

ENDGÜLTIGE STRUKTUR VON SCHAFTOSID AUS *SILENE SCHAFTA*

M. JEAN CHOPIN und MARIE-LOUISE BOUILLANT

Laboratoire de Chimie biologique, UER de Chimie-Biochimie, Villeurbanne (Lyon), France

und

HILDEBERT WAGNER und KATJA GALLE

Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, Germany

(Eingegangen 18. Juli 1974)

Key Word Index—*Silene schafta* Gmel.; Caryophyllaceae; Schaftosid, 6-C- β -D-Glucopyranosyl-8-C- α -L-arabinopyranosylapigenin. Isochaftosid, 6-C- α -L-arabinopyranosyl-8-C- β -D-glucopyranosylapigenin.

Abstract—*Schaftoside, an apigenin-di-E-glycoside from Silene schafta was identified by oxidative degradation and spectroscopic investigations as 6-O- β -D-glucopyranosyl-8- α -L-arabinopyranosylapigenin. Its main isomerization product (isochaftoside) is identical with synthetic 6-C- α -L-arabinopyranosyl-8- β -D-glucopyranosylapigenin.*

Plouvier¹ hatte im Jahre 1967 für ein neues von ihm isoliertes Flavondiglykosid aus *Silene schafta* vor allem auf Grund spektroskopischer Untersuchungen die Struktur eines Di- oder Trihydroxy-flavons mit zwei C-C verknüpften Pentosen abgeleitet. Das Vorliegen einer Rhamnose konnte durch das NMR-Spektrum ausgeschlossen werden. Die endgültige Strukturauflösung stand jedoch noch aus. Der spätere spektroskopische Vergleich von Schaftosid mit den von Chopin und Mitarb.² aus *Vitexia* durch Partialsynthese hergestellten C-Xylosyl-C-Glucosylapigeninen ergab mit keiner Verbindung eine Übereinstimmung. Dem spektroskopischen Verhalten nach sollte nunmehr ein 6-C-Hexosyl-8-C-pentosyl-apigenin vorliegen. Zur endgültigen Strukturauflösung haben wir neu isoliertes Schaftosid nach verschiedenen Methoden oxidativ abgebaut. Die Eisen-III-chlorid-Oxidation nach Koeppen und Roux³ lieferte neben wenig Glucose vorwiegend Arabinose, der Perjodatabbau nach Viscontini⁴ nur Glyzerin und Äthylenglycol. Beide Ergebnisse sprechen für das Vorliegen von 1 Mol Glucopyranose und 1 Mol Arabinopyranose, da die C-gebundene Glucopyranose bei der Eisen-III-chlorid-Oxidation zwischen C₆ und C₁ und zwischen C₁ und C₂, die C-gebundene Arabinopyranose offenbar nur zwischen C₈ und C₁ gespalten wird. Der titrimetrisch ermittelte Perjodatverbrauch von 8,9 Mol entspricht gut dem theoretischen Wert (9 Mol) für ein Gemisch aus 1 Mol Hexose und 1 Mol Pentose. Die Acetylierung lieferte nach der Barger-Methode das erwartete Dekaacetat (Schmp. 173–175°). Die NMR-Spektren des Schaftosides und seines Trimethylsilyläthers

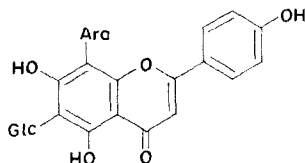
¹ PLOUVIER, V. (1967) *C.R. Acad. Sci. Paris* **265**, 516.

² BOUILLANT, M. L. und CHOPIN, J. (1971) *C.R. Acad. Sci. Ser. C* **273**, 1759.

³ KOEPPEN, B. H. und ROUX, D. G. (1965) *Biochem. J.* **97**, 444.

⁴ VISCONTINI, M., HOCH, D. und KARRER, P. (1955) *Helv. chim. Acta* **28**, 642.

bestätigen die Glucosylarabinosyl-Struktur und ergeben für die Glucose eindeutig eine β -D-Verknüpfung ($H_{1\alpha}$, $J \sim 9$ –10 Hz) und für die Arabinose eine α -L-Konfiguration ($H_{1\alpha}$, $J > 10$ Hz). Im NMR-Spektrum von Schaftosidacetat erscheint das H-3-Proton auf Grund von zwei vorliegenden Rotationskonformeren⁵ in Form von zwei Signalen bei $\delta = 6,62$ und 6,55.



(1) Schaftosid

Im Massen-Spektrum von Schaftosid treten die für Di-C-Glykoside typischen H_2O -Abspaltungen^{6,7} bei m/e 546 ($-H_2O$), 528 ($-2H_2O$), 510 ($-3H_2O$), 492 ($M - 4H_2O$), 474 ($M - 5H_2O$) und 456 ($M - 6H_2O$) auf.

Das Dibenzylation erscheint mit hoher Intensität bei m/e 295 (74%).

Die Festlegung, welcher Zucker an C_6 bzw. C_8 gebunden ist, kann nach Bouillant, Favre-Bonvin und Chopin⁸ aus dem Massen-Spektrum des Di-C-Glykosidpermethyläthers beantwortet werden. Bei unsymmetrisch mit Pentosen und Hexosen substituierten Di-C-Glykosiden erscheint allgemein der M -Glykosyl-Peak des in C_6 gebundenen Zuckers mit höherer relativer Intensität als der entsprechende Peak des C_8 -Zuckers. Da im Schaftosidpermethyläther das $M - 175$ Signal (Hexose) mit hoher relativer Intensität (40%) auftritt und das $M - 131$ Signal (Pentose) nur geringe Intensität (4%) zeigt, muß dem Schaftosid die Struktur 6-C- β -D-Glucopyranosyl-8-C- α -L-arabinopyranosylapigenin zukommen (1). Auch der negative Cotton-Effekt bei 250 nm spricht für eine in C_8 -Stellung verknüpfte Arabinose.⁹

Eine Bestätigung lieferte die Säure-Isomerisierung von Schaftosid. Wir isolierten aus dem Isomerisierungsansatz ein Isomerprodukt des Schaftosids, das Isoschaftosid, das in 15%iger Essigsäure auf Cellulose-DC einen tieferen R_f -Wert als Schaftosid hatte, im Massen-Spektrum des Permethylläthers die umgekehrten Intensitätsverhältnisse für $M - 175$ und $M - 131$ zeigte und sich auch in den $[\theta]$ -Werten des CD bei 272 und 251 nm deutlich von Schaftosid unterschied.

Da das von Chopin und Mitarb.¹⁰ kürzlich synthetisierte 6-C- α -L-arabinosylvitexin im Schmelzpunkt, im IR-Spektrum und im Circular dichroogramm vollkommen mit den Daten von Isoschaftosid übereinstimmte, ist damit auch die Schaftosid-Struktur gesichert.

Isoschaftosid ist in der Zwischenzeit von Chopin und Mitarb.¹¹ in einem von Prof. Mabry (Austin) zur Verfügung gestellten Extrakt aus *Flourensia cernua* D.C. neben anderen Di-C-Glykosiden nachgewiesen worden. Nicht identisch mit Isoschaftosid dagegen ist das erst kürzlich aus *Catananche caerulea* L. von Proliac und Mitarb.¹² iso-

⁵ MABRY, T. J., MARKHAM, K. R. und THOMAS, M. B. (1970) *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer, New York.

⁶ PROX, A. (1968) *Tetrahedron* **24**, 3697.

⁷ WAGNER, H., ROSPRIM, L. und DÜLL, P. (1972) *Z. Naturforsch.* **27b**, 954.

⁸ BOUILLANT, M. L., FAVRE-BONVIN, J. und CHOPIN, J. (1974) *C.R. Acad. Sci. Ser. D* (im Druck).

⁹ GAFFIELD, W. und HOROWITZ, R. M. (1972) *Chem. Commun.* 648. GAFFIELD, W. Persönliche Mitteilung.

¹⁰ BIOL, M. C., BOUILLANT, M. L., PLANCHÉ, G. und CHOPIN, J. *C.R. Acad. Sci. Ser. C* (im Druck).

¹¹ CHOPIN und Mitarb. (unveröffentlicht).

¹² PROLIAC, A., RAYSAUD, J., COMBIER, H., BOUILLANT, M. L. und CHOPIN, J. (1973) *C.R. Acad. Sci. Ser. D* **277**, 2813.

lierte C-Pentosyl-C-hexosyl-apigenin. Wegen seiner engen spektralen Verwandtschaft mit Isoschaftosid bzw. Schaftosid wurde es Neoschaftosid genannt.

EXPERIMENTELLES

Das Pflanzenmaterial stammte teilweise aus dem Botanischen Garten, teilweise wurde das Material von der Firma Kaiser und Seibert, Roßdorf/Darmstadt bezogen.

Isolierung von Schaftosid. 2 kg frischer Zweige und Blätter von *Silene schafta* wurden zerkleinert und drei Tage im Soxhlet mit Methanol extrahiert. Der methanolische Extrakt wurde auf ca 500 ml eingengt. Die methanolische Lösung wurde mit ca 200 ml Wasser versetzt und das Ganze auf dem Wasserbad digeriert. Der Zusatz von Wasser und das Digerieren wurden solange fortgesetzt, bis die gesamte Chlorophyllmenge entfernt war. Nach 24 Stdn. Stehen wurde bei 0° filtriert. Aus dem klaren, braunen Filtrat (ca 150 ml) kristallisierte Schaftosid in hellgelben Nadeln aus. Ausbeute ca 0,17%. Eine weitere Schaftosidmenge wurde aus der Mutterlauge durch Chromatographie an einer 10 cm hohen und 20 cm breiten, mit Zellulosepulver gefüllten Nutsche erhalten. Als Elutionsmittel diente destilliertes Wasser. Die schaftosidhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, bis zur Trockene eingengt und in heißer 30%iger HOAc aufgenommen. Bei Zimmertemperatur kristallisierte Schaftosid in langen, hellgelben Nadeln. Die gesamte Ausbeute an Schaftosid betrug 0,3% des Frischgewichtes. Schmp. 226° (unkorr.) $[\alpha]_D^{25} + 63,7$ ($c = 0,9\%$ in Pyridin) $[\alpha]_D^{22} + 110$ ($c = 0,5\%$ in H_2O) (Ber. für $C_{26}H_{28}O_{14} \cdot H_2O$ (582,12): C 53,64; H 4,51; H_2O 3,13; Gef. C 54,05; H 4,89; H_2O 4,05), R_f 0,50 in 15%iger HOAc, R_f 0,27 BEW (4:1:5) auf Whatman-Papier, R_f 0,45 in 15%iger HOAc, R_f 0,38 in BEW (4:1:5) auf Zelluloseplatten Merck. UV: λ_{max} (MeOH) 273 ($\epsilon = 17799$), 333 ($\epsilon = 19329$) nm; (AlCl₃): 280, 306, 350 und 385 nm; (NaOAc): 282, 332 und 400 nm. IR (KBr): OH: 3350 cm^{-1} , C=O 1635 cm^{-1} , C-H Def. 830 cm^{-1} . NMR (DMSO): δ 8, 13 d, J 8,5 Hz, H-2', H-6'; 6,99 d, J 8,5 Hz, H-3'; H-5': 5,4, 6,2 H-3; 4,86 d, J 9 Hz, CH-1"; 4,82 d, J 9 Hz, CH-1'''; $\delta = 3,23 - 4,2$ m restliche Zuckerkomponenten. CD (i. MeOH) $[\theta]_{275nm} + 2540$ und $[\theta]_{250nm} - 16900$.

NMR des Trimethylsilylschaftosides. CCl₄ δ 8,09 d, J 9 Hz, H-2', 6'; 6,99 d, J 9 Hz, H-3', 5'; 6,58 s, H-3; 4,61 d, J 10 Hz, H-1"; 4,57 d, J 10 Hz, H-1'''; 4,8 - 3,0 13H der Zucker; 0,40 s, 5-TMS; 0,28 s, 4' und 7-TMS; 0,20 bis 0,10 5 TMS der Zucker; -0,19 s, 2"-TMS (6-Glu); -0,37 s, 2'''-TMS (8-Ara).

MS von Schaftosid. $M^+ 564$ (abwesend), 546 (M-H₂O) (3%), 528 (M-2 H₂O) (4), 518 (4), 510 (M-3 H₂O) (78), 492 (M-4 H₂O) (68), 474 (M-5 H₂O) (100), 464 (11), 462 (11), 456 (M-6 H₂O) (47), 450 (21), 446 (14), 432 (17), 427 (42), 409 (70), 398 (54), 392 (58), 391 (97), 379 (62), 373 (67), 363 (21), 361 (30), 349 (46), 336 (22), 335 (25), 325 (21), 323 (27), 307 (49), 295 (74), 282 (30), 270 (10), 255 (10), 189 (14), 177 (22), 149 (19), 121 (31).

MS des Schaftosidpermethyläthers, hergestellt nach Hakomori¹³ und Brimacombe¹⁴: m/e 704 (M^+) 17%, m/e 689 (M - 15) 26%, m/e 674 (M - 30) 37%, m/e 673 (M - 31) 100%, m/e 659 (M - 45) 5%, m/e 657 (M - 47) 7%, m/e 641 (M - 63) 4%, m/e 601 (M - 103) 11%, m/e 573 (M - 131) 8%, m/e 541 (M - 163) 28%, m/e 529 (M - 175) 40%, m/e 515 (M - 189) 6%, m/e 499 (M - 205) 5,4%, m/e 497 (M - 207) 8%.

Schaftosiddecaacetat. Schmp. 173-175°; C₄₆H₄₈O₂₄ (984,7). Ber. C 56,19; H 4,88; Gef. C 56,20 H 4,95; NMR (CDCl₃): δ 8,08 d, J 9 Hz, H-2', H-6'; 7,34 d, J 9 Hz, H-3', H-5'; 6,6 s, H-3; 3,8-5,8 m. Zuckerkomponenten; 1,60 - 2,51 ~ 30 Acetylprotonen.

Perjodsäureoxidation von Schaftosid. 20 mg Schaftosid wurden nach der von Wagner⁷ für Flavon-C-glykoside modifizierten Malaprade-Methode¹⁵ in 2 n H₂SO₄ mit NaIO₄ oxidiert. Titrimetrisch ergab sich dabei ein Verbrauch von 8,9 Mol Perjodat pro Mol Schaftosid. Theoretisch: 9 Mol für 1 Mol Hexose und 1 Mol Pentose.

Perjodatabbau der Schaftosid-Zucker nach Viscontini.⁴ Der Abbau wurde mit 2,38 mg Schaftosid durchgeführt. Nach Chromatographie der Abbauprodukte auf Zellulose-DC im System Pyridin-EtOAc-H₂O (2:7:1) und Besprühen mit Natriumperjodat-Benzidin waren chromatographisch Glycerin und Äthylenglycol nachweisbar.

FeCl₃-Oxidation von Schaftosid nach Koeppen und Roux.² Die Oxidation wurde mit 300 mg Schaftosid durchgeführt. Das über Amberlite IRC-50 und Dowex 2 gereinigte Reaktionsprodukt wurde auf Zelluloseplatten chromatographiert. Es waren Arabinose und Glucose im Verhältnis 2:1 nachweisbar. Im Überstand befanden sich Apigenin, Isovitexin und Spuren von Vitexin.

Isomerisierung von Schaftosid. (a) 8-Stündige Isomerisierung von Schaftosid in 4 n HCl-MeOH (1:1) liefert auf Whatman-Papier in BEW und 15%iger HOAc neben unverändertem Schaftosid 4 Isomerisierungsprodukte: (1) (Iso-schaftosid) R_f 0,21 (0,36); (2) R_f 0,35 (0,50); (3) R_f 0,30 (0,24); (4) R_f 0,33 (0,16). (b) 500 mg Schaftosid wurden in 15 ml 5%iger Salzsäure 27 Stdn. am Rückfluß erhitzt. Das Hydrolysat wurde eingengt und in wenig 15%iger HOAc gelöst. Zur Abtrennung von Schaftosid und anderer Isomerisierungsprodukte wurde die Lösung an einer Zellsäule (Macherey u. Nagel) (30 × 3 cm) mit 15%iger HOAc chromatographiert. Das Schaftosid erschien im Eluat als 1. Verbindung, gefolgt von Isoschaftosid und dem Isomerisierungsprodukt. DC-Zellulose-Merck: 15%ige HOAc, Sprühreagenz: bas. Bleiacetat. Isoschaftosid R_f 0,35; Schaftosid R_f 0,48; (2) Isomerisierungsprodukt R_f 0,13. Isoschaftosid kristallisierte aus 30%iger HOAc in hellgelben Nadeln. Die Ausbeute betrug

¹³ HAKOMORI, S. (1964) *J. Biochem.* **55**, 205.

¹⁴ BRIMACOMBE, S. J., JONES, B. D., STACEY, M. und WILLARD, J. J. (1966) *Carbohydrate Res.* **2**, 167.

¹⁵ MALAPRADE, L. (1928) *Bull. Soc. chim. France* **43**, 685.

0,9°_D, Schmp. 229–230° (synth. Isoschaftosid Schmp. 214–220°). DC-Zellulose Merck: R_f 0,35 in 15%iger Essigsäure, R_f 0,32 in BEW (4:1:5). UV λ_{\max} : 271, 331 nm (in MeOH); 280, 304 (Inflexion und 376 nm (AcONa); 278, 305, 353 und 384 nm (Inflexion) (AlCl₃). CD: (i. MeOH); $[\theta]_{272\text{ nm}} = +16300$ und $[\theta]_{351\text{ nm}} = -5440$. CD von synth. Isoschaftosid: $[\theta]_{272} = +17300$.

MS des Isoschaftosidpermethyläthers, m/e 704 (M⁺) 23%_{rel}, m/e 689 (M – 15) 26%_{rel}, m/e 674 (M – 30) 41%_{rel}, m/e 673 (M – 31) 100%_{rel}, m/e 659 (M – 45) 15%_{rel}, m/e 657 (M – 47) 14%_{rel}, m/e 641 (M – 63) 5%_{rel}, m/e 620 (M – 84) 12%_{rel}, m/e 586 (M – 118) 12%_{rel}, m/e 585 (M – 119) 26%_{rel}, m/e 573 (M – 131) 32%_{rel}, m/e 571 (M – 133) 9%_{rel}, m/e 559 (M – 145) 18%_{rel}, m/e 541 (M – 163) 12%_{rel}, m/e 529 (M – 175) 12%_{rel}.

Anerkennungen—Wir danken Herrn Dr. Plouvier (Naturhistorisches Museum, Paris) für eine Probe auth. Schaftosids und Herrn Prof. Mabry (Austin) sowie Herrn Dr. Sonnenbichler (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried-München) für die Aufnahme von NMR-Spektren. Herrn Dr. Gaffield (Berkeley) sind wir für die Aufnahme der CD-Kurven zu Dank verpflichtet.