

## HOLOCALIN: EIN NEUES CYANOGENES GLYKOSID AUS *HOLOCALYX BALANSAE*

R. GMELIN und M. SCHÜLER

Institut für Pharmakognosie, Freie Universität Berlin, West Berlin  
und

E. BORDAS

Facultad de Química y Farmacia, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay

(Eingegangen 21. August 1972. Angenommen 4. September 1972)

**Key Word Index**—*Holocalyx balansae*; Leguminosae; new cyanogenic glucoside; *O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-L-2-hydroxy-2-(*m*-hydroxyphenyl) acetonitrile.

**Zusammenfassung**—Aus den Samen von *Holocalyx balansae* Mich. wurde durch Chromatographie an Kieselgel Holocalin, ein neues cyanogenes Glykosid, isoliert. Holocalin wird durch Emulsin in Glucose, Cyanwasserstoff und *m*-Hydroxybenzaldehyd gespalten. Laut optischem Drehwert repräsentiert es das Diastereomere von Zierin.

**Abstract**—From seeds of *Holocalyx balansae* Mich. holocaline, a new cyanogenic glycoside, has been isolated by chromatography on silica gel. Holocaline is enzymatically split by emulsin into glucose, HCN and *m*-hydroxybenzaldehyde. According to its optical rotation, it represents the hitherto unknown diastereomer of zierine.

### EINLEITUNG

DIE weite Verbreitung cyanogener Glykoside im Pflanzenreich, ihre Chemie und Biosynthese wurden kürzlich in ausgezeichneten Übersichtsarbeiten ausführlich beschrieben und behandelt.<sup>1-3</sup> Wie die Glucosinolate leiten sie sich von Aminosäuren ab: Über *N*-Hydroxy-Aminosäuren werden die entsprechenden Oxime gebildet, die über Nitrile und  $\alpha$ -Hydroxynitrile schließlich zu den cyanogenen Glykosiden führen.<sup>1,2,19</sup>

Die Amygdalin-Gruppe, die die meisten Vertreter cyanogener Glykoside stellt, leitet sich somit von L-Phenylalanin bzw. L-Tyrosin ab. Einen Einzelfall bildete bisher Zierin<sup>4</sup> aus *Zieris laevigata*, Rutaceae, dessen Vorstufe demnach L-*m*-Hydroxyphenylalanin sein dürfte, das vor kurzem als freie Aminosäure aus *Euphorbia myrsinites* L.<sup>5</sup> isoliert wurde.

Während bei den L-Phenylalanin- und L-Tyrosin-Abkömmlingen beide Diastereomere bekannt waren—Prunasin<sup>6</sup> und Sambunigrin<sup>6</sup> bzw. Taxiphyllin<sup>6</sup> und Dhurrin<sup>6</sup>—fehlte für Zierin bislang das ergänzende Diastereomere. Charakteristisch für die genannten cyanogenen Glykoside ist ihre enzymatische Spaltbarkeit durch Emulsin, einer  $\beta$ -Glycosidase aus bitteren Mandeln, welches als Rohenzym außerdem von einer Hydroxynitril-Lyase mit stereospezifischer Wirkung auf D-Hydroxynitrile begleitet ist.

<sup>1</sup> R. EYJOLFSSON, Thesis, Danmarks Farmaceutiske Højskole (1968).

<sup>2</sup> R. EYJOLFSSON, in *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* (Hrsg. L. ZECHMEISTER), S. 74 ff., Springer, Wien (1970).

<sup>3</sup> R. HEGNAUER, *Pharm. Acta Helv.* **46**, 585 (1971).

<sup>4</sup> H. FINNEMORE und J. M. COOPER, *J. Proc. Roy. Soc. N.S. Wales* **70**, 175 (1936).

<sup>5</sup> L. K. MOTHES, H. R. SCHÜTTE, P. MÜLLER, M. v. ARDENNE und R. TUMMLER, *Z. Naturf.* **19b**, 1161 (1964).

<sup>6</sup> W. KARRER, *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*, Birkhäuser, Basel (1958).

## ERGEBNISSE

*Holocalyx balansae* Mich. (Leguminosae, Caesalpinioideae), 'Yvyrá-pepẽ' gilt als einer der schönsten einheimischen Waldbäume Paraguay's. Wegen seines harten und zähen Holzes wird dieser Baum von Indianern zur Herstellung von Bogen und Pfeilen verwendet. Nach früheren Angaben sollen seine Blätter toxisch sein und ein cyanogenes Glykosid enthalten.<sup>7,8</sup> *Holocalyx balansae* wurde 1949 letztmalig bei Webb<sup>9</sup> als cyanogene Pflanze erwähnt, nähere chemische Untersuchungen scheinen jedoch bisher noch nicht vorzuliegen.

Für unsere Untersuchungen standen Samen dieser Pflanze zur Verfügung. Sie erwiesen sich im Guignard-Mirande-Test<sup>10</sup> und im Feigl-Anger-Test<sup>11</sup> als stark cyanogen. Papierchromatische Prüfung des methanolischen Samenauszugs ließ in verschiedenen Fließmitteln einen Fleck erkennen, der zu Prunasin ein ähnliches  $R_f$ -Verhältnis aufwies wie L-Tyrosin zu L-Phenylalanin. Er bildete mit diazotierter Sulfanilsäure<sup>12</sup> einen orangebraunen Fleck und ließ sich nach Besprühen mit Emulsin-Lösung mit der Sandwich-Methode<sup>13</sup> sichtbar machen. Der methanolische Extrakt von *Holocalyx balansae*-Samen wurde nach Einengen in Wasser aufgenommen. Ausschütteln der wässrigen Lösung mit Butanol führte zu einem angereicherten Glykosid-Präparat, das mit einem Äthylacetat-Methanol-Gradienten auf einer Kieselgelsäule aufgetrennt wurde. Die Glykosid-haltigen Fraktionen ergaben nach Eindampfen und Kristallisation aus Äthylacetat-Chloroform farblose Nadeln von bitterem Geschmack in etwa 1 % Ausbeute. Laut physikalischen Daten (*vide* Experimentelles) handelt es sich um ein neues cyanogenes Glykosid, das wir nach seiner Stammpflanze als Holocalin benennen.

Holocalin wird durch Emulsin in Glucose, HCN und eine schwach aromatisch riechende Fraktion gespalten, die sich mit Äther ausschütteln ließ und sich im DC in 2 diazotierbare Substanzen—(höherer) Fleck A und (tieferer) Fleck B—auftrennen ließ. Die Fleck A entsprechende Substanz wurde durch Chromatographie an Kieselgel rein erhalten. Sie schmolz bei 107–109° wie *m*-Hydroxybenzaldehyd und war auch im IR-Spektrum identisch mit *m*-Hydroxybenzaldehyd. Holocalin ist somit ein *O*- $\beta$ -D-Glucopyranosid von *m*-Hydroxybenzaldehydcyanhydrin.

Vergleicht man den optischen Drehwert von Holocalin ( $[\alpha]_D -59,14^\circ$ ) mit dem Drehwert von Sambunigrin<sup>6</sup> ( $[\alpha]_D -76,1^\circ$ ) und von Dhurrin<sup>6</sup> ( $[\alpha]_D -65^\circ$ ), die beide der L-Reihe angehören, kann man vermuten, daß Holocalin ebenfalls ein Vertreter der L-Reihe und somit das Diastereomere von Zierin<sup>6</sup> ist, das mit einem optischen Drehwert von  $[\alpha]_D -29,5^\circ$  zur D-Reihe zugeteilt werden dürfte wie Prunasin<sup>6</sup> ( $[\alpha]_D -30,1^\circ$ ).

Als zusätzlicher Anhaltspunkt für die Zugehörigkeit von Holocalin zur L-Reihe kann der Verlauf der enzymatischen Spaltung durch Emulsin gewertet werden. Wie oben schon erwähnt, enthält Emulsin eine Hydroxynitril-Lyase, die stereospezifisch nur D-Hydroxynitrile angreifen.<sup>1</sup> Im DC des Ätherauszugs nach enzymatischer Holocalin Spaltung wurde neben *m*-Hydroxybenzaldehyd (Fleck A) noch ein tiefer, d.h. stärker hydrophiler Fleck B gefunden, der sich nach 10 tägigem Stehen des Reaktionsgemisches noch etwa in der gleichen Menge wie Fleck A nachweisen ließ und mit L-*m*-Hydroxybenzaldehydcyanhydrin identisch sein muß, da er bei zweidimensionaler DC wiederum zum Teil in *m*-Hydroxybenzaldehyd zerfiel.

<sup>7</sup> A. BURKART, *Las Leguminosas Argentinas, Silverstres y Cultivadas*, Ed. Acmi Agency, Buenos Aires (1952).

<sup>8</sup> J. PELISH, *Trab. Inst. Bot y Farmac., Facult. de Cienc. Med.*, S. 1–63, Buenos Aires (1920).

<sup>9</sup> L. J. WEBB, *Bull. No. 241 CSIRO*, Australia, Melbourne (1949).

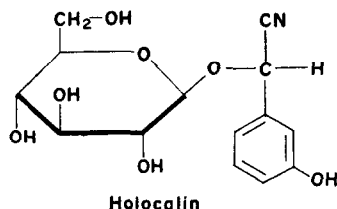
<sup>10</sup> M. MIRANDE, *Compt. Rend.* **149**, 140 (1909).

<sup>11</sup> F. FEIGL und V. ANGER, *Analyst* **91**, 282 (1966).

<sup>12</sup> D. WALDI, *Chromatographie*, 2. Aufl., Merck A.G., Darmstadt.

<sup>13</sup> B. TANTISEWIE, H. W. L. RUIJGROK und R. HEGNAUER, *Pharm. Weekblad.* **104**, 1341 (1969).

Holocalin ist demnach mit großer Wahrscheinlichkeit *O*-[ $\beta$ -D-Glucopyranosyl]-L-2-Hydroxy-2-(*m*-Hydroxyphenyl)acetonitril, das bisher noch fehlende Diastereomere von Zierin, und bildet somit die Vervollständigung der 'Prunasin-Gruppe'.



Weitere Untersuchungen über die optische Reinheit von Holocalin, die Stereochemie von Holocalin und Zierin und deren Synthese und Biogenese, die von *m*-Hydroxyphenylalanin ausgehen dürfte, sind in Vorbereitung. Über die Resultate werden wir in Kürze berichten.

Da der enzymatische Abbau und der anschließende Nachweis und die Isolierung der Spaltprodukte nach der klassischen Methode ausreichende Aussagen über die Struktur von Holocalin gibt, wurde auf eine Interpretation von Spektren verzichtet.

#### DISKUSSION

Mit Holocalin ist die Naturstoffklasse der cyanogenen Glykoside um einen weiteren Vertreter bereichert und die Prunasin-Gruppe vorläufig aufgefüllt worden. Damit ist erstmals für die Leguminosae, Caesalpinioideae, das Vorkommen cyanogener Glykoside durch Isolierung und chemische Charakterisierung gesichert.

Nach Burkhart soll auch *Holocalyx-Glaziovii* Taub.<sup>7</sup> cyanogen sein. Es wäre von Interesse zu prüfen, ob hier ebenfalls Holocalin als cyanogenes Glykosid vorliegt. Das Vorkommen cyanogener Glykoside bei den Leguminosae-Lotoideae ist schon lange bekannt, ist aber chemotaxonomisch ohne Aussagekraft, da die beiden Glykoside Linamarin und Lotaustralin auch in Linaceen, Euphorbiaceen und Compositen gefunden wurden.<sup>3</sup> Das gleiche gilt für Taxiphyllin, das sowohl aus *Taxus*- und *Juncus*-Arten sowie aus Euphorbiaceen isoliert wurde.<sup>3</sup> Das Auftreten von freiem L-*m*-Hydroxyphenylalanin in einer Euphorbiacee<sup>5</sup> macht es wahrscheinlich, daß in der an cyanogenen Glykosiden so reichhaltigen Familie Euphorbiaceae neben Linamarin, Lotaustralin und Taxiphyllin auch Holocalin oder Zierin zu erwarten sind. Da Leguminosae-Lotoideae und Euphorbiaceae oft große Mengen L-4,5-Dihydroxyphenylalanin enthalten, das nach Ettlinger und Eyjolfsson<sup>14</sup> die biogenetische Vorstufe von Triglochinin, einem cyanogenen Glykosid aus *Triglochin maritima* L.<sup>15</sup> und *Lilaea scilloides*,<sup>16</sup> Juncaginaceae, ist, dürfte in diesen Familien eventuell mit Triglochinin bzw. bisher noch unbekannten 4,5-Dihydroxybenzaldehydcyanhydrin-glucosiden zu rechnen sein. Auch Methyläther von Dhurrin, Taxiphyllin, Zierin und Holocalin sind mit großer Wahrscheinlichkeit im Pflanzenreich zu erwarten.

Die endgültige Klärung der Stereochemie von Holocalin bildet ein zusätzliches Problem: Holocalin hat eine optische Drehung  $[\alpha]_D -59,14^\circ$ , die zwar in der Größenordnung der von Sambunigrin  $[\alpha]_D -76,1^\circ$  entspricht, aber doch eine relativ große Abweichung aufweist.

<sup>14</sup> M. ETTLINGER und R. EYJOLFSSON, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 572 (1972).

<sup>15</sup> R. EYJOLFSSON, *Phytochem.* 9, 845 (1970).

<sup>16</sup> R. HEGNAUER und H. W. RUIJGROK, *Phytochem.* 10, 2121 (1971).

Aus der bei der Kristallisation von Holocalin zurückbleibenden Mutterlauge erhielten wir nach Acetylierung ein Pentaacetat mit einer optischen Drehung  $[\alpha]_D -16,9^\circ$ . Dieser Drehwert läßt sich theoretisch für Zierin-Pentaacetat errechnen, das als genuines Glykosid den Drehwert  $[\alpha]_D -29,5^\circ$  hat. Es besteht also die Möglichkeit, daß *Holocalyx balansae* Holocalin und Zierin gemeinsam enthält, und es wäre der erste bekannte Fall, daß beide Diastereomere nebeneinander in einer Pflanze vorkommen. Diese Problemstellung soll noch geklärt werden, sobald uns eine größere Menge *Holocalyx*-Samen bzw. ausreichende Substanzmengen der synthetischen Glykoside zur Verfügung stehen.

#### EXPERIMENTELLES

Die IR Spektren wurden in KBr gepreßt. Die Fp. wurden mit einem Kofler-Schmelzpunktmikroskop bestimmt und sind unkorrigiert. Die Elementaranalysen wurden bei I. Beetz, Kronach, dBR, durchgeführt.

**Pflanzenmaterial.** Die eiförmigen, pflaumengroßen Früchte von *Holocalyx balansae* Mich. wurden im Jardin Botanico Asunción im März gesammelt. Nach Entfernung des Fruchtfleisches wurden die kugeligen Samen vor der Weiterverarbeitung getrocknet. Herbarmaterial befindet sich im Herbario Rojyas, Asunción.

**Orientierende Prüfung auf Cyanogenese.** Prüfung des mit Wasser angerührten Samenpulvers im Guignard-Mirande<sup>10</sup> und Feigl-Anger-Test.<sup>11</sup>

**Papierchromatographie.** 2 g gemahlene Samen von *Holocalyx balansae* wurden mit 10 ml 70 % MeOH aufgeköcht. Vom Überstand wurden 20 µl 8 mal auf der Startlinie eines MN-260-Bogens (20 × 20 cm) aufgetragen. Es wurde aufsteigend mit *n*-BuOH-HOAc-H<sub>2</sub>O (4:1:5) entwickelt. Die getrockneten PC wurden in Längsstreifen zerschnitten. Der Nachweis von Holocalin erfolgte nach der von Tantisewie *et al.*<sup>13</sup> beschriebenen 'Sandwich-Methode'. Ein Teil der Streifen wurde mit diazotierter Sulfanilsäure bzw. mit 1 % KMnO<sub>4</sub>-Lösung besprüht: Holocalin bildete mit diazotierter Sulfanilsäure rotbraune Flecken und entfärbte KMnO<sub>4</sub>-Lösung. Der *R<sub>F</sub>*-Wert betrug 0,7.

**Roh-Emulsin-Lösung für die Sandwich-Methode.** 50 g gemahlene süße Mandeln wurden mit 500 ml m/20 Phosphatpuffer pH 5,5 angerührt. Nach 1 Stunde wurde durch ein Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wurde zur Konservierung mit einigen Tropfen Toluol versetzt und im Eisschrank aufbewahrt.

**Isolierung von Holocalin.** 82 g Samen von *Holocalyx balansae* wurden fein gemahlen. Das Samenpulver wurde 3 mal je 15 Min mit je 600 ml 70 % MeOH am Rückfluß gekocht. Die vereinten Filtrate wurden am Rotationsverdampfer auf 600 ml konzentriert. Man filtrierte durch HYFLO und schüttelte das Filtrat 5 mal mit insgesamt 1 l *n*-Butanol aus. Die Butanol-Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und abgesaugt. Nach Eindampfen i.V. erhielt man 4,4 g Rückstand. Der Rückstand wurde in wenig heißem MeOH gelöst und die Lösung mit 10 g Kieselgel verrührt. Der Brei wurde in einem Rundkolben i.V. am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Das feingepulverte Extrakt-Kieselgel-Gemisch wurde auf seine Säule (φ 2,5 cm) aufgetragen, die mit 150 g Kieselgel Merck (0,08 mm) beschickt war (Suspension in EtOAc). Nun wurde stufenweise mit je 500 ml EtOAc mit steigenden Methanolkonzentrationen entwickelt (0, 5, 10 %). Fraktionen zu 20 ml wurden mit einem Fraktionskollektor gesammelt. Von den einzelnen Eluatfraktionen wurden je 10 µl auf einen Filterstreifen aufgetragen, der mit Rohemulsin-Lösung besprüht wurde und mit der 'Sandwich-Methode' mit Feigl-Anger-Reagenzpapier auf Holocalin geprüft wurde. Die Holocalin-haltigen Fraktionen (65–110) wurden vereint und i.V. eingedampft. Der Rückstand (1,34 g) wurde in wenig heißem EtOAc gelöst. Nach Zugabe von wenig Aktivkohle filtrierte man durch eine mit HYFLO bedeckte Glasfritte. Das farblose, klare Filtrat wurde mit CHCl<sub>3</sub> bis zur beginnenden Trübung versetzt. Es schieden sich feine, weiße Nadeln von Holocalin ab, die nach 24 stdg. Stehen im Eisschrank abgesaugt und im Vakuum getrocknet wurden. Nach nochmaligem Umkristallisieren erhielt man 900 mg Holocalin. Holocalin schmeckt wie Amygdalin bitter.

*Holocalin* Fp. 154–155° (Fp. für Zierin 153–156°),  $[\alpha]_D^{20} -59,14^\circ$  (c, 1,41; EtOH), Berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>O<sub>7</sub>N (Mol. Gew. 311,284) C, 55,38; H, 5,89; N, 4,31. Gefunden C, 54,46; H, 5,92; N, 4,27.

**UV-Spektrum.** λ<sub>max</sub> (EtOH) 222 und 280 nm (ε 3300 und 2180). λ<sub>max</sub> (EtOH; pH 12) 246 und 304 nm (ε 3550 und 2580). **IR-Spektrum** (1 mg Holocalin gepreßt in 300 mg KBr) 690, 775, 805, 880, 895, 1030, 1055, 1075, 1160, 1245, 1275, 1405, 1475 und 1600 cm<sup>-1</sup>.

**Enzymatische Spaltung von Holocalin.** 200 mg Holocalin wurden in 10 ml Phosphatpuffer pH 5,5 (m/20) gelöst. Zugabe von 5 mg Emulsin.<sup>17</sup> Nach 2 tätigem Stehen wurde mit Äther 3 mal ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde i.V. auf das halbe Volumen eingeeengt. Prüfung mit Glucoseoxydase-Teststreifen<sup>18</sup> ergab positive Reaktion auf Glucose. 10 µl der konzentrierten wässrigen Phase wurden auf MN-260-Papier aufgetragen. Als Vergleichssubstanzen wurden Glucose, Galactose, Arabinose und Fructose aufgetragen. Der aus Holocalin enzymatisch abgespaltene Zucker erwies sich in verschiedenen Fließmitteln als identisch mit Glucose (Anilinphthalat als Sprühreagenz).

<sup>17</sup> Lieferfirma, C. Roth OHG, Karlsruhe, DBR.

<sup>18</sup> Glucotest® der Fa. C. F. Boehringer, Mannheim, DBR.

**DC-Nachweis des Aglykon.** Die Ätherphase wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Filtrat wurde auf etwa 1 ml eingeeengt. 5  $\mu\text{l}$  wurden auf Kieselgel-F254-Platten aufgetragen. Als Vergleichssubstanzen ließ man *m*-Hydroxybenzaldehyd, *p*-Hydroxybenzaldehyd, *m*-Hydroxybenzoesäure und *p*-Hydroxybenzoesäure mitlaufen.  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (17:3) diente als Fließmittel. Nach einer Fließhöhe von 15 cm markierte man die dunklen Flecken unter UV-Licht, besprühte anschließend mit diazotierter Sulfanilsäure, und notierte die dabei auftretende, sehr charakteristische Farbentwicklung: *m*-Hydroxybenzaldehyd ( $R_f$  0,59): rasch ockerfarben, später leicht verblassend; *p*-Hydroxybenzaldehyd: ( $R_f$  0,54): erst gelblich, später Übergang in kräftiges karamelbraun. Fleck A im Ätherauszug verhielt sich im  $R_f$  und in der Farbbildung exakt wie *m*-Hydroxybenzaldehyd. Fleck B im Ätherauszug hatte einen  $R_f$  0,16 und gab mit Diazoreagenz erst eine gelbe Färbung, die später in braun überging. Fleck B ist vermutlich *m*-Hydroxybenzaldehydcyanhydrin, da er bei zweidimensionaler DC zum Teil Fleck A bildete.

**Isolierung von *m*-Hydroxybenzaldehyd.** Die konzentrierte Ätherausschüttelung der enzymatischen Holocalin Spaltung wurde auf eine kleine Säule mit 10 g Kieselgel aufgetragen. Man entwickelte mit  $\text{CHCl}_3$ -MeOH-Gradienten und prüfte die Eluatfraktionen durch DC auf Fleck A. Die entsprechenden Fraktionen wurden eingeeengt. Der Rückstand wurde aus Äther-Petrol umkristallisiert. Nach Absaugen und Trocknen erhielt man 36 mg Kristalle. Fp. 107–109° (Lit. Wert für *m*-Hydroxybenzaldehyd 106–108°). Das IR-Spektrum der isolierten Substanz in KBr war deckungsgleich mit einem Vergleichsspektrum von synth. *m*-Hydroxybenzaldehyd.

**Darstellung von Pentaacetyl-O-[ $\beta$ -D-Glucopyranosyl]-2-Hydroxy-2-(*m*-Hydroxyphenyl)acetonitril** (vermutlich D-Form = Pentaacetyl-Zierin). Die bei der Kristallisation von Holocalin erhaltene Mutterlauge hinterließ nach Eindampfen einen Rückstand von 250 mg. Dieser wurde in 2 ml Acetanhydrid und 2 ml Pyridin gelöst. Man ließ das Gemisch über Nacht stehen. Nach Zugabe von Eiswasser erhielt man einen festen Rückstand, der abgesaugt und 2 mal aus verdünntem Methanol umkristallisiert wurde. Feine Nadeln; Fp. 99–102°.  $[\alpha]_D^{20} -16,9^\circ$  (*c*, 1,725; EtOH). UV-Spektrum  $\lambda_{\text{max}}$  (EtOH) 264 und 268 nm ( $\epsilon = 588$  und 550). Berechnet für  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_{12}\text{N}$  (Mol. Gew. 521,464) C, 55,27; H, 4,84; N, 2,69. Gefunden C, 55,92; H, 5,53; N, 2,74%.

**Anerkennungen**—Wir danken Herrn Dr. R. Eyjolfsson, Reykjavik, Island, und Herrn Professor Dr. R. Hegnauer, Leiden, Holland, für interessante und anregende Diskussionen.

<sup>19</sup> G. H. TOWERS und P. V. SUBRA RAO, in *Recent Advances in Phytochemistry* (Hrsg. V. C. RONECKLES und J. E. WATKIN), Vol. 4, S. 11–12, Meredith, New York (1972).