

## 42. Spaltung von Herzglykosiden durch Pilzenzyme.

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

von A. Stoll, J. Renz und A. Brack.

(23. XII. 50.)

Die Zuckerkomponente der genuinen Herzglykoside ist in allen bisher bekannten Fällen mit dem sekundären Hydroxyl in 3-Stellung des Steroidgerüstes<sup>2)</sup> verbunden und besteht in der Regel aus Desoxyzucker- und Glucoseresten oder, in wenigen Fällen, ausschliesslich aus einer oder mehreren Glucosemolekülen. Als Desoxyzucker wurden ausser der im Pflanzenreich weit verbreiteten Rhamnose noch etwa ein Dutzend weitere Desoxyzucker wie Digitoxose, Cymarose, Thevetose usw. gefunden, die bisher nur in Herzglykosiden angetroffen wurden. Bei Glykosiden mit Desoxyzucker ist dieser jeweils direkt mit dem Aglykon verbunden. Die meisten Herzglykoside enthalten nur eine einzige Desoxyzuckermolekel, an der in der Regel ein oder mehrere Glucosereste hängen; eine Ausnahme machen z. B. Glykoside aus Digitalisarten, die eine Kette von drei Digitoxoseresten enthalten. Wir können somit in bezug auf die Zuckerkomponente die beiden folgenden Typen von Herzglykosiden unterscheiden:

I. Aglykon —— (Desoxyzucker)<sub>x</sub> —— (Glucose)<sub>y</sub>

II. Aglykon —— (Glucose)<sub>x</sub>

Bei der Hydrolyse der Herzglykoside mit Säure wird die Bindung zwischen Aglykon und Zucker gelöst. Die Spaltung gelingt aber oftmals nur unter so energischen Bedingungen, dass dabei das Aglykon zerstört wird. Mit Säure ist es bisher auch nicht gelungen, die Zuckerkette schrittweise abzubauen und so zu zuckerärmeren Glykosiden zu gelangen. Hingegen ist es möglich, mit Hilfe spezifischer Enzyme, welche die Herzglykoside in den Drogen begleiten, die Zuckerkette stufenweise zu hydrolysieren. Diese Enzyme erwiesen sich bis zu einem gewissen Grade als spezifisch, d. h. sie spalten die mit ihnen in der Pflanze vergesellschafteten Glykoside optimal, und nur mehr oder weniger gut andere im Aufbau nah verwandte Herzglykoside<sup>3)</sup>. So spaltet z. B. das Enzym der Samen von *Strophanthus kombé* auch die Glykoside aus *Thevetia*<sup>4)</sup>, *Periploca*<sup>3)</sup>, *Cheiranthus*<sup>5)</sup>, *Helleborus*<sup>6)</sup>, *Scilla* (weisse Varietät<sup>3)</sup> u. a.

<sup>1)</sup> 23. Mitteilung, *Helv.* **33**, 1637 (1950).

<sup>2)</sup> Vgl. *L. F. Fieser & M. Fieser*, Natural Products Related to Phenanthrene, Am. Chem. Soc. Monograph No. 70 (1949).

<sup>3)</sup> *A. Stoll & J. Renz*, *Enzymologia* **7**, 362 (1939).

<sup>4)</sup> *H. Helfenberger & T. Reichstein*, *Helv.* **31**, 1470 (1948).

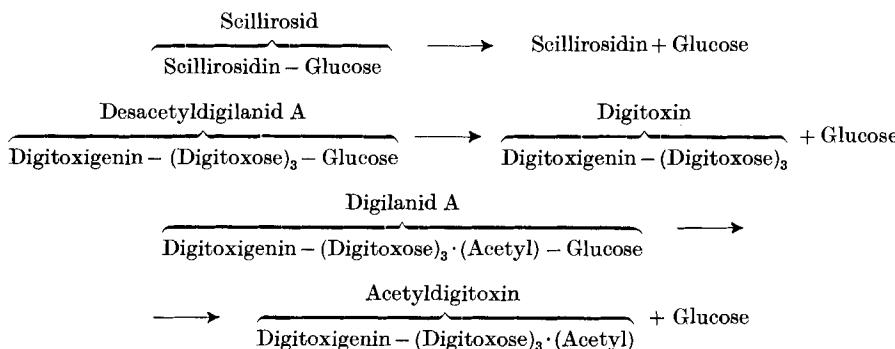
<sup>5)</sup> *N. M. Shah, K. Meyer & T. Reichstein*, *Pharm. acta Helv.* **24**, 113 (1949).

<sup>6)</sup> *J. Schmutz*, *Pharm. acta Helv.* **22**, 373 (1947).

Die Vertreter der oben genannten Gruppe I verlieren bei der enzymatischen Hydrolyse die endständige Glucose, so dass zuckerärmer Glykoside entstehen, die nur noch Desoxyzucker enthalten und die bisher jeder weiteren enzymatischen Spaltung zu widerstehen vermochten. Im Gegensatz dazu können die Glykoside der Gruppe II durch enzymatische Spaltung bis zu den Aglykonen abgebaut werden. Die Enzyme der Samen von *Coronilla*-Arten z. B. spalten die darin enthaltenen Herzglykoside bis zur Aglykonstufe<sup>1)</sup>. Dieselben Enzyme vermögen auch das Scillirosid, das ratizide Glykosid der roten Meerzwiebel, das nur aus dem Aglykon Scillirosidin und 1 Mol Glucose besteht, abzubauen<sup>2)</sup>; wegen Verharzung bei der sauren Hydrolyse ist das Scillirosidin erst durch diese enzymatische Spaltung zugänglich geworden.

Bei allen bis anhin erwähnten Spaltungen wirken Enzyme, die in herzglykosidbildenden Pflanzen vorkommen. Von herzglykosidspaltenden Enzymen anderer Herkunft sind solche im Magensaft der Weinbergschnecke zu nennen, mit denen es in einigen Fällen gelang, Glucosereste von Desoxyzuckern der Glykoside abzutrennen<sup>3)</sup>. Neuerdings wurde auch in den Samen der Luzerne<sup>2)</sup> ein Enzymsystem aufgefunden, das den Glucoserest des Scillirosids abspaltet.

Von niederen Pilzen ist bekannt, dass sie zu sehr intensiven enzymatischen Leistungen befähigt sind. Da diese in vielen Fällen weniger spezifisch sind als bei höheren Pflanzen, haben wir eine Reihe von Pilzen auf ihre Wirkung gegenüber Herzglykosiden geprüft und als besonders geeignetes Substrat das Scillirosid herausgegriffen. Dieses Glykosid, das zum oben erwähnten Typus II gehört, erwies sich auch deshalb für Enzymversuche als besonders geeignet, weil einerseits sein Aglykon gut kristallisiert, und weil es anderseits mit Säure nur schwer spaltbar ist, so dass eine saure Hydrolyse des Glykosids unter den Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden konnte.



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

<sup>2)</sup> A. Stoll & J. Renz, *Helv.* **33**, 286 (1950).

<sup>3)</sup> M. Frerejacque, *C. r.* **225**, 695 (1947); **226**, 835 (1948).

Nachdem es sich bald erwiesen hatte, dass viele niedere Pilze das Scillirosid ausgezeichnet zu spalten vermögen, haben wir noch Glykoside vom Typus I in unsere Untersuchungen einbezogen, so z. B. das Desacetyl digilanid A und das Digilanid A. Die dabei beobachteten enzymatischen Spaltungen sind im vorstehenden Schema wiedergegeben.

Die Durchführung der Spaltungsversuche: Die Pilze wurden auf einem Malzextrakt-Pepton-Rohrzucker-Nährboden in *Fernbach*-Kolben gezüchtet und nach 6- bis 28-tägiger Bebrütung bei 30° geerntet. Sowohl das Mycel selbst als auch daraus bereitete Extrakte sind auf Enzymwirkung geprüft worden. Zur Herstellung der Extrakte wurde das von der Nährösung abgepresste Mycel (entsprechend 2—3 g Trockensubstanz) mit 1/50-m. Acetatpuffer (pH 5) ausgezogen. Dieser Mycelauszug (100 cm<sup>3</sup>) wurde dann mit 5 cm<sup>3</sup> einer alkoholischen Lösung von 100 mg Glykosid versetzt und während 48 Stunden bei 37° gehalten.

Bei Verwendung des Mycels selbst für den Spaltungsversuch wurde dieses nach dem Abpressen der Kulturlösung mit Aceton und Äther behandelt und fein gemahlen. 1 g des trockenen Mycelpräparates wurde in Acetatpuffer von pH 5 aufgeschlämmt und nach Zusatz der Glykosidlösung bei 37° leicht bewegt.

Die Glykoside entzog man den Versuchslösungen direkt durch erschöpfendes Ausschütteln mit Chloroform. Die Eindampfrückstände der Chloroformauszüge wurden an Aluminiumoxyd chromatographiert und die Spaltprodukte durch Kristallisation präparativ isoliert, identifiziert und gewogen. Für die Berechnung der Spaltung wurde nur der nach der Chromatographie kristallisierte gewonnene Anteil berücksichtigt.

Unter dem Einfluss der Pilzenzyme gehen die Glykosidspaltungen in einem weiten pH- und Temperaturbereich vor sich. So wird z. B. das Scillirosid von *Aspergillus oryzae* zwischen pH 3 und pH 8 (optimal bei pH 5 bis 6) und bei Temperaturen von 5 bis 60° (optimal bei 40°) gespalten.

In der Tabelle 1 sind die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse der drei erwähnten Herzglykoside durch niedere Pilze zusammengestellt. Wie aus der Übersicht hervorgeht, vermögen besonders zahlreiche Arten der Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* das Scillirosid zu spalten, ein grosser Teil davon auch das Desacetyl digilanid A. Nur wenige spalten auch das Digilanid A, das sich vom Desacetyl digilanid A durch die Anwesenheit einer Acetylgruppe in der Zuckerkette unterscheidet. Der Acetylrest macht also das Glykosid gegenüber einer enzymatischen Spaltung resistenter. Möglicherweise wird Digilanid A durch ein anderes Enzym gespalten als das acetylfreie Glykosid. Wir konnten die Beobachtung machen, dass das erstere Enzym schwer extrahierbar ist und demnach viel fester am Pilzmycel haftet als das Enzym, welches das acetylfreie Glykosid spaltet.

Eine Anzahl von Vertretern anderer Gattungen der Gruppe *Hyphomycetales*, die wir geprüft haben, vermögen ebenfalls Herzglykoside zu spalten. Unter den Ascomyceten ist die bedeutende enzymatische Leistung des Mutterkornpilzes, *Claviceps purpurea*, bemerkenswert.

Bei mehreren von uns geprüften Pilzen war überhaupt keine Glykosidspaltung festzustellen. Von diesen wären zu nennen: Ein Stamm von *Aspergillus niger* (873), *Aspergillus versicolor* Tirabaschi

Tabelle 1.

Abspaltung von Glucose aus Herzglykosiden durch Enzyme niederer Pilze.

Nr. des Stam- mes	Pilzart	E=Extrakt M=Mycel	Spaltungen in % der theoretischen Ausbeute		
			Scilli- rosid	Desacetyl- digilanid A	Digilanid A
<b>Hypocreales:</b>					
815	Penicillium patulum . . . . .	E	85	5	0
822	Penicillium spec. . . . .	E	60	5	0
825	Penicillium spec. . . . .	E	80	0	0
831	Penicillium notatum . . . . .	M	75	15	0
833	Penicillium spec. . . . .	M	70	65	Spur
834	Penicillium spec. . . . .	M	70	95	0
838	Penicillium spec. . . . .	E	85	15	0
841	Penicillium spec. . . . .	E	80	—	—
851	Penicillium spec. . . . .	M	90	40	0
858	Penicillium spec. . . . .	M	90	20	10
860	Penicillium spec. . . . .	E	60	—	—
872	Penicillium digitatum Sacc. . .	M	80	30	0
889	Penicillium spec. (Gruppe Asym- metrica, Divaricata) . . . . .	M	80	70	50
890	Penicillium spec. . . . .	E	60	0	0
909	Penicillium spec. . . . .	E	90	20	0
804	Aspergillus niger . . . . .	E	25	—	—
809	Aspergillus ustus Bain. . . . .	E	65	20	0
811	Aspergillus spec. (Glaucus- Gruppe) . . . . .	E	80	0	0
843	Aspergillus fumigatus Fres. . .	E	5	—	—
876	Aspergillus oryzae . . . . .	M	100	80	0
882	Aspergillus spec. (candidus ?) .	E	20	—	—
883	Aspergillus spec. (Glaucus- Gruppe) . . . . .	E	80	20	0
888	Aspergillus spec. (Glaucus- Gruppe) . . . . .	M	90	95	0
895	Aspergillus spec. . . . .	E	65	5	0
906	Aspergillus spec. . . . .	E	70	20	0
865	Rhizopus nigricans Ehrb. . . .	E	15	—	—
900	Alternaria spec. . . . .	E	15	—	—
903	Stemphylium spec. . . . .	E	35	—	—
893	Pullularia pullulans Berkh. . .	E	50	—	—
905	Stachybotrys spec. (atra ?) . .	E	30	—	—
904	Paecilomyces spec. . . . .	M	90	20	5
<b>Ascomycetes:</b>					
	Claviceps purpurea Tul. Mycel aus Kulturen . . . . .	M	90	60	Spur
	Claviceps purpurea Tul. Sklero- tien (1 g) . . . . .		85	30	0
	Saccharomyces cerevisiae (Stamm H), Zellen . . . . .		Spur	0	0

(881), ein Stamm von *Rhizopus nigricans* Ehrb. (862), *Sclerotinia libertiana* Fckl. (864), *Sporotrichum* spec. (892), zwei *Monilia*-Arten (Stamm 868 und *M. sitophila* Sacc., 853). Zum Vergleich haben wir noch zwei *Actinomycetales*, *Nocardia* spec. (880) und *Streptomyces griseus* (862), geprüft und festgestellt, dass auch diesen Mikroorganismen die Fähigkeit, Herzglykoside zu spalten, abgeht.

Ausser mit den in der Tabelle verzeichneten Substraten haben wir mit einigen Pilzstämmen die Spaltbarkeit verschiedener anderer Herzglykoside geprüft. So werden z. B. von *Aspergillus oryzae* und von *Claviceps purpurea* auch das Desacetyl digilanid C zum Digoxin, das  $\kappa$ -Strophanthin- $\beta$  zum Cymarin und das Scillaren A zum Proscillarin abgebaut.

### Zusammenfassung.

Enzympräparate aus zahlreichen Stämmen niederer Pilze aus der Gruppe der *Hyphomycetales* sowie von *Claviceps purpurea* (Ascomycetes) vermögen aus glucosehaltigen Herzglykosiden die Glucose abzuspalten. Das Scillirosid, das als Zuckerkomponente nur Glucose enthält, wird bis zum Aglykon, Scillirosidin abgebaut. Stämme der Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* erwiesen sich als besonders reich an herzglykosidspaltenden Enzymen.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium  
„Sandoz“ Basel.

## 43. Zur Kenntnis des Kohlenstoffringes.

58. Mitteilung<sup>1)</sup>.

### Über die Reaktion einiger vielgliedriger Cycloalkyl-bromide mit Magnesium

von L. Ruzicka, P. Barman und V. Prelog.

(26. XII. 50.)

In einem Vortrag<sup>2)</sup> wurde vor kurzem zusammenfassend über den starken Einfluss der Ringgrösse auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Ringverbindungen mit einer mittleren Ringgliederzahl (8–13) berichtet. Neben dem dort erwähnten quantitativen und semiquantitativen Tatsachenmaterial konnten wir im Laufe unserer Untersuchungen über vielgliedrige Ringverbindungen eine Reihe von präparativen Erfahrungen sammeln, welche zur Kenntnis dieses Effektes beitragen.

<sup>1)</sup> 57. Mitt., Helv. 34, 39 (1951).

<sup>2)</sup> V. Prelog, Soc. 1950, 420.