

## 42. Der enzymatische Abbau des Scillirosids zum Scillirosidin.

22. Mitteilung über Herzglykoside<sup>1)</sup>

von A. Stoll und J. Renz.

(27. I. 50.)

Aus der roten Varietät der Meerzwiebel (*Scilla* (= *Urginea*) *maritima* (Baker) L., Fam. Liliaceae), die seit langem zur Vertilgung von Ratten verwendet wird, haben wir vor acht Jahren das Scillirosid<sup>2)</sup>, den Hauptträger der spezifischen Wirkung auf Ratten isoliert und beschrieben. Das Scillirosid ist ein Glykosid; es besteht aus dem Aglykon und 1 Mol Glucose und besitzt wie das chemisch nahe verwandte Scillaren A auch eine sehr starke Wirkung auf das Herz.

Die Untersuchungen über seine Konstitution<sup>3)</sup> waren dadurch erschwert, dass das Aglykon als solches bisher nicht isoliert werden konnte, so dass die Abbaureaktionen vom Glykosid aus durchgeführt werden mussten. Die Zucker-Aglykonbindung von Herzglykosiden, bei denen der Zuckeranteil aus Glucose besteht, ist ganz allgemein mit Säuren schwer verseifbar, so dass hierzu meist Bedingungen notwendig sind, die eine Veränderung bzw. weitgehende Zerstörung des Aglykons mit sich bringen. Die in letzter Zeit bei schwer spaltbaren Herzglykosiden mehrfach mit Erfolg angewandte Verseifungsmethode mit Aceton-Salzsäure nach *Mannich*<sup>4)</sup> führte beim Scillirosid zu keinem brauchbaren Ergebnis. Bei der sauren Hydrolyse des Scillirosids entstanden neben 1 Mol Glucose nur dunkelgefärbte, amorphe Produkte, aus denen keine kristallisierten Fraktionen gewonnen werden konnten. Wie aus der Untersuchung über die Konstitution des Scillirosids hervorgeht, sind die besonders empfindlichen Stellen des Aglykons eine Kerndoppelbindung, die sehr wahrscheinlich zwischen C<sub>8</sub> und C<sub>9</sub> lokalisiert ist, eine dazu benachbarte tertiäre Hydroxylgruppe an C<sub>14</sub>, ferner ein acetyliertes Enol-Hydroxyl in  $\alpha$ -Stellung zur Carboxylgruppe des doppelt ungesättigten, 6gliedrigen Lactonringes.

Bis vor kurzem war es in keinem Fall möglich gewesen, bei den Herzglykosiden die Bindung zwischen Aglykon und Zucker auf dem schonenden, enzymatischen Wege zu lösen. Auch die rote Meerzwiebel enthält kein Ferment, das die glykosidische Bindung des Scillirosids aufzuspalten vermöchte.

<sup>1)</sup> 21. Mitt., Helv. **32**, 293 (1949).

<sup>2)</sup> A. Stoll & J. Renz, Helv. **25**, 43 (1942).

<sup>3)</sup> A. Stoll & J. Renz, Helv. **25**, 377 (1942); A. Stoll, J. Renz & A. Helfenstein, Helv. **26**, 648 (1943).

<sup>4)</sup> C. Mannich & G. Siewert, B. **75**, 750 (1942).

Die Untersuchung der Herzglykoside der Samen von *Coronilla glauca* L. (Fam. Papilionaceae)<sup>1)</sup> führte zu der Feststellung, dass die genuinen, nur mit Glucose verbundenen Aglykone von einem Enzym-system der Samen bis zu den Aglykonen abgebaut werden. Es gelang, vier verschiedene, neue Aglykone zu identifizieren, die einerseits zum Strophanthidin, andererseits zu gewissen Digitalis-Aglykonen in näherer Beziehung stehen. Neu war die Beobachtung, dass Enzyme der Coronillasamen Glucosereste von Glykosiden, denen übrigens verschiedene Aglykone zugrunde liegen, gleicherweise bis zur zuckerfreien Stufe abzuspalten vermögen. Das Enzymsystem der Coronillasamen erweist sich insofern als spezifisch, als es mit Hilfe der  $\alpha$ -Glucosidase der Hefe oder der  $\beta$ -Glucosidase des Emulsins nicht gelingt, die Coronillaglykoside zu spalten.

Dieser Befund veranlasste uns, auch auf das Scillirosid der Meerzwiebel, das wie erwähnt nur aus Glucose und Aglykon besteht, die Enzyme der *Coronilla* einwirken zu lassen. Das Ergebnis war positiv; es konnte mit guter Ausbeute eine kristallisierte, zuckerfreie Verbindung isoliert werden, die sich auf Grund ihrer Eigenschaften und der Analysen als intaktes Aglykon des Scillirosids erwies. Für diesen Abbau eignen sich nicht nur die zerkleinerten, nicht vorbehandelten Samen, sondern besonders auch Enzympräparate, die z. B. durch Extraktion der Coronillasamen mit Fettlösungsmitteln oder durch Vorextraktion mit Alkohol oder Methanol erhalten werden. Die Herzglykoside und das Furocumaringlykosid der Samen werden so entfernt, ohne dass die enzymatische Aktivität leidet. Die Enzyme können auch mit Wasser oder Pufferlösungen aus dem Pflanzenmaterial extrahiert und aus diesen Auszügen mit Alkohol gefällt werden. Solche Enzympräparate sind wasserlöslich und eignen sich für die Glykosidspaltung unter Bedingungen, die für die präparative Aufarbeitung des Aglykons günstig sind.

Auf der Suche nach leichter zugänglichem Enzymmaterial für die fermentative Spaltung des Scillirosids fanden wir, dass auch Luzernesamen (*Medicago sativa* L.) befähigt sind, den Glucoserest des Scillirosids abzuspalten. Diese Beobachtung ist insofern bemerkenswert, als sowohl die Samen als auch die übrigen Teile der Luzernepflanze frei von Herzglykosiden sind. Über die interessanten Enzymsysteme, die sich in *Coronilla*- und in Luzernesamen vorfinden, werden wir in einer besonderen Arbeit später berichten.

Das Aglykon des Scillirosids, das wir Scillirosidin nennen, besitzt die Zusammensetzung  $C_{26}H_{34}O_7$ . Wie aus den Analysen und der Lactontitration hervorgeht, enthält das Aglykon die Acetylgruppe noch, die nach den früheren Untersuchungen im Lactonring sitzt. Das Scillirosidin kristallisiert aus wässrigem Methanol in bis

<sup>1)</sup> A. Stoll, A. Pereira & J. Renz, *Helv.* **32**, 293 (1949).

1 cm langen Nadeln, die bei 173—175<sup>01</sup>) schmelzen. Der Drehwert liegt bei  $-22,6^{\circ}$  ( $[\alpha]_D^{20}$  in Methanol). Als charakteristische Merkmale sind in Fig. 1 die im Laboratorium von Prof. *T. Reichstein*, Basel, neu aufgenommenen UV.-Spektren von Scillirosid und Scillirosidin abgebildet.

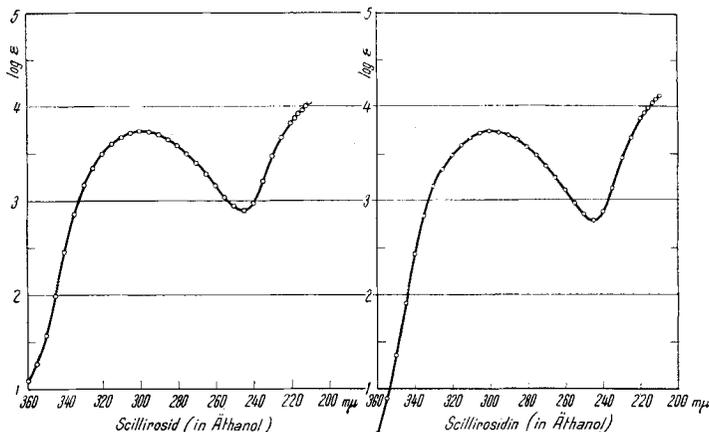


Fig. 1.

Aus der Identität der beiden Spektren geht hervor, dass das Aglykon bei der enzymatischen Hydrolyse, insbesondere in bezug auf den die Acetylgruppe tragenden Lactonring intakt geblieben ist.

Das Scillirosidin löst sich bei Zimmertemperatur bereits in der 20fachen Menge Methanol. Bei der Acetylierung entsteht ein Monoacetyl-scillirosidin,  $C_{28}H_{36}O_8$ , das aus Methanol in glasklaren, meist viereckigen Plättchen kristallisiert und bei 256<sup>0</sup> schmilzt. Das reine Acetylderivat löst sich erst in der ca. 100fachen Menge siedendem Methanol.

Das Scillirosidin ist ausgezeichnet durch eine sehr hohe Herzwirksamkeit. Die Toxizität nach *Hatcher*<sup>2)</sup> liegt bei 0,057 mg. Unseres Wissens steht damit das Aglykon des Scillirosids an der Spitze aller bis jetzt bekannten Herzgifte. Erst kürzlich ist im Hellebrigenin<sup>3)</sup> ein Aglykon bekannt geworden, das sich durch eine sehr hohe Wirksamkeit auszeichnet und dessen Acetylierung mit einer Steigerung der Toxizität einhergeht. Die Acetylverbindung des Scillirosidins ist dagegen weniger wirksam. Das Hellebrigenin und das Scillirosidin sind die einzigen bisher bekannt gewordenen Aglykone, die gegenüber ihren Glykosiden eine erhöhte Toxizität aufweisen. In der folgenden Ta-

<sup>1)</sup> Alle Schmelzpunkte dieser Arbeit sind korrigiert.

<sup>2)</sup> Die Werte, die an der Katze bestimmt wurden und sich auf 1 kg Tier bei intravenöser Infusion beziehen, verdanken wir einer Privatmitteilung von Prof. *E. Rothlin*, Basel.

<sup>3)</sup> *J. Schmutz*, *Helv.* **32**, 1442 (1949).

belle sind vergleichbare Toxizitätswerte einiger Aglykone und ihrer dazugehörigen Glykoside zusammengestellt.

**Tabelle 1.**  
Toxizitätswerte einiger Glykoside und Aglykone

Substanz	Formel	M.G.	Toxizität nach <i>Hatcher</i>	
			mg/kg	10 <sup>-3</sup> Millimol/kg
Scillirosid . . . . .	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> O <sub>12</sub>	620	0,120 <sup>1)</sup>	0,194
Scillirosidin . . . . .	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	458	0,057 <sup>1)</sup>	0,124
Acetyl-scillirosidin . . . . .	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>8</sub>	500	0,152 <sup>1)</sup>	0,304
Hellebrin . . . . .	C <sub>36</sub> H <sub>54</sub> O <sub>15</sub>	734	0,104 <sup>2)</sup>	0,142
Desgluco-hellebrin . . . . .	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>10</sub>	562	0,087 <sup>2)</sup>	0,155
Hellebrigenin . . . . .	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	416	0,077 <sup>2)</sup>	0,185
Acetyl-hellebrigenin . . . . .	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	458	0,064 <sup>2)</sup>	0,140
k-Strophanthosid . . . . .	C <sub>42</sub> H <sub>64</sub> O <sub>19</sub>	872	0,126 <sup>3)</sup>	0,144
Cymarin . . . . .	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>9</sub>	548	0,111 <sup>3)</sup>	0,202
Strophanthidin . . . . .	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	404	0,285 <sup>3)</sup>	0,705

In der letzten Spalte der Tabelle ist vergleichsweise die letale Infusionsdosis nach *Hatcher* in Millimolen angeführt; daraus geht besonders deutlich die Wirksamkeitssteigerung hervor, die bei der Überführung des Glykosids Scillirosid in das Aglykon Scillirosidin eintritt.

### Experimenteller Teil.

Darstellung von Scillirosidin. Um Raum zu sparen, beschreiben wir im folgenden nur ein Beispiel für die enzymatische Spaltung des Scillirosids mit Coronillasamen. Bei der Verwendung von Luzernesamen oder des aus Samen herausgelösten Enzyms verfährt man ganz analog.

Eine Aufschwemmung von 400 g mit Äther und Methanol vorextrahierten Samen der *Coronilla glauca*<sup>4)</sup> in 2,5 Liter Wasser, zu der man die Lösung von 5 g Scillirosid in 125 cm<sup>3</sup> Alkohol zumischt, wird nach Zugabe von etwas Toluol während 3 Tagen bei 35° schwach gerührt, wobei das pH des Versuchsansatzes zwischen 5,7 und 6 schwankt. Dann wird das Reaktionsgemisch mit 6 Litern Alkohol verdünnt, nach kurzem Rühren die Samenmasse von der wässrig-alkoholischen Lösung abfiltriert und noch zweimal mit Alkohol extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden im Vakuum auf 1 Liter konzentriert, worauf man das gebildete Aglykon mit Chloroform extrahiert. Der Eindampfrückstand der Chloroformlösung wird in 2 Litern 50-proz. Methylalkohol aufgenommen, diese Lösung mit Bleiacetat behandelt und das Filtrat der Bleifällung im Vakuum konzentriert. Darauf wird das Genin erneut in Chloroform übergeführt und die Chloroformlösung zur Trockne eingedampft. Den Eindampfrückstand (4,3 g) löst man in Benzol-Chloroform (1:1) und filtriert durch eine Säule aus Aluminiumoxyd. Die mit Benzol-Chloroform gewonnenen Fraktionen enthalten das in den Coronillasamen nach der Vorextraktion zurückgebliebene Furocumarin (Smp. 163°)<sup>5)</sup>. Die mit reinem und mit 0,5% Methanol-haltigem

<sup>1)</sup> Bestimmung von Prof. *E. Rothlin*, Pharmakol. Labor der *Sandoz AG.*, Basel.

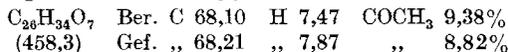
<sup>2)</sup> *J. Schmutz*, Helv. **32**, 1442 (1949).

<sup>3)</sup> *E. Rothlin*, Schweiz. med. Wschr. **70**, 577 (1940).

<sup>4)</sup> Die Samen stammen aus der Umgebung von Lissabon. Für die Einsammlung sind wir Herrn Dr. *A. Pereira* in Lissabon zu bestem Dank verpflichtet.

<sup>5)</sup> Vgl. *A. Stoll, A. Pereira & J. Renz*, Helv. **32**, 293 (1949).

Chloroform eluierten Anteile kristallisieren rasch beim Anreiben mit Methanol in langen Nadeln und geben eine starke *Liebermann'sche* Farbreaktion. Die Kristalle werden vereinigt und mit wenig Methanol gewaschen. Die Ausbeute an diesen weissen Kristallen beträgt 2,2 g, was einer Ausbeute von 60% entspricht. Zur weiteren Reinigung wird das Präparat in der 5fachen Menge heissen Methanols gelöst und durch Zugabe des gleichen Volumens heissen Wassers umkristallisiert. Beim Abkühlen bildet sich zuerst eine farblose ölige Abscheidung, die beim Stehen vollständig in grosse, schön ausgebildete Drusen, die aus Nadeln und Spiesen bestehen, übergeht (2 g). Aus verdünnter Lösung kristallisiert das Scillirosidin in Blättchen ohne vorherige ölige Ausscheidung und schmilzt bei 173—175°. Bei Zimmertemperatur wird das Aglykon von der 20fachen Menge Methanol gelöst.



Optische Drehung: 0,2102 g im Hochvakuum bei 80° getrocknete Substanz in 25 cm<sup>3</sup> Methanol, 2 dm-Rohr.

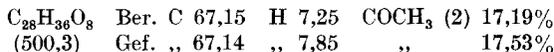
$$\alpha = -0,38^\circ \quad [\alpha]_D^{20} = -22,6^\circ$$

Lactontitration: 0,1638 g hochvakuumtrockene Substanz, gelöst in 10 cm<sup>3</sup> Methanol, werden nach Zugabe von 10,00 cm<sup>3</sup> 0,1-n. Schwefelsäure während 15 Minuten im Dampfbad erwärmt und nach 2stündigem Stehen bei Zimmertemperatur gegen Phenolphthalein mit 0,1-n. Natronlauge titriert. Die gelblich verfärbte Lösung verbrauchte 6,65 cm<sup>3</sup> Lauge.

Äquivalentgewicht: Ber. 229 Gef. 245

Die Lauge (2 Mol) wurde vom Lactonring und der Acetylgruppe verbraucht.

Die Acetylverbindung des Scillirosidins. 0,50 g des Aglykons werden in Pyridin gelöst und mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Beim Eingiessen der Reaktionslösung in Wasser scheidet sich ein weisses Pulver (0,50 g) ab, das nach dem Aufnehmen in 35 cm<sup>3</sup> siedendem Methanol in glasklaren Plättchen (0,46 g) kristallisiert. Nach dem Umkristallisieren aus der 100fachen Menge siedenden Methanols schmilzt die Acetylverbindung bei 256°.



Optische Drehung: 0,0841 mg Substanz in 25 cm<sup>3</sup> Methanol gelöst, 2 dm-Rohr,  $\alpha = -0,41^\circ$ .

$$[\alpha]_D^{20} = -61,0^\circ$$

Alkalische Titration: 52,1 mg der Acetylverbindung wurden in 5 cm<sup>3</sup> Methanol und 5,00 cm<sup>3</sup> 0,1-n. Natronlauge gelöst. Die Lösung wurde im Dampfbad kurz erwärmt und nach einigem Stehen bei 20° mit 0,1-n. Schwefelsäure gegen Phenolphthalein titriert. Laugenverbrauch 3,12 cm<sup>3</sup>.

Äquivalentgewicht: Ber. 166,4; Gef. 167,0.

Das entspricht 3 Mol Alkali, 1 Mol für den Lactonring, 2 Mol für 2 Acetylgruppen.

### Zusammenfassung.

Das Scillirosid, das sehr aktive ratizide und herzwirksame Hauptglykosid aus der roten Meerzwiebel, wird durch Enzyme der Coronilla- und der Luzernesamen, welche die Bindung zwischen Aglykon und Glucose angreifen, in das Aglykon Scillirosidin und Glucose zerlegt. Das erst durch diese enzymatische Spaltung zugänglich gewordene Scillirosidin besitzt eine gegenüber Scillirosid gesteigerte, sehr hohe Wirksamkeit auf das Herz.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium  
„Sandoz“, Basel.