

Strophanthidin-fucosid, ein neues Cardenolidglykosid aus *Adonis vernalis* L.*

Von

M. Wichtl, K. Jentzsch und Elga Türk**

Aus dem Pharmakognostischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 8. September 1971)

*Strophanthidine Fucoside, a New Cardenolide Glycoside from
Adonis vernalis L.*

Besides a large number of minor constituents a new cardenolide was isolated from the herbs of *Adonis vernalis*. By chromatographic (TLC, PC, paper electrophoresis) and spectroscopic investigations (UV-, NMR-spectra) the unknown substance has been identified as strophanthidine fucoside, a glycoside which to our knowledge has not been found in nature previously. This compound is present in the dried herbs of *Adonis vernalis* in an amount of about 0,025%, its portion of the total glycoside content is approximately 10%.

Unter den zahlreichen Nebenglykosiden von *Adonis vernalis* konnte in reiner Form eine zunächst als „Glykosid g“ bezeichnete Substanz isoliert werden. Auf Grund von chromatographischen (Dünnschicht-, Papierchromatographie, Papierelektrophorese) und spektroskopischen Untersuchungen (UV-, NMR-Spektren) handelt es sich um Strophanthidinfucosid, das damit erstmals als natürlich vorkommendes Cardenolidglykosid nachgewiesen wird. Es ist in Herba Adonidis in einer Menge von etwa 0,025% enthalten, sein Anteil am Gesamtglykosidgehalt beträgt etwa 10%.

In *Adonis vernalis* L. (Ranunculaceae) sind bisher 10 Cardenolide, davon 7 Glykoside, isoliert und ihre Strukturen aufgeklärt worden, und zwar k-Strophanthidin¹ und die davon abgeleiteten Glykoside Cymarin² und k-Strophanthin- β ³, ferner Adonitoxin^{4, 5}, Adonitoxigenin-3-O-acetylramnosid⁶ und Adonitoxigenin-2-O-acetylramnosid⁷, Adonitoxol⁸ sowie Strophadogenin⁶, dessen Glykosid Vernadigin⁷ und schließlich 3-Acetylstrophadogenin⁷.

Im Zuge der Ausarbeitung einer papierchromatographisch-photometrischen Gehaltsbestimmungsmethode für Herba Adonidis konnten

* Herrn Prof. Dr. M. Pailer zum 60. Geburtstag herzlich gewidmet.

** Z. T. Ergebnisse der Dissertation E. Türk, Universität Wien, 1971.

wir bei der Gewinnung von Reinsubstanzen feststellen, daß in der Droge neben den genannten 10 Verbindungen noch zahlreiche weitere, bisher nicht bekannte Cardenolide enthalten sind. Es ist auf Grund unserer Untersuchungen mittels Säulen-, Papier- und Dünnschichtchromatographie anzunehmen, daß *Adonis vernalis* mindestens 32 Cardenolide (bzw. Substanzen mit positiver Reaktion nach *Kedde*⁹, Ausführungsform nach *Reichstein* und Mitarb.¹⁰) enthält. Unter ihnen befindet sich eine, zunächst als Glykosid **g** bezeichnete Verbindung, die sich verhältnismäßig leicht aus einer Mischfraktion gewinnen läßt; die Abtrennung von den Begleitstoffen Adonitoxin, Adonitoxol und k-Strophanthin- β gelingt mittels Verteilungschromatographie an Silicagel mit Benzol—n-Butanol-Gemischen, die Reindarstellung durch Anwendung der präparativen Papierchromatographie (s. exper. Teil).

Bereits die Polarität des Glykosides **g**, erkennbar an der Lage in Papier- und Dünnschichtchromatogrammen, sowie die Anfärbung mit Antimontrichlorid¹¹ und mit Vanillin—Schwefelsäure¹² ließen vermuten, daß es sich bei dieser Substanz um ein Strophanthidin-*mono*-glykosid handelt. Bei der hydrolytischen Spaltung nach *Mannich* und *Siewert*¹³ konnte tatsächlich k-Strophanthidin erhalten werden, dessen Identität sich durch papier- und dünnschichtchromatographischen Vergleich mit einem authentischen Präparat ergab. Das UV-Absorptionsspektrum von Glykosid **g** zeigt die für Cardenolide charakteristische Absorption bei 218 nm ($\log \epsilon_{\text{mol}}$ etwa 4,11), die Carbonylabsorption im Bereich von 270 bis 310 nm war wegen der geringen Substanzkonzentration nur angedeutet. Glykosid **g** läßt sich mit Natriumborantat reduzieren; das erhaltene Reaktionsprodukt gibt bei der Hydrolyse Strophanthidol als Aglykon, ein zusätzlicher Beweis dafür, daß es sich bei Glykosid **g** um ein Strophanthidinderivat handelt. In Übereinstimmung mit diesen Befunden steht auch das NMR-Spektrum* von Glykosid **g**; zwar liegt das Signal des Aldehydprotons bei δ 10,1, ist also gegenüber der Norm (δ 9,5 bis 10,0) etwas nach tieferem Feld verschoben, doch ist eine solche Verschiebung nach höheren δ -Werten auch bei Convallatoxin (= Strophanthidin-rhamnosid) zu beobachten. Die Methylprotonen von C-18 erscheinen bei δ 0,91, weitere Signale bei δ 1,28 und 1,37 ließen sich erst nach Aufklärung der Zuckerkomponente (Fucose) als Dublett deuten (δ 1,32, Kopplungskonstante $J = 5$ Hertz), wobei das Signal der Methylprotonen des 6-Desoxyzuckers von CH_2 -Signalen bei δ 1,37 überlappt wird.

* Herrn Dr. *W. Silhan*, Organisch-chemisches Institut der Universität Wien, sei auch an dieser Stelle für die Aufnahme der Spektren auf den Geräten Varian T-60 und Varian A-60A (Lösungsmittel: Deuteromethanol) bestens gedankt.

Die Identifizierung der Zuckerkomponente von Glykosid **g** mit Fucose (= 6-Desoxygalaktose) — Ausführung der Hydrolyse nach *Kiliani*¹⁴ — gelang durch papier- und dünnschichtchromatographischen Vergleich mit einer Reihe von Zuckern, die in Herzglykosiden häufig vorkommen, wie Xylose, Rhamnose, Fucose, Talomethylose, Alloxymethylose, Glucose, Mannose, Galaktose und 3-O-Methylglucose. Fucose gab in allen Fällen Übereinstimmung mit dem Zucker von Glykosid **g**. Ein zusätzlicher Beweis konnte durch Hochspannungspapiererelektrophorese* erbracht werden (s. Exper. Teil). Damit erscheint die Struktur von Glykosid **g** als Strophanthidin-fucosid hinlänglich gesichert. Dieses Glykosid ist damit u. W. erstmals als natürlich vorkommendes Cardenolid nachgewiesen worden.

Experimenteller Teil

Es werden folgende Abkürzungen benützt: *AcOH* = Eisessig, *Ae* = = Äther, *Alk* = Äthylalkohol, *An* = Aceton, *Be* = Benzol, *Bu* = n-Butanol, *Chf* = Chloroform, *DC* = Dünnschichtchromatographie, -chromatogramm, *Eg* = Äthylacetat, *Fr.* = Fraktion(en), *i-Pr* = Isopropylalkohol, *Me* = Methylalkohol, *Mek* = Methyläthylketon, *PAe* = Petroläther, *PC* = Papierchromatographie, -chromatogramm, *Pe* = Amylalkohol, *To* = = Toluol, *W* = Wasser, *Xy* = Xylol. Mengenangaben bei Lösungsmitteln bedeuten immer Volumenteile. Als Sorptionsmittel für die *DC* wurde, falls nichts anderes angegeben, stets Kieselgel G, Merck verwendet, Schichtdicke 0,25 mm. Für die *PC* verwendeten wir das Papier 2043 b Mgl von Schleicher & Schüll oder Whatman Nr. 1.

Gewinnung der Rohextrakte

4 kg mittelfein gepulv. Herba Adonidis werden mit 45 l heißem 70proz. *Alk* 15 Min. zum Sieden erhitzt. Nach Filtration extrahiert man nochmals mit 23 l heißem 70proz. *Alk* in gleicher Weise, filtriert wieder und engt die vereinigten Auszüge unter vermind. Druck auf 20 l ein. Die Hauptmenge der Ballaststoffe entfernt man durch Ausschütteln mit 20, 10 und 10 l *PAe*. Die so vorgereinigte glykosidhaltige Lösung wird mit 2,4 l Bleiessig (DAB 6) vermischt; nach kurzem Absetzen saugt man den Niederschlag ab und wäscht mit wenig 20proz. *Alk* nach. Zur Entfernung von überschüss. Bleisalz wird das Filtrat mit 1,68 l 10proz. Na_2HPO_4 -Lösung durchgemischt und der Niederschlag filtriert. Das klare Filtrat engt man unter vermind. Druck auf 20 l ein und schüttelt nacheinander mit 3mal je 5 l *Chf*, 5mal je 5 l *Chf—Alk* (2 + 1) und nach Halbsättig. mit Na_2SO_4 4mal mit je 5 l *Chf—Alk* (3 + 2) aus. Die drei Phasen wurden getrennt unter vermind. Druck eingedampft; der *Chf* Trockenextrakt wog 32,8 g (Glykosidgehalt etwa 18%), der *Chf—Alk* (2 + 1)-Extrakt 15,0 g (Glykosidgehalt etwa 46%) und der *Chf—Alk* (3 + 2)-Extrakt 8,3 g (Glykosidgehalt etwa 30%).

* Wir danken Herrn Dr. G. Kreil für die Möglichkeit, im Institut für Molekularbiologie der Akademie der Wissenschaften in Wien die Papiererelektrophorese durchführen zu können.

Chromatographische Vortrennungen

2,87 g *Chf—Alk* (2 + 1)-Extrakt wurden in wenig *Chf—Me* (1 + 1) gelöst und auf eine Säule, Durchmesser 8 cm, Füllhöhe 24 cm, aus Al_2O_3 (Woelm, neutral, Akt. II) aufgetragen. Als mobile Phase dienten *Chf*, *Chf—Me*-Gemische, *Me* und *Me—W*; insgesamt wurden 320 *Fr.* (je 600 ml) aufgefangen: Chromatographie Nr. 1, Tab. 1.

Tabelle 1. Chromatographie Nr. 1

Vortrennung von 2,87 g *Chf—Alk* (2 + 1)-Extrakt an 1300 g Al_2O_3 (Akt. II)

Fraktionen (je 600 ml)	Mobile Phase	Glykoside im Eindampfrückstand
1—8	<i>Chf</i>	keine
9—57	<i>Chf—Me</i> (99 + 1)	Cymarín, Acetyládonitoxín(?), unbekánná
58—118	<i>Chf—Me</i> (98 + 2)	16-Hydroxystrophánthidin(?), unbekánná
119—143	<i>Chf—Me</i> (95 + 5)	unbekánná
144—164	<i>Chf—Me</i> (90 + 10)	unbekánná
165—171	<i>Chf—Me</i> (80 + 20)	unbekánná
172—237	<i>Chf—Me</i> (70 + 30)	Adonitoxín, g , unbekánná
238—260	<i>Chf—Me</i> (60 + 40)	Adonitoxín, Adonitoxól, g , unbekánná
261—269	<i>Chf—Me</i> (50 + 50)	Adonitoxín, Adonitoxól, g , unbekánná
270—275	<i>Chf—Me</i> (20 + 80)	Adonitoxín, Adonitoxól, g , unbekánná
276—282	<i>Me</i>	Adonitoxín, Adonitoxól, unbekánná
283—320	<i>Me—W</i> (90 + 10)	k-Strophánthín- β , unbekánná

Die Kontrolle der Fraktionierung erfolgte durch *DC* im System nach *Görlích*¹⁵ *Mek—To—W—Me—AcOH* (80 + 10 + 6 + 5 + 2), Sichtbarmachung der Glykoside durch Besprühen der — nach dem Trocknen noch heißen — Platten mit Vanillin—Schwefelsäure¹².

Tabelle 2. Chromatographie Nr. 2

Trennung von 0,9539 g Glykosidgemisch (*Fr.* Nr. 201 bis 297 von Chromatographie Nr. 1) an 127,5 g wassergesätt. Silicagel

Fraktionen (je 130 ml)	Mobile Phase	Glykoside im Eindampfrückstand
1—4	<i>W</i> -ges. <i>Be</i>	keine
5—54	<i>W</i> -ges. <i>Be—Bu</i> (95 + 5)	unbekánná
55—98	<i>W</i> -ges. <i>Be—Bu</i> (94 + 6)	unbekánná
99—216	<i>W</i> -ges. <i>Be—Bu</i> (93 + 7)	Adonitoxín, unbekánná
217—235	<i>W</i> -ges. <i>Be—Bu</i> (92 + 8)	Adonitoxín, g , unbekánná
236—283	<i>W</i> -ges. <i>Be—Bu</i> (90 + 10)	Adonitoxín, g , unbekánná
284—301	<i>W</i> -ges. <i>Be—Bu</i> (88 + 12)	Adonitoxín, g , unbekánná
302—356	<i>W</i> -ges. <i>Be—Bu</i> (85 + 15)	Adonitoxín, Adonitoxól, k-Strophánthín- β , unbekánná
357—416	<i>W</i> -ges. <i>Be—Bu</i> (83 + 17)	Adonitoxín, Adonitoxól, k-Strophánthín- β , unbekánná
417—444	<i>W</i> -ges. <i>Be—Bu</i> (80 + 20)	k-Strophánthín- β , unbekánná
445—480	<i>W</i> -ges. <i>Be—Bu</i> (70 + 30)	unbekánná

Von Chromatographie Nr. 1 (die wir zur Erzielung größerer Mengen einmal in gleicher Weise mit 3 g Extrakt wiederholt haben) werden die *Fr.* 201 bis 297 vereinigt und unter vermindertem Druck eingedampft.

Der verbliebene Rückstand, 0,9539 g, wird an Silicagel, hergestellt nach der Vorschrift von *Stoll*¹⁶, weiter aufgetrennt (Chromatographie Nr. 2, Tab. 2). Dazu füllten wir ein Chromatographierohr von 3 cm Durchmesser mit einer Suspension von wasserhaltigem Silicagel (51 g Silicagel + 76,5 g *Be*-gesätt. *W*) in wassergesätt. *Be* bis zu einer Höhe von 29 cm. Der mit trockenem Silicagel vermischte glykosidhaltige Rückstand (*Fr.* Nr. 201 bis 297 von Chromatographie Nr. 1) wird trocken auf die Säule aufgetragen. Als mobile Phase dienten wassergesätt. *Be* und Gemische wassergesätt. *Be—Bu*; insgesamt wurden 480 *Fr.* (je 130 ml) aufgefangen (Tab. 2).

Kontrolle der Fraktionierung, wie bei Chromatographie Nr. 1 beschrieben. Der Eindampfrückstand von *Fr.* 230 bis 250 (enthält die Hauptmenge) diente zur Gewinnung von Glykosid **g**.

Präparative *PC* zur Gewinnung von Glykosid **g**

Ausführung auf 12 Papierbogen zu 18 × 60 cm; Imprägnierung des Papiers zu 60% mit der Unterphase des Fließmittels *Pe—Be—W* (1 + 1 + 2), Chromatographie mit der Oberphase etwa 14 Stdn. (Durchlaufchromatogramm).

Wanderungsstrecke von Glykosid **g** dabei etwa 20 cm. Man eluiert die entsprechenden Zonen mit *Me*. Nach Eindampfen verblieben 18 mg nahezu rein weißer Rückstand. Reinigung durch Fällung aus *Me*-Lösung mit *Ae*. Kristallisation aus *Me—Chf*: sehr feine, weiße Nadeln.

Glykosid **g** (Strophanthidinfucosid) zeigt in *PC* bzw. *DC* folgende *R_f*-Werte (zum Vergleich sind die *R_f*-Werte einiger anderer Adonisglykoside angeführt):

PC mit *Pe—Be—W* (1 + 1 + 2), Oberphase, Imprägnierung des Papiers mit der Unterphase (60%): *R_f*-Werte für Glykosid **g** 0,43, Adonitoxin 0,72, Adonitoxol 0,58, k-Strophanthin-β 0,37.

PC mit *Bu—Xy—W* (1 + 1 + 2), Oberphase, Imprägnierung des Papiers mit der Unterphase (60%): *R_f*-Werte für Glykosid **g** 0,40, Adonitoxin 0,62, Adonitoxol 0,36, k-Strophanthin-β 0,28.

DC mit *Mek—To—W—Me—AcOH* (80 + 10 + 6 + 5 + 2): *R_f*-Werte für Glykosid **g** 0,33—0,43, Adonitoxin 0,37—0,58, Adonitoxol 0,36—0,46, k-Strophanthin-β 0,24—0,35.

Hydrolyse nach *Mannich* und *Siewert*¹³

2 mg Glykosid **g** werden in 0,2 ml einer Mischung *An*-konz. HCl (99 + 1) gelöst und bei 20 °C im Dunkeln 10 bis 20 Tage verschlossen stengelassen. Anschließend entfernt man nach Zugabe von 1 ml *W* das *An* im Vak., setzt 2 ml *W* zu und schüttelt 5mal mit je 5 ml *Chf* aus. Der Eindampfrückstand der *Chf*-Phasen, in 0,1 ml *Chf—Me* gelöst, dient zur *DC*. Auftragsmenge 10 μl, verwendete Systeme: *Eg—Me* (95 + 5) und *Chf—Me* (9 + 1). Neben einigen schwächeren Flecken ist k-Strophanthidin als Hauptfleck eindeutig nachweisbar.

Reduktion von Glykosid **g** mit NaBH₄, Ausführung nach *Reichstein* und Mitarb.¹⁷

1,5 mg Glykosid **g** werden in 0,2 ml 80proz. *Alk* gelöst. Innerhalb von 30 Min. setzt man eine Lösung von 2,3 mg NaBH₄ in 60 μl 80proz. *Alk* bei

— 15 °C zu und läßt anschließend bei 0° 5 Stdn. verschlossen stehen. Durch Zusatz von wenig n-H₂SO₄ bringt man auf pH etwa 3 und engt unter Zugabe von 2mal 2 ml *W* zur Entfernung des *Alk* ein. Nach Ausschütteln mit 3mal 15 ml *Chf—Alk* (9 + 1) und Eindampfen verblieben 1,3 mg Rückstand, die wir nach *Mannich* und *Siewert* (s. o.) hydrolysierten. Sowohl im *DC*, System *Eg—Me* (95 + 5) als auch im *PC*, System *To—Bu* (9 + 1)/*W*, Papier imprägniert mit *An—W* (2 + 1), ließ sich Strophanthidol eindeutig nachweisen.

Hydrolyse mit *Kiliani*-Mischung¹⁴ zum Nachweis des Zuckers

3 mg Glykosid **g** werden mit 0,3 ml *Kiliani*-Mischung (3,5 ml *AcOH*, 5,5 ml *W* und 1 ml konz. HCl) 1 Stde. auf 100 °C erhitzt. Anschließend bringt man unter vermind. Druck über festem KOH zur Trockene, nimmt den Rückstand in 1 ml *W* auf und schüttelt 3mal mit 1 ml *Chf* aus. Die wäßr. Phase wird eingedampft, der Rückstand in wenig *Me—W* gelöst. *PC* und *DC* wie nachstehend angegeben, Anfärbung der Zucker im *PC*, *DC* und Papirelektropherogramm mit p-Aminohippursäure—Phthalsäure¹⁸, im *DC* auch mit Anisaldehyd—H₂SO₄¹⁹.

PC mit *To—Bu* (1 + 2)/*W*, Vergleichssubstanzen: Allomethylose, Rhamnose, Talomethylose, Fucose.

DC mit *Eg—i-Pr—W* (70 + 15 + 15), Vergleichssubstanzen: Xylose, Rhamnose, Fucose, Talomethylose, Mannose.

DC auf gepuff. Schichten (0,02M-Natriumacetat) mit *Chf—Me* (60 + 40), Vergleichssubstanzen: Fucose, Talomethylose, Glucose, Mannose, Galaktose, 3-O-Methylglucose.

In allen Fällen ergab sich Übereinstimmung der *R_f*-Werte mit Fucose. Hochspannungspapirelektrophorese auf Whatman 3MM, imprägniert mit Boratpuffer pH 10,4; 3 Stdn. bei 1300 V, etwa 90 bis 110 mA. Vergleichssubstanzen: Rhamnose, Talomethylose, Fucose, Glucose. Es ergab sich auch hier eindeutig Übereinstimmung mit Fucose.

Literatur

- ¹ D. G. Kolesnikov und N. A. Bugrim, Med. Prom. SSSR **14**, Nr. 2, 19 (1960); Chem. Abstr. **54**, 21 647 f (1960).
- ² T. Reichstein und H. Rosenmund, Pharmac. Acta Helv. **15**, 150 (1940).
- ³ D. G. Kolesnikov und N. A. Bugrim, Med. Prom. SSSR **14**, Nr. 7, 27 (1960); Chem. Abstr. **55**, 10 801 h (1961).
- ⁴ A. Katz und T. Reichstein, Pharmac. Acta Helv. **22**, 437 (1947).
- ⁵ R. Tschesche und R. Petersen, Chem. Ber. **86**, 574 (1953).
- ⁶ Z. Čekan und J. Pitra, Chem. and Ind. **41**, 497 (1960).
- ⁷ A. Poláková und Z. Čekan, Chem. and Ind. **44**, 1766 (1963).
- ⁸ A. Cserep, L. Masler, D. Šikl und S. Bauer, Chem. Zvesti **18**, 273 (1964); Chem. Abstr. **61**, 9572 a (1964).
- ⁹ D. L. Kedde, Pharmac. Weekbl. **82**, 741 (1947).
- ¹⁰ M. L. Lewbart, W. Wehrli und T. Reichstein, Helv. chim. Acta **46**, 505 (1963).
- ¹¹ D. Lawday, Nature **170**, 415 (1952).
- ¹² J. S. Matthews, Biochim. Biophys. Acta **69**, 163 (1963).
- ¹³ C. Mannich und G. Siewert, Ber. dtsh. chem. Ges. **75**, 737 (1942).
- ¹⁴ H. Kiliani, Ber. dtsh. chem. Ges. **63**, 2866 (1930).
- ¹⁵ B. Görlich, Arzneimittel-Forsch. **15**, 493 (1965).

- ¹⁶ *A. Stoll, E. Angliker, F. Barfuss, W. Kussmaul und J. Renz*, *Helv. chim. Acta* **34**, 1460 (1951).
- ¹⁷ *W. Wehrli, O. Schindler und T. Reichstein*, *Helv. chim. Acta* **45**, 1183 (1962).
- ¹⁸ *F. Scheffer und R. Kikuth*, *Z. analyt. Chem.* **191**, 116 (1962).
- ¹⁹ *E. Stahl und U. Kaltenbach*, *J. Chromatogr. [Amsterdam]* **5**, 351 (1961).