# Saponin glycosides
# الغلوكوزيدات الصابونينية

# General characters
# الخواص العامة

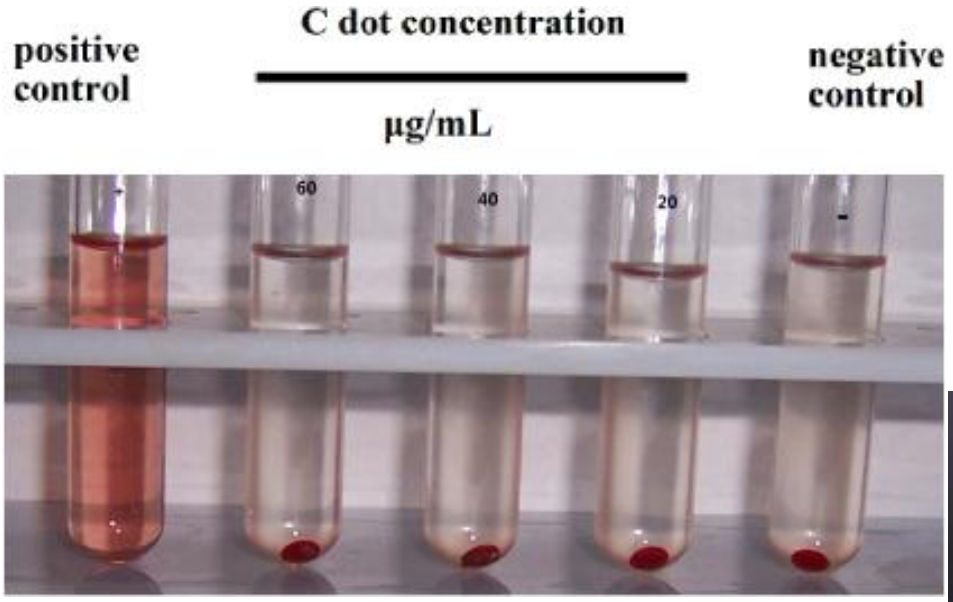
1. **Widely distributed in higher plants.** منتشرة بشكل واسع في النباتات
2. **Bitter, acrid taste & sternutatory (irritant to mucous membranes).** طعمها مر وحامذ تخرش الأغشية المخاطية
3. **Form colloidal solutions in $H_2O$ ➔ foam on shaking due to: hydrophobic / hydrophilic asymmetry of the molecule (large aglycone & small sugar moiety) ➔ lowering of surface tension in aqueous solution.** تشكل مع الماء مخاليل غرويدية (انحلال مزيلي) وتعطي رغوة ثابتة بالرج مع الماء لخواصها المحبة للماء والكارهة للماء (ثنائية القطب) وهي خافضة للتوتر السطحي في المحاليل المائية

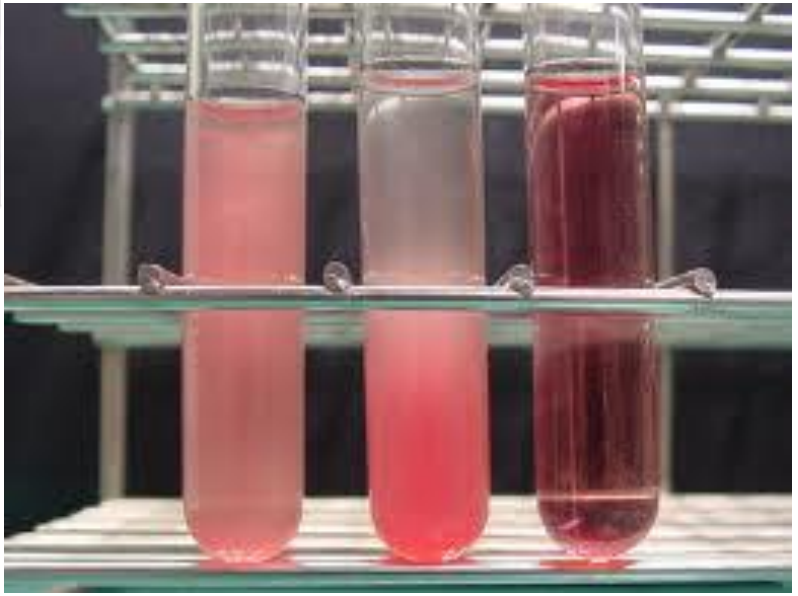
# General characters
# الخواص العامة

1. **Form insoluble complex with sterols.**
   - **Destroy RBCs ➔haemolysis.**
   - **Toxic to cold- blood animals (fishes & frogs).**
   - **Toxic by i.v. injection & harmless by oral route.**

- تشكل مع الستيرولات معقدات غير ذوابة
- تحطم كريات الدم الحمراء
- سامة بالطريق الوريدي وغير سامة فمويا

# General characters
# الخواص العامة



# General characters
# الخواص العامة

- Not soluble in diethyl ether غير ذوابة في الايتر الايتيلي
- Soluble in water, ethanol, methanol, alcohol water mixture ذوابة في الماء والايتانول والميتانول وفي مزيج الكحول والماء
- Specific solution is n-Butanol or Is-oprobanol ذوابة وبشكل نوعي في البوتانول النظامي وفي الايزوبروبانول
- Absorption max. 210-220 nm (glycyrrhizin 254 nm) امتصاصها الأعظمي بطول موجة 210-220 نانومتر

# Chemical characters
# الخواص الكيميائية

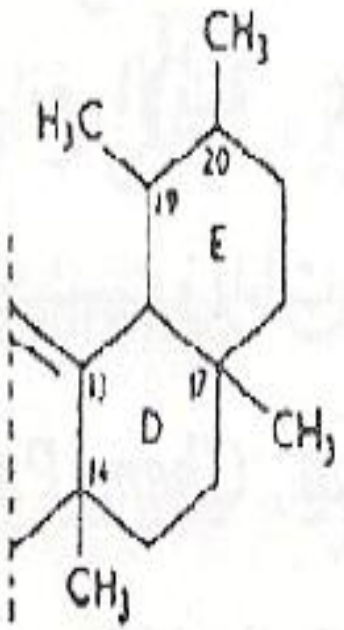
1. **O-glycosides ➔ hydrolysis ➔ aglycone (sapogenin) + sugar moiety.** هي غليكوزيدات اكسيجسينية تعطي بالاماهة الحامضية جسم لا سكري يسمى الأغليكون (صابوجينين) وجسم سكري
2. **Aglycone:** تصنيفها وفق جسم الأغليكون
   - **triterpenoidal (C-30) [mainly in Dicotyledons]** صابونينات ثلاثية تيربين : وتكون خماسية الحلقات أو رباعية الخلقات
   - **steroidal (C-27) [mainly in Monocotyledons]** صابونينات ستيروئيدية وتكون ذات بنية مشتقة من الكوليستيرول وهي اما ان تكون بنمط فوروستان أو سبيروستان وقد تكون قلويد ستيروئيدية حيث يحل النيتروجين محل الاوكسجين في النواة القورانية أو في النواة البيرونية أو في كليهما

# Classification of Triterpenoid Saponins تصنيف الصابونينات ثلاثيات التيربينوئيد

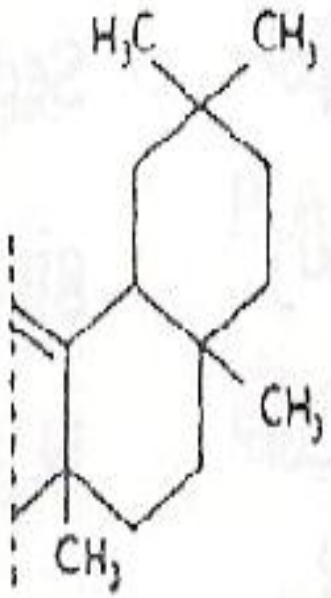
Triterpenoid Saponins can be classified after Sapogenin part in three types: تصنف وفق جسم الأغليكون الى

- α-amyrin الفا اميرين
- β-amyrin بيتا اميرين
- Lupeol لوبيول

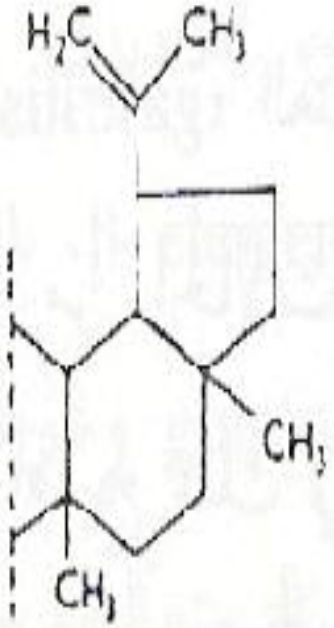
# Classification of Triterpenoid Saponins تصنيف الصابونينات ثلاثيات التيربينوئيد




α-Amyrin



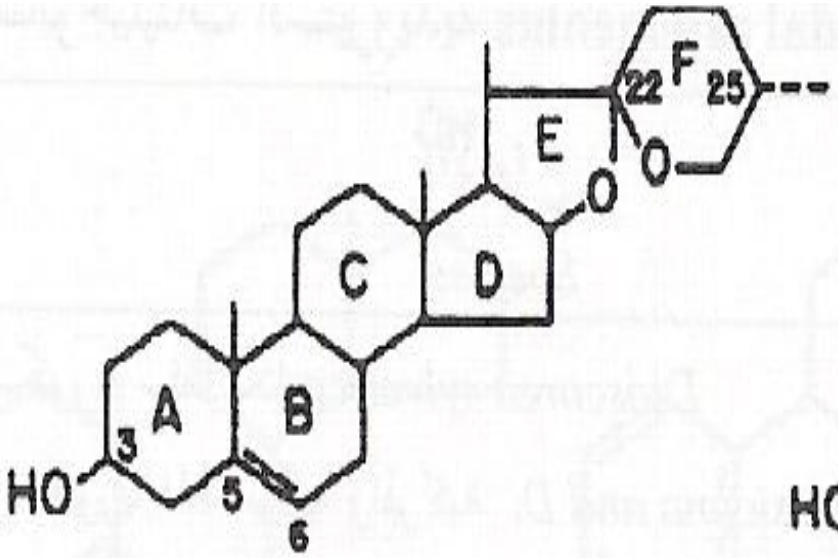

β-Amyrin



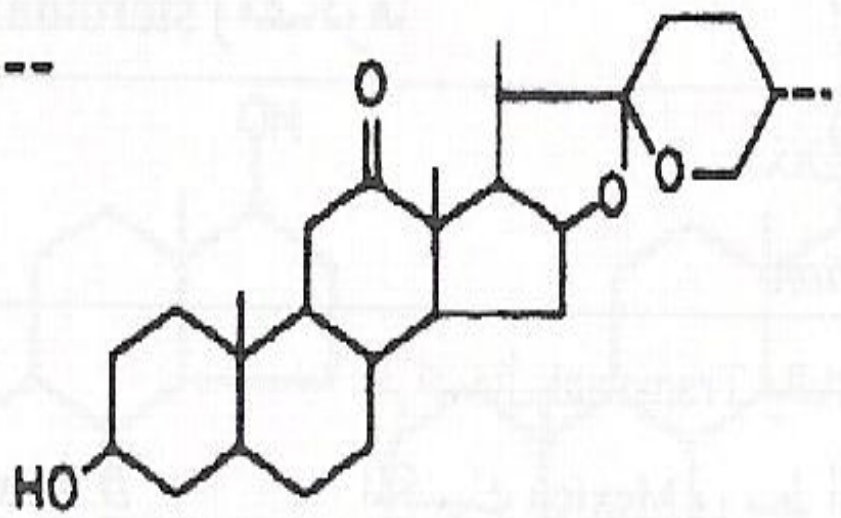

Lupeol

# Chemical structure of Diosgenin and Hecogenins spirostanol type

البنية الكيميائية للديوسجينين والهيكوجينين وهما من نمط السبيروستانول

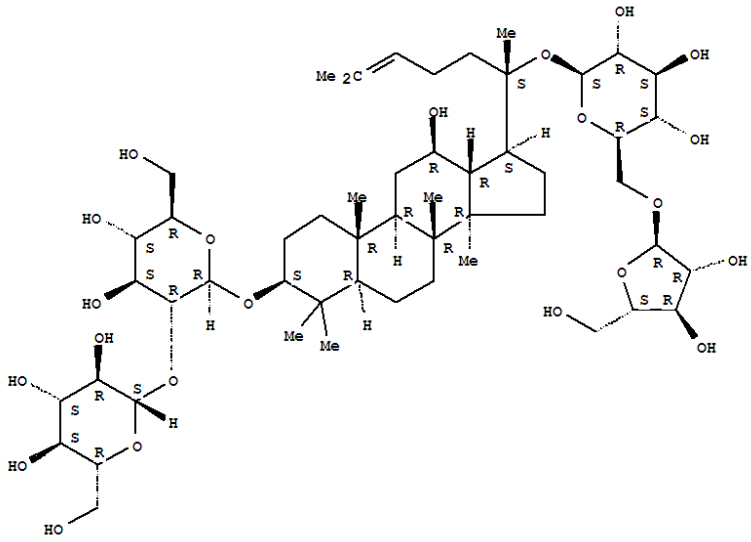


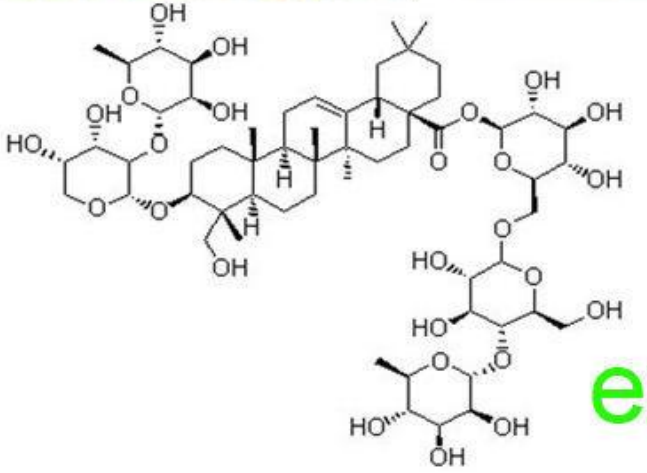

Diosgenin ( $\Delta^5$ 25$\alpha$-spirosten-3$\beta$-ol)
(various spp. of *Dioscorea*,
Fenugreek)




Hecogenin (*Sisal* spp.)

# Triterpen Saponins
# الصابونينات ثلاثيات التيربين





ivy

extract

# Chemical characters
# الخواص الكيميائية للصابونينات

3. **Sugar moiety:** تصنيفها وفق القسم السكري
   - **Often contain uronic acids or acyl residues.**
   - **Usually glycosylation is at C-3.**
   - **Sometimes -$CH_3$ (side chain) ➔ -COOH, which may be esterified by a sugar.** يرتبط جسم الأغليكون بعدد من السكاكر البسيطة وقد يصل عددها الى 14 وذلك في عدة مواضع من جسم الأغليكون، حيث تكون اما أحادية الغلوكوزيد (ارتباط سلسلة سكرية واحدة) ثنائي الغلوكوزيد (ارتبط سلسلتين سكريتين بموضعين) ثلاثي غلوكوزيد (ارتباط بثلاث سلاسل سكرية)
   - ويكون الارتباط الرئيسي عبر الموضع 3 من جسم الأغليكون، حيث توجد وظيفة غولية ومن ثم في مواضع تواجد الوظائف الغولية الحرة أو مع الكربوكسيل، وقد تكون السكاكر على شكل أحماض اورونية

# Tests for identification
# اخبارات التشخيص

1. **Froth test:** اختبار الرغوة

   **1 ml of aqueous solution of saponin or plant extract + shake ➔ persistent & voluminous froth.** يرج 1 مل من محلول الصابونين المائي أو الخلاصة النباتية مدة 15 ثانية فيتشكل عمود من الرغوة يتناسب ارتفاعه طردا مع فعالية الصابونين على السطح

# Tests for identification
# اخبارات التشخيص

2. **Haemolysis test:** اختبار انحلال الدم

**Suspension of RBCs in normal saline + equal volume of plant extract in normal saline + shake gently ➔ clear red solution indicating heamolysis of RBCs (compared with blank ).**

**يرج مقدار متساوي من معلق كريات الدم الحمراء في وسط معادل للتوتر مع الخلاصة النباتية المحضرة في وسط معادل للتوتر ، حيث يلاحظ تشكل محلول رائق خالي من أي رسابة مما يدل على وجود فعالية حالة لكريات الدم الحمراء (يقارن الناتج مع الناصع )**

# Quantitative Determination
# معايرة الصابونينات كميا

1. **Gravimetric method** طريقة الترسيب
   - Saponin glycosides + $Ba(OH)_2$ ➔ precipitate [Saponin-$Ba(OH)_2$ complex]
   - Filter, dry & weigh the precipitate ➔ original weight {W1}
   - Ignite & weigh the residue➔ {W2} (calculated as BaO)
   - W1 - W2 = Saponin content
   - تشكل الصابونينات مع هيدروكسيد الباريوم رسابة من معقد الصابونين مع هيدروكسيد الباريوم، يرشح وتجفف الرسابة ومن ثم توزن وبعد ذلك تلهب لطرد أكسيد الباريوم من المعقد ويحسب فرق الوزن الذي يعبر عن الصابونينات في الخلاصة
2. **Determination of Foam Index** تحديد معامل الرغوة
   - The foam index is defined as:

     " The dilution of the drug, that gives a layer of foam of 1 cm height, when an aqueous solution is shaken in a graduated cylinder for 15 seconds after standing for 15 min."

     يعرف منسب الرغوة (معامل الرغوة) على أنه (يعطي ممدد محلول العقار في الماء عمود من الرغوة ارتفاعة 1 سم بعد الرج مدة 15 ثانية وهذا العمود من الرغوة ثابت مدة 15 دقيقة )

# Quantitative Determination
# معايرة الصابونينات كميا

3. **Determination of Fish Index** منسب السمك
   - **Saponins are toxic to cold blooded animals.**
   - **The fish index is defined as:**

     **"The reciprocal of the saponin dilution that kills 60 % of the experimental animals within 1 hour."** الصابونينات سامة للاسماك والحيوانات ذوات الدم البارد وعليه يعرف منسب السمك على أنه نسبة ممدد محلول الصابونين القادر على قتل 60% من الحيوانات المختبرة خلال ساعة واحدة
4. **Determination of Haemolytic Index** منسب انحلال الدم
   - **The heamolytic index is defined as:**

     **"The greatest dilution of saponin that produces complete haemolysis."** يعلرف منسب انحلال الدم على أنه التمديد الأعلى الذي يتسبب بانحلال دم كامل

# Isolation
# العزل

1. **Plant material + water, alcohol or aqueous alcohol + reflux.** تؤخذ مسحوق المادة النباتية الجافة وتستخلص بمزيج ايتانول وماء تحت مبرد صاعد بالغليان
2. **Concentrate & precipitate crude saponin mixture with:** تكثف (يطرد الغول) وتجفف ومن ثم يرسب الصابونين الخام بإضافة الايتر الايتيلي أو الأسيتون ويمكن الاستعانة بمحلول خلات الرصاص المشبع لترسيب الصابونينات الحامضية أو خلات الرصاص الأساسية لترسيب الصابونينات المعتدلة وذلك بعد التحميض بحمض معدني.
   - **Ether or acetone.**
   - **Lead acetate (acidic saponins), or basic lead acetate (neutral saponins) followed by decomposition with acid.**
3. **Individual glycosides are separated by chromatography.** يتم فصل الصابونينات النقية باستخدام تقانات الكروماتوغرافيا

# Extraction of saponins
# استخلاص الصابونينات

Powdered drug extracted with petroleum ether using soxhlet extraction method (elimination of lipid) and drying

يستخلص مسحوق العقار بايتر البترول بطريقة سوكسليه للتخلص من الليبيدات ويجفف

Dried drug extracted with alcohol 80% (ethanol or methanol with water)

يستخلص العقار الجاف بالكحول %80

Alcoholic Extract concentrated (elimination of alcohol)

الخلاصة الكحولية تركز

Water residue extracted with chloroform (elimination of non polar part)

البقية المائية تستخلص بالكلوروفورم

Prof. Dr. Isam Agha

# Extraction of saponins
# استخلاص الصابونينات

Water residue extracted four times with N-Butanol

البقية المائية تستخلص أربع مرات بالبوتانول النظامي

Drying of N-Butanol extract using vacuum

التجفيف الخلاصة البوتانولية بالخلاء

The dried residue

solve in Methanol

تحل الخلاصة في الميتانول

precipitation in di ethylether (1ml Methanol solution in about 100 ml of di ethylether)

الترسيب في الدي ايتيل ايتر (1 مل خلاصة في 100 مل ايتر)

Dried precipitate constitute the crud saponins mixture.

الراسب المتشكل هو عبارة عن اجمالي الصابونينات الخام

Prof. Dr. Isam Agha

# Separation of Sapogenins
# فصل الأغليكون الستيروئيدي

Sapogenins are separated by acid hydrolysis of the saponins, But Previous fermentation of the material for some 4-10 days give a better yield.

تخمير ومن ثم اماهة حامضية

After acid hydr. the sapogenin extracted with organic solvents

بعد الاماهة الحامضية يستخلص الصابوجينين بالمذيبات العضوية

# Detection of saponins using TLC
# الكشف عن الصابونينات على الطبقة الرقيقة

- Mobile phase: chloroform +Methanol + water (40+60+5)
- الطور المتحرك (كلوروفورم+ميتانول+ماء)
- Stabile phase: silica gel or RP8, RP18
- الطور الثابت : صفائح من السيليكا الغروية أو الطور العكوس

Prof. Dr. Isam Agha

# Detection of saponins using TLC
# الكشف عن الصابوجينين

Spraying with Anis aldehyde / Sulfuric acid reagent

الرذ بألدهيد اليانسون / حمض الكبريت

Spraying with water (surface activity, weight spots)

الرذ بالماء

Detection:

الكشف

Using blood gel suspension reagent (haemolyse effect)

كاشف الدم الجيلاتيني

UV exposure (plats with fluorescence reagent)

الأشعة فوق البنفسجية

# Detection of saponins using TLC
# الكشف عن الصابونينات على الطبقة الرقيقة

Anis aldehyde / Sulfuric acid reagent: كاشف الرذ ألدهيد اليانسون / حمض الكبريت

(80%Methanol+15%glacial acetic acid + 5%sulfuric acid + 15 drops of anis aldehyde) after spraying heating about 10 Min. in temp. 110 (coloring reagent) يتكون الكاشف من مزيج: ميتانول 85%+ حمض الخل الثلجي15% + حمض الكبريت5% و15 قطرة من الدهيد اليانسون

# Detection of saponins
# كشف الصابونينات

1. Color reaction with aromatic aldehyde (hydroxyl triterpen with anis aldehyde, vanillin . تفاعلات لونية مع الألدهيدات العطرية مثل الفانيلين
2. In strong mineral acids (sulfuric acid, phosphoric acid, perchloric acid) gives colored mixture (dehydration reaction) تعطي بوسط من الحموض المعدنية الكثيفة معقدات ملونة ،
3. Reaction with sulfuric acid and anhydrous acetic acid (unsaturated and hydroxyl triterpenoids and steroids تعطي تفاعلات مع حمض الكبريت وبلا ماء حمض الخل (نزع الماء، تفاعل ليبرمان)
4. Reaction with mineral acids and oxidant (Zlatkis-Zak reaction) تفاعل مع الحموض المعدنية والمؤكسدات
5. Reaction with Antimony (III)-chloride تفاعل مع كلوريد الأنتموان الثلاثي

# Property of Saponins
# خواص الصابونينات

- Saponins frothing aqueous solution.
- تزبد بالماء
- They have haemolyse property
- لها خواص حالة للدم
- They have a high molecular weight
- لها وزن جزيئي عالي يتراوح من 3000-1500

# HI determination
# معامل انحلال الدم

- HI is the haemolyse index which indicate the milliliter number of blood which haemolysed by only one g of the drug
- يعبر عنه بعدد ميليلترات الدم التي يتم حلها من قبل 1غ صابونين
- $HI_{sa} = HI_{st} X C_{sa} / C_{st}$
- $C_{sa}$ is the concentration of the sample solution in the last reagent glass in which the blood haemolysed تركيز أنبوب العينة الذي حدث فيه انحلال دم
- $C_{st}$ is the concentration of the standard solution in the last reagent glass in which the blood haemolysed تركيز أنبوب المعياري الذي حدث فيه انحلال دم

# HI determination
# تحديد قرينة انحلال الدم

- To determine the HI we need the followings:

1. Phosphate puffer (PH=7.4)دارئة فوسفات
2. Blood suspension 4% in the Phosphate puffer (PH=7.4) معلق دموي في الوقاء
3. Standard saponin dissolved in Phosphate puffer (PH=7.4) محلول الصابونين المعياري
4. Sample of saponin dissolved in Phosphate puffer (PH=7.4) محلول العينة

# HI determination
# تحديد قرينة انحلال الدم

- We need two series of reagent glasses (sample , standard) مجموعتي أنابيب تجربة
- Add one ml. of Phosphate puffer (PH=7.4) to all glasses يضاف 1 ملل من الوقاء لكافة الأنابيب

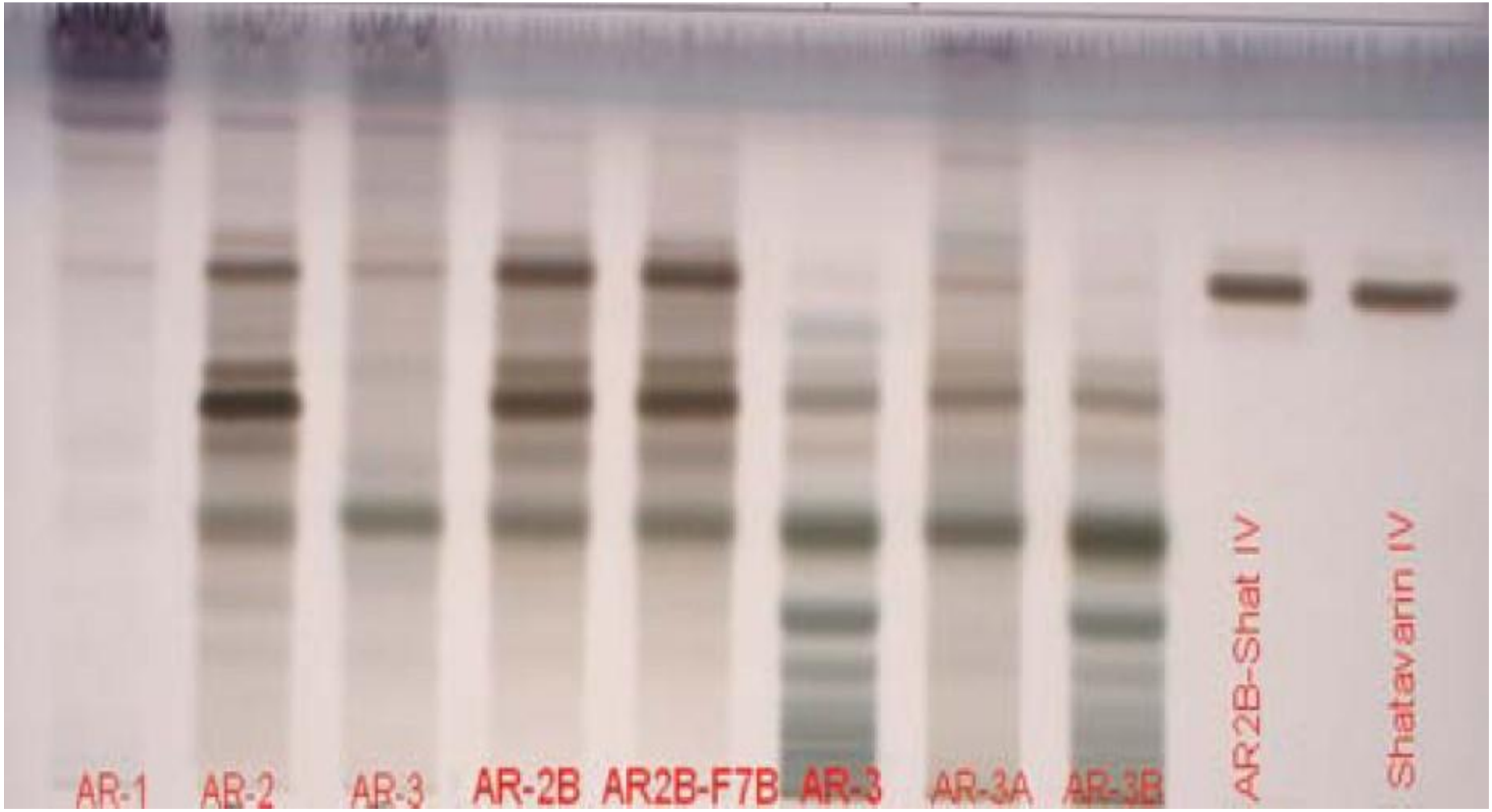
2. Add One ml. of the standard solution in the second glass of the standard series, mix and take this one ml again to the third glass, mix and take one ml … (still one ml in every glass)

يضاف 1 مل من المعياري للانبوب الأول من أنابيب السلسلة المعياري وينقل الى الثاني ومن ثم للثالث وهكذا حتى اخر أنبوب.

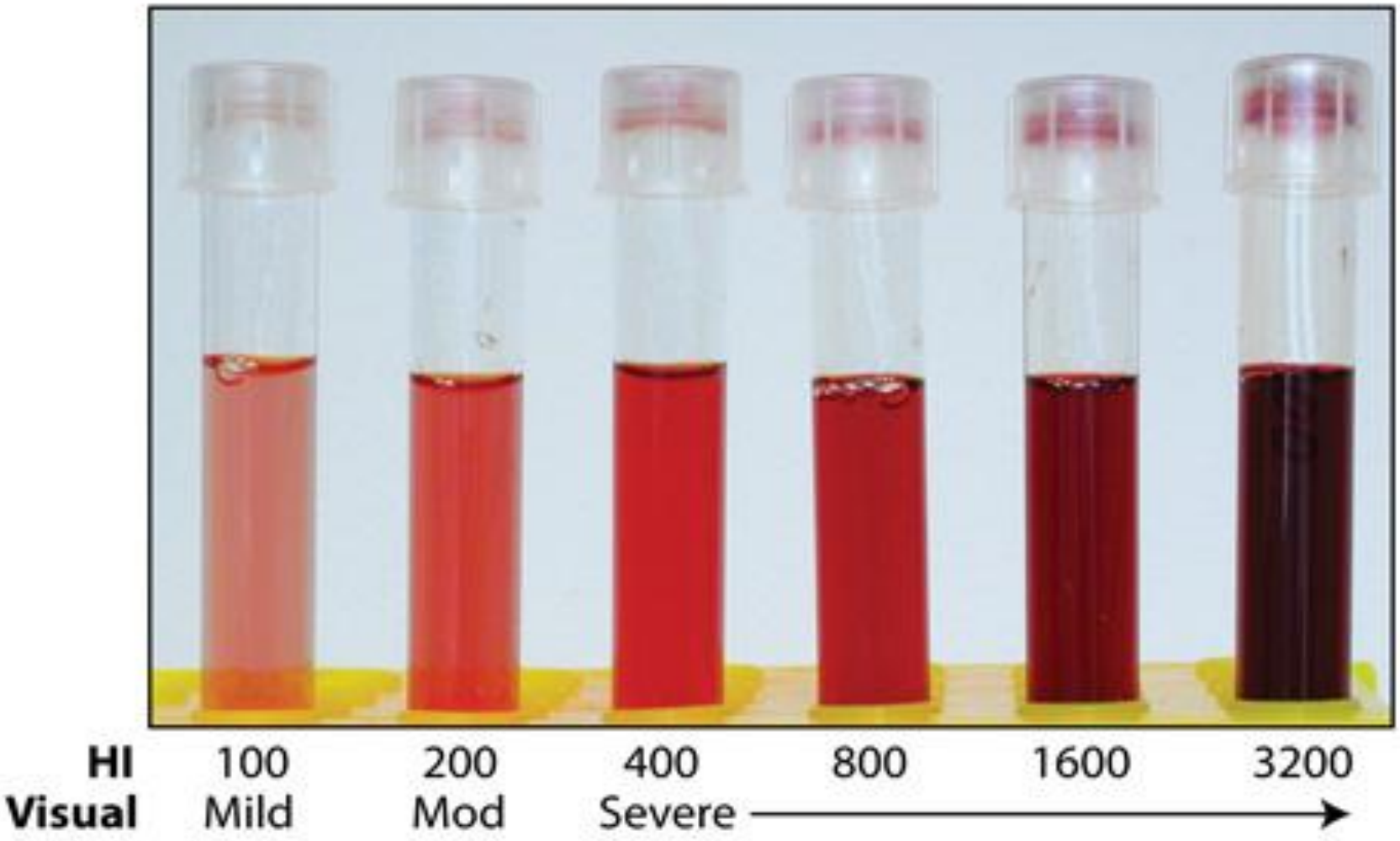
# HI determination
# تحديد قرينة انحلال الدم

- Add One ml. of the sample solution in the second glass of the sample series, mix and take this one ml again to the third glass, mix and take one ml ... (still one ml in every glass) يضاف 1 ملل من العينة لكل انبوب من سلسلة العينة
- Add one ml of the blood suspension in every glass of two series. يضاف 1 ملل من المعلق الدموي لكلا السلسلتين
- After 4 hour determine the last glass of two series in which the blood still totally haemolysed. And determine the concentration of this glass. بعد 4 ساعات يحدد الانبوب الأخير من كلا السلسلتين الذي انحلت فيه كامل كرات الدم الحمراء كاملة (اعلى تمديد ممكن) ويحدد تركيز الانبوب في كلا السلسلتين

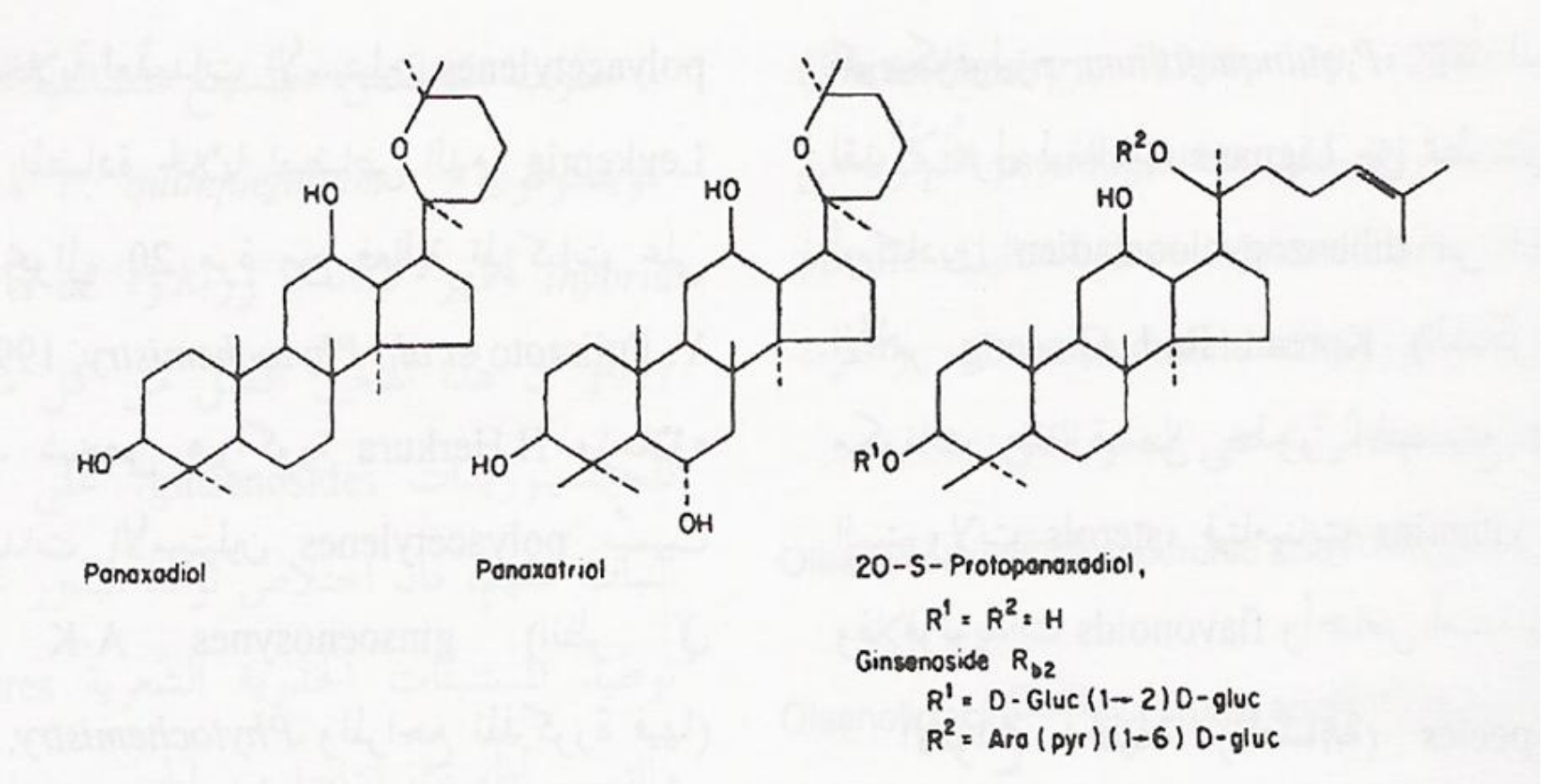
# TLC of Saponins

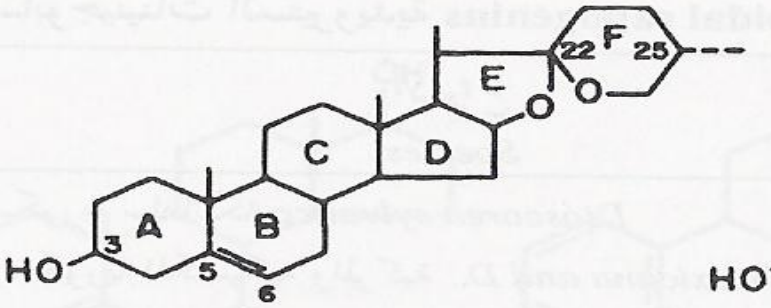


# HI of saponins

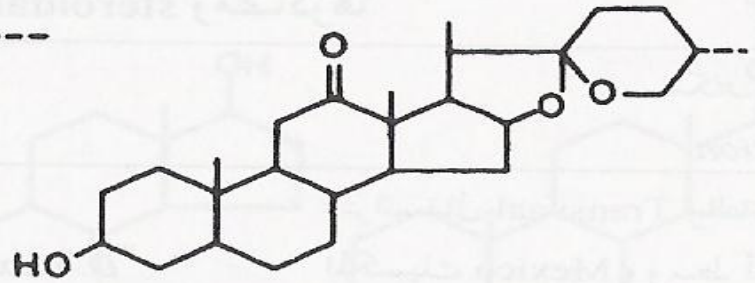


# الصابونينات ثلاثية التيربين في الجينسينج

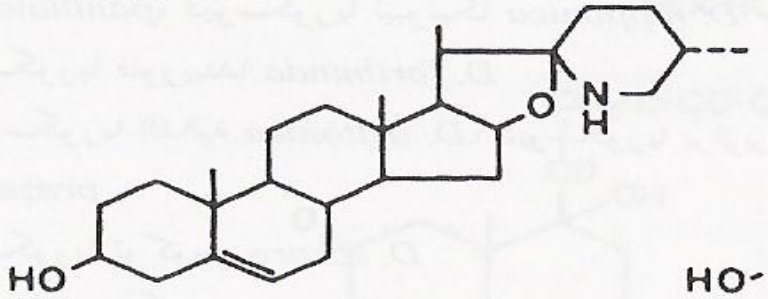




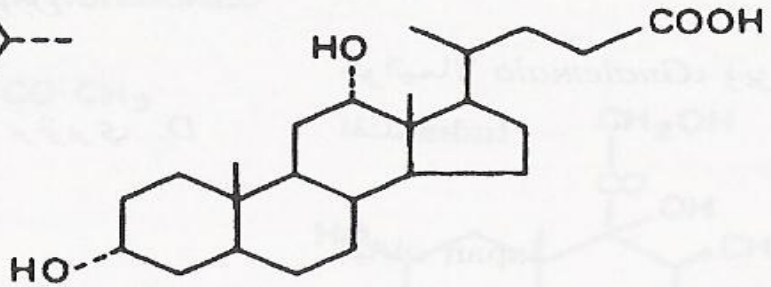

Diosgenin ( $\Delta^5$ 25α-spirosten-3β-ol)
(various spp. of *Dioscorea*,
Fenugreek)



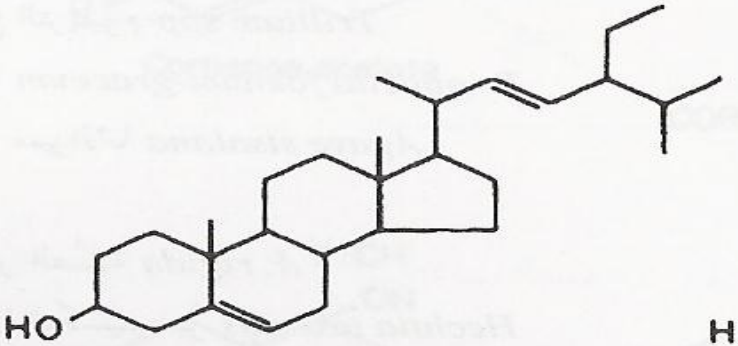

Hecogenin (*Sisal* spp.)



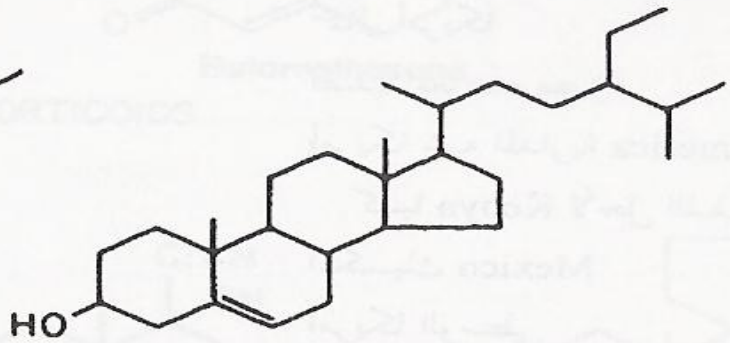

Solasodine (*Solanum* spp.)




Deoxycholic acid (ox-bile)

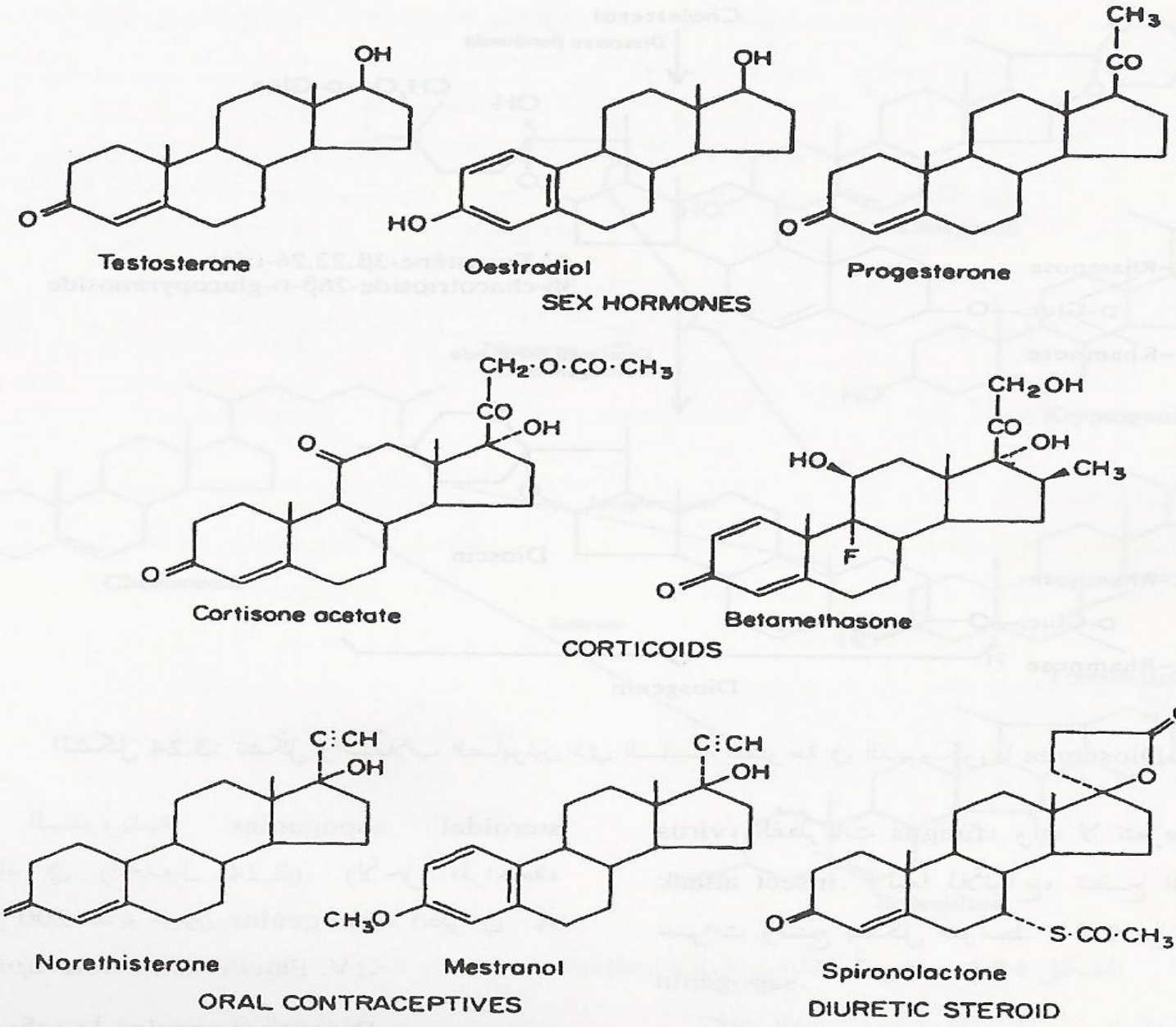



Stigmasterol (soya)

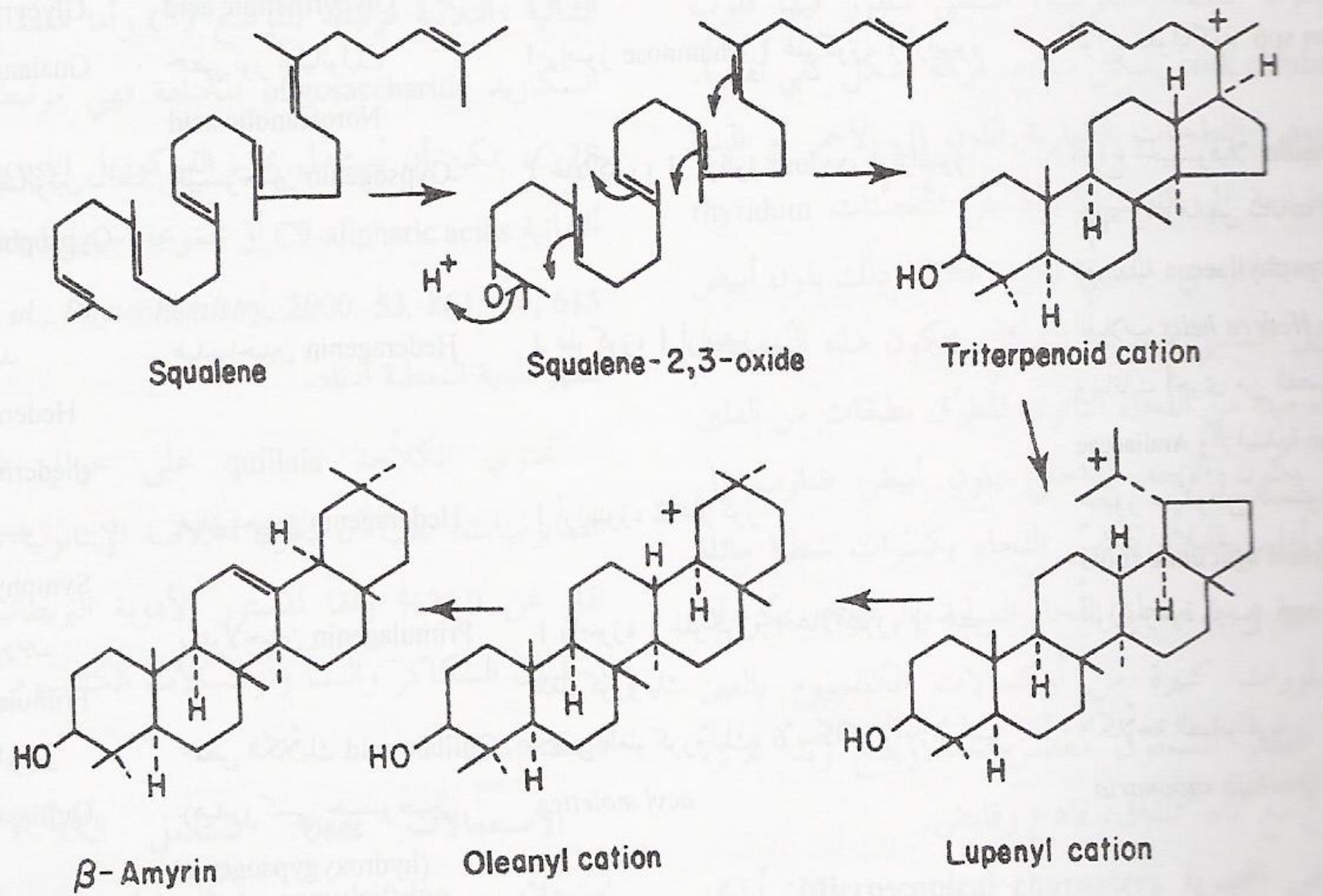



Sitosterol (soya)

الشكل 5.24: بعض الستيرويدات steroids الموجودة طبيعياً




الشكل 4.24: أمثلة عن بِنـــى الستيرويدات steroids الفعَّالة علاجياً




الشكل 9.24: مسلك التَّخليق البيولوجي Biosynthethic لثلاثيات التيربينويد triterpenoids

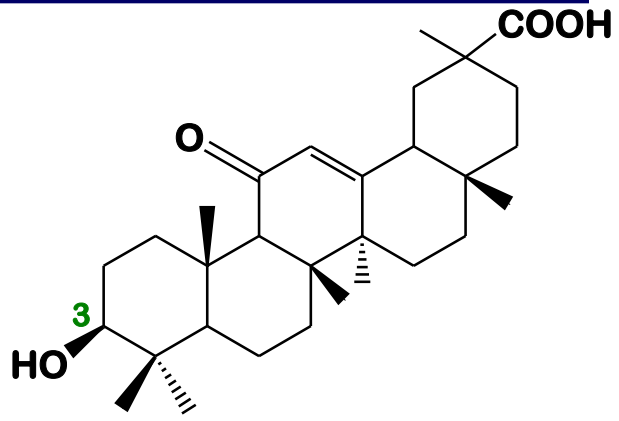
# Triterpenoidal Saponins - Licorice saponins الصابونينات ثلاثية التيربين في عرق السوس

**Glycyrrhizin = mixture of K+ & Ca++ salts of Glycyrrhizic acid**

**Glycyrrhizic acid ≡ Glycyrrhizinic acid**

**Structure**

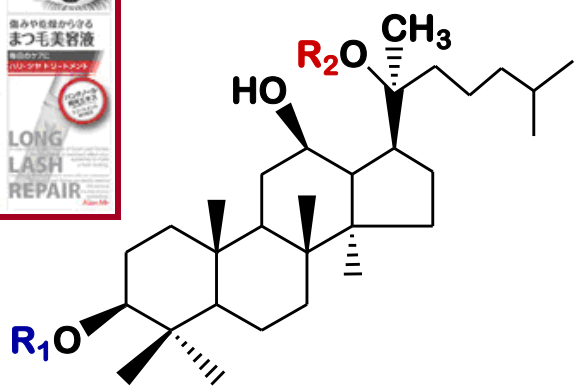
**Glycyrrhizic acid = Glycyrrhetic acid -3 O- diglucuronide (2 molecules of glucuronic acid)**

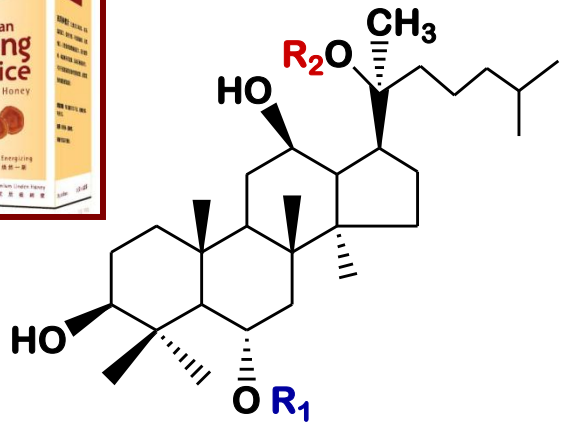



**Glycyrrhetic acid (aglycone)**

**Glycyrrhetic acid ≡ Glycyrrhetinic acid**

# Ginsenosides الجينسوزيدات



## 20(S)-Protopanaxadiols

| Ginsenoside | $R_1$ | $R_2$ |
|---|---|---|
| $Rb_1$ | -glc (2-1)glc | -glc (6-1)glc |
| $Rb_2$ | -glc (2-1)glc | -glc (6-1)arab |
| Rc | -glc (2-1)glc | -glc (2-1)arab |
| Rd | -glc (2-1)glc | -glc |

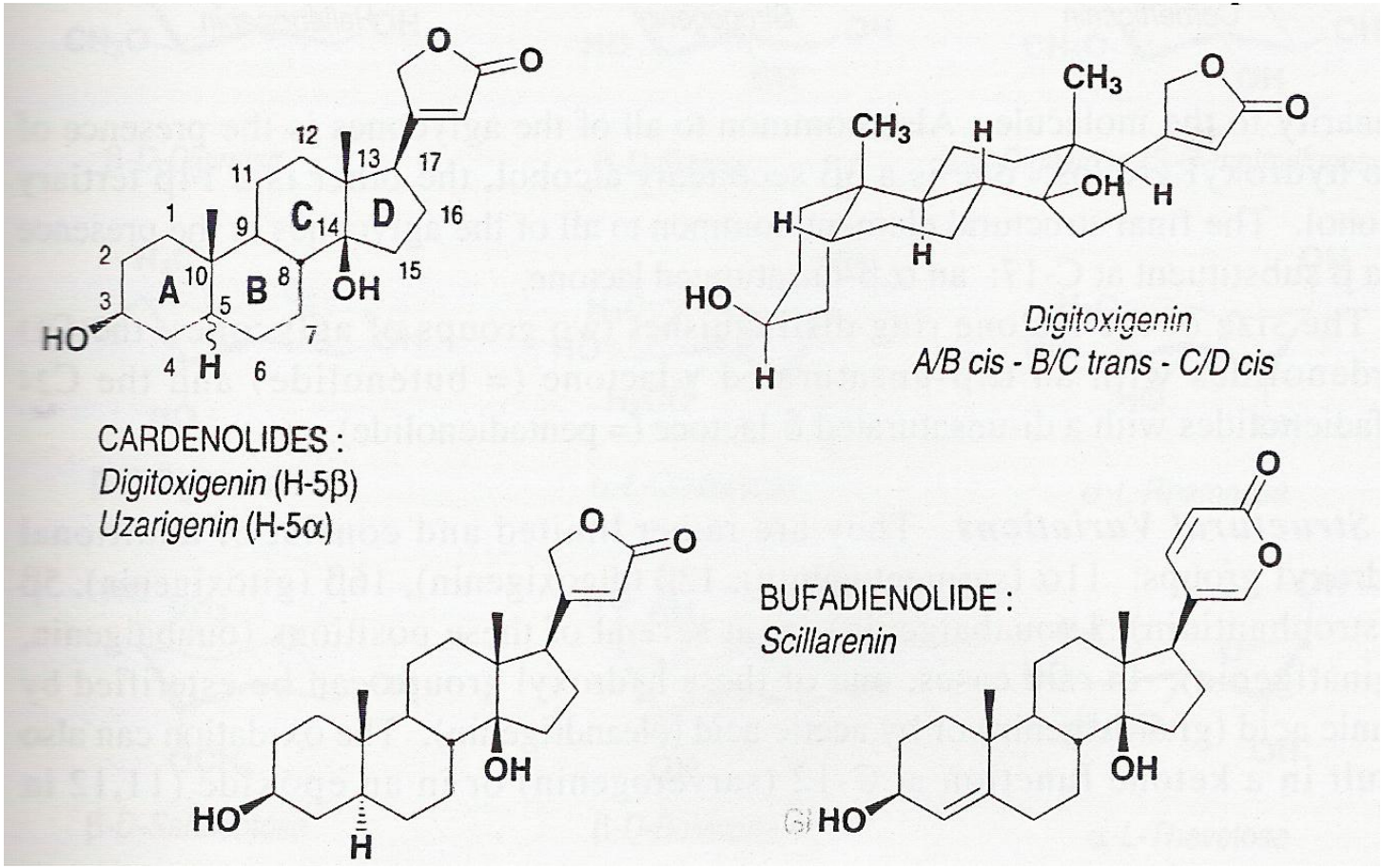
## 20(S)-Protopanaxatriols

| Ginsenoside | $R_1$ | $R_2$ |
|---|---|---|
| Re | -glc (2-1)rha | -glc |
| Rf | -glc (2-1)glc | -H |
| $Rg_1$ | -glc | -glc |
| $Rg_2$ | -glc (2-1)rha | -H |

# Cardiac glycosides الغلوكوزيدات الوعائية القلبية

Cardinolides, Bufadinolides نمط
كاردينوليد وبوفادينوليد

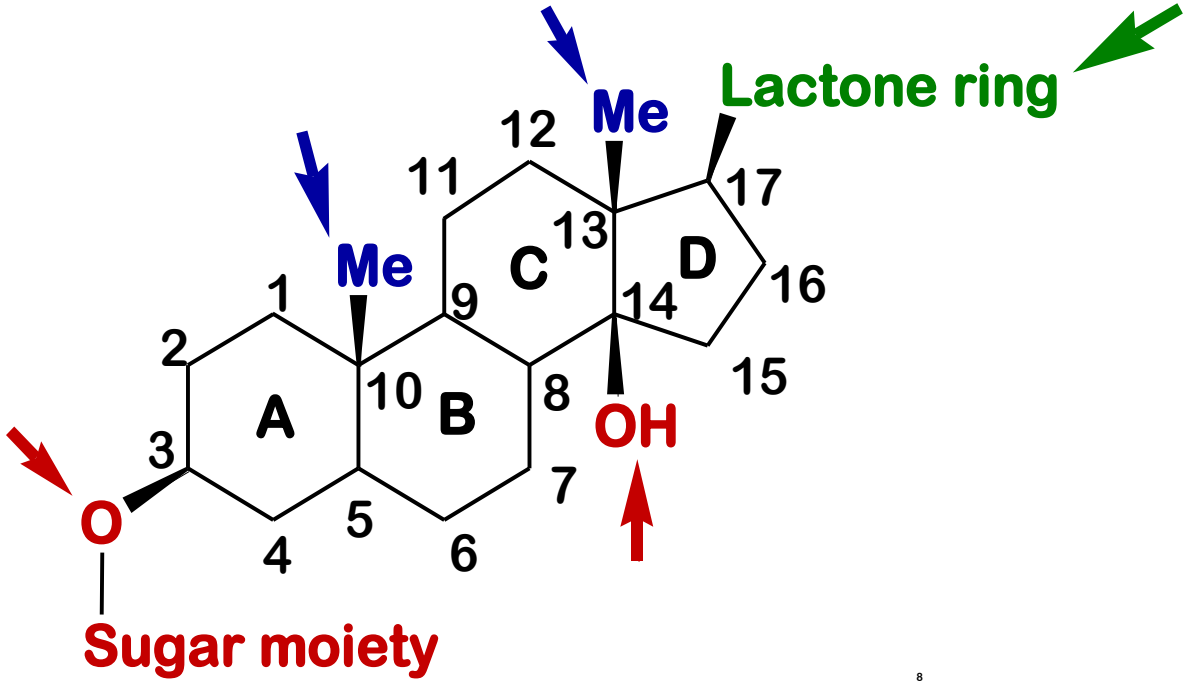
# Cardiotonic Aglycons اغليكون الغلوكوزيدات الوعائية القلبية



# Chemical Structure البنية الكيميائية

**Steroidal nucleus with:** نواة ستيروئيدية تحوي على

- **An unsaturated lactone ring attached to C-17** حلقة لاكتونية غير مشبعة مرتبطة بالموضع 17
- **β-hydroxyl group at C-14.** مجموعة هيدروكسيل بالموضع بيتا




**Basic structure of cardioactive glycosides**

# Chemical Structure

**In addition to:**

1. **An axially oriented -OH at C-3 to which is attached the sugar moiety.**
2. **Methyl groups at C-10 & C-13.**
3. **Cis-fusion of rings C / D & in most cases that of rings A / B.**
4. **Other substituents on steroidal nucleus e.g.:**

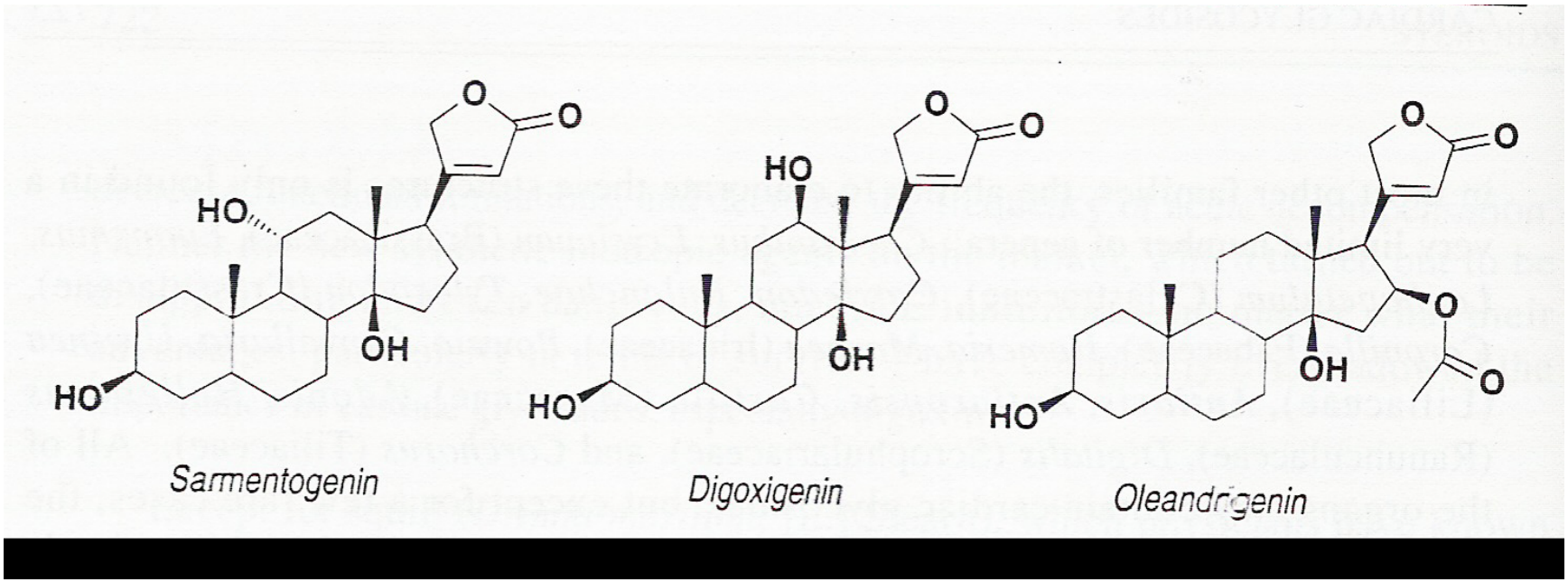
- **Replacement of $-CH_3$ at C-10 by -CHO or $-CH_2OH$ (e.g. *Strophanthus* glycosides).**
- **Additional-OHs present at C-1, C-2, C-5, C-11, C-12 & C-16.**

# Chemical of Sugar moiety السكاكر المرتبطة

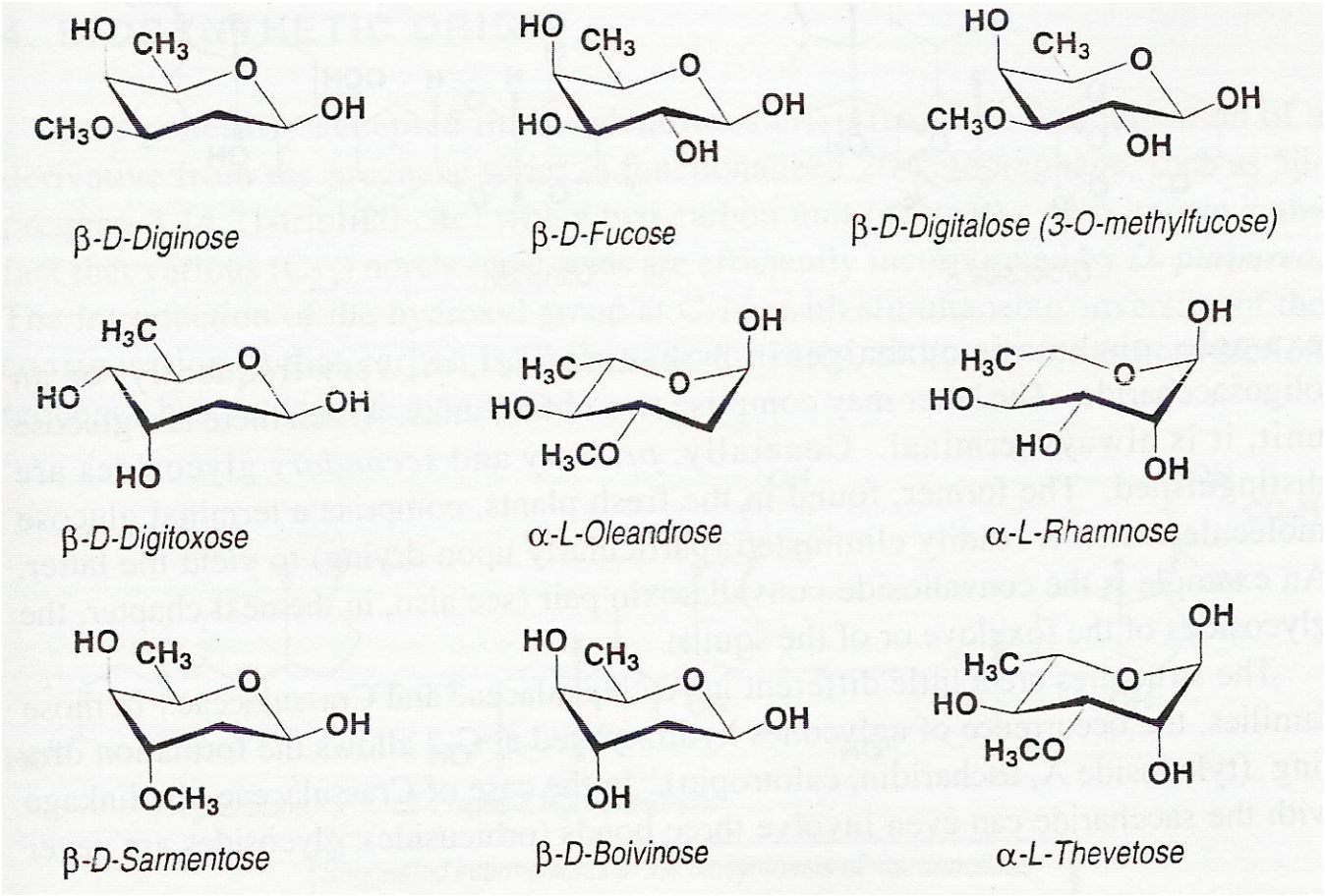
- **Characterized by being:**
  - **Attached to C-3 of the steroidal nucleus.** مرتبطة بالموضع 3 من جسم الاغليكون
  - **Variable number of sugar units (1 – 4).**عدد من السكاكر من 1-4
- **Sugars are of different types: hexoses, methyl pentoses & 2-6 deoxy hexoses etc**أنماط السكاكر المرتبطة...

| Type of sugar نوع السكر | Examples امثلة |
|---|---|
| 1. Hexose | Glucose |
| 2. Methyl pentose (6-deoxy hexose) | Rhamnose, Fucose & Allomethylose |
| 3. 2-6 deoxy hexose | Digitoxose & Boivinose |
| 4. Methyl pentose-3-methyl ether | Digitalose |
| 5. 2-6 deoxy hexose-3-methyl ether | Cymarose, Sarmentose & Oleandrose |

# Examples of the Aglycone of Cardinolides
# أمثلة عن أغليكونات الكاردينوليدات



# Sugars of Cardiac Glycosides



# Sugar moiety السكاكر

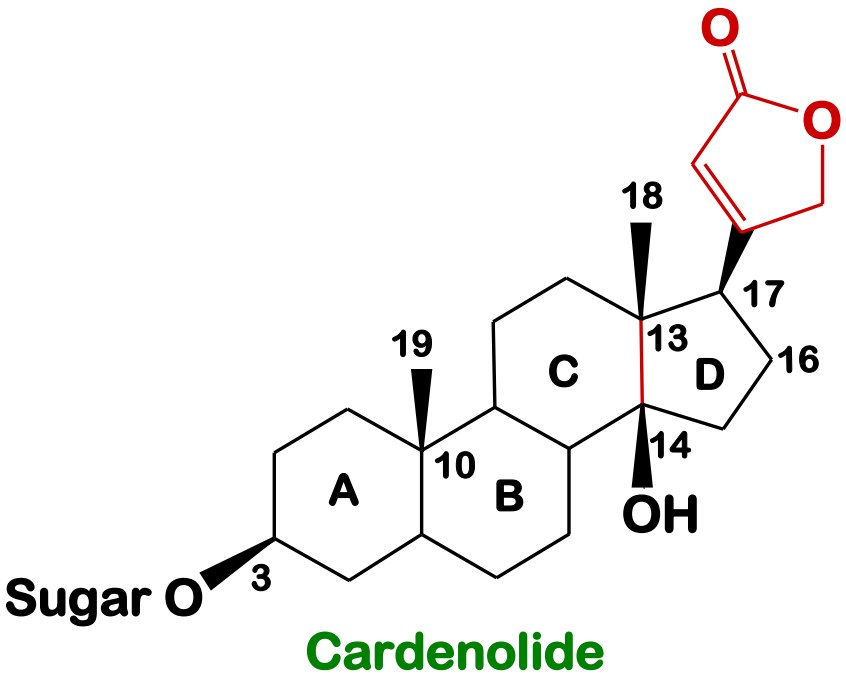
- **Generally there is no branching in the sugar chain** تكون بشكل عام على شكل سلاسل سكرية غير متفرعة
- **"Primary glycosides" have 1 or 2 molecules of glucose attached to the end of the sugar chain. Removal of these glucose units (by prolonged storage or enzymes) ➔ "secondary glycosides".** الغلوكوزيدات الأولية تتضمن جزيئة الى جزيئتي غلوكوز مرتبطتين في النهاية البعيدة للسلسلة السكرية، إزالة سكر الغلوكوز (بالحفظ الطويل أو بالانزيمات) يسبب تشكل الغليكوزيدات الثانوية
- **Sugars can modify activity (potency, toxicity), solubility, distribution & absorption of glycosides.** يمكن للسكاكر ان تعدل من الفعالية (السمية والتاثير) وكذلك من الذوبانية والتوزع والامتصاص لهذه الغليكوزيدات

# Classification تصنيف الغليكوزيدات الوعائية

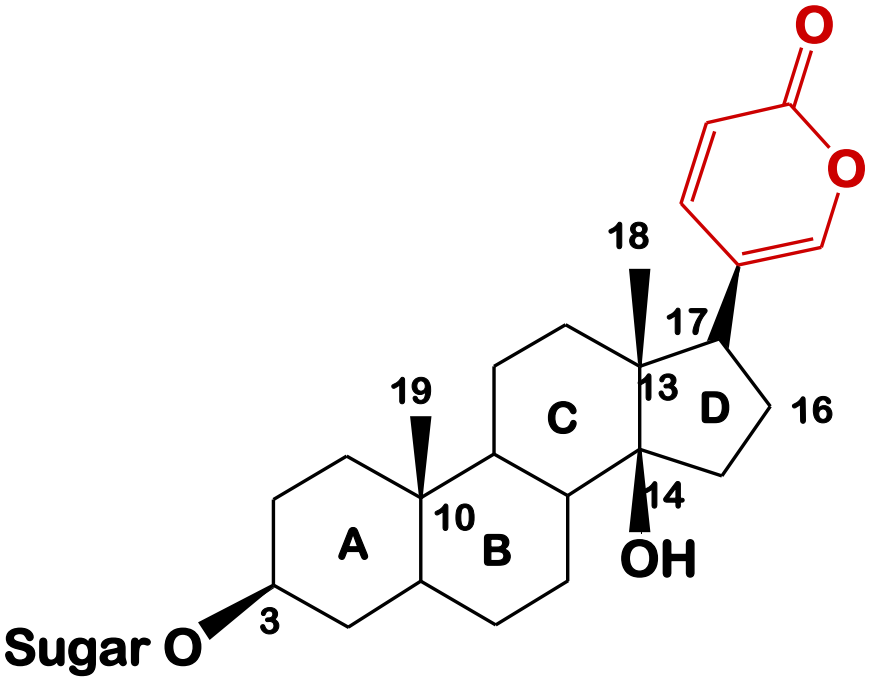
**According to the type of lactone ring present in the aglycones as:** وفقا للحلقة اللاكتونية تصنف الغليكوزيدات الوعائية الى

| مواضع الاختلافات Points of differentiation | Cardenolides (Butenolides) الكاردينوليدات | Bufadienolides (Pentadienolide or Scilladienolides البوفادينوليدات |
|---|---|---|
| 1. Structure of lactone ring الحلقة اللكتونية | 5-membered (4 C + 1 O) خماسية | 6-membered (5 C + 1 O) سداسية |
| 2. UV absorbance الامتصاص الأعظمي | 220 nm | 300 nm |
| 3. Tests for identification اختبارات التشخيص | + ve (Kedde's, Legal's & Raymond's tests) يعطي تفاعل إيجابي (كيدة، ليغال، رايموند.) | – ve (Kedde's, Legal's & Raymond's tests) يعطي تفاعل سلبي مع كيدة وليغال ورايموند |
| 4. Examples : Glycosides of امثلة | *Digitalis* & *Strophanthus* *الديجيتال والستروفانتوس* | Squill (*Urginea*) العنصل |

# Classification
# التصنيف




Cardenolide




Bufadienolide

# Properties, Stability & Hydrolysis
# الخواص، الثباتية والاماهة

- **Condition: crystalline, odorless & bitter taste.** حالتها: توجد متبلورة، بلا رائحة وبمذاق مر
- **Solubility: most are hydrophobic, soluble in organic solvent, slightly soluble in water & freely soluble in alcohol.** الانحلالية: هي كارهة للماء، ذوابة في المذيبات العضوية، قليلة الذوبان في الماء وذوابة في الايتانول والأغوال

**Except: ouabain highly hydroxylated, hydrophilic & water soluble.** الاستثناءات: الوبائين فهو محب للمذيبات المائية وذواب فيها

# Stability- Effect of acids
# الثباتية : تاثير الاحماض

1. **Mild acidic conditions ➔complete hydrolysis (cleavage of all glycosidic linkages) ➔ aglycone + individual sugar units.**

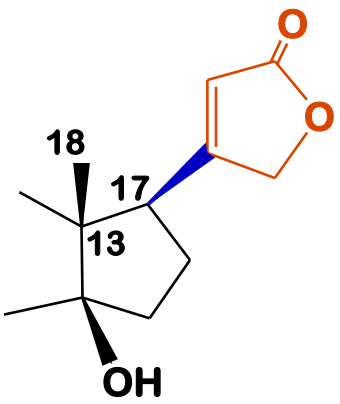
   **2-deoxy sugars directly attached to the aglycones are the most easily hydrolyzed**

بوسط حامضي ضعيف تسبب الاماهة للسكاكر فيتم الحصول على جسم الأغليكون

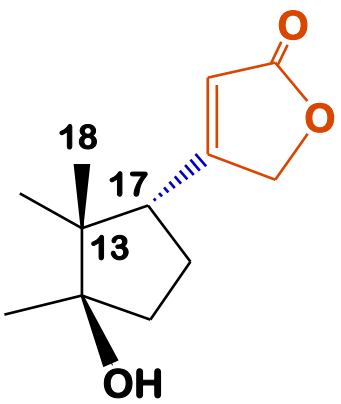
2. **Drastic acidic conditions ➔ elimination of OH group at C-14 ➔ 14, 15 anhydro derivatives.** في وسط حامضي شديد تسبب نزع للماء وتشكل اربطة مضاع

# Stability- Effect of alkalis
# تاثير القلويات

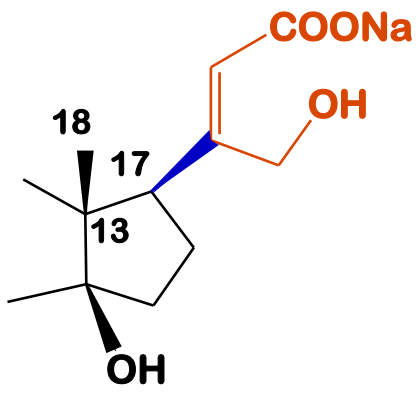
1. **Mild alkaline conditions → different products according to type of alkali:** يسبب بوسط قلوي ضعيف تشكل منتجات متعددة وفق التالي:
   - ♣ **+ NaOAc → Isomerisation of lactone ring from unstable β-oriented → stable α-oriented → inactive allo-cardenolides.** مع اسيتات وحيدة الصوديوم تعطي مصاوغات للحلقة اللاكتونية مشكلة مركبات غير ثابتة وذلك يسبب تشكل مركبات غير فعالة (الو كاردينوليد)
   - ♣ **+ $Na_2CO_3$ → deacylation of acylated sugars (e.g. of acetyl digitoxose in Lanatosides → corresponding *Purpurea* glycosides).** مع كربونات الصوديوم الثنائية يتم نزع جزر الاسيتيل المرتبط مع سكر الديجيتوكسوز (تحويل اللاناتوزيدات الى غليكوزيدات البوربوريا
2. **Drastic alkaline conditions: e.g. + strong NaOH solution → cleavage of lactone ring → carboxylic acid salt → complete loss of activity.** شروط قلوية قوية: إضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم يسبب انفتاح الحلقة اللاكتونية وتشكل املاح وبالتالي فقدان الفعالية.



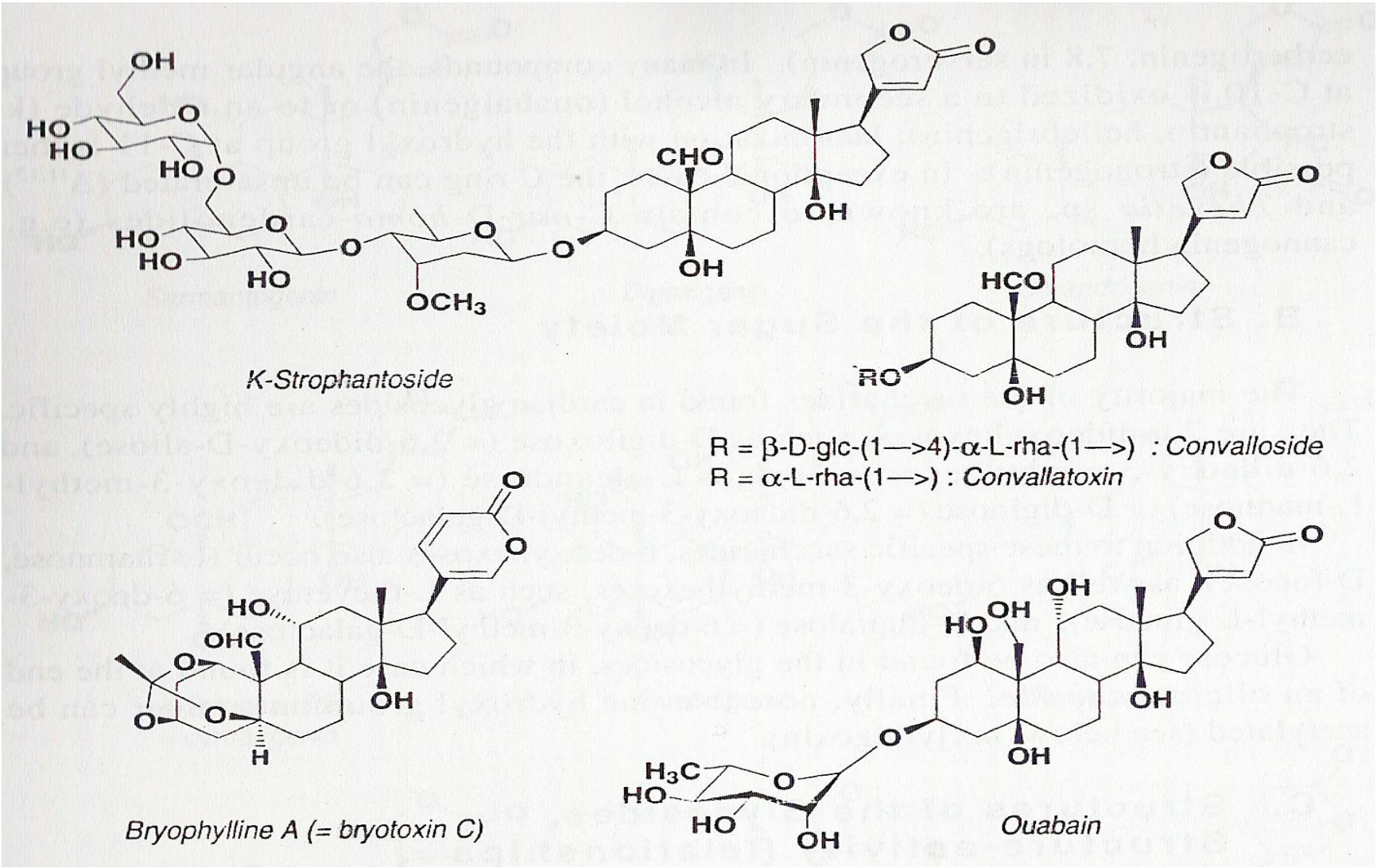

Cardenolide




Allo-cardenolide




Carboxylic acid salt



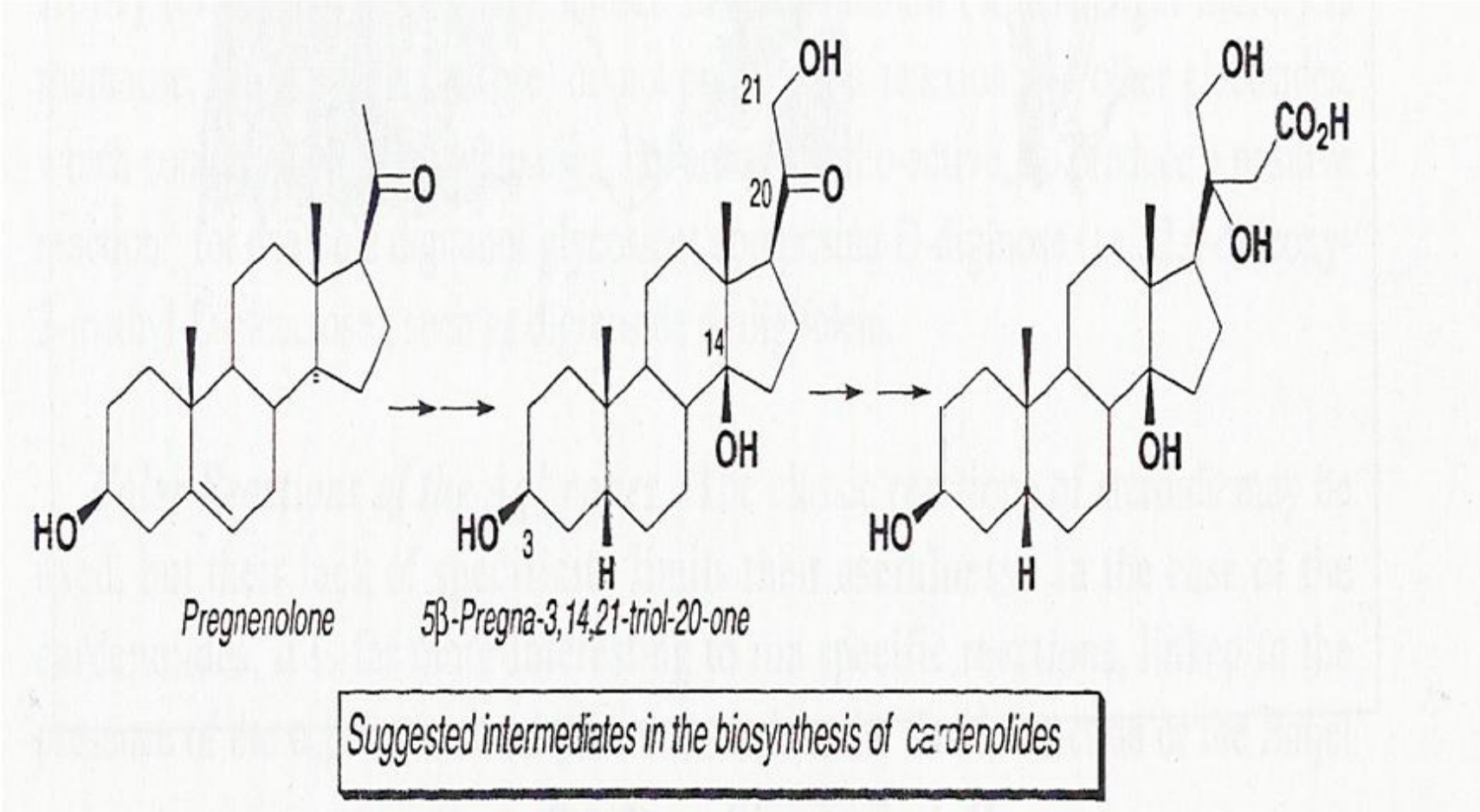

*K-Strophantoside*

R = β-D-glc-(1—>4)-α-L-rha-(1—>) : *Convalloside*
R = α-L-rha-(1—>) : *Convallatoxin*

*Bryophylline A (= bryotoxin C)*

*Ouabain*

# Biosyntheses of Cardinolides
# الاصطناع الحيوي للكاردينوليدات




Suggested intermediates in the biosynthesis of cardenolides

# Characterization of cardiac glycosides
# تشخيص الغليكوزيدات القلبية

- Extraction الاستخلاص
- Purification التنقية
- (pulverized drug + ethanol 50%, and lead acetate solution, boiling, cooling, elimination the residue by centrifugation. The supernatant layer extracted with CHCl3, Chloroform solution used in the test.)
- مسحوق عقار+ايتانول 50% ومحلول خلات رصاص، غليان، تبريد، فصل البقية البقية بالتنبيذ، الطبقة الطافية تستخلص بالكلوروفورم وتستخدم الخلاصة الكلوروفورمية للتشخيص.

# Color Reactions
# التفاعلات اللونية

- **Color Reactions of the Sugers**:تفاعلات لونية للسكاكر

1. Xanthydrol reaction (adding xanthydrol to the glycoside solution in concentrated acetic acid, heating, red color. تفاعل الكزانتيدرول: عند إضافة الكزانتيدرول الى محلول الغليكوزيد بوسط مركز م حمض الخل وبالتسخين نحصل على لون حمر
2. Keller –Kiliani reaction: تفاعل كيلر كلياني

adding of concentrated sulfuric acid, traces of ferric salts to a glycoside solution in concentrated acetic acid, reddish-brown ring develops and the acetic acid solution turns slowly blue-green. إضافة حمض الخل الى خلاصة الغليكوزيد ومن ثم إضافة اثار من ملح هيدروكلوريد الحديد وأخيرا قليل من حمض الكبريت يتشكل لون ضارب الى الأخضر في طبقة حمض الخل وتشكل حلقة بلون بني الى وردي عند إضافة حمض الكبريت المركز

# Color Reactions of the Aglycones
## تفاعلات لونية للأغليكونات

1. Steroids Reactions تفاعلات الستيروئيدات
2. Kedde reaction (Orange color with di-nitro Benzoic acid) and Baljet Reaction (orange color with picric acid): Aromatic nitro derivatives gives in an alkaline medium, deeply colored adduct in the presence of unsaturated lactones rings.

تفاعل كيدة ، تفاعل بالجيت (حلقة البوتينوليد مع عديدات النترو العطرية بوسط قلوي)

# Color Reactions التفاعلات اللونية

- **Fluorescence Reactions**: تفاعلات التالق

Cardiac glycosides form, under acidic conditions, fluorescent dehydrated derivatives (14-dehydro derivatives), and in the case of Aglycones substituted at C-16, 14, 16-didehydro derivatives. (resulting trienone has three double bonds conjuated with carbonyl groups). تعطي بوسط حمضي مشتقات منزوعة الماء متالقة

These reaction is useful to visualize chromatogram (TLC). يستخدم التفاعل ككاشف رذ على الطبقة الرقبقة

# Color Reactions التفاعلات اللونية

- **Fluorescence Reactions: تفاعلات التالق**

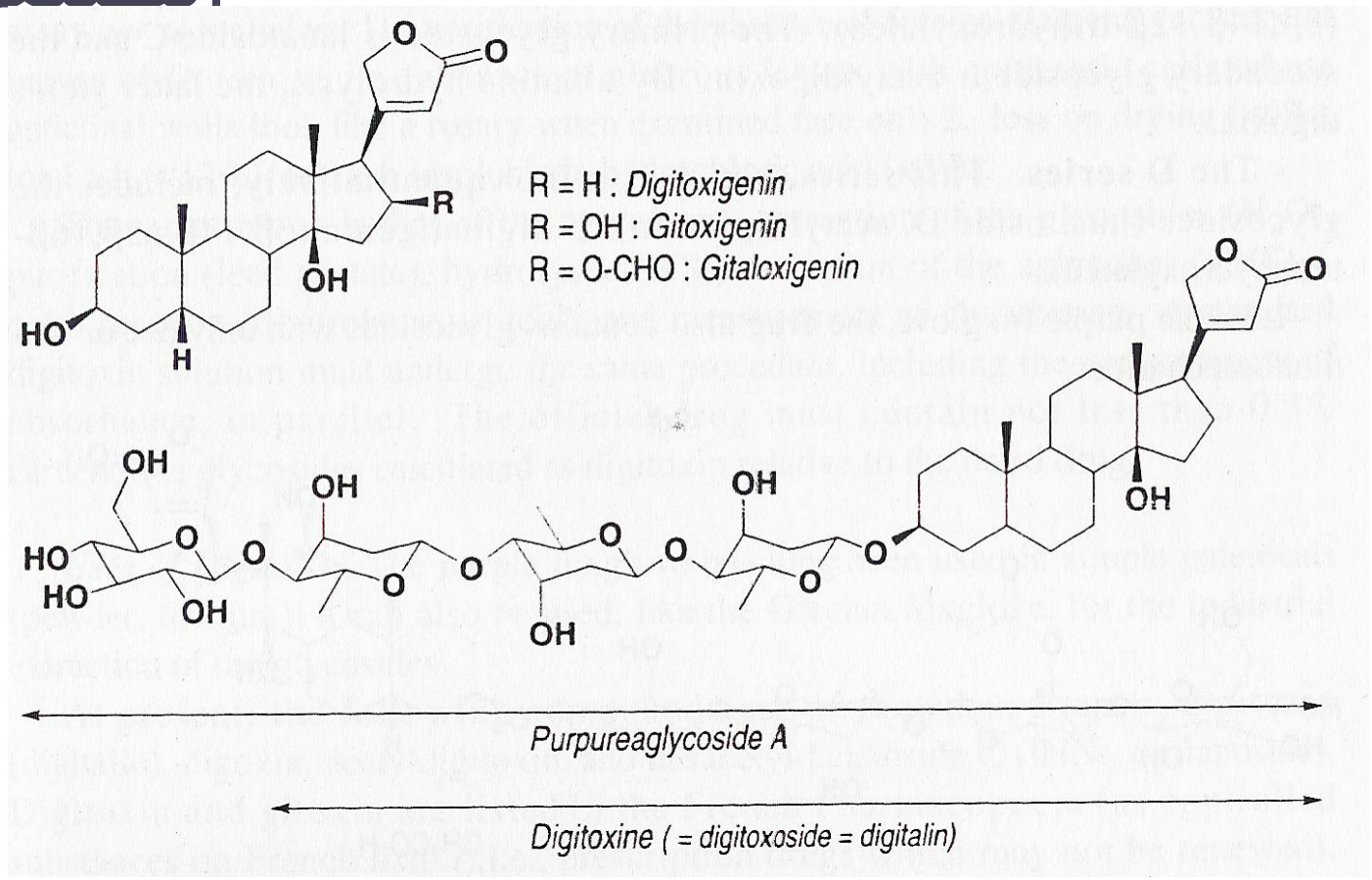
1. Jensen reaction: تفاعل جنسن كني

Spraying the plates with trichloracetic acid in solution in ethanol. The simultaneous use of an oxidant (chloramine T) allows the observation of fluorescent spots of different colors, which facilitates the interpretation of the chromatograms. Phosphoric acid can also be used, alone or mixed with sulfuric acid and ferric chloride.

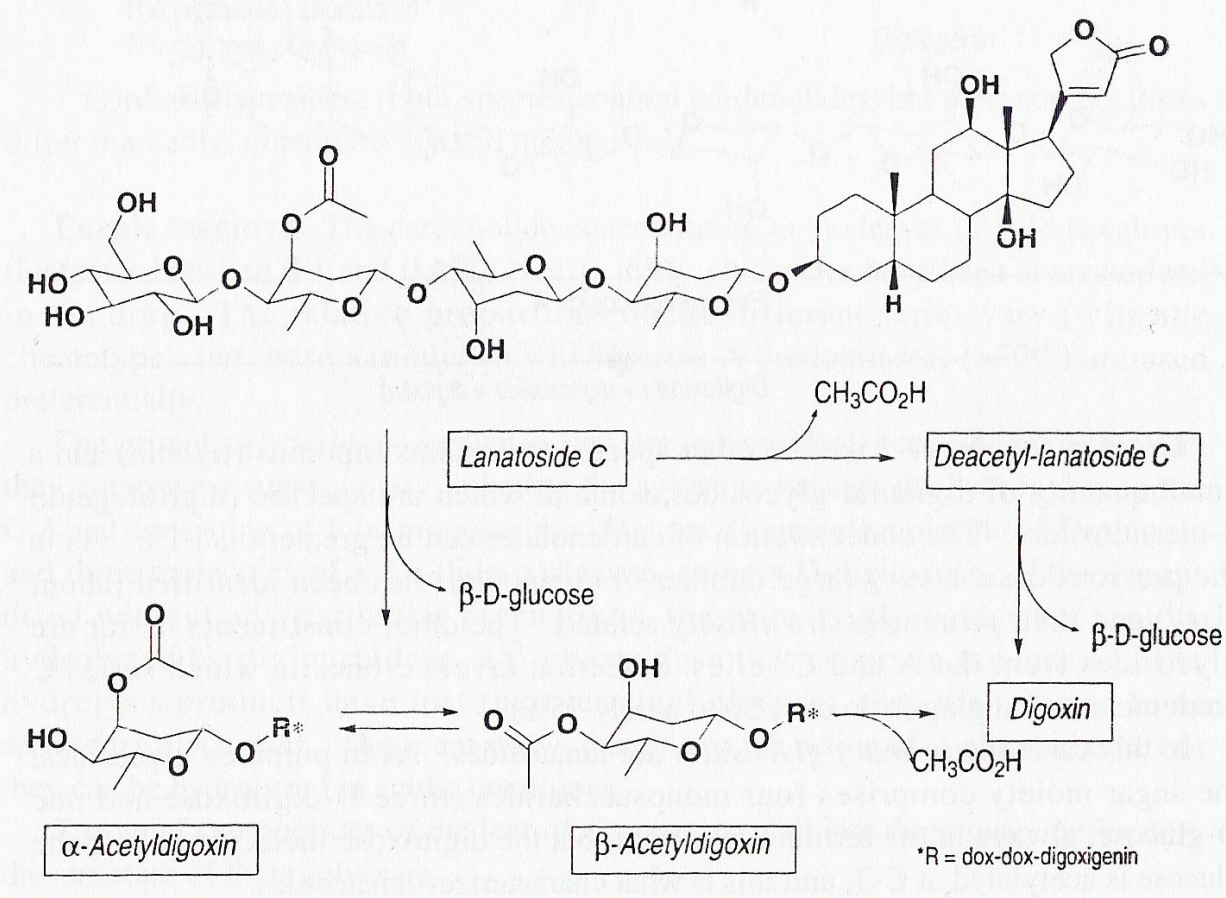
# Quantitation المعايرة

- Colorimetric method (Cardinolides):طريقة لونية
after Kedde reaction (lactone ring) or Baljet reaction. باستخدام تفاعل كيدة أو بالجيت
- Changing in the max. Absorbance of the solution after adding alkaline (Bufadinolides). تغير قيمة الامتصاص الاعظمي بانفتاح خلقة البنتانوليد بوسط قلوي

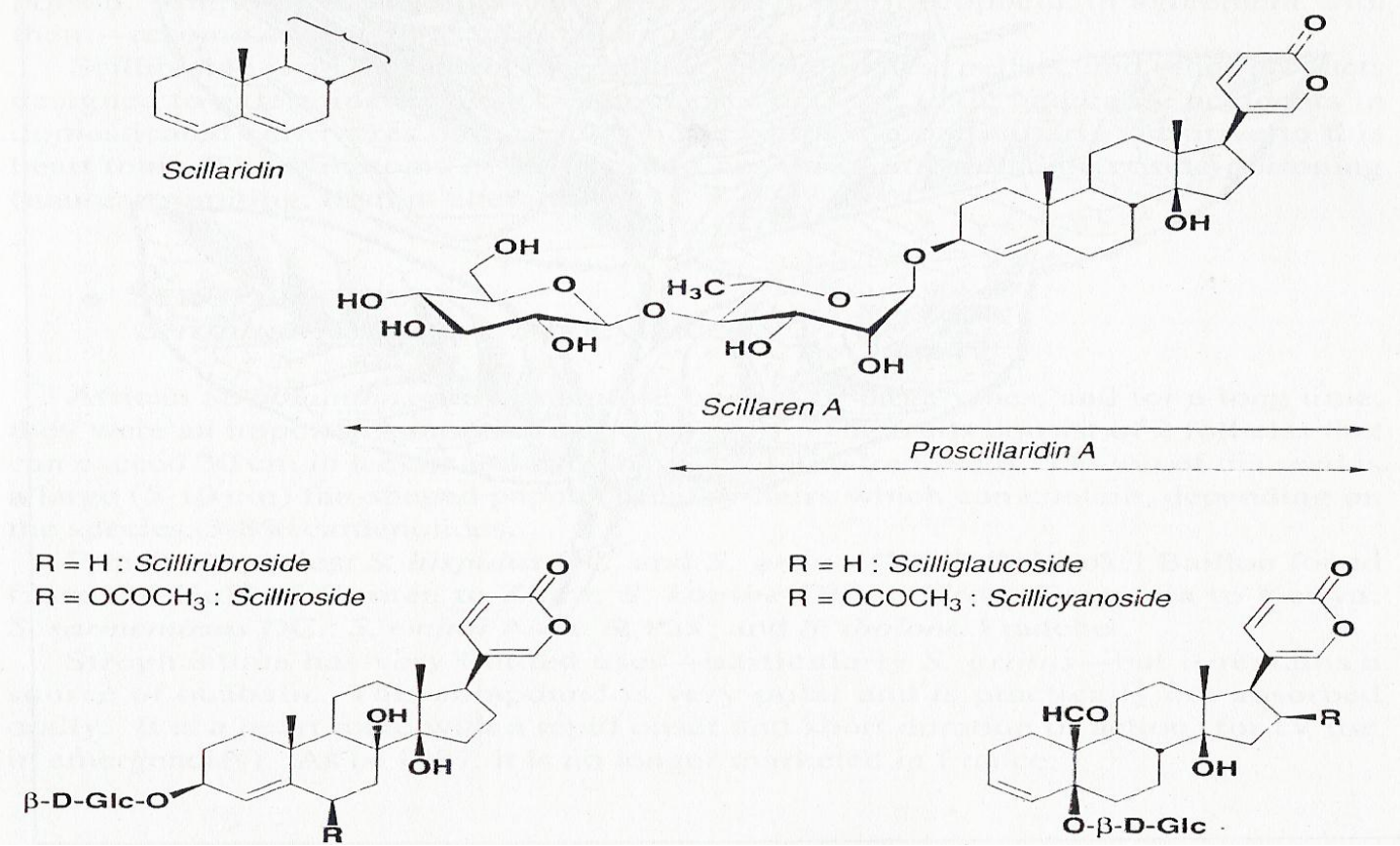
# Aglycones and Cardinolides in Digitalis purpurea امثلة عن الغليكوزيدات القلبية الطبعية



# Synthesis of new derivatives اصطناع الغليكوزيدات القلبية اعتبارا من اللاناتوزيدات



# أمثلة عن البوفادينوليدات Scillarins



# Stability-
# Effect of hydrolyzing enzymes الثباتية
# وتأثير الاماهة الانزيمية

**Glycosides + Enzymes ➔ Gradual hydrolysis**

**غليكوزيد + انزيم يؤدي الى اماهة تدريجية**

⏭ **Example:**

**Primary glycosides + α-glucosidase ➔**
**removal of terminal α-glucose ➔**
**Secondary glycosides** مثال: الغليكوزدات الأولية مع
الفا غليكوزيداز تؤدي الى انفصال الفا غلوكوز

# Chemical tests- الاختبارات الكيميائية

## A- Color reactions due to the aglycone moiety تفاعلات لونية تعود لوجود جسم الأغليكون

- **Reactions due to the (-$CH_2$-) group of the lactone ring [characteristic for 5-membered lactone ring of cardenolides]:** تحدث هذه التفاعلات لوجود مجموعات ميتيل على الحلقة اللاكتونية (مميز لحلقة للحلقة اللاكتونية الخماسية: الكاردينوليدات)

1. **Legal's test: + Na nitroprusside + NaOH ➔deep red color.** اختبار ليغال (نتروبروسيد الصوديوم بوسط قلوي)
2. **Raymond's test: + m-dinitrobenzene + NaOH ➔ violet color ➔ blue color.** اختبار رايموند (ميتا دي نترو بنزين بوسط قلوي)
3. **Kedde's test: + Kedde's reagents A (3, 5 dinitrobenzoic acid) & B (NaOH) ➔ violet color.** اختبار كيدة، دي نترو بنزوئيك اسيد مع قلوي
4. **Baljet's test: + Baljet's reagent (picric acid + NaOH) ➔ orange or red.** اختبار بالجين (حمض المر بوسط قلوي)

# Chemical tests- الاختبارات الكيميائية
## A- Color reactions due to the aglycone moiety
## تفاعلات لونية تعود لوجود جسم الأغليكون

- **Tests for steroidal nucleus: +ve with any steroidal compound including cardenolides & bufadienolides:** اختبارات تحري النواة الستيروئيدية: تعطي مع الستيرولات ومنها الكاردينوليدات والبوفادينوليدات الوانا مميزة

1- **Antimony trichloride test: + $SbCl_3$ / $CCl_4$ → blue or violet.** ثلاثي كلوريد الأنتموان

2- **Liebermann's test: + glacial acetic acid + 1 drop conc. $H_2SO_4$ → red, violet, blue to green.** اختبار ليبرمان (حمض الخل الثلجي وحمض الكبريت

# Chemical tests- اختبارات تحري وجود السكر منقوص الاوكسجين
# B-Color reactions due to the sugar moiety

**Keller-Killiani's test (for 2-deoxy sugar):** تفاعل كيلر كلياني

**Glycoside containing 2-deoxysugar + glacial acetic acid (+ traces of $FeCl_3$) + conc. $H_2SO_4$ (carefully added on wall of test tube ➔ lower layer) ➔ blue ring between the 2 layers.**

# Quantitative determination
# التحديد الكمي (المعايرة)

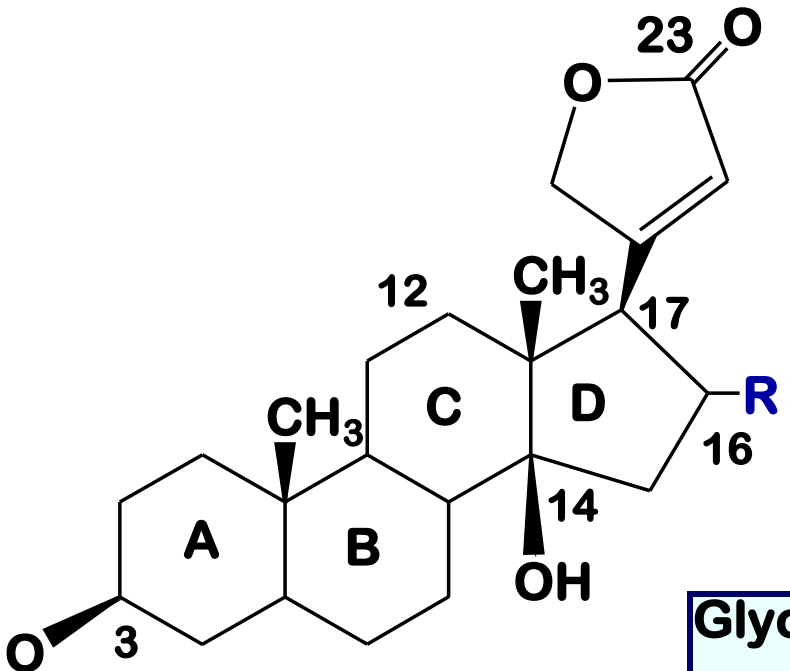
1. **Colorimetric: based on color tests e.g. Balget's or Kedde's.** لوني بتفاعل كيدة
2. **Gravimetric.** بالترسيب
3. **Fluorimetric (combined with chromatography)** مقياس التالق
4. **Biological: most widely used, based on determination of the minimum lethal dose that stops the heart under specified conditions.** اختبار خيوي (موت 60% من الأسماك)
5. **Immunoassay.** الاختبارات المناعية
6. **Chromatographic methods e.g. RP-HPLC (Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography).** طرق الكروماتوغرافيا

# *Digitalis lanata* glycosides – Structure
# بنية غليكوزيدات الديجيتال الصوفي

- **Primary glycosides with acetylated sugar moieties.** الغلوكوزيدات الأولية مرتبطة بسكاكر مؤستلة
- **Major constituents:** اهم الغلوكوزيدات

| Primary glycosides | Secondary glycosides | Aglycones |
|---|---|---|
| Lanatoside A | Digitoxin | Digitoxigenin |
| Lanatoside B | Gitoxin | Gitoxigenin |
| Lanatoside E | Gitaloxin | Gitaloxigenin |

# *Digitalis lanata* glycosides - Structure




β–D-digitoxose

β-D-digitoxose

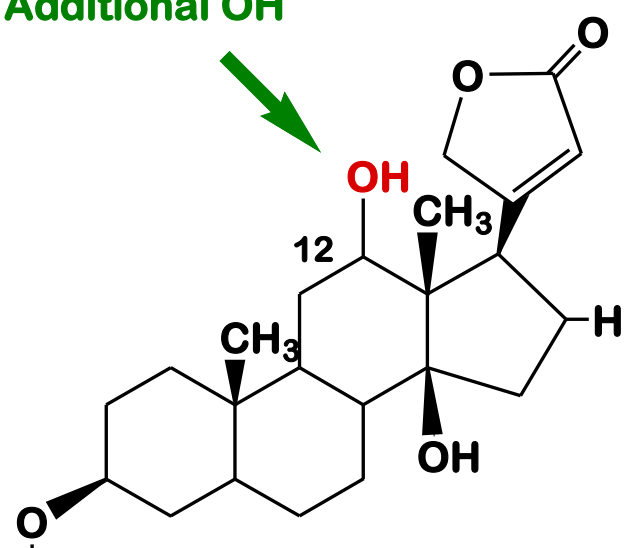
β-D-digitoxose – 3– O-acetyl

β-D-glucose

| Glycoside | R | Aglycone |
|---|---|---|
| Lanatoside A | H | Digitoxigenin |
| Lanatoside B | OH | Gitoxigenin |
| Lanatoside E | CHO | Gitaloxigenin |

# **Digoxin** (Lanoxin®)

Additional OH



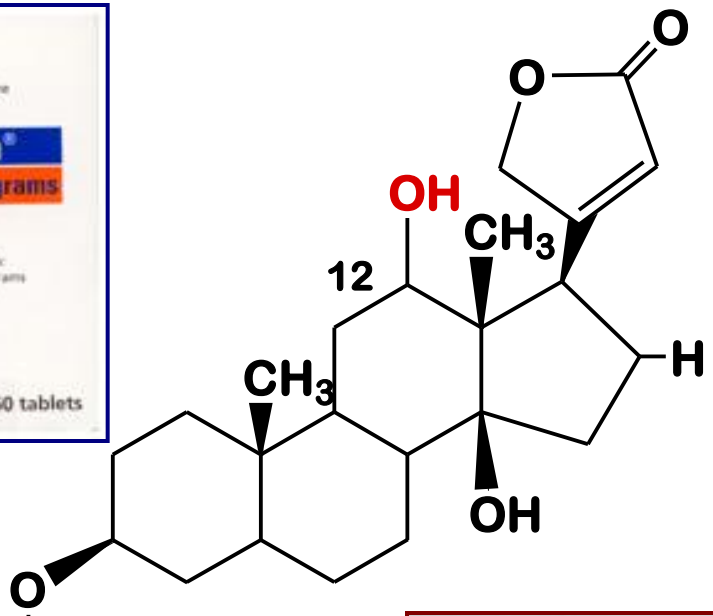

β-D-digitoxose

β-D-digitoxose

β-D-digitoxose - 3- O-acetyl

β–D-glucose

**Lanatoside C**



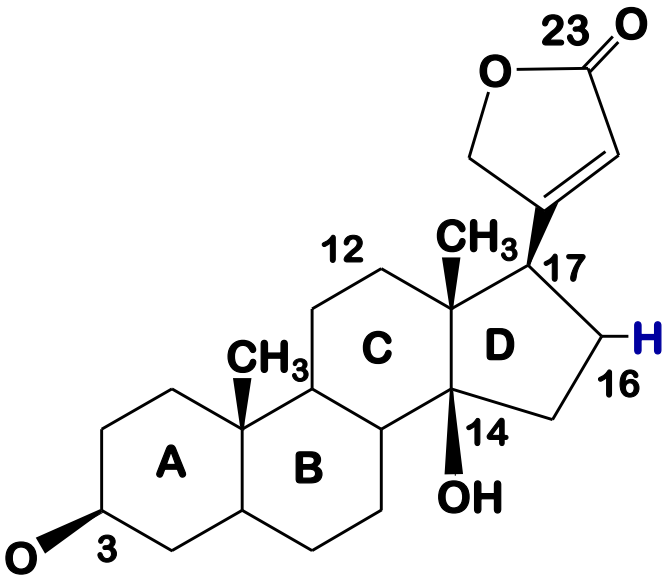

β-D-digitoxose

β-D-digitoxose

β-D-digitoxose

**Digoxin**

# Digitoxin



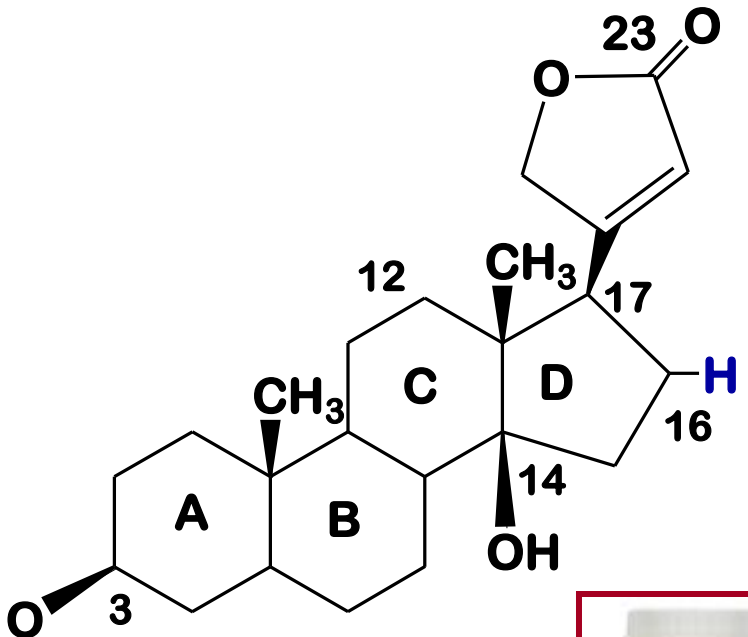

β–D-digitoxose

β-D-digitoxose

β-D-digitoxose - 3- O-acetyl

β-D-glucose

**Lanatoside A**




β–D-digitoxose

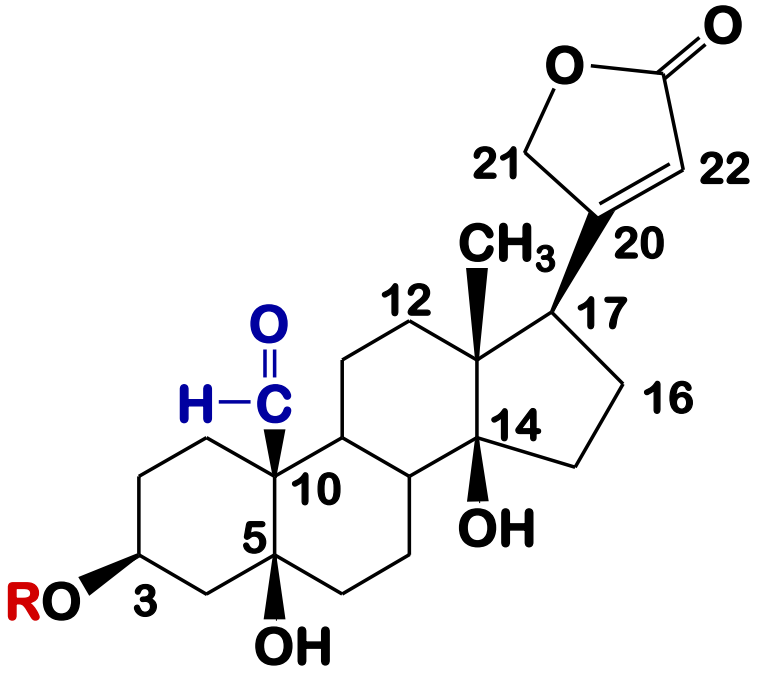
β-D-digitoxose

β-D-digitoxose

**Digitoxin**

# ***Strophanthus kombe*** glycosides

# غليكوزيدات الستروفانتوس




| | |
|---|---|
| **Glycoside** | **R=sugar moiety** |
| **K-strophanthoside** | **Cymarose- β–glucose- α-glucose** |
| **K-strophanthin-B** | **Cymarose-β–glucose** |
| **Cymarin** | **Cymarose** |

# *Strophanthus kombe* glycosides
# غليكوزيدات الستروفانتوس

**Hydrolysis:** الاماهة

**Enzymatic (gradual)** الماهة الانزيمية (التدريجية)

- **K-strophanthoside+ α-Glucosidase → terminal α-glucose + K-strophanthin-B**
- **K-strophanthin-B + strophanthobiase → β-glucose + cymarin**

**Uses:**

**K-strophanthin-B (like ouabain) is mainly used for intravenous therapy.**

**Chemical tests:** الاختبارات

- **+ 66% $H_2SO_4$ → emerald green color.** مع حمض الكبريت %66
- **Solution in $H_2O$ + $FeCl_3$ + $H_2SO_4$ → red color → green color.**
  مع حمض الكبريت وفوق كلور الحديد بوسك

# Strophanthus gratus glycosides-

## Ouabain (G-strophanthin)

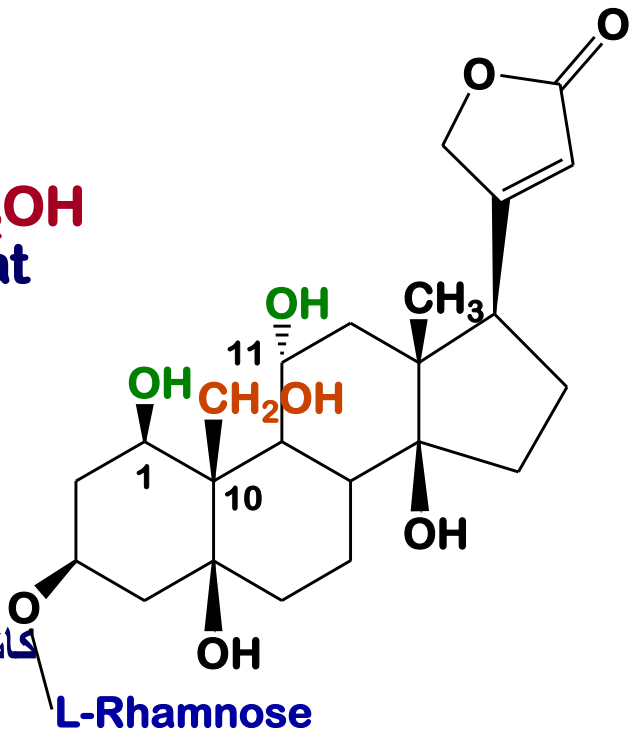
**Hydrolysis:** ➔**ouabagenin + rhamnose.**

**Structure:**

1. **Most polar cardiac glycoside.**
2. **Characterized by the presence of -$CH_2OH$ group at C-10 & additional OH groups at C-1& C-11.**

**Chemical test** الاختبارات

1. **+ 66% $H_2SO_4$ ➔ pink color ➔ green fluorescence.** مع حمض الكبريت %66
2. **+ Froehd's reagent, evaporate + conc. $H_2SO_4$ ➔ blue color.** كاشف فرويد خلاصة جافة مع حمض الكبريت المركز




**Ouabain**

**Uses**

**Used as cardiotonic & antiarrhythmic agent.**

# Squill glycosides- White squill
# غليكوزيدات العنصل

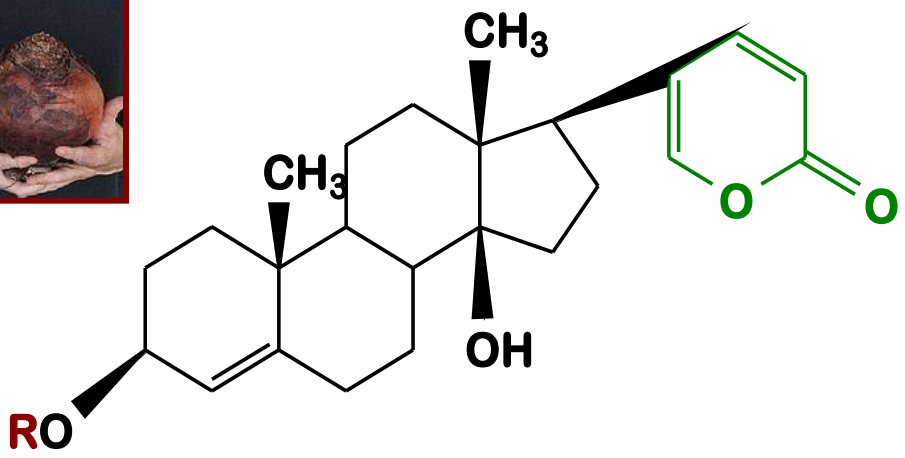
**Chemical test الاختبارات**

1. **Squill glycosides give positive tests for the steroidal moiety only, as they neither contain a pentacyclic lactone ring with a -$CH_2$ group (c.f. cardenolides) nor a 2- deoxy sugar in their sugar moiety.** يعطي فقط تفاعلا الجسم الستيروئية بينما لايعطي تفاعلات الحلقة اللاكتونية لأنها ليست خماسية ولا يعطي تفاعلات السكاكر النوعية لأنها لا تخوي عليها
2. **Squill glycoside or aglycone + acetic anhydride + $H_2SO_4$ ➔blood red ➔ blue ➔ bluish green color.**

يعطي غليكوزيد العنصل أو الأغليكون مع بلاماء حمض الخل وحمض الكبريت لونا احمر

# Squill glycosides- White squill

# غليكوزيدات العنصل



R= H,

R= Rhamnose-glucose,

R= Rhamnose,

Scillarenin

Scillaren A

Proscillaridin A

Acid hydrolysis

Enzyme (scillarenase) hydrolysis

Acid hydrolysis