

Unter den 58 geprüften Flechtenarten zeigten 38 eine mehr oder weniger ausgesprochene antibakterielle Wirkung gegenüber Staphylokokken *in vitro*. Unter den Wirkstoffen, die in der letzten Kolonne der Tabelle aufgeführt sind, spielen die Usninsäuren eine hervortretende Rolle; wir werden in der folgenden Mitteilung darauf zurückkommen.

A. STOLL, J. RENZ und A. BRACK

Chemisch-pharmazeutisches Laboratorium «Sandoz», Basel, den 10. Februar 1947.

### Summary

The authors have succeeded in demonstrating the antibiotic activity of various species of lichens. 58 species of different genera have been investigated, 38 of which have been found to have a distinct antibacterial action *in vitro* against *Staphylococcus aureus*. Some of the characteristic acids of lichens have been found to be the active principles.

## Über Alliin, die genuine Muttersubstanz des Knoblauchöls

Es ist von jeher aufgefallen, daß Zwiebeln von Knoblauch nur schwach riechen, solange sie intakt sind, daß sich aber sogleich ein intensiver Knoblauchgeruch bemerkbar macht, wenn die Zwiebeln zerschnitten oder gar zerrieben werden. Die flüchtigen, riechenden Stoffe aus *Allium*arten bestehen, wie TH. WERTHEIM<sup>1</sup> und F. W. SEMMLER<sup>2</sup> gezeigt haben, in der Hauptsache aus Allylsulfiden. In Analogie zu den Senföldrögen wird seit langem angenommen, daß die Riechstoffe der *Allium*-arten durch enzymatische Spaltung aus wenig oder gar nicht riechenden, höher molekularen, genuinen Substanzen entstehen.

Der Knoblauch hat von alters her nicht nur als Gewürz und Nahrungsmittel, sondern auch als Volksheilmittel bei den verschiedensten Erkrankungen eine ausgedehnte Verwendung gefunden. F. LEHMANN<sup>3</sup> und FLEURY<sup>4</sup> wiesen als erste die antibakterielle Wirkung von Knoblauch (*Allium sativum* L.) und später OSBORN<sup>5</sup> von *Allium ursinum* L. und *Allium triquetrum* L. nach. Es gelang dann J. CAVALLITO und J. BAILEY<sup>6</sup>, aus dem Destillat, das sie aus einem wässrig-alkoholischen Knoblauchextrakt durch Destillation mit Wasserdampf unter vermindertem Druck erhielten, eine wasserlösliche Substanz zu isolieren, die sie *Allicin* nannten. Allicin ist ein farbloses, unbeständiges Öl von der Zusammensetzung  $C_6H_{10}OS_2$ . Auf Grund von chemischen Untersuchungen schlugen die Autoren die Konstitutionsformeln



O

(A = Allyl-) vor<sup>7</sup>. Allicin erscheint demnach als Zwischenstufe des Abbaus zu den leichter flüchtigen Allylsulfiden.

<sup>1</sup> TH. WERTHEIM, Liebigs Ann. 51, 289 (1844); 55, 287 (1845).

<sup>2</sup> F. W. SEMMLER, Arch. pharm. 231, 434 (1892).

<sup>3</sup> F. LEHMANN, Arch. exper. Path. Pharmacol. 147, 245 (1930).

<sup>4</sup> G. FLEURY, Bull. Soc. de Pharm. de Bordeaux 70, 190 (1932).

<sup>5</sup> T. OSBORN, Brit. J. exper. Path. 24, 227 (1943).

<sup>6</sup> J. CAVALLITO und J. BAILEY, J. amer. chem. Soc. 66, 1950 (1944).

<sup>7</sup> Wir konnten nach der Einwirkung von Hydrogenperoxyd auf Diallyldisulfid in Eisessig ein Öl isolieren, das sowohl in bezug auf die chemischen wie die antibakteriellen Eigenschaften gegenüber Allicin keine Unterschiede aufwies, und möchten daher der Formel I den Vorzug geben.

Eine wässrige Lösung des Allicins zeigt sowohl gegenüber grampositiven wie gramnegativen Mikroorganismen (z. B. Staphylokokken, Streptokokken, *Bact. typhi*, *Bact. dysenteriae*, *Bact. enteritidis*, *Vibrio cholerae*) eine gleich starke antibakterielle Wirkung. Es entspricht 1 mg Allicin ungefähr 15 OE von Penicillin.

Daß Allicin seine Entstehung einem enzymatischen Abbau aus einer größeren Molekel verdankt, konnten J. CAVALLITO und Mitarbeiter<sup>1</sup> auf folgende Weise bestätigen: Frische, mit Alkoholdampf stabilisierte Droge lieferte kein Allicin. Fügte man aber einer wässrigen Suspension von stabilisiertem Knoblauch, die an sich gegen Mikroorganismen unwirksam war, eine kleine Menge von nicht stabilisierter frischer Droge zu, so trat bald eine starke antibakterielle Wirkung auf. Durch die Einwirkung eines spezifischen Fermentes war das antibakteriell wirkende Allicin aus einer bisher noch unbekannten, im Knoblauch ursprünglich vorhandenen Substanz abgespalten worden.

Es ist uns gelungen, aus frischem Knoblauch (*Allium sativum*) und aus Bärlauch (*Allium ursinum*) diesen Naturstoff auf relativ einfache Weise rein darzustellen, zu kristallisieren und als schwefel- und stickstoffhaltige Verbindung zu charakterisieren.

Der enzymatische Abbau wird durch Gefrieren frischen Ausgangsmaterials (Zwiebeln von Knoblauch oder Bärlauch) mit fester Kohlensäure hintangehalten. Der gefrorene Zustand bleibt auch beim Mahlen zu einem feinen Pulver bestehen. Das noch immer tiefgekühlte Mahlgut wird hierauf in Methanol suspendiert und der daraus gewonnene und abfiltrierte Extrakt im Vakuum bei möglichst tiefer Temperatur zur Trockne verdampft. Nach dem Digerieren des Trockenrückstandes mit Methanol wird der Rückstand pulverig. Durch Umkristallisieren aus verdünntem Alkohol oder verdünntem Ätzeon wird die Substanz kristallin und rein abgeschieden.

C. RUNDQVIST<sup>2</sup> hat vor vier Jahrzehnten angestrebt, den Grundstoff, aus dem die Allylsulfide beim Zermahlen des Knoblauchs durch enzymatische Spaltung sich bilden, zu isolieren. Durch starke Beimischungen von Kohlehydraten, die seine Präparate noch enthielten, ließ er sich zu der irrigen Auffassung verleiten, es handle sich bei dem gesuchten Stoff um ein Glykosid, das er «Alliin» nannte. Der Autor gibt an, daß «das Glykosid nicht in reiner Form isoliert werden konnte». Die in Aussicht gestellte Fortsetzung seiner Untersuchung ist unseres Wissens unterblieben. Einige Reaktionen mit dem Rohpräparat, wie die Bildung von schwarzem Kupfersulfid und das Auftreten von Knoblauchgeruch beim Erhitzen mit Fehlingscher Lösung, oder das Auftreten von Knoblauchgeruch nach Zusatz von «Knoblauchenzym» zeigen an, daß RUNDQVIST die von uns nun rein dargestellte Substanz – freilich vermischt mit einer unbekannten Menge von Begleitstoffen – in Händen hatte. Wir haben daher seine Bezeichnung «Alliin» für die Reinsubstanz übernommen.

Alliin kristallisiert aus verdünntem Alkohol in langen, äußerst feinen, farblosen, zu Büscheln vereinigten, geruchlosen Nadeln (siehe Fig. 1), die unter Zersetzung und Aufschäumen zwischen 163–165° C schmelzen. Alliin ist optisch aktiv, seine wässrige Lösung zeigt einen Drehwert von  $[\alpha]_D^{21} = +62,8^\circ$  ( $c = 2$ ). Die Werte der Elementaranalyse stimmen für die Zusammensetzung  $C_{12}H_{24}O_7N_2S_2$  (ber. C 38,73, H 6,42, N 7,52, S 17,19%, gef. C 38,60, H 6,21, N 7,35, S 17,46%).

<sup>1</sup> J. CAVALLITO, J. BAILEY, J. BUCH, J. amer. chem. Soc. 67, 1032 (1945).

<sup>2</sup> C. RUNDQVIST, Pharmaceutisk Notisblad 18, 323 (1909).

Alliin ist in Wasser sehr leicht löslich, unlöslich in absolutem Alkohol, Chloroform, Azeton, Äther und Benzol. Eine verdünnte wässrige Lösung gibt mit Alloxan eine Rotfärbung und mit Ninhydrin eine positive Reaktion, die bis zu einer Verdünnung von 1:2000 noch erkennbar ist.

Eine wässrige Lösung des reinen Alliins erweist sich im Staphylokokken-Lochplattentest<sup>1</sup> im Gegensatz zu dem von CAVALLITO<sup>2</sup> aus Knoblauch nach der Enzymeinwirkung isolierten Allicin als unwirksam. Versetzt man aber die Alliinlösung mit einer aus Knoblauch her-

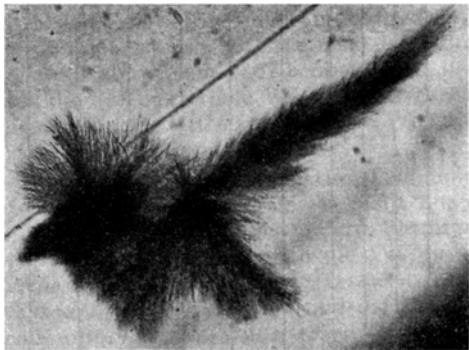


Fig. 1. Alliin aus verdünntem Alkohol (50fach vergrößert).

gestellten Fermentlösung, die an sich gegen Staphylokokken unwirksam ist, so tritt eine antibakterielle Wirkung auf, die derjenigen des Allicins gleicht; sie ist im sauren Milieu am stärksten und nimmt mit steigendem  $p_H$  ab. Das enzymatisch aus Alliin gebildete Spaltprodukt erwies sich auch gegenüber *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Eberthella typhosa* und *Bact. dysenteriae* E. als antibakteriell.

Mit der Spaltung von Alliin durch ein spezifisches Enzym, für das wir die Bezeichnung «Alliinase» vorschlagen, tritt ein immer intensiver werdender Geruch nach Knoblauch auf. Läßt man diese Lösung einige Tage bei 37° C stehen, so wird sie trübe und es scheiden sich ölige Tröpfchen ab, die im wesentlichen aus Diallyldisulfid, dem Hauptbestandteil des Knoblauchöls, bestehen. Der Abbau geht demnach über das an sich unbeständige Allicin hinaus bis zu den flüchtigen, stark riechenden Verbindungen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß im Alliin die für gewisse *Allium*-arten charakteristische schwefel- und stickstoffhaltige Grundsubstanz nun in reiner Form vorliegt. Alliin selbst ist gegen Bakterien unwirksam; bei dessen Abbau durch ein spezifisches Begleitenzym (Alliinase) entsteht das antibakteriell stark wirksame Allicin, das durch weitere Zersetzung die flüchtigen, stark riechenden Allylsulfide liefert.

A. STOLL und E. SEEBECK

Chemisch-pharmazeutisches Laboratorium Sandoz, Basel, den 10. Februar 1947.

Summary

The authors have succeeded in isolating alliin in a pure, crystalline form and in defining its properties.

<sup>1</sup> Die antibakterielle Wirksamkeit wurde von Dr. A. BRACK im Lochplattentest (Lochdurchmesser 13 mm, Fleischextrakt-Pepton-Agar, *Staphylococcus aureus* Stamm 114) nach FLEMING geprüft.  
<sup>2</sup> Loc. cit.

Alliin is characteristic for certain kinds of garlic; it contains sulphur and nitrogen and represents the initial substance of garlic oil. Alliin itself has no bactericidal action. Upon decomposition—caused by a specific concomitant enzyme, alliinase—the highly bactericidal substance, allicin, is produced. Further decomposition yields the volatile, sharply-odorous allyl-sulphides.

Die antibakterielle Wirkung der Usninsäure auf Mykobakterien und andere Mikroorganismen

Fünfte Mitteilung über antibakterielle Stoffe<sup>1</sup>

In der vorangehenden Mitteilung wurde gezeigt, daß die Usninsäure von zahlreichen Flechtenarten gebildet wird und im wesentlichen für deren antibakterielle Wirksamkeit verantwortlich ist. Diese gelbgefärbte Flechtensäure ist bisher in der Natur stets in einer der beiden optisch aktiven Formen aufgefunden worden. Bei der Aufarbeitung einer größeren Menge von isländischem Moos (*Cetraria islandica* Ach.) konnten wir nun neben der *d*-Protolichesterinsäure auch die *razemische Usninsäure* als interessantes Nebenprodukt in geringer Menge isolieren. Die *l*- und die *d*-Usninsäure zeigen sehr hohe optische Drehwerte. Da allen aus dieser Flechte isolierten Präparaten die optische Aktivität hingegen fehlt und eine Razemisierung während der Isolierung unwahrscheinlich ist, so scheint im isländischen Moos ein Gemisch gleicher Mengen von *l*- und *d*-Usninsäure, also die *razemische Form*, als Naturprodukt vorzuliegen.

Im übrigen kommen die Usninsäuren in den Flechten in sehr unterschiedlichen Mengen vor. Die folgende Zusammenstellung zeigt den Gehalt an Usninsäure, bezogen auf Trockensubstanz einiger von uns untersuchter Flechten (Tabelle I).

Tabelle I  
Gehalt verschiedener Flechten an Usninsäure

Flechtenart	Prozente Usninsäure, bezogen auf Trockensubstanz der Flechte
<i>Evernia divaricata</i> Ach. . . .	0,50 ( <i>d</i> -Usninsäure)
<i>Cladonia rangiferina</i> Web. . .	0,55 „
<i>Cladonia mitis</i> Sandst. . . .	0,60 „
<i>Ramalina capitata</i> Nyl. . . .	0,60 „
<i>Usnea dasypoga</i> Röhl. . . .	1,15 „
<i>Usnea hirta</i> Wigg. . . . .	1,50 „
<i>Usnea florida</i> Wigg. . . . .	1,80 „
<i>Cladonia amaurocraea</i> Schaer.	0,22 ( <i>l</i> -Usninsäure)
<i>Cetraria pinastri</i> Röhl. . . .	0,55 „
<i>Cetraria cucullata</i> Ach. . . .	0,70 „
<i>Cladonia deformis</i> Hoffm. . .	1,00 „
<i>Cetraria nivalis</i> Ach. . . . .	2,75 „
<i>Alectoria ochroleuca</i> Ach. . .	4,00 „
<i>Alectoria ochroleuca</i> Ach.	
(auf Urgestein) . . . . .	8,00 „
<i>Cetraria islandica</i> Ach. . . .	0,04 ( <i>d,l</i> -Usninsäure)

<sup>1</sup> Vierte Mitteilung, siehe vorstehend S. 111.