrum von Scillirubrosid⁵⁾

⁴⁾ Auf die quantitative Isolierung von Scilliglaucosid und Scillaren A wurde verzichtet.

⁵⁾ Die NMR.-Spektrn wurden in Dimethylsulfoxid mit einem VARIAN-Spektrographen Mod. A 60 bei 60 Megahertz und einer Feldänderungsgeschwindigkeit von 1 Hz/s gemessen. Die Lage der Signale ist in δ -Werten (ppm) angegeben. Als internes Bezugssignal diente Tetramethylsilan ($\delta = 0$).

enes Singlett bei 7,46 ppm (1 H; $J = 2$ cps) sind den Protonen an C-22, C-23 und C-21 des Lactonringes zuzuordnen.

Scillirubrosid reagierte mit Acetanhydrid in Pyridin zum kristallisierten Tetra-O-acetylderivat $C_{38}H_{50}O_{14}$ (VII). Die Zahl der Acetylreste liess sich durch 4 NMR.-Signale im Gebiet von 2,0–2,1 ppm (entspr. je 3 H) festlegen. Der glykosidische Bau des Scillirubrosids wurde durch die hydrolytische Spaltung bestätigt: Eine orientierende saure Hydrolyse lieferte ein Aglykongemisch und eine einheitliche Zuckerkomponente, die durch dünn- und papierchromatographische Vergleiche sowie durch Überführung in α -Methyl-D-glucopyranosid als *D-Glucose* identifiziert wurde. Aus der Aglykonfraktion liess sich nach mehrfacher Chromatographie in schlechter

IR.-Absorptionsspektren

(auf einem PERKIN-ELMER-IR.-Spektrometer, Mod. 21, aufgenommen)

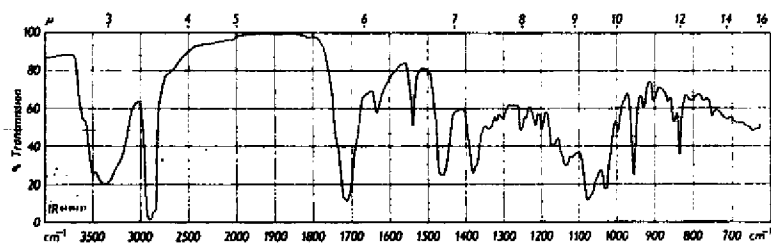


Fig. 2. Scillirubrosid VI (in Nujol)

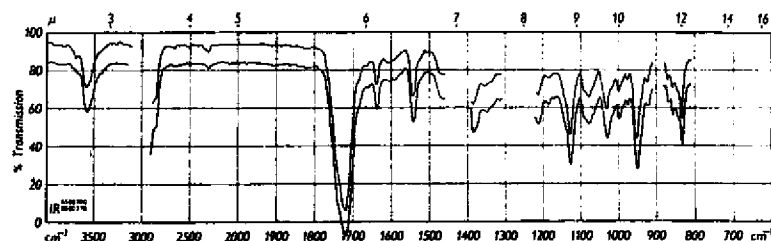


Fig. 3. Scillirubrosidin IX (in CH_2Cl_2); obere Kurve: aus VI; untere Kurve: aus XI

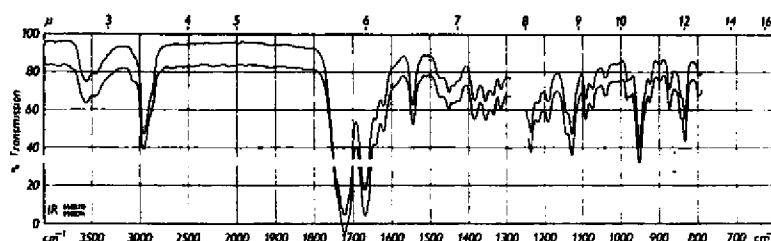
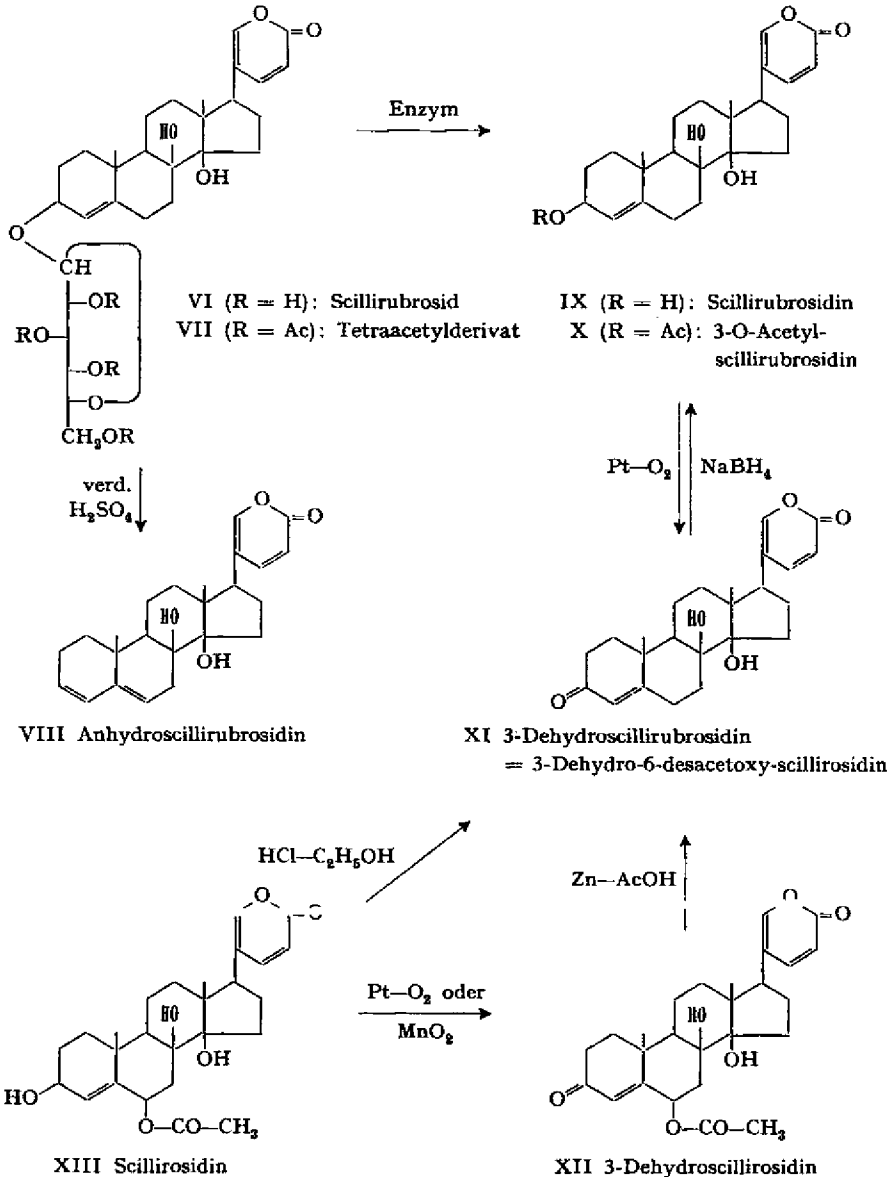


Fig. 4. 3-Dehydroscillirubrosidin XI = 3-Dehydro-6-desacetoxy-scillirosidin (in CH_2Cl_2)
obere Kurve: aus IX; untere Kurve: aus XII

^{b)} Dieses β -Glucosiden hochaktive Pilzferment (Präparat C 1290) erhielten wir vor Jahren ohne Provenienzangaben von der Firma LAB. DR. WEBER, Küsnacht-Zürich. Das Präparat ergab z. B. die folgenden Spaltungsquoten: beim Scillirosid ca. 100%, beim Altosid 81%, beim Scillarenin- β -D-glucosid 74% [3].

Ausbeute ein Anhydrogenin VIII vom Smp. 188–199° isolieren. VIII besass in den üblichen Lösungsmittelsystemen gleiche oder sehr ähnliche Laufstrecken wie Scillaridin A, war jedoch durch seine blaue Farbreaktion mit Cer(IV)-Reagens leicht unterscheidbar. Im UV.-Spektrum zeigte das Anhydrogenin VIII Maxima bei 226, 233 und 299 nm und dürfte demnach wie Scillaridin A konjugierte Doppelbindungen an C-3, C-5 aufweisen. Der Verlauf der sauren Spaltung bildete eine erste Bestätigung für die an C-4 vermutete Doppelbindung im Scillirubrosid (VI).



Die weiteren Versuche zur Spaltung des Scillirubrosids (VI) wurden mit dem schon früher bei andern Scillaglykosiden erfolgreich eingesetzten Pilzferment C-1290⁶) vorgenommen. Das Fermentpräparat bewirkte beim Scillirubrosid eine einheitlich verlaufende Hydrolyse zum intakten Aglykon. Scillirubrosidin (IX) kristallisierte in farblosen Klötzen vom Smp. 194–198°; $[\alpha]_D^{20} = -8,6^\circ$ (in Methanol). Im UV.-Spektrum von IX ist lediglich ein Maximum bei 298 nm festzustellen, das dem Lactonring zukommt; die entsprechenden IR.-Banden liegen bei 1710, 1632, 1540 cm^{-1} (Fig. 3).

Die Integration des NMR.-Spektrums von Scillirubrosidin (Fig. 5) ergab 32 Protonen, entsprechend der durch Elementaranalysen abgeleiteten Bruttoformel $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{O}_5$. Auffallend sind die Signale des α -Pyroneing (7,54; 7,92 und 6,33 ppm), das Singlett des an C-4 postulierten Vinylprotons (5,27 ppm), die Singlette der beiden angulären Methylgruppen (1,12 und 0,78 ppm) sowie das Multiplett des Protons an C-3 (3,98 ppm). Neue Informationen zur Konstitution des Scillirubrosidins lieferten die beiden Singlette bei 4,39 ppm (1 H) und 3,28 ppm (1 H) sowie das Dublett bei 4,54 ppm (1 H, $J = 6$ cps). Diese Signale entsprechen den Protonen von drei OH-Gruppen, da sie nach Zusatz von D_2O verschwinden; ein in VI zuerst vermutetes Methinproton eines Epoxidringes liegt nicht vor. Die drei Alkoholreaktionen des Scillirubrosidins liessen sich durch Acetylierungs- und Dehydrierungsreaktionen nähr charakterisieren. So lieferte der Umsatz von IX mit Essigsäureanhydrid in Pyridin

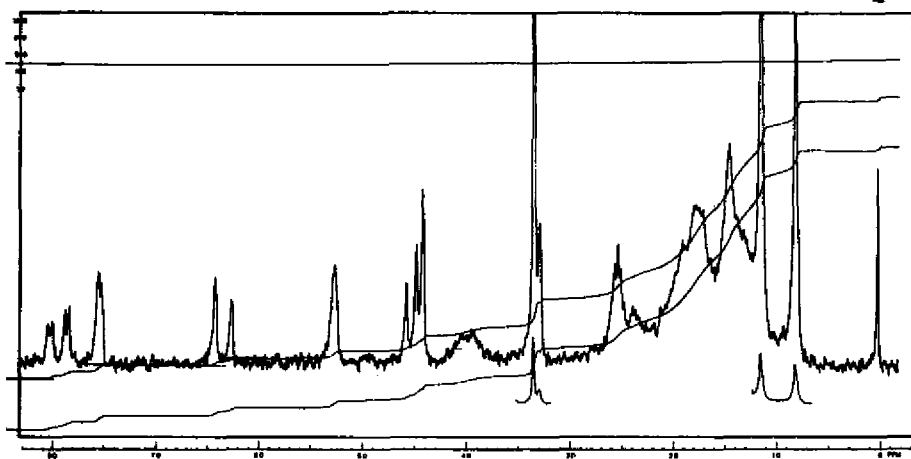


Fig. 5. NMR.-Spektrum von Scillirubrosidin (IX)⁶)

ausschliesslich das 3-Monoacetylderivat $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_6$ (X); in Übereinstimmung mit den NMR.-Befunden liegen die beiden nicht acylierbaren OH-Gruppen in tertiären Bindungen vor. Die Dehydrierung des Scillirubrosidins (IX) mit Sauerstoff und Platin-katalysator führte zum 3-Dehydroscillirubrosidin XI. Dieses 3-Keto- A^4 -Derivat (Smp. 252–257°; $[\alpha]_D^{20} = +70^\circ$ in Chloroform) zeigte im UV. zwei typische Maxima bei 241 bzw. 299 nm und stimmte in allen Eigenschaften mit dem bekannten 3-Dehydro-6-desacetoxy-scillirosidin (XI) überein (Vergleich der IR.-Spektren, Fig. 4). XI war früher durch Hydrogenolyse von 3-Dehydroscillirosidin (XII) oder direkt aus Scillirosidin (XIII) mittels der für En-1,4-diole charakteristischen Umlagerung mit abs.

alkoholischer Salzsäure erhalten worden [6]. Durch die Verknüpfung von IX mit XII bzw. XIII ist die Lage sämtlicher Sauerstoff-Funktionen des Scillirubrosids bestimmt; die beiden tertiären OH-Gruppen liegen als $8\beta, 14\beta$ -Glykol vor. Auch die vermutete β -Konfiguration der sekundären OH-Gruppe an C-3 liess sich beweisen. Durch Reduktion der 3-Dehydroverbindung XI mit NaBH_4 in Dioxan-Wasser bildet sich nämlich in guter Ausbeute Scillirubrosidin (IX) zurück (Vergleich der IR.-Spektren, Fig. 3). Da allgemein 3-Keto- Δ^4 -sterioide mit NaBH_4 vorzugsweise die entsprechenden 3β -Hydroxy- Δ^4 -Derivate liefern [10], sind damit die Stereochemie an C-3 und die postulierte Lage der isolierten Doppelbindung im Scillirubrosidin fixiert worden. Scillirubrosidin besitzt die Formel IX und kann demnach auch als 6-Desacetoxy-scilliro-sidin bzw. als 8β -Hydroxy-scillarenin bezeichnet werden.

Nach der Charakterisierung der hydrolytischen Spaltprodukte war jetzt noch die räumliche Anordnung der Glucosebindung im Scillirubrosid (VI) abzuleiten⁷⁾. Die in Herzglykosiden übliche β -Konfiguration liegt auch beim Scillirubrosid vor, wie aus der leicht verlaufenden enzymatischen Hydrolyse mit dem Pilzferment C-1290 zu schliessen ist; dieses Pilzferment vermag, nach unseren bisherigen Versuchen, nur β -Glucoside zu spalten. Für die β -glykosidische Zuckerverknüpfung sprach auch der nach KLYNE [11] berechnete Drehungsbeitrag der D-Glucose in VI ($\Delta C = -189^\circ$ in Methanol).

Mit den beschriebenen Experimenten und Ableitungen ist die Konstitution des Scillirubrosids im Sinne der Formel VI gesichert.

*Pharmakologische Befunde*⁸⁾. Scillirubrosid (VI) und sein Aglykon IX erwiesen sich an der Katze erwartungsgemäss als herzaktiv, wirkten jedoch im Vergleich zu anderen Scillaglykosiden etwas schwächer (Tab. 2).

Tabelle 2. *Toxizität von Scillastoffen*

Scilladienolide	LD nach HATCHER
Scillirubrosid (VI)	0,180 mg/kg
Scillirubrosidin (IX)	0,495 mg/kg
Scillirosid (I) [12]	0,120 mg/kg
Scillirosidin (XIII) [12]	0,057 mg/kg
Scillarenin- β -D-glucosid (II) [3]	0,112 mg/kg
Scillarenin [7]	0,125 mg/kg
Scilliglaucosid (V) [8]	0,069 mg/kg
Scilliglaucosidin [8]	0,064 mg/kg

Im akuten Toxizitätsversuch an weiblichen Ratten⁹⁾ erwiesen sich Scillirubrosid rund 350mal Scillirubrosidin 500mal weniger giftig als Scillirosid bzw. Scillirosidin. Eine ähnlich geringe Toxizität gegen Ratten wie VI und IX zeigt auch Scillaren A [5].

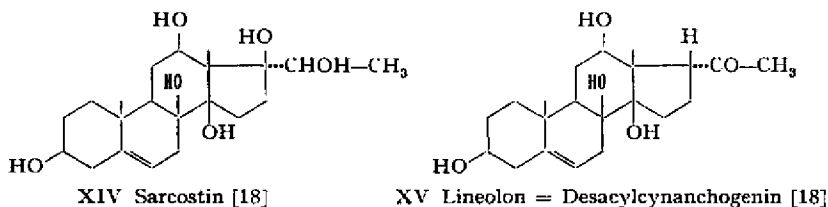
⁷⁾ Die bei Herzglykosiden übliche Lage der Zuckerkomponente am C-3-Hydroxyl des Aglykons ergab sich aus der Bildung des oben erwähnten Tetracetylderivates VII; bei einer an sich möglichen Verknüpfung des Glucoserestes an einem der beiden Glykolhydroxyle wäre die Bildung einer Pentaacetylverbindung zu erwarten.

⁸⁾ Die pharmakologischen Versuche wurden von Herrn Dr. J. GRAUWILER in unserer medizinisch-biologischen Forschungsabteilung (Leitung: Dr. A. CERLETTI) ausgeführt.

⁹⁾ Je 10 Tiere im Gewicht von 135–200 g. Applikation einer 0,1-proz. und einer 1-proz. Suspension in Gelatine (2%) mit der Schlundsonde.

Aus diesen pharmakologischen Befunden geht hervor, dass die 6 β -Acetoxygruppe des Scillirosids (I) ein für seine spezifisch rattizide Wirkung ausschlaggebendes Strukturelement darstellt.

Zur Biogenese der Scillaglykoside. Bei der strukturellen Ähnlichkeit des Scillirubrosids (VI) mit Scillirosid (I) und den Scillarenin-Glykosiden (II-IV) liegt es nahe, zwischen diesen Naturstoffen eine direkte biogenetische Beziehung zu suchen. So ist z. B. die Bildung des Scillirosids nach der Reaktionsfolge II \rightarrow VI \rightarrow I denkbar. Nachdem SIPERSTEIN, MURRAY & TITUS [13] die Entstehung der Krötengifte Marinobufagin und Marinobufotoxin (in *Bufo marinus*) aus Cholesterol gezeigt haben, ist für die pflanzlichen Bufadienolide (Scilladienolide) eine analog verlaufende Biosynthese anzunehmen. Als geeignete Abbauprodukte der Pflanzensterine und Vorläufer der Scillastoffe kommen prinzipiell sowohl C₂₄-Steroide (Gallensäurederivate) als auch C₂₁-Steroide (die Vorstufen der Cardenolide) in Betracht. TSCHESCHE & BRASSET [14] zeigten kürzlich, dass die Pflanze den Weg über Pregnane benützt, wie aus der Synthese von radioaktivem Hellebrin nach Applikation von [21-¹⁴C]- Δ^5 -Pregnen-3 β -ol-20-on-glucosid in *Helleborus atrorubens* hervorgeht. Die bei den Cardenoliden diskutierten pflanzlichen Pregnanverbindungen [15] [16] kommen somit auch als Vorläufer der Scillaglykoside in Frage. Unter den zahlreichen aus Scrophulariaceen (Digitalis-Arten) und Asclepiadaceen isolierten Pregnanderivaten [16] [17] beanspruchen Sarcostin (XIV) [18] und Lineolon (XV) [18] unser besonderes Interesse, da sie wie Scillirosidin (XIII) und Scillirubrosidin (IX) eine 8 β ,14 β -Glykolgruppierung enthalten; möglicherweise werden die Stoffe IX, XIII, XIV und XV aus einem gemeinsamen C₂₁-Vorläufer gebildet.



Experimenteller Teil¹⁰⁾

unter Mitarbeit von S. Wagner und A. Nussbaumer

1. Isolierung der Glykoside. - a) *Extraktion der Droge:* 65 kg getrocknete und zerkleinerte Meerzwiebeln wurden erschöpfend mit Methanol extrahiert. Die vereinigten Methanolauszüge engte man im Vakuum auf ca. 15 l ein, versetzte mit dem gleichen Volumen Wasser und führte dann nach früheren Angaben [3] eine Fällung mit Bleiacetat durch. Nach Entfernen der gelbroten Bleisalze wurde das wässrig-methanolische Filtrat im Vakuum unter Einsaugen von Wasser auf ca. 7 l eingedampft. Das rein wässrige Filtrat schüttelte man der Reihe nach je 5mal mit je 750 ml Chloroform, Chloroform-Butanol-(9:1), Chloroform-Butanol-(7:3) und zum Schluss noch mit 1,5 l reinem Butanol aus. Die jeweils über Na₂SO₄ getrockneten Auszüge lieferten nach dem

¹⁰⁾ Alle Smp. sind auf dem KOFLER-Block bestimmt. Zur Messung der optischen Drehwerte wurden die Substanzproben bei 80° im Hochvakuum getrocknet. Die Dünnschichtchromatographien wurden auf Kieselgel-Platten ausgeführt, wobei als Fließmittel Chloroform-Methanol-Wasser-(70:25:5) oder Methylenchlorid-Methanol-Wasser-(75:23:2) dienten. Die Sichtbarmachung der Scillaglykoside erfolgte durch Besprühen der Platten mit einer 1-proz. Lösung von Cer(IV)-ammoniumnitrat in 50-proz. Schwefelsäure und anschließendes Erwärmen auf 90-100°.

Eindampfen: 9,5 g Chloroform-Extrakt; 161,8 g Chloroform-Butanol-(9:1)-Extrakt; 79,4 g Chloroform-Butanol-(7:3)-Extrakt; 21,9 g Butanol-Extrakt.

Die Dünnschichtchromatographie zeigte, dass die Scillaglykoside fast ausschliesslich in den beiden Chloroform-Butanol-Extrakten vorlagen. Der Chloroform-Extrakt enthielt ca. 1 Dutzend unbekannte Spurenstoffe und die Aglykone Scillarenin, Scillirosidin und Scilliglaucosidin, sowie Proscillaridin A und sehr wenig Scillirosid. Im Butanol-Extrakt liessen sich geringe Mengen Scillarenin A und ein stärker polares, noch unbekanntes Glykosid nachweisen.

b) *Aufarbeitung des Chloroform-Extraktes*: Der Extrakt wurde in 50 ml eines Gemisches von Essigester mit 3% Methanol gelöst und auf eine nach DUNCAN [19] präparierte Säule aus 500 g Kieselgel (MERCK, Korngrösse 0,05–0,2 mm) aufgezogen. Die Elution erfolgte mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch in Fraktionen à 500 ml. Über den Trennverlauf orientiert Tab. 3.

Die Proscillaridin-A-haltigen Fraktionen 10–14 wurden an 400 g Kieselgel nachchromatographiert, wobei als Elutionsmittel ein Gemisch von Chloroform-Methanol-Wasser-(60:6:0,5) verwendet wurde. Dabei konnte eine einheitliche Proscillaridin-A-Fraktion abgetrennt werden, die aus Methanol farblose Kristalle vom Smp. 219–232° lieferte (siehe unten). Die restlichen Fraktionen der beiden Chromatogramme wurden nicht weiter untersucht.

Tabelle 3. *Isolierung von Proscillaridin A*

Fr. Nr.	mg	Komponenten
1	125	Ballaststoffe
2	1780	unbekannte Stoffe + Scillarenin
3	2695	unbekannte Stoffe + Scillirosidin
4	860	Scillirosidin + unbekanntes Aglykon
5	394	unbekannte Stoffe
6–9	913	unbekanntes Aglykon + Scilliglaucosidin
10–14	614	Proscillaridin A + unbekannte Stoffe
15–20	315	unbekannte Stoffe + Scillirosid
21	1018	unbekannte Stoffe

c) *Aufarbeitung des Chloroform-Butanol-(9:1)-Extraktes*: Zur Vortrennung wurde der Extrakt zunächst an grobkörnigem Kieselgel chromatographiert: In eine Lösung von 10 g Extrakt in 20 ml Methanol rührte man 20 g Kieselgel ein und verdampfte dann das Lösungsmittel im Vakuum. Mit dem derart imprägnierten Pulver beschickte man eine Säule aus 500 g grobem Kieselgel (MERCK, Korngrösse 0,2–0,5 mm). Im Unterschied zu den früheren Angaben [3] wurde im vorliegenden Fall ein Gemisch von Chloroform-Methanol-Wasser-(60:6:0,5) zur Elution verwendet. Die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen (je 500 ml Eluat) wurde wiederum mittels Dünnschichtchromatographie ermittelt. Über den Trennverlauf an insgesamt 16 Säulen orientiert Tab. 4.

Tabelle 4. *Vortrennung des Chloroform-Butanol-(9:1)-Extraktes*

Fr. Nr.	g	Glykosidkomponenten
1–3	1,5	unpolare Anteile, Aglykone
4–6	7,5	Proscillaridin, Scillirosid
7–10	71,6	reines Scillirosid
11–12	16,4	Scillirosid, Scillarenin-glucosid
13–18	16,3	wenig Scillirosid, Scillarenin-glucosid, Scillirubrosid
19–23	3,4	Scillarenin-glucosid, Scillirubrosid, Scilliglaucosid
24	32,7	Scilliglaucosid, Scillarenin A und stärker polare Anteile

Die Fraktionen 1–6 und Fraktion 24 wurden nicht weiter aufgearbeitet. Die auf Scillirosid (Fr. 7–10) folgenden Fraktionen 11–12 wurden mehrmals an Kieselgel mit Chloroform-Methanol-Wasser-Gemisch (60:6:0,5) nachchromatographiert. Dabei liessen sich weitere 10,2 g einheitliches Scillirosid abtrennen, sowie 4,7 g einer Mischfraktion aus Scillarenin- β -D-glucosid und Scillirubrosid gewinnen. 1,3 g Mischfraktion gleicher Zusammensetzung ergab die Nachchromatographie der Fr. 19–23. Zusammen mit Fr. 13–18 lagen somit 22,3 g eines Gemisches aus Scillarenin- β -D-glucosid und Scillirubrosid vor. Dieses Material wurde in zwei Portionen an je 500 g feinkörnigem Kieselgel (Korngrösse 0,05–0,2 mm) mit Chloroform + 10% Methanol, wassergesättigt, chromatographiert, wobei sich folgende Auftrennung ergab (Tab. 5).

Tabelle 5. *Auftrennung der Mischfraktionen*

Fr. Nr.	g	Glykosidkomponenten
1–5	0,165	unpolare Anteile, Ballaststoffe (verworfen)
6–7	1,536	Scillirosid
8–9	3,767	Scillirosid + Scillarenin-glucosid
10–12	12,427	Scillarenin-glucosid + wenig Scillirubrosid
13–23	4,453	Scillirubrosid + wenig Scillarenin-glucosid
24	0,716	Scilligliancosid + polare Anteile (verworfen)

Mehrfache Nachchromatographie der einzelnen Mischfraktionen und sinngemässe Kombination der angereicherten Präparate lieferten schliesslich aus dem Chloroform-Butanol-(9:1)-Extrakt folgende Ausbeuten an Reinstoffen: 84,8 g Scillirosid, 11,3 g Scillarenin- β -D-glucosid sowie 3,5 g Scillirubrosid.

d) *Auftrennung des Chloroform-Butanol-(7:3)-Extraktes*: Die Aufarbeitung erfolgte in der oben beschriebenen Weise durch systematische Chromatographie an grobkörnigem und an feinkörnigem Kieselgel unter dünnschichtchromatographischer Kontrolle. Die Ausbeuten an Reinglykosiden betragen: 18,6 g Scillirosid, 5,8 g Scillarenin- β -D-glucosid, 2,7 g Scillirubrosid, 0,3 g Scilligliaucosid, sowie 7,2 g eines Gemisches aus Scilligliaucosid, Scillarenin A und stärker polaren Anteilen.

2. Beschreibung der isolierten Reinglykoside. – a) *Proscillaridin A (III)*. Das aus dem Chloroform-Extrakt gewonnene Rohkristallisat wurde zweimal aus Methanol umkristallisiert und lieferte farblose Prismen vom Smp. 219–232°; $[\alpha]_D^{20} = -92,9^\circ$ ($c = 0,501$ in Methanol) [4]. Die Identifizierung erfolgte durch Misch-Smp., Farbreaktionen, Vergleich des IR.-Spektrums und der Laufstrecken im Dünnschichtchromatogramm.

b) *Scillirosid (I)*. Aus Methanol-Wasser farblose Blättchen vom Smp. 169–171°; $[\alpha]_D^{20} = -58,4^\circ$ ($c = 0,488$ in Methanol) [2]. Identifizierung nach Misch-Smp., IR.-Spektrum, Dünnschichtchromatographie und Farbreaktionen.

c) *Scillarenin- β -D-glucosid (II)*. Aus Methanol farblose, feine Nadeln vom Smp. 188–191°; aus abs. Alkohol Prismen vom Smp. 188–222°; $[\alpha]_D^{20} = -50,2^\circ$ ($c = 0,508$ in Methanol) [3]. Das Präparat wurde durch Vergleich des IR.-Spektrums sowie durch Misch-Smp., Rf-Werte und Farbreaktionen identifiziert.

d) *Scilligliaucosid (V)*. Das aus dem Chloroform-Butanol-(7:3)-Extrakt erhaltene Rohprodukt (0,3 g) wurde erneut an Kieselgel chromatographiert. Die mit Chloroform-Methanol-Wasser-(60:6:0,5) eluierten Spitzenfraktionen lieferten aus Methanol 55 mg farblose, zu Büscheln angeordnete Prismen vom Smp. 165–167°; $[\alpha]_D^{20} = +108,7^\circ$ ($c = 0,543$ in Methanol) [4]. Das IR.-Spektrum, die Laufstrecken und Farbreaktionen in den Dünnschichtchromatogrammen stimmten mit den entsprechenden Daten eines Testpräparates überein.

e) *Scillirubrosid (VI)*. 6,2 g Rohkristallisat wurden zweimal aus Methanol umkristallisiert. Feine, farblose Nadeln vom Smp. 200–207°; $[\alpha]_D^{20} = -40,2^\circ$ ($c = 0,521$ in Methanol). IR.-Spektrum: Fig. 2; UV.-Spektrum in Methanol: $\lambda_{max} = 298$ nm ($\log \epsilon = 3,72$); NMR.-Spektrum: Fig. 1. LIEBERMANN-Reaktion: rosa-lila-blau-blaugrün.

$C_{30}H_{48}O_{10}$ (562,64) Ber. C 64,0 H 7,5 O 28,4% Gef. C 64,2 H 7,8 O 28,4%

3. Reaktionen des Scillirubrosids. – *Tetra-O-acetyl-scillirubrosid (VII)*: Eine Lösung von 100 mg Scillirubrosid (VI) in 1 ml abs. Pyridin und 1 ml Essigsäureanhydrid wurde 17 Std. bei 20° stehengelassen. Man verdampfte die Lösungsmittel im Vakuum, nahm den Rückstand in Chloroform auf und schüttelte mit 2N Salzsäure, gesättigter KHCO_3 -Lösung und Wasser aus. Die Chloroformphase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Das anfallende rohe Acetat chromatographierte man an neutralem Aluminiumoxid und kristallisierte die dünn-schichtchromatographisch einheitlichen Spitzenfraktionen aus Methanol-Äther-Pentan. Ausbeute ca. 50 mg farblose Kristalle vom Smp. 163–167°; $[\alpha]_D^{20} = -12,3^\circ$ ($c = 0,619$ in Chloroform). IR.-Spektrum in CH_2Cl_2 : 3700, 3550 (OH), 1755, 1230 (Acetat), 1720, 1640, 1606, 1542 (Lacton-Sechsring) cm^{-1} .

$\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_{14}$ (730,80) Ber. C 62,5 H 6,9 O 30,7% Gef. C 62,4 H 6,9 O 31,0%

Hydrolyse von Scillirubrosid (VI). – a) *Mit verdünnter Schwefelsäure*: Eine Lösung von 200 mg Scillirubrosid (VI) in 12 ml Methanol wurde mit 12 ml 2N H_2SO_4 auf dem Dampfbad erwärmt. Nach 5 Min. begann die Abscheidung farbloser Kristalle. Nach 20minütiger Reaktionszeit verdünnte man mit 10 ml Wasser und engte im Vakuum auf 15 ml ein. Das auskristallisierte Aglykongemisch wurde an Kieselgel chromatographiert und lieferte 60 mg Spitzenfraktion, die dünn-schichtchromatographisch noch nicht völlig einheitlich war. Mehrfache Umkristallisation aus Alkohol lieferte 18 mg farbloses *Anhydroaglykon VIII* vom Smp. 188–198°. UV.-Spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 226$; 233,5 und 299 nm ($\log \epsilon = 4,31$; 4,30 und 3,74).

Die nach Abtrennung des Aglykonteils verbleibende Hydrolysenlösung wurde mit BaCO_3 neutralisiert und nach Entfernung der Bariumsalmz eingedampft. Der anfallende farblose Sirup (91 mg) zeigte im Dünn-schichtchromatogramm (Kieselgel; Flm.: Chloroform-Alkohol-(4:6); Entwicklung: Benzidin-Natriumperjodat-Reagens) die gleiche Laufstrecke wie *D-Glucose*. Zur eindeutigen Charakterisierung wurde der Zuckersirup durch 20stdg. Erwärmen mit 15 ml 0,1N abs. methanolischer Salzsäure in das α -Methyl-D-glucopyranosid übergeführt. Farblose Prismen vom Smp. 168–171°; $[\alpha]_D^{20} = +165,4^\circ$ ($c = 0,573$ in Methanol). Die Identifizierung erfolgte durch direkten Vergleich mit einem Testpräparat (Misch-Smp., IR.-Spektr., Dünn-schichtchromatographie).

b) *Mit Pilzferment*: 514 mg Scillirubrosid (VI) in 16,75 ml abs. Alkohol wurden mit 750 mg käuflichem Pilzferment C-1290[®]) in 334 ml 0,02M Acetatpuffer versetzt (pH = 5,05) und die Suspension 3 Tage bei 37° gerührt. Danach schüttelte man die trübe Reaktionslösung erschöpfend mit Chloroform aus und wusch die vereinigten Chloroformextrakte mehrmals mit Wasser. Die über Na_2SO_4 getrocknete Chloroformphase lieferte nach Eindampfen 400 mg rohe Aglykonfraktion. Nach dem Umkristallisieren aus Aceton wurden 273 mg¹¹⁾ einheitliches *Scillirubrosidin (IX)* vom Smp. 194–198° (letzte Reste bis 210°) gewonnen; $[\alpha]_D^{20} = -8,6^\circ$ ($c = 0,522$ in Methanol). UV.-Spektrum: $\lambda_{\text{max}} = 298$ nm ($\log \epsilon = 3,72$); IR.-Spektrum: Fig. 3; NMR.-Spektrum: Fig. 1.

$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$ (400,50) Ber. C 72,0 H 8,1 O 20,0% Gef. C 72,0 H 8,0 O 19,9%

3-O-Acetyl-scillirubrosidin (X): 223 mg Scillirubrosidin (IX) wurden mit 2 ml abs. Pyridin und 2 ml Essigsäureanhydrid 2 Tage bei 20° stehengelassen. Die farblose Lösung wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Chloroform aufgenommen und mit 2N Salzsäure, gesättigter KHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen und Eindampfen der Chloroformphase fielen 230 mg rohes Acetat an. Aus Aceton farblose Kristalle vom Smp. 224–232°; $[\alpha]_D^{20} = -5,2^\circ$ ($c = 0,580$ in Chloroform).

$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$ (442,53) Ber. C 70,6 H 7,7 O 21,7% Gef. C 70,3 H 8,0 O 22,0%

3-Dehydroscillirubrosidin (XI) (= *3-Dehydro-6-desacetoxy-scillirosidin*): 100 mg $\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 16 ml Wasser suspendiert, wurden mit H_2 reduziert. Nach Verdrängen des Wasserstoffes durch Stickstoff wurde eine Lösung von 173 mg Scillirubrosidin (IX) in 35 ml Aceton zugegeben und anschliessend 22 Std. mit reinem Sauerstoff geschüttelt. Die vom Katalysator abfiltrierte Lösung wurde eingedampft und der Rückstand aus Aceton umkristallisiert. 103 mg grobe Polyeder vom Smp. 253–261°; $[\alpha]_D^{20} = +70,3^\circ$ ($c = 0,540$ in Chloroform). UV.-Spektrum: λ_{max} bei 241 und 298 nm ($\log \epsilon = 4,21$ und 3,76). IR.-Spektrum siehe Fig. 4.

$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_5$ (398,48) Ber. C 72,3 H 7,6 O 20,1% Gef. C 72,4 H 7,5 O 19,9%

¹¹⁾ Die Spaltungsquote betrug mindestens 75% d. Th.

3-Dehydroscillirubrosidin (XI) stimmte in allen Eigenschaften mit 3-Dehydro-6-desacetoxy-scillirosidin überein, das nach früheren Angaben durch Reduktion von 3-Dehydroscillirosidin (XII) mittels Zink-Eisessig hergestellt wurde [6]. Das Vergleichspräparat schmolz bei 252–257°; $[\alpha]_D^{20} = +71,7^\circ$ ($c = 0,516$ in Chloroform) (Vergleich der IR.-Spektren: Fig. 4).

Reduktion von 3-Dehydro-6-desacetoxy-scillirosidin zu Scillirubrosidin (IX) mit NaBH_4 : 1,32 g 3-Dehydro-6-desacetoxy-scillirosidin (XI) (aus Scillirosidin bereitet) wurden in 26 ml 75-proz. wässrigem Dioxan aufgenommen und innert 1 Std. unter Rühren mit der Lösung von 156 mg NaBH_4 in 13 ml 75-proz. wässrigem Dioxan versetzt. Nach 5stdg. Rühren bei 20° säuerte man mit 0,25 ml Essigsäure an, wobei eine deutliche H_2 -Entwicklung eintrat. Nach Zugabe von 100 ml Wasser konzentrierte man die Lösung im Vakuum und schüttelte erschöpfend mit Chloroform-Butanol-(9:1) aus. Die vereinigten Extrakte wurden mit Wasser, gesättigter KHCO_3 -Lösung und erneut mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Im Rückstand liessen sich dünnschichtchromatographisch wenig Ausgangsmaterial, ein Hauptprodukt mit gleicher Laufstrecke wie Scillirubrosidin und in geringer Menge ein nicht identifizierter Begleitstoff (3-*epi*-Scillirubrosidin?) feststellen (Kieselgel, Flm: Chloroform + 6% Methanol oder trockenes Isopropylacetat). Durch Chromatographie des rohen Reaktionsproduktes an Kieselgel mit Chloroform + 2% Methanol konnte nicht umgesetztes 3-Dehydroderivat XI entfernt werden. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte durch erneute Chromatographie an Kieselgel mit trockenem Isopropylacetat als Elutionsmittel. Dabei liessen sich 824 mg rohes Scillirubrosidin (IX) gewinnen. Ein im Dünnschichtchromatogramm langsamer laufender Begleitstoff (evtl. 3-*epi*-Scillirubrosidin) wurde nicht weiter untersucht. Das Spitzenpräparat kristallisierte aus Aceton in groben Polyedern vom Smp. 194–198° (Reste bis 220°); $[\alpha]_D^{20} = -9,1^\circ$ ($c = 0,603$ in Methanol). UV.-Spektrum: λ_{max} bei 298 nm ($\log \epsilon = 3,77$).

$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$ (400,50) Ber. C 72,0 H 8,1 O 20,0% Gef. C 72,5 H 8,0 O 20,3%

Das Präparat stimmte in allen Eigenschaften mit Scillirubrosidin (IX) überein (Misch-Smp., Dünnschichtchromatographie; Vergleich der IR.-Spektren: Fig. 3; NMR.-Spektrum: Fig. 1).

SUMMARY

The isolation of scillirubroside (VI), a new glycoside from the red variety of squill [*Scilla* (= *Urginea*) *maritima* (BAKER L.)] is described. Acid hydrolysis splits the new compound into D-glucose and the anhydrogenin VIII. The intact aglycone, scillirubrosidin (IX), is obtained by enzymatic degradation of VI. Selective oxidation of scillirubrosidin (IX) furnishes the 3-dehydro derivative, which is identical with 3-dehydro-6-desacetoxy-scillirosidin (XI). Although scillirubroside (VI), structurally, differs little from scilliroside (I), it lacks the specific toxicity against rats.

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien
SANDOZ AG., Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 53. Mitt.: A. VON WARTBURG, F. KALBERER & J. RUTSCHMANN, *Biochem. Pharmacol.* 1965, im Druck.
- [2] A. STOLL & J. RENZ, *Helv.* 25, 43 (1942).
- [3] A. VON WARTBURG, *Helv.* 47, 1228 (1964).
- [4] A. STOLL, E. SUTER, W. KREIS, B. B. BUSSEMAKER & A. HOFMANN, *Helv.* 16, 703 (1933); A. STOLL & W. KREIS, *Helv.* 34, 1431 (1951); A. STOLL, W. KREIS & A. VON WARTBURG, *Helv.* 35, 2495 (1952).
- [5] E. ROTHLIN & W. SCHALCH, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 10, 427 (1952).
- [6] A. VON WARTBURG & J. RENZ, *Helv.* 42, 1620, 1643 (1959).
- [7] A. STOLL, J. RENZ & A. BRACK, *Helv.* 34, 2301 (1951).
- [8] A. STOLL, A. VON WARTBURG & J. RENZ, *Helv.* 36, 1531 (1953).
- [9] A. STOLL, *Experientia* 10, 282 (1954); 16, 85, 96 (1960).

- [10] W. G. DAUBEN, R. A. MICHELI & J. F. EASTHAM, J. Amer. chem. Soc. *74*, 3852 (1952); O. H. WHEELER & J. L. MATEOS, Chemistry & Ind. *1957*, 395; Canad. J. Chemistry *36*, 1049 (1958).
- [11] W. KLYNE, Biochem. J. *47*, XLI (1950).
- [12] A. STOLL & J. RENZ, Helv. *33*, 286 (1950).
- [13] M. D. SIPERSTEIN, A. W. MURRAY & E. TITUS, Arch. Biochem. Biophysics *67*, 154 (1957).
- [14] R. TSCHESCHE & B. BRASSET, Z. Naturforsch. *20b*, 707 (1965).
- [15] H. GREGORY & E. LEEDE, Chemistry & Ind. *1960*, 4242; R. TSCHESCHE & G. LILLENWEISS, Z. Naturforsch. *19b*, 265 (1964).
- [16] R. TSCHESCHE, Angew. Chem. *73*, 727 (1961).
- [17] J. V. EUW & T. REICHSTEIN, Helv. *47*, 711 (1964); C. W. SHOPPEE, R. E. LACK & A. V. ROBERTSON, J. chem. Soc. *1962*, 3610.
- [18] K. A. JAEGLI, EK. WEISS & T. REICHSTEIN, Helv. *46*, 694 (1963); H. MITSUHASHI & T. NOMURA, Chem. pharmac. Bull. (Japan) *11*, 1333 (1963); H. MITSUHASHI & Y. SHIMIZU, Steroids *2*, 373 (1963).
- [19] G. R. DUNCAN, J. Chromatography *8*, 37 (1962).

7. Trennung und stereochemische Zuordnung von zwei substituierten isomeren Thioxanthenoxiden

von W. Michaelis, O. Schindler und R. Signer

(15. IX. 65)

Die Oxydation von 9-[(N-Methyl-3'-piperidyl)-methyl]-thioxanthen (I, *Methixen* G.N.¹⁾) mit Peressigsäure lieferte zwei stereoisomere Sulfoxide (II), deren Trennung durch präparative Papierchromatographie gelang [1]. Um die stereochemische Zuordnung der beiden Isomeren durchführen zu können, wurde eine ergiebige präparative Trennmethode benötigt; diese wird im folgenden beschrieben.

1. Trennung der stereoisomeren Sulfoxide II. – Da die Trennung der beiden Stereoisomeren durch Adsorptionschromatographie an Aluminiumoxid nicht gelang, wurde ein verbessertes Modell der früher beschriebenen Apparatur zur multiplikativen Verteilung [2] eingesetzt, bei dem die leichtere Phase bewegt wurde.

Die Verhältnisse einer solchen multiplikativen Verteilung können durch folgende Gleichung beschrieben werden [3]:

$$V_{max} = \frac{n-1}{n} \cdot v_m \cdot \frac{K \cdot \rho + 1}{K \cdot \rho} \quad (1)$$

Dabei bedeuten: V_{max} : ausgeflossenes Volumen beim Konzentrationsmaximum

n : Anzahl der theoretisch wirksamen Kammern

v_m : Volumen der bewegten Phase

K : Verteilungskoeffizient = $\frac{\text{Konzentration in bewegter Phase}}{\text{Konzentration in ruhender Phase}}$

ρ : Volumenkoeffizient = $\frac{\text{Volumen der bewegten Phase}}{\text{Volumen der ruhenden Phase}}$

¹⁾ *Methixen*-Hydrochlorid = Wirksubstanz von *Tremaril*® WANDER.