

ZUR BIOGENESE VON STROPHANTHIDIN-GLYKOSIDEN: CONVALLATOXOL ALS VORSTUFE VON CONVALLATOXIN IN *CONVALLARIA MAJALIS*

WOLFGANG KUBELKA, BRIGITTE KOPP und KURT JENTZSCH

Pharmakognostisches Institut der Universität Wien, A-1090 Wien, Österreich

und

HELMUT RUIS

Institut für Allgemeine Biochemie der Universität Wien und
Ludwig Boltzmann-Forschungsstelle für Biochemie, A-1090 Wien, Österreich

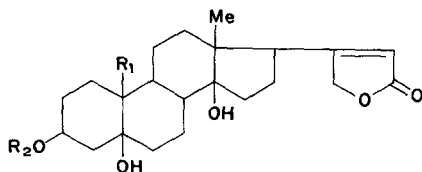
(Eingegangen 3. Februar 1974)

Key Word Index—*Convallaria majalis*; Liliaceae; lily of the valley; cardenolide biogenesis; strophanthidin rhamnoside; convallatoxol.

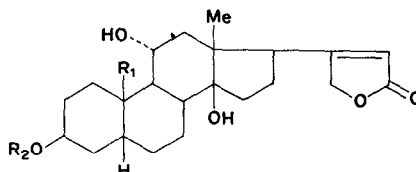
Abstract—Labelled convallatoxin was isolated from leaves of *Convallaria majalis* after administration of convallatoxol-19-³H and convallatoxol-U-¹⁴C, resp. Oxidation of $-\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow -\text{CHO}$ at the glycoside level therefore is a possible step in the biogenesis of strophanthidin glycosides.

EINFÜHRUNG

TSCHESCHE und Mitarb.¹ vermuteten bereits 1954, daß in *Convallaria majalis* außer Glykosiden des Strophanthidins (1) und Strophanthidols (2) auch Verbindungen ohne Sauerstofffunktion an C-19 vorkommen könnten. Die Verbindungen mit einer Aldehydgruppe an C-10—z.B. Convallatoxin (5)—sollten nach der damaligen Annahme in der Pflanze zuerst entstehen und dann stufenweise reduziert werden.



- (1) $\text{R}_1 = \text{CHO}$ $\text{R}_2 = \text{H}$: Strophanthidin
 (2) $\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ $\text{R}_2 = \text{H}$: Strophanthidol
 (3) $\text{R}_1 = \text{Me}$ $\text{R}_2 = \text{H}$: Periplogenin
 (5) $\text{R}_1 = \text{CHO}$ $\text{R}_2 = \text{Rhamnose}$: Convallatoxin
 (6) $\text{R}_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ $\text{R}_2 = \text{Rhamnose}$: Convallatoxol



- (4) $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ $\text{R}_2 = \text{H}$: Sarmetogenin

Mit der Isolierung von Glykosiden des Periplogenins (3)—Periplorhamnosid,² Perigulosid³—und des Sarmetogenins (4)—Rhodexin A, Rhodexosid⁴—aus *C. majalis* konnte

¹ TSCHESCHE, R. und SEEHOFER, F. (1954) *Chem. Ber.* **87**, 1108.

² KUBELKA, W. (1967) *Mh. Chem.* **98**, 1262.

³ KUBELKA, W. (1971) *Planta Medica* **19**, 153.

⁴ KUBELKA, W. und EICHHORN-KAISER, S. (1970) *Pharm. Acta Helv.* **45**, 513.

das Vorkommen von Verbindungen mit einer Me-Gruppe in Position 10 bewiesen werden. Auch für die angenommene Biosynthesefolge ($-\text{CHO} \rightarrow -\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow \text{Me}$) sprachen zunächst einige Untersuchungen, bei denen beispielsweise die Reduktion von Strophanthidin zu Strophanthidol durch einen Pilz (*Psilocybe semperviva*⁵), weiters von Convallatoxin (5) zu Convallatoxol (6) durch Rattenleberschnitte und -homogenate⁶ sowie Rattendünndarmsegmente⁷ nachgewiesen wurde.

Demgegenüber fand man allerdings später, daß Progesteron-4-¹⁴C von *Strophanthus kombé* in Periplogenin, Strophanthidol und Strophanthidin eingebaut wird.^{8,9} wobei die Einbauraten auf eine schrittweise Oxidation schließen lassen. Als möglicher Vorläufer eines Bufadienolid-Glykosides (Hellebrin:-Hellebrigenin-rhamnosid) wurde Pregnenolonglucosid nachgewiesen:¹⁰ auch hier muß Oxidation am C-19 erfolgen. Aus beiden Untersuchungen läßt sich aber nicht erkennen, auf welcher Stufe (21-C,23-C bzw. Glykosidstufe?) die Oxidation stattfindet.

Auch eine quantitative Bestimmung einzelner Glykoside, durchgeführt an *Convallaria*-Pflanzen verschiedenen Entwicklungsstadiums, von der man sich Aufschlüsse über die Umwandlung einzelner Verbindungen ineinander erhoffte, ließ keine Aussage über den Biogeneseweg zu.¹¹

Da Cardenolid-Aglykone in freier Form in *C. majalis* offenbar nur in sehr geringen Mengen vorkommen,¹² sollte im Rahmen unserer Arbeiten zunächst geprüft werden, welche Umsetzungen auf der Monoglykosidstufe ablaufen können. Nach Vorgabe von Convallatoxol—als Verbindung des mittleren Oxidationsgrades—war entweder Convallatoxin oder aber die reduzierte Form (Periplorhamnosid) als Folgeprodukt zu erwarten.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Für die Versuche wurden Convallatoxol-19-³H, das wir aus Convallatoxin durch Reduktion mit NaBT₄ hergestellt hatten, und Convallatoxol-u-¹⁴C (gewonnen aus *Convallaria* durch Photoassimilation mit ¹⁴CO₂) eingesetzt.

Die Applikation erfolgte Anfang Mai, also zu einem Zeitpunkt, wo nach Wichtl *et al.*¹¹ in den noch jungen *Convallaria*-Blättern Glykoside neu gebildet werden. Der Cardenolid-Glykosidgehalt der verwendeten Blätter betrug ca 0,2% (bezogen auf Trockengewicht), davon je etwa 20–30% Convallatoxin und Convallatoxol.

Acht Tage nach Verabreichung der Convallatoxol-Lösung wurden die Blätter aufgearbeitet und die erhaltene Menge markierten Convallatoxins durch Auszählen von Papierchromatogrammen ermittelt: beim Versuch mit Convallatoxol-19-³H fanden wir einen Einbau von 6,4%, beim analogen Versuch mit Convallatoxol-u-¹⁴C von 3,7% des verabreichten Convallatoxols.

Die Identität des isolierten Convallatoxins wurde durch Papierchromatographie des Glykosides sowie des nach enzymatischer Spaltung* erhaltenen Strophanthidins in meh-

* Ausgeführt mit Hilfe eines Fermentpräparates aus einem geeigneten Stamm von *Aspergillus niger* (Einzelheiten werden später publiziert).

⁵ WEISS-BERG, E. und TAMM, CH. (1963) *Helv. Chim. Acta* **46**, 2435.

⁶ LAUTERBACH, F. (1964) *Arch. Exp. Path. u. Pharmac.* **247**, 71.

⁷ ZATHURECKY, L., KRUPA, V. und ROCHOVA, M. (1966) *Pharmazie* **21**, 322.

⁸ SAUER, H. H., BENNETT, R. D. und HEFTMANN, E. (1968) *Phytochemistry* **7**, 1543.

⁹ SAUER, H. H., BENNETT, R. D. und HEFTMANN, E. (1969) *Phytochemistry* **8**, 69.

¹⁰ TSCHESCHE, R. und BRASSAT, B. (1965) *Z. Naturforsch.* **20b**, 707.

¹¹ WICHTL, M., JENTZSCH, K. und AIGNER, W. (1968) *Sci. Pharm.* **36**, 94.

¹² KOPP, B. und KUBELKA, W., unveröffentlichte Ergebnisse.

reren Systemen sichergestellt. Weiters kristallisierten wir einen Teil des markierten Convallatoxins nach Vermischen mit inaktivem Glykosid mehrmals aus Methanol-Wasser um. Durch vorhergehende Reinigung (mehrfache Papierchromatographie) zeigte das Präparat bereits von der ersten Kristallisation an praktisch gleichbleibende Aktivität (21,650, 21,400, 21,700, 21,400, 22,000 dpm/mg).

Für die Existenz der Folge Convallatoxol \rightarrow Strophanthidol \rightarrow Strophanthidin \rightarrow Convallatoxin, also Spaltung des Glykosids, Oxidation des Aglykons und nachfolgende Glykosidierung, fanden wir bei unseren Versuchen keine Anhaltspunkte: die Zone der Genine auf den Papierchromatogrammen war frei von Aktivität, ebensowenig war markiertes Desglucocheirototoxin (= Strophanthidin-gulomethylosid) vorhanden, dessen Bildung aus Strophanthidin—analog der Bildung von Convallatoxin in diesem Fall zu erwarten gewesen wäre. Periplorhamnosid war radiochromatographisch ebenfalls nicht nachzuweisen, eine Reduktion der $-\text{CH}_2\text{OH}$ -Gruppe hatte demnach in meßbarem Ausmaß nicht stattgefunden.

Um Aufschluß darüber zu erhalten, ob nur bestimmte Pflanzenorgane zur Ausführung der Oxidation Convallatoxol \rightarrow Convallatoxin befähigt sind, wurde Convallatoxol- $19\text{-}^3\text{H}$ auch an Stückchen von Wurzel, Rhizom, Blattstiel und Blattspreite von *Convallaria* vorgegeben; nach zweitägigem Stoffwechsel war in allen Fällen radioaktives Convallatoxin nachzuweisen.

Unsere Versuche zeigen, daß in *C. majalis* Convallatoxin aus Convallatoxol gebildet werden kann, daß also eine Umwandlung $-\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow \text{CHO}$ auf der Monoglykosidstufe möglich ist. Da Glykoside mit Carboxylgruppe oder höher hydroxylierte Monoglykoside mit Aldehydgruppe in *Convallaria* bisher nicht aufgefunden wurden, scheint die einzige Fortsetzung des Biosyntheseweges in der Glukosidierung des gebildeten Convallatoxins zu Convallosid zu liegen.

Die Reduktion der Aldehydgruppe an C-10 der Cardenolide ist aber im pflanzlichen und tierischen Organismus immerhin möglich (siehe oben); es bleibt also doch die Frage offen, ob nicht unter gewissen Bedingungen—etwa in einer bestimmten Entwicklungsphase—auch bei *Convallaria* eine Reaktion in dieser Richtung stattfinden kann.

EXPERIMENTELLES

Für die PC wurde Papier Schleicher & Schüll 2043 bMgl verwendet; Systeme: (a) $\text{PeOH}-\text{C}_6\text{H}_6-\text{H}_2\text{O}$ (1:1:2), Oberphase, 60%, stationäre Phase. (b) Toluol-*n*-BuOH (2:1); (c) Toluol-*n*-BuOH (4:1); (d) Toluol-*n*-BuOH (9:1), wassergesättigt, 35% stationäre Phase. (e) CHCl_3 -Tetrahydrofuran- HCONH_2 (50:50:6,5).¹³ Dünnschichtchromatographie(DC): Kieselgel G Merck; Systeme: (f) CHCl_3 -MeOH (4:1); (g) MeCOEt -Toluol- H_2O -MeOH-HOAc (40:5:3:2,5:1).¹⁴

Die Auszählung der radioaktiven Zonen erfolgte mit Hilfe eines 4π -Papierchromatogramm-Scanners der Fa. Tracerlab. Die kristallinen Proben wurden in Aquasol (New England Nuclear) im Szintillationszähler ausgezählt.

Convallatoxol- $19\text{-}^3\text{H}$: 3 mg Convallatoxin (Fp 234–238°), gelöst in 0,5 ml 75 proz. Dioxan, wurden in eine Lösung von 25 mCi NaBT₄ (Radiochemical Centre, Amersham, 870 mCi/mMol) in 1,8 ml 75proz. Dioxan eingebracht. Nach fünfständigem Stehen bei 20° stellten wir mit 1 N H_2SO_4 auf pH 3 und entfernten das Dioxan i.V. unter Zugabe von 2 \times 2 ml H_2O . Die wäßrige Lösung wurde 3 \times mit 15 ml CHCl_3 -EtOH (9:1) ausgeschüttelt und der Rückstand der organischen Phase durch PC gereinigt (System a). Auszählung mittels PC-Scanner ergab $2,59 \times 10^8$ dpm, entsprechend 58 μCi /mg Convallatoxol.

Verabreichung von Convallatoxol- $19\text{-}^3\text{H}$: Ein Teil des radiochromatographisch einheitlichen Convallatoxols ($4,74 \times 10^7$ dpm) wurde in 0,4 ml H_2O gelöst. Die Lösung ließen wir von zwei am Blattstiel abgeschnittenen Blättern von *C. majalis* (Länge ca 10 cm) einsaugen; nach 2 Stunden war die Lösung vollständig aufgenommen. Unter wiederholter Wasserzugabe blieben die Blätter 8 Tage im Laboratorium (Tageslicht) stehen.

Isolierung und Identifizierung des Convallatoxins. Die grob zerschnittenen Blätter wurden 2 \times mit je 30 g EtOH heiß extrahiert, der Rückstand der Alkohollösung in 20 ml H_2O gelöst und zur Entfernung von Ballaststoffen

¹³ KAISER, F. (1955) *Chem. Ber.* **88**, 556.

¹⁴ GÖRLICH, B. (1965) *Arzneimittel-Forsch.* **15**, 493.

2 × mit 5 ml C₆H₆ ausgeschüttelt. Mit 3 × 30 ml CHCl₃-EtOH (9:1) und 3 × 30 ml CHCl₃-EtOH (2:1) extrahierten wir die Glykoside. Der Rückstand der organischen Phase wurde—gelöst in CHCl₃-MeOH (1:1)—zur PC verwendet (System a). Nach Lokalisieren der Convallatoxinzone (SbCl₃ bzw. Kedde-Reagens) wurde mit dem PC-Scanner ausgewertet; insgesamt erhielten wir $3,03 \times 10^6$ dpm, das entspricht 6,4% der eingesetzten Convallatoxol-Menge. Zur eindeutigen Identifizierung wurde die Convallatoxin-Zone mit MeOH eluiert und der Rückstand im System b und nach erneuter Elution im System c rechromatographiert. Ein Teil des erhaltenen Präparates wurde mit inaktivem Convallatoxin vermischt und wiederholt aus MeOH-H₂O umkristallisiert. Die PC des nach fermentativer Spaltung resultierenden Strophanthidins erfolgte im System d.

Convallatoxol-u-¹⁴C. Zwei Blätter von *C. majalis* ließen wir in einer Photosynthesekammer eine Woche lang in ¹⁴CO₂-Atmosphäre (2 mCi ¹⁴CO₂) assimilieren. Nach Zusatz von inaktiven Glykosiden und analoger Aufarbeitung wie oben sowie mehrfacher PC (Systeme a,c) und DC (Systeme f,g) wurden 1,8 mg Convallatoxol-u-¹⁴C (entsprechend $4,6 \times 10^4$ dpm) erhalten.

Verabreichung von Convallatoxol-u-¹⁴C und Aufarbeitung sowie Identifizierung wie bei Convallatoxol-19-³H beschrieben.