

**269. Umwandlung von Cardenoliden durch Mikroorganismen.
V. Hydroxylierung und Dehydrierung durch *Psilocybe semperviva*
HEIM et CAILLEUX und *Psilocybe mexicana* HEIM.**

11. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen¹⁾

von **E. Weiss-Berg** und **Ch. Tamm**

Herrn Prof. Dr. TH. POSTERNAK zum 60. Geburtstag gewidmet

(31. VIII. 63)

Bei der Inkubation von Elymoclavin und Agroclavin, Mutterkornalkaloiden des Clavin-Typus, mit Kulturen von *Psilocybe semperviva* beobachteten BRACK *et al.*²⁾ Hydroxylierung am Ergolingerüst. Der Eintritt einer mikrobiellen Reaktion ist nicht verwunderlich, sind doch die zugesetzten Substrate chemisch nahe verwandt mit den eigenen Stoffwechselprodukten, Psilocybin³⁾ und Psilocin³⁾, des Pilzes. Allen erwähnten Verbindungen liegt das Ringsystem des Indols zu Grunde. Schon im Verlaufe der Biosynthese⁴⁾ des Psilocybins tritt Oxygenierung der 4-Stellung des Indolgerüsts ein. Bei den Ergotalkaloiden ist diese Stellung durch die Angliederung der weiteren Ringe bereits substituiert, weshalb sich die Oxydation in der 8-Stellung des Ergolinsystems vollzieht.

Anknüpfend an diese Befunde schien es uns interessant zu prüfen, ob erstens das hydroxylierende Enzymsystem der genannten *Psilocybe*-Arten auch bei Substraten von sehr verschiedener chemischer Struktur, z. B. bei Steroiden, zur Wirkung gelangt, und zweitens, ob dabei der Metabolismus des Pilzes, insbesondere die Synthese von Psilocybin und Psilocin beeinflusst wird⁵⁾.

Wir begannen unsere Versuche mit *Digitoxigenin*, dem einfachsten Vertreter der herzwirksamen Aglykone. Bei der aeroben Inkubation mit wachsenden Kulturen von *Psilocybe mexicana* bei 27° waren nach 9 Tagen in den Dünnschicht- und Papierchromatogrammen mindestens 4 Umwandlungsprodukte dieses Cardenolids nachweisbar. Die Zahl der Produkte erhöhte sich nach weiterer Inkubation. Aus einem 9-tägigen Versuch konnten wir nach mühsamer Trennung und Anreicherung durch Säulenchromatographie die Hauptkomponenten des Reaktionsgemisches in präparativem Maßstab rein isolieren und identifizieren. Als Hauptprodukte fanden wir das bekannte 7 β -Hydroxydigitoxigenin und 3-Dehydrodigitoxigenin und als Nebenprodukt

¹⁾ 10. Mitteilung: CH. TAMM, *Pathologia et Microbiologia* 1963, im Druck.

²⁾ A. BRACK, R. BRUNNER & H. KOBEL, *Helv.* 45, 276 (1962).

³⁾ A. HOFMANN, R. HEIM, A. BRACK & H. KOBEL, *Experientia* 14, 107 (1958); A. HOFMANN, A. FREY, H. OTT, TH. PETRZILKA & F. TROXLER, *ibid.* 14, 397 (1958); A. HOFMANN & F. TROXLER, *ibid.* 15, 101 (1959); A. HOFMANN, R. HEIM, A. BRACK, H. KOBEL, A. FREY, H. OTT, TH. PETRZILKA & F. TROXLER, *Helv.* 42, 1557 (1959).

⁴⁾ A. BRACK, A. HOFMANN, F. KALBERER, H. KOBEL & J. RUTSCHMANN, *Arch. Pharmaz.* 294, 230 (1961).

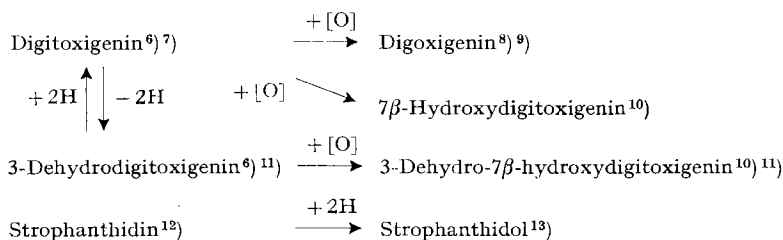
⁵⁾ Herrn Dr. H. KOBEL, SANDOZ AG., Basel, möchten wir auch an dieser Stelle für die Überlassung von Stämmen von *P. semperviva* und *P. mexicana* und für seine Ratschläge zur Züchtung bestens danken.

3-Dehydro-7 β -hydroxydigitoxigenin (Ausbeuten s. Tabelle). Als viertes Produkt konnte mit Hilfe der Dünnschicht- und Papierchromatographie Digoxigenin nachgewiesen werden, das sich nur in sehr kleiner Menge gebildet hatte. Zur Identifizierung der Cardenolide auf den Dünnschichtplatten bewährten sich besonders die Fluoreszenz im UV. und die charakteristischen Farbreaktionen, die durch Besprühen mit konz. H₂SO₄-Äthanol-(1:1) oder 22-proz. SbCl₃-Lösung in Chloroform oder Chloramin-Trichloressigsäure-(1:4) erzielt wurden. – Wesentlich träger verlief die Umsetzung von Digitoxigenin mit *P. semperviva*, indem bis zu 9 Tagen nur Digoxigenin nachweisbar war. Nach dieser Zeit bildeten sich mehrere zusätzliche Produkte, allerdings in nur sehr geringen Mengen.

Die Inkubation von 3-Dehydrodigitoxigenin mit *P. mexicana* ergab bereits nach 5 Tagen zwei Produkte; das eine war 3-Dehydro-7 β -hydroxy-digitoxigenin. Nach längerer Reaktionszeit waren in den Chromatogrammen weitere Flecke erkennbar, die aber nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Mit *P. semperviva* verlief die Umsetzung sehr träge. Es bildeten sich mehrere Produkte. Das zuerst entstandene konnte mit Digitoxigenin identifiziert werden, was bemerkenswert ist, da die mikrobielle Hydrierung der 3-Ketogruppe bei den früher untersuchten Organismen ausschliesslich zur 3-*epi*-Verbindung, also zu einer äquatorialen 3-Hydroxygruppe geführt hatte. Bei längerer Inkubation ergab sich die gleiche Serie von Produkten, wie sie bei der oben beschriebenen Umsetzung von Digitoxigenin beobachtet wurde. Eines von ihnen war Digoxigenin.

Um die Substratspezifität der besprochenen Reaktionen etwas näher abzuklären, wurden noch die hydroxylreicheren Cardenolide *Sarmentogenin*, *Gitoxigenin*, *Strophanthidol* und *Strophanthidin* zu Kulturen beider *Psilocybe*-Arten gegeben. Mit Ausnahme des Strophanthidins, das zu Strophanthidol reduziert und zu einem nicht identifizierten Derivat umgewandelt wurde, wurde keines dieser Substrate verändert.

Die beobachteten Reaktionen lassen sich in folgender Weise zusammenfassen:



⁶⁾ A. WINDAUS & G. STEIN, Ber. deutsch. chem. Ges. 61, 2436 (1928).

⁷⁾ F. HUNZIKER & T. REICHSTEIN, Helv. 28, 1472 (1945).

⁸⁾ S. SMITH, J. chem. Soc. 1930, 508.

⁹⁾ M. STEIGER & T. REICHSTEIN, Helv. 27, 828 (1938).

¹⁰⁾ H. ISHII, Y. NOZAKI, T. OKUMURA & D. SATOH, J. pharmac. Soc. (Jap.) 80, 1150 (1960); G. JUHASZ & CH. TAMM, Helv. 44, 1063 (1961).

¹¹⁾ K. MEYER & T. REICHSTEIN, Helv. 30, 1508 (1947).

¹²⁾ F. FEIST, Ber. deutsch. chem. Ges. 33, 2069 (1900); W. A. JACOBS & A. HOFFMANN, J. biol. Chemistry 67, 609 (1926).

¹³⁾ E. RABALD & J. KRAUS, Z. physiol. Chem. 265, 39 (1940); W. BLOME, A. KATZ & T. REICHSTEIN, Pharmaceut. Acta Helv. 27, 325 (1946).

Cardenolide werden somit durch Kulturen von *P. semperviva* und *P. mexicana* vorwiegend in den 7 β - und 12 β -Stellungen hydroxyliert. Daneben findet Dehydrierung der 3-Hydroxygruppe statt. Es ist anzunehmen, dass sich 3-Dehydro-7 β -hydroxydigitoxigenin *via* 3-Dehydrodigitoxigenin bildet, denn 7 β -Hydroxydigitoxigenin wird nicht mehr dehydriert. Die Dehydrogenase vermag auch eine anguläre C₁₉-Aldehydgruppe zu reduzieren.

Die Frage nach der Beeinflussung der Biosynthese von Psilocybin und Psilocin konnte nicht beantwortet werden, da die im Mycel gebildeten Mengen an sich schon so gering sind, so dass sie sich unter den oben verwendeten Bedingungen dem Nachweis entziehen.

Umwandlung von Digitoxigenin, 3-Dehydrodigitoxigenin und Strophanthidin durch P. semperviva und P. mexicana

Edukt	Organismus	Identifizierte Produkte	Ausbeute an reinen Kristallen oder Art des Nachweises ^{a)}
Digitoxigenin	<i>P. mexicana</i>	7 β -Hydroxydigitoxigenin	8%
		3-Dehydrodigitoxigenin	5%
		3-Dehydro-7 β -hydroxydigitoxigenin	1,5%
		Digoxigenin	< 1%; DC & PC
Digitoxigenin	<i>P. semperviva</i>	Digoxigenin	ca. 1%; DC & PC
3-Dehydrodigitoxigenin	<i>P. mexicana</i>	3-Dehydro-7 β -hydroxydigitoxigenin	DC & PC
3-Dehydrodigitoxigenin	<i>P. semperviva</i>	Digitoxigenin	DC & PC
		Digoxigenin	DC & PC
Strophanthidin	<i>P. semperviva</i>	Strophanthidol	DC & PC

^{a)} DC = Dünnschichtchromatogramm; PC = Papierchromatogramm.

Abschliessend wurde noch das Verhalten von Δ^4 -Androstendion-(3,17), Progesteron und Cortexon gegenüber diesen Organismen geprüft und festgestellt, dass die beiden ersten Verbindungen durch *P. mexicana* langsam angegriffen werden unter Bildung von zahlreichen polaren Produkten, die wir noch nicht identifiziert haben. Cortexon hingegen blieb bei der Inkubation mit *P. semperviva* unverändert. Dieses Pregnanderivat ist offenbar für den Organismus zu toxisch, indem es zunächst sein Wachstum stark hemmt und ihn schliesslich zum Absterben bringt.

Der SANDOZ AG., Basel, danken wir bestens für die finanzielle Unterstützung dieser Untersuchungen und die Gewährung eines Stipendiums an E. W.-B.

Experimenteller Teil

1) *Allgemeines.* – *Psilocybe semperviva* wurde in einem natürlichen Nährmedium²⁾ ⁴⁾ gezüchtet, während *P. mexicana* nur in einer synthetischen Nährlösung kultiviert wurde, weil sich aus dieser die Produkte viel sauberer isolieren liessen. Synthetische Nährlösung: 30 g Glucose; 4,5 g Bernsteinsäure mit NH₄OH bis pH 5,0; 1 g KH₂PO₄; 0,5 g MgSO₄; 0,1 g NaCl; 0,1 g CaCl₂; 0,1 mg Aneurin; 0,05 mg Biotin; 1 mg Cystein; 1 ml Spurenelementlösung (siehe unten); Spur FeSO₄; dest. Wasser ad 1 l. Spurenelementlösung: 2 g MnCl₂·7H₂O; 0,5 g KJ; 0,05 g NiCl₂·6H₂O; 0,05 g

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g $\text{TiSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (löslich in heisser H_2SO_4); 0,1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g $\text{Be}(\text{NO}_3)_2$; 1 ccm H_2SO_4 konz.; ad 1 l dest. Wasser.

Die Kulturen wurden in 100-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 20 ml Nährlösung aerob bei 27° auf der rotierenden Schüttelmaschine (170 Umdrehungen/Min.) inkubiert und das Substrat (Lösung von 4–5 mg in 1 ml Aceton pro 20 ml Nährlösung) zu den 4–7 Tage alten Kulturen zugegeben. Aufarbeitung nach früheren Angaben¹⁴) durch Filtrieren, Nachwaschen des Mycels mit Methanol und Befreien des Filtrats vom Methanol im Vakuum. Die wässrige Lösung wurde mit Chloroform oder Methylenchlorid ausgeschüttelt, die Extrakte mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft.

Das erhaltene Rohprodukt wurde absteigend auf Papier WHATMAN Nr. 1 (stationäre Phase: Formamid (mit Formamid-Aceton-(1:3) imprägniert)¹⁵); mobile Phasen (mit Formamid gesättigt): Chloroform; Benzol-Chloroform-(7:5); Benzol und Chloroform-Tetrahydrofuran-(1:1) chromatographiert. Die Flecke der Cardenolide wurden mit KEDDE-Reagens¹⁶) und die der anderen Steroide mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens¹⁷) sichtbar gemacht. Zur Dünnschichtchromatographie¹⁸) wurde Kieselgel als Adsorbens mit Chloroform-Methanol-(9:1) und -(1:1) als Lösungsmittel verwendet. Die Flecke wurden durch Fluoreszenz im UV. oder durch Besprühen mit konz. H_2SO_4 -Äthanol-(1:1) oder mit 22-proz. SbCl_3 -Lösung in Chloroform oder mit Chloramin-Trichloroessigsäure-(1:4)¹⁹) und kurzem Erwärmen mit typischen Färbungen sichtbar gemacht. Die Adsorptionschromatographien wurden nach der Durchlaufmethode²⁰) an neutralem Al_2O_3 oder an Silicagel (Korngrösse 0,15–0,30 mm), sowie an Kieselgel nach der Modifikation von DUNCAN²¹) ausgeführt. Die Smp. wurden auf dem Kofler-Block bestimmt; Fehlergrenze etwa $\pm 2^\circ$.

2) *Umsetzung von Digitoxigenin mit Psilocybe mexicana*. Eine Lösung von 500 mg Digitoxigenin in 20 ml Aceton wurde gleichmässig verteilt und zu 102 100-ml-ERLENMEYER-Kolben steril zugegeben, die mit 5 Tage alten Kulturen in der synthetischen Nährlösung beschickt waren. Nach 9 Tagen Inkubation wurde aufgearbeitet und das erhaltene Rohprodukt (435 mg) an 10 g Al_2O_3 chromatographiert.

Chromatogramm A: Die Fraktionen 1–5 (eluiert mit Benzol) ergaben 3 mg KEDDE-negatives Material (verworfen).

Die Fraktionen 6–39 (eluiert mit Benzol-Chloroform-(9:1), (8:2), (6:4) und (2:8)) ergaben 180 mg amorphes Material, das nochmals chromatographiert wurde (Chromatogramm B).

Die Fraktionen 40 und 41 (eluiert mit Chloroform) ergaben 14 mg amorphes Material, das ein Gemisch von Digitoxigenin und 7β -Hydroxydigitoxigenin enthielt.

Die Fraktionen 42 und 43 (37 mg, eluiert mit Chloroform-Methanol-(98:2)) gaben aus Aceton-Äther Kristalle vom Smp. 246–253°. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Aceton-Äther resultierten 19 mg reines 7β -Hydroxydigitoxigenin vom Smp. 263–266°. $[\alpha]_D^{24} = +39^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,745$ in Methanol). Misch-Smp. mit authent. Material¹⁰) war gleich, ebenso die Rf-Werte in Papier- und Dünnschichtchromatogramm und die IR.-Spektren.

Die Fraktionen 44–47 (eluiert mit Chloroform-Methanol-(9:1) und -(1:1)) ergaben 12 mg amorphes Material, das nach den Dünnschicht- und Papierchromatogrammen *Digoxigenin* enthält.

Chromatogramm B: 180 mg Material der Fraktionen 6–39 von Chromatogramm A wurden an 170 g Kieselgel nach DUNCAN mit Chloroform-Methanol-(95:5) chromatographiert.

Die Fraktionen 1 und 2 (eluiert mit 185 ml) ergaben 11 mg amorphes Material (verworfen).

¹⁴) CH. TAMM & A. GUBLER, *Helv.* 42, 239 (1959); E. WEISS-BERG & CH. TAMM, *Helv.* 46, 1166 (1963).

¹⁵) O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, *Helv.* 34, 108 (1951); H. HEGEDÜS, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, *Helv.* 36, 357 (1953).

¹⁶) I. E. BUSH & D. A. H. TAYLOR, *Biochem. J.* 52, 643 (1952).

¹⁷) L. R. AXELROD, *J. biol. Chemistry* 205, 173 (1953).

¹⁸) Vgl. E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962; K. RANDERRATH, *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim 1962.

¹⁹) K. B. JENSEN, *Acta pharm. toxicol.* (Kopenhagen) 9, 99 (1953).

²⁰) T. REICHSTEIN & C. W. SHOPPEE, *Discuss. Farad. Soc.* Nr. 7, 305 (1949).

²¹) G. R. DUNCAN, *J. Chromatography* 8, 37 (1962).

Fraktion 3 (eluiert mit 150 ml) ergab 145 mg KEDDE-positives Material, das nochmals chromatographiert wurde (Chromatogramm C).

Fraktion 4 (21 mg, eluiert mit 150 ml) ergab rohes krist. *Digitoxigenin*.

Chromatogramm C: 145 mg Material der Fraktion 3 von Chromatogramm B wurden an 170 g Kieselgel nach DUNCAN mit Chloroform-Methanol-(98:2) chromatographiert.

Fraktion 1 (eluiert mit 170 ml) ergab 1 mg amorphes Material (verworfen).

Fraktion 2 (21 mg, eluiert mit 170 ml) lieferte aus Aceton-Äther 12 mg reines krist. *3-Dehydrodigitoxigenin* vom Smp. 205–207°. Der Misch-Smp. mit authent. Material war gleich, ebenso die Rf-Werte in Papier- und Dünnschichtchromatogramm und die IR.-Spektren.

Fraktion 3 (eluiert mit 170 ml) ergab 44 mg amorphes Material, das nochmals chromatographiert wurde (Chromatogramm D).

Die Fraktionen 4 und 5 (eluiert mit 340 ml) bestanden aus 76 mg rohem krist. *Digitoxigenin*. Nach Dünnschichtchromatogramm einheitlich.

Chromatographie D: 44 mg Material der Fraktion 3 von Chromatogramm C wurden nochmals an 170 g Kieselgel nach Duncan mit Chloroform-Methanol-(98:2) chromatographiert.

Die Fraktionen 1 und 2 (8 mg, eluiert mit 380 ml) lieferten aus Aceton-Petroläther 4 mg reines krist. *3-Dehydro-7 β -hydroxydigitoxigenin* vom Smp. 259–269°. Die Rf-Werte in den Dünnschichtchromatogrammen und das IR.-Spektrum stimmten mit den Resultaten von authent. Material überein.

Die Fraktionen 3–5 (eluiert mit 800 ml) ergaben 18 mg Material, das zum grössten Teil aus *Digitoxigenin* bestand.

3) *Umsetzung weiterer Substrate mit P. mexicana und P. semperviva*. Mit *P. mexicana* wurden inkubiert: Sarmetogenin, Gitoxigenin, 3-Dehydrodigitoxigenin, Strophanthidol, Strophanthidin, Δ^4 -Androstendion-(3,17), Progesteron. Mit *P. semperviva* wurden inkubiert: Digitoxigenin, Sarmetogenin, Gitoxigenin, 3-Dehydrodigitoxigenin, Strophanthidin und Cortexon. Proben wurden in regelmässigen Zeitabständen, wie oben beschrieben, aufgearbeitet und das Rohprodukt im Papier- und Dünnschichtchromatogramm untersucht.

SUMMARY

Digitoxigenin was transformed by growing cultures of *Psilocybe mexicana* HEIM to 7 β -hydroxydigitoxigenin, 3-dehydrodigitoxigenin, 3-dehydro-7 β -hydroxydigitoxigenin and to digoxigenin. Incubation of digitoxigenin with *Psilocybe semperviva* CAILLEUX et HEIM yielded Digoxigenin as main product. 3-Dehydrodigitoxigenin was oxygenated to 3-dehydro-7 β -hydroxydigitoxigenin by *P. mexicana* and hydrogenated to digitoxigenin and hydroxylated to digoxigenin by *P. semperviva*. Strophanthidin was reduced to strophanthidol by *P. semperviva*.

Thus the main reactions catalysed by these organisms were monohydroxylation in 7 β - and 12 β -position and dehydrogenation of 3-hydroxy- and 19-oxo groups.

Institut für Organische Chemie
der Universität Basel
