

DESMOSTEROL ALS BIOGENETISCHE VORSTUFE FÜR CONVALLAMAROGENIN*

RUDOLF TSCHESCHE, HANS W. GUTTEL und GUNTER JOSST

Aus dem Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn

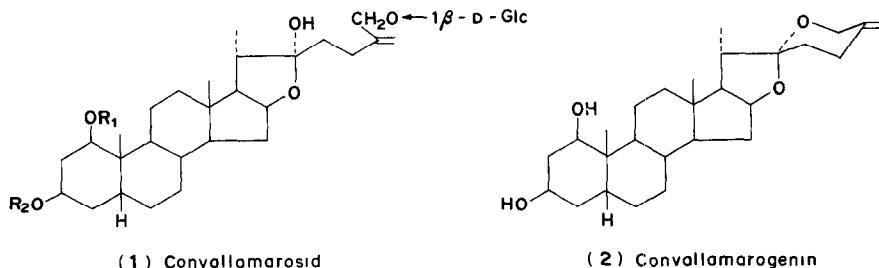
(Eingegangen 28. Mai 1973 Angenommen 20. August 1973)

Key Word Index—*Convallaria majalis*, Liliaceae, saponin biosynthesis, desmosterol, convallamarogenin, cholesterol pathway

Abstract—Labelled 4-¹⁴C-desmosterol, but not cholesterol, is used by plants of *Convallaria majalis* L. for the biosynthesis of convallamarogenin. It can therefore be concluded that precursors of cholesterol biosynthesis can in some cases be converted directly into steroid saponins, the pathway via cholesterol not always being obligatory.

EINLEITUNG

IN DEN WURZELN des Maiglockchens (*Convallaria majalis* L.) findet sich das Glykosid Convallamarosid (1), dessen Struktur 1968 als die eines Furostanolderivates aufgeklärt wurde.^{1,2} Nach Abspaltung der Zuckerreste durch saure Hydrolyse entsteht aus dem wahren Aglykon durch Ringschluß das Spirostanol Convallamarogenin (2), dessen Aufbau schon 1961 bestimmt werden konnte.³ Es enthält im Gegensatz zu den bisher in ihrer Biogenese untersuchten Steroid-saponinen eine $\Delta^{25(27)}$ -Doppelbindung, außerdem stehen die Ringe A und B in *cis*-Stellung, während sie im Tigogenin und Gitogenin *trans*-verknüpft sind. Es schien daher von Interesse zu prüfen, ob für Convallamarogenin ebenfalls Cholesterin als Vorstufe dienen kann. Obwohl Convallamarogenin nur ein Sekundärprodukt der Hydrolyse darstellt, eignet es sich für Biogenesevereuche besser als das Convallamarosid, da es leichter in kleinen Mengen fassbar und das Furostanolaglykon als solches nicht beständig ist.



$R_1 = 1 \text{ Mol } \text{l}-\text{Rhamnose und } 1 \text{ Mol } \text{D}-\text{Chinovose}$
 $R_2 = 1 \text{ Mol } \text{D}-\text{Glucose und } 1 \text{ Mol } \text{l}-\text{Rhamnose}$

* Mitt XIX Zur Biosynthese von Steroidderivaten im Pflanzenreich Mitt XVIII TSCHESCHE, R. und KLEFF, U. (1973) *Phytochemistry* **12**, 2375

¹ TSCHESCHE, R., TJOA, B. T. und NORONHA, R. V. (1968) *Tetrahedron Letters*, 5141

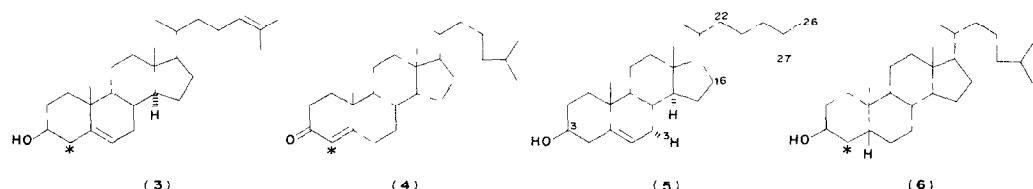
² TSCHESCHE, R., HERMANN, K. H., LANGLAIS, R., TJOA, B. T. und WILFF, G. (1973) *Chem. Ber.* **106**, 3010

³ TSCHESCHE, R., SCHWARZ, H. und SNATZKE, G. (1961) *Chem. Ber.* **94**, 1699

In diesem Zusammenhang sollen die Untersuchungen von Ronchetti und Russo⁴ erwähnt werden, sie konnten zeigen, daß im Convallamarogenin das C der Methylengruppe (C-27 der Seitenkette) aus dem C-2 der Mevalonsäure herruht. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen überein, die Joly und Tamm⁵ an *Digitalis-Ianata*-Pflanzen für Tigogenin finden konnten.

ERGEBNISSE

Die Herkunft der Doppelbindung im Convallamarogenin konnte auf folgende Weise wahrscheinlich gemacht werden. Die folgenden Steroide wurden *Convallaria majalis*-Pflanzen angeboten, und zwar 4-¹⁴C-Desmosterol (3), 4-¹⁴C-Cholesten-4-on-3 (4) und 4-¹⁴C-Koprostanol (5). Von diesen erwies sich allein Desmosterol als biogenetischer Vorausseiter für Convallamarogenin: nach 5 Wochen wurde eine Einbaurate von ca. 0.13% gefunden. Aus (4) konnte allein die Bildung von Cholesterin nachgewiesen werden.



Um den Befund zu stützen, daß Desmosterol in Convallamarogenin umgewandelt wird, wurde ersteres an C-4 mit ¹⁴C markiert zusammen mit 7 α -³H-Cholesterin *Convallaria majalis* angeboten im Verhältnis der Radioaktivitäten von 1:3 und der Ansatz nach 6 Wochen in der üblichen Weise aufgearbeitet. Bei der Kokristallisation mit inaktivem Convallamarogenin verschwand nach mehrfachen Umkristallisierungen die Tritiumaktivität vollkommen. Für Desmosterol selbst wurde in diesem Fall eine Einbaurate von 0.31% ermittelt (Tabelle 1).

TABELLE 1

Precursor spezif. Aktivität Expt (Imp min/mg ferment) $\times 10^8$	Angewandte Aktivität (Imp min $\times 10^8$)	Aufgenommene Aktivität (Imp min $\times 10^8$)	Convallimogenin Gesamtaktivität (Imp min) spezif. Aktivität (Imp min) Einbaurate (%)	Bedingungen des Pflanzenexperiments
1 4- ¹⁴ C Cholesten-4-on-3 22	5.6	5.27	kein Einbau	(a) 12 Monate (b) Jun (c) 35 Tage
2 4- ¹⁴ C Koprostanol 318	2.0	1.78	kein Einbau	(a) 12 Monate (b) Jun (c) 35 Tage
3 4- ¹⁴ C Desmosterol 309	3.8	3.71	4.83×10^8 3700 0.13%	(a) 24 Monate (b) April (c) 42 Tage
4 4- ¹⁴ C Desmosterol (309) 7 α - ³ H Cholestanol 288	10.8	10.1	114.700 7.650 0.31%	(a) 2 Monate (b) Jun (c) 35 Tage
¹⁴ C- ³ H = 1:3		¹⁴ C- ³ H = 1:3	nur ¹⁴ C	

⁴ RONCHETTI, F. und RUSSO, G. (1973) *J. C. S. Chem. Commun.* 184

⁵ JOLY, R. und TAMM, C.H. (1967) *Tetrahedron Letters* 3535

DISKUSSION

Aus diesen Ergebnissen muß geschlossen werden, daß Desmosterol als Vorstufe von Convallamarogenin dienen kann, nicht aber Cholesterol. Vermutlich wird bei der Biogenese die Δ^{24} -Doppelbindung nach Δ^{25} ⁽²⁷⁾ verschoben, fehlt sie, ist eine Bildung von Convallamarogenin nicht mehr möglich. Interessant ist ferner, daß Convallamarogenin im allgemeinen ca. 20% Dihydroverbinding enthält, die mit den üblichen Methoden kaum abzutrennen ist. Es darf angenommen werden, daß die Hydrierung zur Dihydrostufe erst am schon gebildeten Convallamarogenin erfolgt.

EXPERIMENTELLES

Die vom The Radiochemical Centre Amersham-Buchler bezogenen radioaktiven Ausgangssubstanzen wurden in vier Markierungsexperimenten unter den in Tabelle 1 angegebenen Bedingungen an jeweils 10 *Convallaria majalis*-Pflanzen untersucht. Die Aktivitätsmessungen erfolgten bei den Experimenten 1-3 mit dem fensterlosen Methandurchflußzähler FI 407 mit Handprobenwechsler BI 503 der Fa. Frieske Hoepfner und in Experiment 4 zur Bestimmung des $^{14}\text{C}/^{3}\text{H}$ -Verhältnisses (Doppelmärkierung) zusätzlich mit dem Liquid Szintillation Analyzer von Philips. Bei der Applikation fand die Methode von Bennett und Heftmann⁶ Verwendung durch Auftragen der Precursor in aethanolischer Lösung auf die mit 2% Tween 20-Emulgator vorbehandelten Blattoberflächen. Zur Beendigung des Versuchs wurde die nicht aufgenommenen Aktivitäten mit Essigester abgewaschen. Wurzeln und Blätter gemeinsam zerkleinert und dreimal mit je 500 ml MeOH extrahiert. Die durch Einengen erhaltenen Rückstände nahm man in 50 ml Wasser auf und extrahierte fünfmal mit je 100 ml Cyclohexan. In der Cyclohexanphase fand sich im Experiment 1 radioaktives Cholesterin, das nach fünfmaliger Kokristallisation eine konstante spezifische Aktivität von 2150 Imp./min. mg besaß, entsprechend einer Einbaurate von 0.83%. Zur Gewinnung des Convallamarogenins wurde die wässrige Phase eingeengt und einer mehrstündigen Hydrolyse mit 3 N aethanolisch-wässriger H_2SO_4 in der Siedehitze unterworfen. Das nach den üblichen Isolierungsmethoden gewonnene Aglykon wurde mit inaktivem Material vermischt und zur Herstellung einer einheitlichen Substanz in der von Tschesche und Mitarb.¹ beschriebenen Weise hydriert und aquilibriert. Nach fünfmaligem Umlösen aus MeOH nahmen bei den Experimenten 3 und 4 die spezifischen Aktivitäten konstante Werte an, in den Experimenten 1 und 2 wurde kein Einbau beobachtet.

Anerkennungen—Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Ebenso gebührt unser Dank Herrn Prof. Steiner, Direktor des Pharmakognostischen Instituts der Universität Bonn, für die freundliche Erlaubnis zur Benutzung seines Gewächshauses.

⁶ BENNETT R D und HEFTMANN E (1965) *Phytochemistry* 4, 577