

87. Spaltung von Herzglykosiden mit Enzympräparaten aus tierischen Organen.

25. Mitteilung über Herzglykoside¹⁾

von A. Stoll und J. Renz.

(10. II. 51.)

In der vorangehenden Mitteilung¹⁾ dieser Reihe haben wir gezeigt, dass zahlreiche niedere Pilze aus genuinen Herzglykosiden die Glucose enzymatisch abzuspalten vermögen. Je nach dem Aufbau des Zuckerrestes entstehen bei der enzymatischen Hydrolyse entweder die Aglykone, wenn die Glykoside als Zucker primär nur Glucose enthalten, oder glucosefreie Glykoside, die nur noch Desoxyzucker tragen.

Im folgenden wird gezeigt, dass auch Präparate aus tierischen Organen imstande sind, Herzglykoside enzymatisch anzugreifen. Enzympräparate aus Herzmuskel standen dabei im Vordergrund des Interesses. Von verschiedenen Autoren²⁾ wurde bereits die Ansicht geäussert, dass die Herzglykoside durch Enzyme des Herzmuskels zu den Aglykonen abgebaut und als solche eliminiert würden. Die Ergebnisse der früheren Versuche wurden aber in neuerer Zeit angezweifelt; doch wurde darauf hingewiesen³⁾, dass die Möglichkeit einer enzymatischen Abspaltung von Glucoseresten aus Herzglykosiden in den Organen bestehe.

Die Voraussetzung für schlüssige Versuchsergebnisse war eine genaue Kenntnis und möglichst quantitative Erfassung der Spaltprodukte, vor allem der Aglycone bzw. glucosefreien Glykoside, die nur Desoxyzucker enthalten.

Für die Herstellung der Enzympräparate wurden die tierischen Organe: Herzmuskel, Skelettmuskel, Leber, Niere u. a. von frisch geschlachteten Tieren bei Gegenwart von viel Aceton rasch zerkleinert, mit weiteren Mengen Aceton entwässert, mit abs. Äther getrocknet und fein gemahlen. Nach den Erfahrungen der Enzymchemie konnte erwartet werden, dass so hergestellte Präparate ihre enzymatische Aktivität mehr oder weniger beibehalten hätten.

Die Herzglykoside, die in unseren Versuchen als Substrate gedient haben, sind in Tabelle 1 zusammengestellt, aus der auch ersichtlich ist, aus welchen Aglykonen und Zuckern sich die einzelnen Glykoside aufbauen.

¹⁾ 24. Mitteilung, *Helv.* **34**, 397 (1951).

²⁾ A. Gröber, *Arch. exp. Path. Pharm.* **72**, 317 (1913); W. Straub, *ibid.* **84**, 223 (1919); M. Cloetta, *ibid.* **88**, 113 (1920); H. Fischer, *ibid.* **130**, 111 (1928); O. Steppuhn & J. Nolle, *Biochem. Z.* **193**, 409 (1928).

³⁾ W. Neumann, *Arch. exp. Path. Pharm.* **208**, 46, 100 (1949).

Tabelle 1.
Chemischer Aufbau der untersuchten Herzglykoside.

Glykosid	Aglykon	Zuckerrest	Glucosefreies Abbauprodukt
Digilanid A	Digitoxigenin	3 Mol. Digitoxose + 1 Mol. Glucose + 1 Mol. Acetyl	Acetyl-digitoxin
Desacetyldigilanid A	Digitoxigenin	3 Mol. Digitoxose + 1 Mol. Glucose	Digitoxin
κ -Strophanthin- β	Strophanthidin	1 Mol. Cymarose + 1 Mol. Glucose	Cymarin
Scillaren A	Scillardin A	1 Mol. Rhamnose + 1 Mol. Glucose	Proscillardin A
Scillirosid	Scillirosidin	1 Mol. Glucose	Scillirosidin

Scillardin A ist eigentlich ein Anhydroprodukt; das primäre Aglykon von Scillaren A ist noch unbekannt; unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse des Scillaren A verliert das Aglykon 1 Mol. Wasser, wodurch im Ringgerüst eine zusätzliche Doppelbindung entsteht.

Die enzymatische Spaltung wurde in schwach saurem Medium (pH 5—6) bei 37° durchgeführt, und zwar in Ansätzen von 5 bzw. 10 g Enzympräparat in 100 cm³ Pufferlösung mit 100 mg Glykosid. Wir sind uns dabei bewusst, dass diese Glykosidkonzentration viertausendmal höher ist als im therapeutischen Versuch, auch wenn man in Betracht zieht, dass die Affinität der Herzglykoside zum Herzmuskel viel grösser ist als zu den übrigen Organen¹⁾.

Nach 48 Stunden wurden die Ansätze mit Chloroform ausgeschüttelt. In diesem Lösungsmittel sind zuckerärmer Glykoside meist viel leichter löslich als die Ausgangsstoffe; nur unverändertes Digilanid A wird zum grössten Teil von Chloroform auch aufgenommen. Die Lösung der Glykoside in Chloroform wurde an Aluminiumoxyd chromatographiert. Die erhaltenen Spaltprodukte wurden in kristallisiertem Zustand gewogen und auf Grund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften identifiziert.

Wie die Tabelle 2 veranschaulicht, ist in zahlreichen Fällen durch tierisches Organmaterial aus den genuinen Glykosiden die Glucose abgespalten worden. Es entstehen dabei dieselben Spaltprodukte wie bei der Hydrolyse mit den spezifischen Enzymen, welche die genuinen Glykoside in den herzaktiven Pflanzen begleiten, oder mit Enzymen von Pilzen, Luzernesamen usw.

Als auffälliges Ergebnis tritt aus der Tabelle 2 hervor, dass Enzympräparate aus Herzmuskel eine viel stärkere Aktivität aufweisen als Enzympräparate aus Skelettmuskel. Der enzymatischen Wirksamkeit des Herzmuskels kommt deswegen eine besondere Bedeutung zu, weil die Herzglykoside in kleinsten Dosen die Tätigkeit des Herzens beeinflussen, sich im Herzmuskel stark anreichern und darin je nach der Natur der Glykoside mehr oder weniger fest haften, wobei die Länge der Zuckerkette eine Rolle zu spielen scheint.

¹⁾ E. Rothlin, Schweiz. med. Wschr. **74**, 217 (1944).

Tabelle 2.

Abbau von Herzglykosiden durch Enzympräparate aus tierischen Organen.

Enzympräparat aus	Tierart	Enzym-präparat g	Spaltungen in % der theoretischen Ausbeute				
			Scillirosid	Scillaren A	k-Strophanthin- β	Des-acetyl-digilanid A	Digilanid A
Herzmuskel	Schwein	10	35	45	Spur	4	0
	Kalb	10	30	25	2	2	0
	Rind	10	15	40	Spur	3	0
	Pferd	10	10	12	0	3	0
Skelettmuskel	Schwein	10	4	Spur	0	0	0
	Kalb	10	0-4*)	3	0	0-1*)	0
Omentum majus	Kalb	5	30	20	0	3-8	0
Niere	Schwein	5	65	80	5	14	0
	Kalb	5	55	50	6	20	0
Leber	Schwein	5	60	90	6	25	0
	Kalb	5	35	50	Spur	3	0
Milz	Kalb	5	25	40	3	8	0
Pankreas	Schwein	5	25	50	0	6	0

*) In einzelnen Muskelgebieten scheint eine ganz schwache enzymatische Aktivität nachweisbar zu sein.

Von den Präparaten aus drüsigen Organen zeigen vor allem solche aus der Niere und der Leber eine hohe enzymatische Aktivität. Auffallend ist, dass auch die Pankreasdrüse des Schweins ein Präparat mit einem relativ sehr aktiven glucoseabspaltenden Enzym liefert.

Im Hinblick auf das Substrat sind die Ergebnisse der enzymatischen Spaltungsversuche sehr verschieden ausgefallen. k Strophanthin- β wird von allen Enzympräparaten entweder gar nicht oder nur sehr wenig angegriffen. Desacetyl digilanid A (Purpureaglykosid A) unterliegt nur durch die Enzyme aus Niere und aus Leber einer erheblichen Spaltung, während Digilanid A allen Spaltungsversuchen widersteht. Für diese Resistenz scheint die Acetylgruppe am dritten Digitoxose-Rest verantwortlich zu sein. Eine Desacetylierung im lebenden Organismus ist natürlich möglich, worauf dann auch die Glucoseabspaltung eintreten könnte. Die Digilanidase, welche die genuinen Glykoside der Digitalis lanata in der Pflanze begleitet, und Enzyme aus niederen Pilzen vermögen den Glucoserest auch bei Anwesenheit der Acetylgruppe abzuspalten.

Als weiteres interessantes Ergebnis zeigt die Tabelle 2, dass die Glykoside aus der Meerzwiebel (Scillirosid und Scillaren A) viel stärker der enzymatischen Hydrolyse unterliegen als k-Strophanthin- β und die beiden Digitalisglykoside (Desacetyl digilanid A und Digila-

nid A). Bekanntlich besitzen die Digitalis- und die Strophanthus-glykoside einen einfach ungesättigten 5gliedrigen Lactonring, während die Glykoside aus der Meerzwiebel wie die herzaktiven Kröten-gifte einen doppelt ungesättigten 6gliedrigen Lactonring aufweisen. Die Verbindungen mit dem 6gliedrigen Lactonring besitzen 24 Kohlenstoffatome und lassen sich, wie wir früher gezeigt haben, direkt und ohne Veränderung des Kohlenstoffgerüsts auf ganz einfache Weise in Gallensäuren überführen. So geht z. B. das Aglykon von Scillaren A in Allocholansäure¹⁾ oder in eine Allo-lithocholsäure²⁾ über. Vielleicht begünstigt die nahe Verwandtschaft der Aglykone von Glykosiden aus der Meerzwiebel mit Steroiden tierischen Ursprungs die Spaltung dieser pflanzlichen Glykoside mit Enzympräparaten aus tierischen Organen.

Die enzymatische Spaltung kann in bezug auf die Grösse der Hatcher-Dosis zu bedeutend herzwirksameren Verbindungen führen. So liefert der Abbau des Scillirosids das Aglykon Scillirosidin, das pro Gewichtseinheit eine doppelt so starke Herzaktivität aufweist wie das Glykosid³⁾.

Unsere Versuche mit Enzympräparaten aus tierischen Organen beweisen natürlich noch nicht, dass die Herzglykoside im lebenden Organismus in gleicher Weise abgebaut werden, doch ist nach den vorliegenden Ergebnissen die Möglichkeit einer Glucoseabspaltung im lebenden Organ und besonders im Herzmuskel nicht von der Hand zu weisen.

Experimenteller Teil.

1. Herstellung der Enzympräparate. Die Organe von frisch geschlachteten Tieren wurden von fettigem Gewebe möglichst vollständig befreit und bei Gegenwart von viel Aceton rasch zerkleinert. Nach kurzem Digerieren in Aceton wurde vom Lösungsmittel abfiltriert und das Organmaterial durch Behandeln mit mehr Aceton entwässert. Mit abs. Äther wurde das Fett herausgelöst und das nun ganz trockene Material fein gemahlen. Die Ausbeuten an solchen Enzympräparaten, die für die Spaltungsversuche Verwendung fanden, betrugen z. B. beim Herzmuskel des Kalbes 17—19%; beim Herzmuskel des Schweines 18—20%; beim Skelettmuskel des Kalbes 17—24%; beim Skelettmuskel des Schweines 10—12%; bei der Niere des Schweines 18%; bei der Leber des Kalbes 24%; bei der Leber des Schweines 23%; beim Pankreas des Schweines 7—12%; bei der Milz des Kalbes 40—50% und beim Omentum des Kalbes 2—3%.

Mit Pufferlösungen lässt sich das Herzglykosid-spaltende Enzym des Herzmuskels nicht ohne weiteres aus dem Zellmaterial Herauslösen. Erst nach dessen teilweiser Verdauung durch Trypsin wird es durch wässrige Lösungen allmählich extrahierbar.

2. Ausführung der Spaltungsversuche. 5 bzw. 10 g der Enzympräparate (siehe die Tabelle 2) wurden in 100 cm³ eines 0,02-m. Acetatpuffers von pH 5 aufgeschwemmt. In orientierenden Versuchen hatten wir uns zuvor davon überzeugt, dass der enzymatische Abbau optimal zwischen pH 5 und 6 abläuft. Falls beim Suspendieren des Enzympräparates im Puffer eine kleine Verschiebung nach der neutralen Seite eintrat,

¹⁾ A. Stoll, A. Hofmann & W. Kreis, Helv. 18, 644 (1935).

²⁾ A. Stoll & J. Renz, Helv. 24, 1380 (1941).

³⁾ A. Stoll & J. Renz, Helv. 33, 286 (1950).

so wurde durch Zusatz von etwas Salzsäure wieder auf pH 5 eingestellt. Im allgemeinen blieb die Wasserstoffionen-Konzentration während des ganzen Versuches ziemlich konstant. Nun fügte man die Lösung von 100 mg des Glykosids in 5 cm³ Alkohol hinzu und hielt die Ansätze nach Zugabe von etwas Toluol bei 37° während 48 Stunden in schwacher Bewegung.

3. Aufarbeitung und Bestimmung der Spaltprodukte. Die Ansätze wurden nun ohne Abtrennung des Enzymmaterials mit Chloroform erschöpfend ausgeschüttelt; die Schichtentrennung wurde gegebenenfalls unter Zuhilfenahme der Zentrifuge erreicht. Vorheriges Aufnehmen der Glykoside in Alkohol und Abtrennung vom ungelösten Enzymmaterial führte zu keinen anderen Ergebnissen als die rascher durchführbare Chloroform-extraktion. Der Eindampfrückstand des Chloroformauszugs wurde zur Entfernung von fetigen Verunreinigungen mit Petroläther digeriert. Die so erhaltenen Präparate, welche die Abbauprodukte und je nach der Chloroformlöslichkeit des angewandten Glykosids auch noch unverändertes Ausgangsmaterial enthielten, wurden an Aluminiumoxyd chromatographiert und die Säulen mit Benzol-Chloroformgemischen, mit Chloroform allein oder mit Chloroform und wenig Methanol entwickelt. Die optimalen Verhältnisse für die Isolierung der Abbauprodukte mussten für das bei unseren Versuchen verwendete, neutral gewaschene Aluminiumoxyd für jeden Fall mit den Reinsubstanzen ausgetestet werden, bevor die Präparate des enzymatischen Abbaus verarbeitet wurden. Die Berechnung des Spaltungsgrades erfolgte auf Grund des Gewichts der nach der Chromatographie kristallisiert erhaltenen Fraktionen. Die Kristalle wurden durch die Kristallform, die Farbreaktion, den Schmelzpunkt, die Löslichkeit und durch den Verteilungskoeffizienten zwischen Essigester und Wasser charakterisiert. Dieser ist besonders charakteristisch für abgebauta Glykoside und stark verschieden von demjenigen der Ausgangsstoffe, da infolge der längeren Zuckerkette die genuinen Glykoside vom organischen Lösungsmittel viel weniger aufgenommen werden.

Die kristallisierten erhaltenen, glucosefreien Abbauprodukte erwiesen sich bei allen Versuchen identisch mit den in der rechten Spalte der Tabelle 1 aufgeführten glucosefreien Substanzen.

Zusammenfassung.

Es wurde die Spaltung von Herzglykosiden durch Enzympräparate aus verschiedenen tierischen Organen geprüft und festgestellt, dass eine Reihe davon befähigt sind, die in glucosehaltigen Herzglykosiden stets endständige Glucose abzuspalten. Das Scillirosid, das nur Glucose enthält, wird zum Aglykon abgebaut. Im Gegensatz zu Präparaten aus Skelettmuskeln, die nur eine kaum feststellbare Aktivität aufweisen, bauen Enzympräparate aus Herzmuskel glucosehaltige Herzglykoside in manchen Fällen kräftig ab. Drüsige Organe, wie Niere, Leber und Milz liefern Enzympräparate, die sich durch eine besonders hohe enzymatische Aktivität auszeichnen. Für alle untersuchten Organpräparate ist charakteristisch, dass sie die Glykoside der Meerzwiebel (Scillirosid, Scillaren A), die den 6gliedrigen, doppelt ungesättigten Lactonring besitzen, viel stärker abbauen als Digitalis- und Strophanthusglykoside mit dem 5gliedrigen Lactonring.

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium „Sandoz“, Basel.