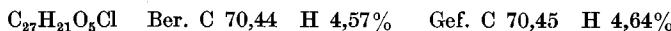
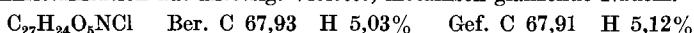


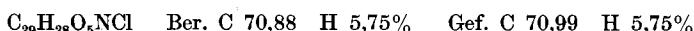
1 Std. auf 120° erhitzen. Nach dem Erkalten mit 20 cm³ Äthanol verdünnen und mit 20-proz. Perchlorsäure das Salz fällen. Umkristallisation aus Eisessig. Blauviolette Kristalle.



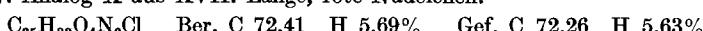
2-Dimethylaminostyryl-4,6-diphenyl-pyryliumperchlorat (XVI). 0,77 g 2-Methyl-4,6-diphenyl-pyryliumsulfoacetat und 0,3 g p-Dimethylaminobenzaldehyd 20 Min. in 30 cm³ Eisessig zum Sieden erhitzen. Mit 20-proz. Perchlorsäure das Salz fällen. Umkristallisation aus Eisessig. Violette, metallisch glänzende Nadeln.



2-Diäthylaminostyryl-4,6-diphenyl-pyryliumperchlorat (XVII). Analog XVI mit 0,36 g p-Diäthylaminobenzaldehyd. Violette, metallisch schimmernde Kristalle.



N-Phenyl-2-diäthylaminostyryl-4,6-diphenyl-pyridiniumperchlorat (XVIII). Analog X aus XVII. Lange, rote Nadelchen.



Zusammenfassung.

Eine Anzahl 2,6-Distyrylpypyliumverbindungen werden synthetisiert und durch Umsatz mit primären Aminen in Distyrylpypyridiniumsalze übergeführt. Unter Heranziehung geeigneter Vergleichssubstanzen werden einige Regeln über Konstitution und Farbe abgeleitet. Das Hauptergebnis ist, dass in den Pyryliumsalzen die zweite Styrylgruppe einen nur mässig starken, in den Pyridiniumsalzen sogar nur einen sehr schwachen bathochromen Einfluss ausübt.

Basel, Institut für Farbenchemie der Universität.

284. Darstellung von Scillarenin, dem primären Aglykon von Scillaren A, mit Hilfe eines adaptiven Enzyms.

28. Mitteilung über Herzglykoside¹⁾
von A. Stoll, J. Renz und A. Brack.

(13. X. 51.)

Das Scillaren A (Ib, S. 2305), das Hauptglykosid der weissen Meerzwiebel²⁾, wird bei der Hydrolyse mit Säure schon unter ganz milden Bedingungen gespalten und zwar in Scillarin A (III, S. 2305) und Scillabiose, ein Disaccharid, das aus Rhamnose und Glucose besteht. Das Scillarin A ist nicht das intakte Aglykon: Bei der Hydrolyse ist die zuckertragende Hydroxylgruppe an C 3 des Steroidgerüstes durch Wasserabspaltung ausgetreten unter Bildung einer

¹⁾ 27. Mitt., Helv. **34**, 1460 (1951).

²⁾ A. Stoll, E. Suter, W. Kreis, B. B. Bussemaker & A. Hofmann, Helv. **16**, 703 (1933).

neuen Doppelbindung, die in Konjugation zu der bereits im Naturprodukt vorhandenen Doppelbindung A5,6 zu stehen kommt. Die neu hinzukommende Doppelbindung liegt demnach zwischen C 3 und C 4. Für die Verteilung der beiden Doppelbindungen des Scillaridins A auf die Ringe A und B spricht vor allem die Absorption im Ultraviolett (s. Fig. 2, b) und die Tatsache, dass Maleinsäureanhydrid nicht addiert wird.

Die Leichtigkeit, mit welcher der Zuckerrest bei der Hydrolyse von Scillaren A unter Wasserabspaltung und Bildung einer neuen Doppelbindung schon mit stark verdünnten Säuren entfernt wird, ist wohl auf die Nachbarschaft der ursprünglich vorhandenen Doppelbindung A5,6 zurückzuführen. Erst wenn diese hydriert ist, kann der Zuckerrest abgespalten werden, ohne dass das Hydroxyl an C 3 eliminiert wird. In einer entsprechenden Versuchsreihe kann das Scillaren A schliesslich in Epi-allo-lithocholsäure¹⁾ übergeführt werden, ein Beweis, dass das zuckertragende Hydroxyl an C 3 in β -Stellung vorhanden ist.

Bei der enzymatischen Hydrolyse von Scillaren A mit Scillarena-se, einem Enzym, das in der Meerzwiebel enthalten ist, wird aus der Zuckerkette dieses Glykosids nur der aussenstehende Glucoserest abgespalten²⁾. Es entsteht das Proscillarin A (Ia, S. 2305).

In neuester Zeit sind Enzymsysteme fremder Herkunft gefunden worden, die den Glucoserest aus Scillaren A und aus andern Herzglykosiden ebenfalls abzuspalten vermögen. Es sind dies vor allem Enzyme aus niederen Pilzen³⁾ und solche, die in gewissen tierischen Organen⁴⁾, wie Herzmuskel, Niere und Leber enthalten sind. Herzglykoside, die in ihrer Molekel Desoxyzucker enthalten, werden auch von diesen Enzymen nicht bis zur Aglykonstufe, sondern nur bis zu den glucosefreien Glykosiden abgebaut. Nur in den wenigen Fällen, bei denen ein Aglucon direkt mit Glucose verbunden ist, wie z. B. im Scillirosid und im Uzarin, erfolgt der Abbau mit diesen Enzymen fremder Herkunft bis zur Agluconstufe. Bis vor kurzem galt die Regel, dass enzymatisch aus Herzglykosiden nur Glucosereste abgespalten werden können.

Wir versuchten nun, durch Züchtung eines unserer Pilzstämme auf Rhamnose als einziger Kohlenstoffquelle die Bildung von adaptiven Enzymen im Sinne von Karström⁵⁾ anzuregen, in der Hoffnung, damit z. B. den Rhamnoserest aus dem Proscillarin A abspalten

¹⁾ A. Stoll & J. Renz, Helv. **24**, 1380 (1941).

²⁾ A. Stoll, W. Kreis & A. Hofmann, Z. physiol. Ch. **222**, 24 (1933).

³⁾ A. Stoll, J. Renz & A. Brack, Helv. **34**, 397 (1951); R. Tschesche, K. Sellhorn & K.-H. Braßge, B. **84**, 576 (1951).

⁴⁾ A. Stoll & J. Renz, Helv. **34**, 782 (1951).

⁵⁾ H. Karström, Ergebnisse d. Enzymforschung **7**, 350 (1938); vgl. auch B. S. Gould & A. A. Tytell, J. Gen. Physiol. **24**, 655 (1941).

zu können. Für die Kulturen wählten wir Pilzstämme¹⁾, die sich besonders für die Spaltung des Scillirosids in Aglucon und Glucose als geeignet erwiesen hatten. Es kamen dafür z. B. die folgenden Pilze in Frage: Die Penicilliumstämme 833 und 889, der Paecilomyces-stamm 904 und Claviceps purpurea. Werden diese Pilze auf glucosehaltigen Nährböden gezüchtet, so enthalten weder Nährösung noch Mycel Enzyme, die Proscillarin A zu spalten vermögen.

Die Pilze wuchsen auf der Nährösung, die außer Pepton nur noch 2% Rhamnose enthielt, zuerst nur spärlich. Nach der zweiten Überimpfung zeichnete sich der Pilz 889 (Penicillium spec., Gruppe Asymmetrica, Divaricata) gegenüber den andern durch eine deutlich bessere Entwicklung aus, weshalb wir von da an nur noch mit diesem Penicilliumstamm weitergearbeitet haben. Nach fünf Generationen zeigte der Pilz auf diesem Nährboden bereits ein so gutes Wachstum, dass wir ihn in grösseren Mengen in Fernbach-Kolben auf einer etwas modifizierten Rhamnose-Nährösung züchten konnten. Wir haben dann einerseits das gewaschene Mycel und anderseits die Nährösung auf ihre enzymatische Aktivität gegenüber Proscillarin A geprüft und konnten feststellen, dass in die Nährösung ein Enzym übergegangen war, das die Rhamnose aus dem Proscillarin A abspaltete, worauf dann auch das intakte primäre Aglykon in kristallisierter Form isoliert werden konnte.

Das neue Enzym wird zum grössten Teil an die Nährösung abgegeben; der Enzymgehalt des Mycels ist wesentlich geringer. Die Fähigkeit, aus Scillirosid die Glucose abzuspalten, bleibt dem auf Rhamnose gezüchteten Pilz erhalten, und zwar ungefähr im gleichen Ausmass wie bei den Kulturen auf glucosehaltiger Nährösung. Das glucoseabspaltende Enzym ist also ein konstitutives Enzym, d. h. es wird unabhängig von der Nährösung in den Zellen stets gebildet. Dagegen entsteht das Rhamnose-abspaltende Enzym nur, wenn der Pilz auf einer Rhamnose-Nährösung gezüchtet wird; es ist ein adaptives Enzym, allerdings nicht gemäss der strengen Definition von Karström²⁾.

Bemerkenswert ist, dass die Gegenwart von freier Rhamnose als einziger Kohlenstoffquelle in der Nährösung genügt, um das neue Enzym zu bilden, das dann aus einem enzymatisch sonst nicht spaltbaren Rhamnose-Glykosid die gebundene Rhamnose durch Lösung der glykosidischen Bindung freizulegen vermag.

Eine ähnliche Beobachtung wurde bei Penicillium chrysogenum³⁾ gemacht. Dieser Pilz bildet auf synthetischen Nährböden keine pektinabbauenden Fermente. In der Nähr-

¹⁾ A. Stoll, J. Renz & A. Brack, Helv. 34, 397 (1951).

²⁾ H. Karström, Ergebnisse d. Enzymforschung 7, 354 (1938). Die Bildung der adaptiven Enzyme in einem Mikroorganismus ist abhängig von der Gewöhnung des Organismus an die spezifischen Substrate. In unserm Fall wäre das spezifische Substrat das Proscillarin A und nicht Rhamnose.

³⁾ H. J. Phaff, Arch. Biochem. 13, 67 (1947).

lösung sind also weder die Pektinase, welche die glykosidischen Bindungen des Pektins aufspaltet — wobei unter anderem hauptsächlich Galakturonsäure frei wird — noch die Pektinesterase (Pektase) vorhanden, welche die mit Methanol veresterten Carboxylgruppen freilegt. Wird bei der Züchtung des Pilzes aber als Kohlenstoffquelle z. B. die D-Galakturonsäure¹⁾, das Produkt der Hydrolyse des Pektins, verwendet, so werden in die Nährlösung die Pektinase und die Pektinesterase abgeschieden.

Bei andern Pilzen, wie z. B. bei dem Parasiten *Botrytis cinerea* Pers.²⁾ und bei *Aspergillus niger v. Tiegh*³⁾ erwies sich hingegen die Pektinase als ein konstitutives und die Pektinesterase als ein adaptives Enzym, das in Gegenwart von Pektin reichlich gebildet wird.

Unser auf Rhamnose gezüchteter *Penicillium* stamm 889 vermag also mit Hilfe seines konstitutiven Enzyms das Scillirosid in Scillirosidin und Glucose, und mit seinem adaptiven Enzym das Proscillarin A in das bisher unzugängliche primäre Aglykon und Rhamnose zu spalten. Wenn wir den über 14 Generationen nur auf Rhamnose gezüchteten Pilz wieder ausschliesslich auf Glucose züchten, so verliert er die Fähigkeit, das Proscillarin A-spaltende Enzym zu bilden, wieder.

Es sei hier noch darauf hingewiesen, dass das adaptive Enzym von *Penicillium* 889, welches das Proscillarin A spaltet, bisher als konstitutives Enzym noch nicht angetroffen wurde, im Gegensatz z. B. zur Pektinase, die sowohl als adaptives (in *Penicillium chrysogenum*) als auch als konstitutives Enzym (in *Botrytis* und *Aspergillus*) vorkommt. Es handelt sich also in unserer Arbeit um die Bildung eines bisher unbekannten Enzyms.

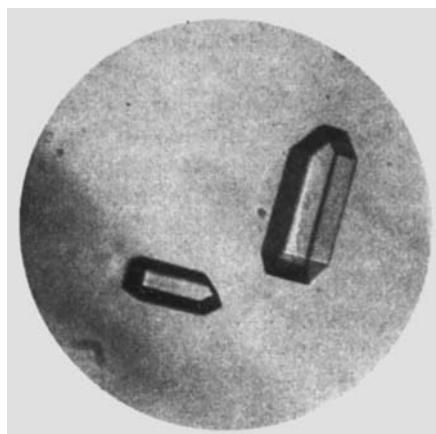


Fig. 1.
Scillarenin aus 50-proz. Alkohol.

¹⁾ Andere Kohlenstoffquellen, die zur Bildung der pektinspaltenden Enzyme führten, waren außer Pektin und Pektinsäure nur noch Schleimsäure und L-Galaktonsäure, also Verbindungen, welche in der Konfiguration mit der D-Galakturonsäure übereinstimmen.

²⁾ E. Gäumann & E. Böhni, Helv. 30, 24 (1947).

³⁾ E. Gäumann & E. Böhni, Helv. 30, 1591 (1947).

Zur Spaltung von Proscillarin A haben wir die Nährlösung, auf der das Pilzmycel während 14 Tagen gewachsen war, bei einem pH von 5,5 und bei 37° auf das Glykosid einwirken lassen. Nach der Fermentation wurde das Abbauprodukt der wässerigen Lösung mit Chloroform entzogen und durch Chromatographie an Aluminiumoxyd gereinigt. Das bisher unbekannte primäre Aglykon, das wir Scillarenin (II, s. S. 2306) nennen wollen, kristallisiert aus 50-proz. Alkohol in charakteristischen durchsichtigen, dachförmig abgeschnittenen Prismen (Fig. 1).

Sein Schmelzpunkt liegt unscharf bei 214—234° (Kofler-Block). Das Scillarenin zeigt in Chloroform einen schwach positiven ($[\alpha]_D^{20} = +13,5^\circ$) und in Methanol einen schwach negativen Drehwert ($[\alpha]_D^{20} = -16,5$). Bei der Liebermann'schen Farbreaktion wird die gleiche Farbfolge von Rosaviolett nach Dunkelgrün beobachtet wie bei Scillaren A und Proscillarin A.

Das Scillarenin besitzt die Zusammensetzung $C_{24}H_{32}O_4$ und enthält im Gegensatz zum Scillarin A (III) die sekundäre Hydroxylgruppe an C3 noch. Das UV.-Spektrum (Fig. 2, a) ist demnach praktisch identisch mit demjenigen von Scillaren A, d. h. es tritt nur das für den Lactonring charakteristische Maximum bei 300 m μ und $\log \epsilon = 3,72$ in Erscheinung. Beim Scillarin A (Fig. 2) tritt hingegen noch ein weiteres Maximum bei 230 m μ und $\log \epsilon = 4,23$ auf, das charakteristisch ist für zwei konjugierte Doppelbindungen, die auf zwei Ringe verteilt sind.

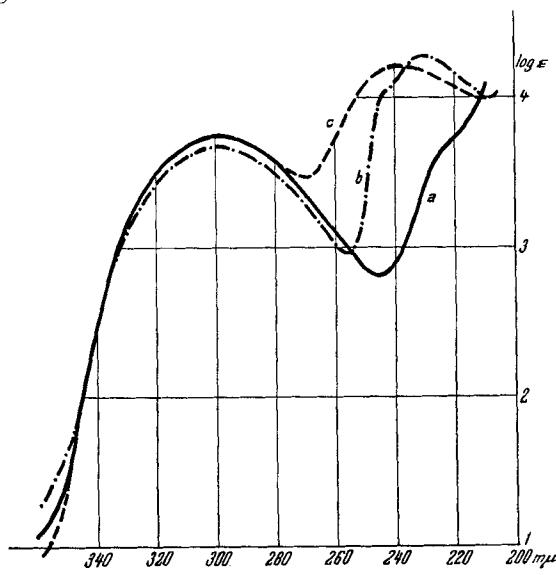
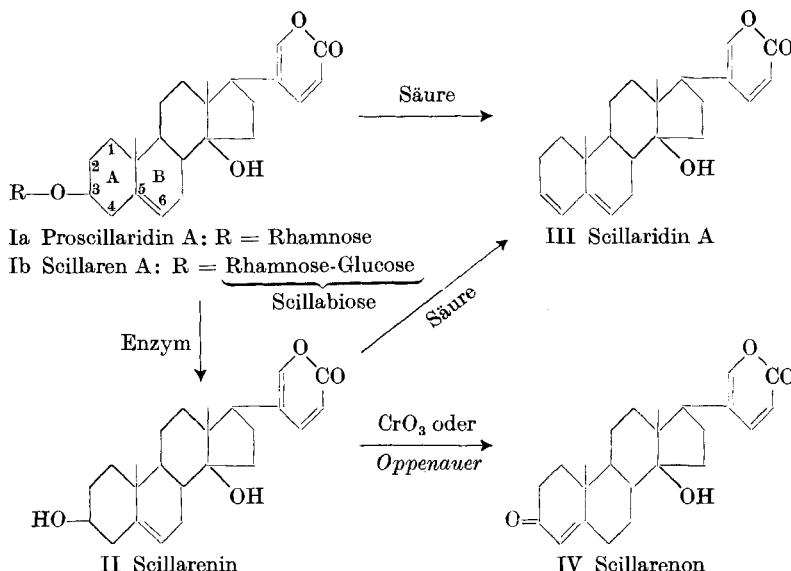


Fig. 2.
UV.-Spektren.

Scillarenin (a), Scillarin A (b) und Scillarenon (c) in abs. Alkohol.

Bei der Acetylierung von Scillarenin mit Essigsäureanhydrid und Pyridin entsteht eine Monoacetylverbindung $C_{26}H_{34}O_5$, die bei 240—243° schmilzt und in Chloroform einen schwach negativen Drehwert ($[\alpha]_D^{20} = -23,4^\circ$) aufweist. Die acylierbare sekundäre Hydroxylgruppe an C 3 wird sehr leicht und unter Bildung einer Doppelbindung abgespalten, wobei Scillarin A (III) entsteht. Diese Reaktion verläuft schon mit 0,05-n. wässriger-methanolischer Schwefelsäure bei 35°.



Die sekundäre Hydroxylgruppe des Scillarenins wird mit tert. Aluminiumbutylat nach *Oppenauer*, oder durch vorsichtiges Behandeln mit Chromsäure-Eisessig in der Kälte oder mit tert. Butylchromat¹⁾ zum Keton oxydiert. Das Oxydationsprodukt, das Scillarenon (IV) kristallisiert aus Aceton in kleinen Prismen und lässt sich im Hochvakuum gegen 200° sublimieren. Der Schmelzpunkt liegt bei 245—255°; der Drehwert beträgt in Chloroform $[\alpha]_D^{20} = +63,3^\circ$. Das 3-Keton zeigt in alkoholischer Lösung im Ultravioletten zwei Absorptionsmaxima (Fig. 2, c), eines bei $300\text{ m}\mu$ und $\log \epsilon = 3,74$, das andere bei $240\text{ m}\mu$ und $\log \epsilon = 4,25$. Das erste Maximum entspricht dem doppelt ungesättigten Lactonsechsring, das zweite einer α, β -ungesättigten Ketongruppierung.

Das Scillarenon ist in allen Eigenschaften identisch mit Anhydrotelocinobufagon²⁾, einem Abbauprodukt, das aus dem Krötengift Telocinobufagin der chinesischen Droge Ch'an Su erhalten wurde.

¹⁾ R. V. Oppenauer & H. Oberrauch, *Anales asoc. quim. argentina* **37**, 246 (1949); *Chem. Abstr.* **44**, 3871 (1950).

²⁾ Kuno Meyer, *Helv.* **32**, 1593 (1949).

Da in dem Oxydationsprodukt des Scilla-Aglykons und in dem Abbauprodukt des Krötengiftes die doppelt ungesättigte Lactonseitenkette noch unversehrt erhalten ist, so ist die Identität von Scillarenon mit Anhydro-telocinobufagon ein eindeutiger Beweis, dass die Scilla-Herzglykoside und die Krötengifte den gleichen doppelt ungesättigten Lactonsechsring enthalten.

Das Scillarenin besitzt wie die anderen Aglykone mit einem 6gliedrigen Lactonring (Scillirosidin, Hellebrigenin) eine hohe Wirksamkeit auf das Herz. Die Toxizität nach *Hatcher*¹⁾ liegt bei 0,125 mg. In der folgenden Tabelle 1 sind die Toxizitätswerte des Aglykons und der natürlich vorkommenden Scillareninglykoside vergleichsweise zusammengestellt.

Tabelle 1.

Toxizitätswerte von Scillarenin und seinen natürlich vorkommenden Glykosidstufen

Substanz	Formel	M. G.	Zuckerrest	Toxizität nach Hatcher	
				10^{-3} mg/kg	Millimol/kg
Scillarenin (II)	$C_{24}H_{32}O_4$	384	—	0,125	0,326
Proscillarin A (Ia) . . .	$C_{30}H_{42}O_8$	531	Rhamnose	0,157	0,295
Scillaren A (Ib)	$C_{36}H_{52}O_{13}$	673	Rhamnose + Glucose	0,145	0,215
Glucoscillaren A ²⁾ . . .	$C_{42}H_{62}O_{18}$	855	Rhamnose + 2 Glucose	0,172	0,201

Vergleicht man die letale Infusionsdosis nach *Hatcher* in Millimol, so hat das Scillarenin ungefähr die gleiche Wirksamkeit wie das Rhamnoglykosid Proscillarin A; die beiden höhermolekularen, glucosehaltigen Stufen sind deutlich wirksamer.

Experimenteller Teil.

1. Züchtung des Pilzes. Der Pilzstamm 889 (*Penicillium spec.*, Gruppe Asymmetrica, Divaricata) wurde auf einer Nährlösung, die neben 1% Pepton nur noch 2% Rhamnose als Kohlenstoffquelle enthielt, überimpft. Nach fünf Generationen auf demselben Nährboden wurde der Pilz zur Produktion von grösseren Mengen auf folgender Nährlösung weitergezüchtet:

KH_2PO_4	1,3 g	Pepton	5,0 g
Na_2HPO_4	0,7 g	L-Rhamnose	20,0 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,6 g	Leitungswasser ad 1000 cm ³	
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,0287 mg = 10^{-7} molar		

Diese Lösung wurde 20 Min. bei 107° sterilisiert, das pH betrug 6,3. *Fernbach*-Kolben mit je 1,6 l Inhalt wurden mit je 300 cm³ dieser Nährlösung beschickt und nach Beimpfen mit den Pilzsporen in der Regel 14 Tage bei 24° bebrütet. Der Pilz bildet dann eine geschlossene Myceldecke und zeigt normale Sporulation.

In Vorversuchen mit Enzympräparaten aus Mycel und aus dem Kulturfiltrat zeigte sich, dass letzteres in unveränderter Form die beste Aktivität aufwies.

¹⁾ Die Werte, die an der Katze bestimmt wurden und sich auf 1 kg Tier bei intravenöser Infusion beziehen, verdanken wir Herrn Prof. E. Rothlin, Basel.

²⁾ A. Stoll & W. Kreis, Helv. **34**, 1431 (1951).

2. Darstellung von Scillarenin. Die Nährösung von 10 *Fernbach*-Kolben (ca. 2,8 l) hatte nach 14-tägiger Bebrütung ein pH von 7,6. Nach dem Abpressen der Nährösung, Waschen des Mycels mit Aceton und Trocknen mit Äther wog dieses 10—12 g. Die Nährösung wurde mit n. Salzsäure auf ein pH von 5,5 gestellt, mit 1 g Proscillarinid A in 50 cm³ Alkohol und etwas Toluol versetzt und in einem Thermostaten bei 37° während 48 Std. durch langsames Rühren in Bewegung gehalten. Der durch fünfmaliges Ausschütteln mit je 500 cm³ Chloroform und Eindampfen der Chloroformlösung gewonnene Rückstand war ein gelber Lack (0,90 g). Er wurde in 90 cm³ reinem Chloroform gelöst und an einer Säule aus 27 g neutralem Al₂O₃ chromatographiert. Der gelbe Farbstoff des Präparates wurde zum grössten Teil in den oberen Partien der Säule festgehalten. Mit reinem Chloroform und mit Chloroform, das 0,5% Methanol enthielt, konnten Fraktionen eluiert werden, aus denen sich beim Anreiben mit Methanol sofort kleine Polyeder abschieden. Durch weiteres Auswaschen der Säule mit Chloroform-Methanol 9 : 1 wurde nur noch wenig gelbes Harz eluiert, aus dem keine kristallisierte Substanz mehr gewonnen werden konnte. Mit Chloroform-Methanol 9 : 1 sollte etwa noch vorhandenes Proscillarinid A eluiert werden, was jedoch in diesem Versuchsansatz nicht der Fall war. Die Kristalle wurden abfiltriert und mit wenig Methanol ausgewaschen. Das nahezu farblose Kristallpulver wog 475 mg, was einer 65-proz. Ausbeute von Aglykon aus Proscillarinid A entspricht. Nach dem Aufnehmen des Rohkristallisats in 16 cm³ siedendem abs. Alkohol und Abkühlen kristallisierte aus der klar filtrierten Lösung das Scillarenin in einheitlichen kurzen Prismen, die an den Enden dachartig abgeschrägt sind (Fig. 1). Die Kristallisation wurde durch Zugabe von etwas Wasser vervollständigt (0,32 g). Die Kristalle schmelzen unscharf und unter Gelbfärbung zwischen 214—234° (*Kofler*-Block). Zur Analyse wurde das Aglykon nochmals aus absolutem Alkohol kristallisiert und dann bei 105° im Hochvakuum getrocknet.

C₂₄H₃₂O₄ (384,25) Ber. C 74,95 H 8,39% Gef. C 74,80; 74,88 H 8,46; 8,59%

Optische Drehung.

26,3 mg Substanz in 1,976 cm³ Methanol; c = 1,331; 1 dm-Rohr;
 $\alpha_D^{20} = -0,22^\circ \pm 0,02^\circ$ $[\alpha]_D^{20} = -16,5^\circ \pm 2^\circ$

30,4 mg Substanz in 1,956 cm³ Chloroform-Methanol (4 : 1); c = 1,555; 1 dm-Rohr;
 $\alpha_D^{20} = +0,05^\circ \pm 0,02^\circ$ $[\alpha]_D^{20} = +3,2^\circ \pm 2^\circ$

23,3 mg Substanz in 1,973 cm³ Chloroform; c = 1,181; 1 dm-Rohr;
 $\alpha_D^{20} = +0,16^\circ \pm 0,02^\circ$ $[\alpha]_D^{20} = +13,5^\circ \pm 2^\circ$

Bei der *Liebermann*'schen Farbreaktion zeigt das Scillarenin wie Scillaren A und Proscillarinid A einen Übergang von Rosaviolett nach Dunkelgrün.

3. Acetylierung des Scillarenins. 100 mg Scillarenin wurden in 1 cm³ Pyridin gelöst und blieben nach Zugabe von 0,2 cm³ Essigsäureanhydrid über Nacht bei Zimmertemperatur stehen. Beim Eindampfen im Vakuum krystallisierte der Rückstand bereits; er wurde mit Wasser gewaschen, filtriert und getrocknet (100 mg). Die noch rohe Acetylverbindung wurde aus 6 cm³ siedendem Methanol, in dem sie sich gerade löste, umkrystallisiert. Beim Erkalten der filtrierten Lösung schieden sich 57 mg Polyeder ab, doch konnte aus der Mutterlauge durch Zusatz von Wasser noch eine weitere Kristallfraktion gewonnen werden. Der Schmelzpunkt der reinen Acetylverbindung liegt bei 240—243° (*Kofler*-Block). Zur Analyse wurde das Acetylscillarenin bei 110° im Hochvakuum getrocknet.

C₂₆H₃₄O₅ (426,25) Ber. C 73,20 H 8,03% Gef. C 72,99; 73,04 H 8,03; 8,31%

Optische Drehung.

26,7 mg Substanz in 1,956 cm³ Chloroform; c = 1,365; 1 dm-Rohr;
 $\alpha_D^{20} = -0,32^\circ \pm 0,02^\circ$ $[\alpha]_D^{20} = -23,4^\circ \pm 2^\circ$

Alkalische Titration: 6,682 mg Substanz wurden mit 0,01-n. KOH während 3 Std. zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die unverbrauchte Lauge mit 0,01-n. Salzsäure zurücktitriert. Es waren $3,005 \text{ cm}^3$ Lauge verbraucht worden, was zwei Mol Alkali entspricht: 1 Mol für die Öffnung des Lactonrings und 1 Mol für die Abspaltung der Acetylgruppe.

Äquivalentgewicht: Ber. 192; Gef. 222.

4. Wasserabspaltung aus Scillarenin, Übergang in Scillaridin A. Die Lösung von 100 mg Scillarenin in 100 cm^3 Methanol wurde mit 100 cm^3 0,1-n. Schwefelsäure vermischt und blieb während 24 Std. bei 35° stehen. Dabei schied sich eine kristalline Substanz ab. Man konzentrierte noch etwas und filtrierte die Ausfällung (60 mg) ab. Der Mutterlauge konnten mit Chloroform noch 40 mg Substanz entzogen werden. Die vereinigten Fraktionen wurden mit 5 cm^3 abs. Alkohol aufgekocht und das unlösliche nach kurzem Stehen abfiltriert (42 mg). Zur Reinigung kristallisierte man die Substanz aus siedendem abs. Alkohol, wofür man die ca. 400fache Menge benötigte, um. Beim Abkühlen kristallisierte das Scillaridin A in kurzen Prismen, die unter Gelbfärbung und Zersetzung bei $244\text{--}250^\circ$ schmolzen (*Kofler-Block*). Zur Analyse wurde die Verbindung zwei Stunden im Hochvakuum bei 110° getrocknet.



Optische Drehung.

20,1 mg Substanz in $1,977 \text{ cm}^3$ Chloroform-Methanol (4:1); $c = 1,01$; 1 dm-Rohr;

$$[\alpha]_D^{20} = -0,62^\circ \pm 0,02^\circ \quad [\alpha]_D^{20} = -61,3^\circ \pm 2^\circ$$

Die Anhydroverbindung aus Scillarenin ist in allen Eigenschaften identisch mit Scillaridin A, das schon durch gelinde saure Hydrolyse aus Proscillaridin A oder Scillaren A leicht entsteht.

5. Oxydation von Scillarenin nach Oppenauer. Die Lösung von 0,6 g Aluminium-tert.-butylat in 10 cm^3 abs. Benzol wurde mit 10 cm^3 trockenem Aceton vermischt, von einer geringen amorphen Fällung durch eine trockene Glasfilternutsche abfiltriert und nun mit 120 mg fein gepulvertem und hochvakuumtrockenem Scillarenin versetzt. Die Substanz ging beim Umschütteln allmählich in Lösung. Man kochte unter Feuchtigkeitsausschluss während 20 Std. am Rückfluss und beobachtete allmähliche Gelbfärbung. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgedampft und der Eindampfrückstand in 30 cm^3 Chloroform aufgenommen, das man zuerst mit n. Schwefelsäure, dann mit Wasser wusch und mit Calciumchlorid trocknete. Der beim Eindampfen zum Teil kristallisierende Rückstand wurde mit abs. Benzol gewaschen, wobei 100 mg eines weißen Kristallpulvers hinterblieben. Bei der Chromatographie an einer Aluminiumoxydsäule konnten mit Chloroform-Benzol (1:1) 60 mg kristallisierte Anteile eluiert werden, die in siedendem Aceton gelöst wurden. Aus der auf dem Dampfbad etwas konzentrierten Lösung schieden sich bald wasserklare Prismen (50 mg) des Oxydationsproduktes, des Scillarenons, ab. Sie schmolzen bei $245\text{--}255^\circ$ (*Kofler-Block*) und wurden zur Analyse nochmals aus Aceton umkristallisiert und dann bei 100° im Hochvakuum getrocknet.



Optische Drehung.

21,3 mg Substanz in $1,984 \text{ cm}^3$ Chloroform; $c = 1,073$; 1 dm-Rohr;

$$[\alpha]_D^{20} = +0,68^\circ \pm 0,02^\circ \quad [\alpha]_D^{20} = +63,3^\circ \pm 2^\circ$$

Das Scillarenon ist in allen Eigenschaften identisch mit Anhydro-telocinobufagon, einem Abbauprodukt des Krötengiftes Telocinobufagin. Auch der Mischschmelzpunkt mit einem Vergleichspräparat¹⁾ zeigt keine Depression.

¹⁾ Wir danken Herrn Dr. Kuno Meyer für die Überlassung einer kleinen Probe von Anhydro-telocinobufagon.

Das Scillarenon wird auch erhalten durch vorsichtige Oxydation von Scillarenin mit Chromsäure. Zur Lösung von 100 mg Scillarenin in 8 cm³ Eisessig fügte man bei Zimmertemperatur 1 cm³ einer 2-proz. Chromsäure-Eisessiglösung hinzu und liess das Gemisch während 2 Std. bei 0° stehen, um es dann mit etwas Methanol zu versetzen und nach weiteren 15 Std. einzudampfen. Der Eindampfrückstand wurde in Chloroform gelöst und die Lösung nacheinander mit n. Schwefelsäure, kalter n. Sodalösung und mit Wasser gewaschen, mit Calciumchlorid getrocknet und eingedampft. Die Chromatographie an Aluminiumoxyd in der oben beschriebenen Art und die Kristallisation aus Aceton lieferten reines Scillarenon in etwas geringerer Ausbeute als bei der Oppenauer-Oxydation.

Auch das neuerdings von Oppenauer vorgeschlagene tert. Butylchromat ist für die Oxydation von Scillarenin zum 3-Keton geeignet.

6. Enzymatische Spaltung von Scillirosid mit dem nur auf Rhamnose gezüchteten Pilzstamm 889. 250 cm³ Nährösung, die wie im 1. und 2. Abschnitt beschrieben hergestellt wurde, stellte man mit Salzsäure auf pH 5,5 ein und vermischt sie mit einer Lösung von 100 mg Scillirosid in 5 cm³ Alkohol. Nach 48ständigem langsamem Rühren bei 37° wurde die Lösung mit Chloroform ausgeschüttelt und das Chloroform abgedampft, wobei 100 mg eines gelblichen Lackes zurückblieben. Man löste diesen in Chloroform-Benzol 2 : 1 auf und liess die Lösung durch eine Säule aus Al₂O₃ passieren. Mit Chloroform-Methanol (199 : 1) konnten 65 mg gut kristallisierendes Scillirosidin eluiert werden, was einer Spaltung von ca. 85% entspricht.

7. Enzymatische Spaltung von Scillirosid mit dem nur auf Glucose gezüchteten Pilzstamm 889. Die Züchtung des Pilzes erfolgte wie im 1. Abschnitt beschrieben wurde, doch enthielt die Nährösung an Stelle von Rhamnose 2% Glucose. Bei der Züchtung des Pilzes auf Glucose wurde etwa die doppelte Menge Mycel gebildet (ca. 20 g in 10 Fernbach-Kolben) als bei den Kulturen auf Rhamnose. Die enzymatische Aktivität gegenüber Scillirosid von 250 cm³ dieser Nährösung wurde wie im 6. Abschnitt beschrieben bestimmt. Die Spaltung von Scillirosid in Aglucon und Glucose betrug ebenfalls ca. 85%.

8. Verhalten von Proscillarin A gegenüber dem nur auf Glucose gezüchteten Pilzstamm 889. Für diesen Versuch wurden 1350 cm³ Nährösung und 500 mg Proscillarin A verwendet. Ansatz und Aufarbeitung waren analog, wie sie für die Rhamnose-Nährösung (2. Abschnitt) beschrieben sind. Das Rohprodukt wurde ebenfalls chromatographiert. Aus den mit reinem Chloroform und 0,5-proz. methanolhaltigem Chloroform eluierten Fraktionen, in denen das Aglykon hätte enthalten sein müssen, kristallisierten in zwei Fraktionen nur ganz kleine Mengen feiner Nadeln aus, die wohl eine positive Liebermann-Reaktion zeigten, aber mit Scillarenin nicht identisch waren. Die geringe Substanzmenge reichte nicht aus, um diese Verbindung weiter zu untersuchen. Dagegen konnte unverändertes Proscillarin A aus der Säule mit Chloroform-Methanol 9 : 1 wieder eluiert und kristallisiert werden. Der Nachweis von Scillarenin verlief demnach negativ.

9. Verhalten von Proscillarin A gegenüber dem zuerst auf Rhamnose, dann wieder auf Glucose gezüchteten Pilzstamm 889. Der Pilz, der während 14 Generationen an einer Rhamnose-Nährösung angewöhnt war, wurde nun wieder auf einer Glucose-Nährösung gezüchtet. Es sollte geprüft werden, ob er die Fähigkeit, adaptiertes Enzym — das Proscillarin A spaltet — zu bilden, beibehält, auch wenn er wieder auf Glucose gezüchtet wird.

Die Nährösung von 10 Fernbach-Kolben (2,7 l) wurde wie im 2. Abschnitt beschrieben mit 1 g Proscillarin A angesetzt, 48 Std. bei 37° gehalten und dann aufgearbeitet. Die Chromatographie der chloroformlöslichen Anteile an Aluminiumoxyd lieferte bei der Elution mit reinem Chloroform eine Fraktion, aus der noch etwa 5 mg Scillarenin isoliert werden konnten, was einer Spaltung von ca. 0,7% entspricht. Nach einer weiteren wieder auf einer Glucose-Nährösung durchgeführten Kultur des Pilzes hatte derselbe seine Fähigkeit, Proscillarin A zu spalten, gänzlich verloren.

Zusammenfassung.

Durch Kultur des *Penicillium*-stammes 889 auf einer Nährösung, die als Kohlenstoffquelle ausschliesslich Rhamnose enthielt, wurde ein Enzym gebildet, das Proscillarin A in das bisher unzugängliche primäre Aglykon Scillarenin und Rhamnose spaltet. Durch Oxydation der im Scillarenin erhaltenen Hydroxylgruppe an C3 konnte ein α, β -ungesättigtes Keton gewonnen werden, das sich als identisch erwies mit dem Anhydro-telocinobufagon, einem Abbauprodukt des Krötengiftes Telocinobufagin. Da in beiden Präparaten der doppelt ungesättigte sechsgliedrige Lactonring unversehrt geblieben ist, so beweist ihre Identität, dass Scillaglykoside und Krötengifte dieselbe Lactonseitenkette besitzen.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium „Sandoz“, Basel.

285. Probleme der Blutgerinnung.

4. Mitteilung¹⁾.

β -Heparin, ein neuer, blutgerinnungshemmender Mucoitinschwefelsäureester

von R. Marbet und A. Winterstein.

(13. X. 51.)

Bei der Fabrikation von Heparin aus Rinderlungen sind uns in beträchtlicher Menge Nebenprodukte angefallen, die ihrer chemischen Natur nach — ebenso wie Heparin selber — als Mucoitinschwefelsäureester anzusprechen sind. Ihrem physiologischen Verhalten nach unterscheiden sich diese Nebenprodukte vom Heparin durch ihre sehr viel geringere blutgerinnungshemmende Wirkung. Während reinstes Heparin aus Rindslungen (d. h. der Mucoitin-trischwefelsäureester) eine Wirksamkeit von 130 i. E./mg besitzt, weist das Gemisch der Nebenprodukte nur einen Titer von 3 bis 5 i. E./mg auf.

Die nähere Untersuchung dieser Nebenprodukte erscheint sowohl theoretisch als auch praktisch von Interesse. Sie stellen ein ideales Ausgangsmaterial für die Erforschung der Mucopolysaccharide dar, die als integrierende Bestandteile der Grundsubstanzen des Mesenchyms eine wichtige Rolle im Rheumaproblem spielen²⁾. Ferner scheint es denkbar, dass in diesen Nebenfraktionen Zwischenstufen

¹⁾ 3. Mitteilung, siehe *Helv. physiol. pharmacol. acta* 9, 24 (1951).

²⁾ Siehe hiezu *R. Marbet & A. Winterstein, Exper.* 1951 im Druck.