

ZUR HERKUNFT DER $\Delta^{25(27)}$ -DOPPELBINDUNG IN CONVALLAMAROGENIN*

RUDOLF TSCHESCHE, GERHARD PIESTERT und HANS W. GÜTTEL

Aus dem Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, Germany

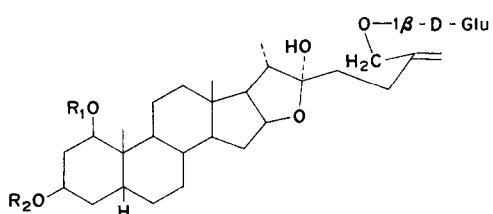
(Received 6 May 1974)

Key Word Index—*Convallaria majalis*; Liliaceae; saponin biosynthesis; 25-hydroxycholesterol; $\Delta^{5,25(27)}$ -cholestadien-3 β -ol; convallamarogenin.

Abstract— 7α -[3 H]-25-Hydroxycholesterol and 7α -[3 H]- $\Delta^{5,25(27)}$ -cholestadien-3 β -ol were administered to *Convallaria majalis* L. plants and the biosynthesized labeled convallamarogenin were isolated in both cases. The results are discussed in relation to the isomerization of the $\Delta^{24(25)}$ -double bond of desmosterol to the $\Delta^{24(27)}$ -double bond in convallamarogenin.

EINFÜHRUNG

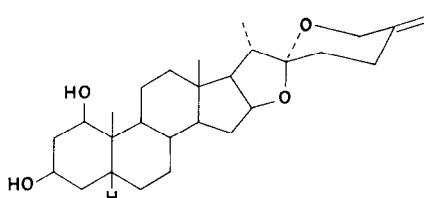
Convallaria majalis L. enthält als Hauptsapponin Convallamarosid (1). Dieses trisdesmosidische



(1) Convallamarosid

$R_1 = 1$ Mol L-Rhamnose u. 1 Mol D-Chinovose
 $R_2 = 1$ Mol D-Glucose u. 1 Mol L-Rhamnose

Furostanolglycosid [1, 2] geht bei der sauren Abspaltung der Zuckerketten in das Spirostanol Convallamarogenin [3] (2) über. Als besonderes



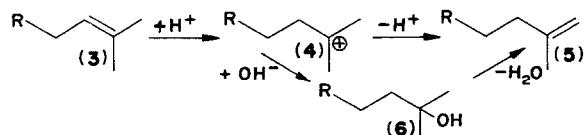
(2) Convallamarogenin

Strukturmerkmal enthält das Aglykon eine $\Delta^{25(27)}$ -Doppelbindung. Tschesche u. Coll [4] konnten zeigen, daß Desmosterol als biogenetische Vorstufe des Convallamarogenins dienen kann.

Cholesterin dagegen wird durch die Pflanze nicht in dieses Genin übergeführt. Die $\Delta^{25(27)}$ -Doppelbindung des Convallamarogenins könnte somit ihren Ursprung in der $\Delta^{24(25)}$ -Doppelbindung des Desmosterols haben. Weiterhin bewiesen Ronchetti und Russo [5], daß die 27-Methylengruppe im Convallamarogenin stets vom C-2 der Mevalonsäure herrührt. Die endständigen C-26- und C-27-Methylgruppen im Desmosterol besitzen daher, wie im Cholesterin, keine biologische Gleichwertigkeit.

RESULTAT UND DISKUSSION

Um Hinweise über eine Verschiebung der im Desmosterol vorliegenden $\Delta^{24(25)}$ -Doppelbindung nach $\Delta^{25(27)}$ im Verlauf der Biogenese des Convallamarogenins zu erhalten, wurden 7α -[3 H]-25-Hydroxycholesterol und 7α -[3 H]- $\Delta^{5,25(27)}$ -Cholestadien-3 β -ol an *Convallaria majalis* L. appliziert und die Pflanzen nach 4 Wochen aufgearbeitet. In beiden Experimenten konnte radioaktives Convallamarogenin isoliert werden, die Verbindungen wurden biogenetisch verwendet (Tabelle 1).



Schema 1. Isomerisierung der Δ^{24} -Doppelbindung (3) nach Δ^{25} (5) (Schema 1).

Die Isomerisierung der Δ^{24} -Doppelbindung (3) nach Δ^{25} (5) (Schema 1) könnte durch Addition

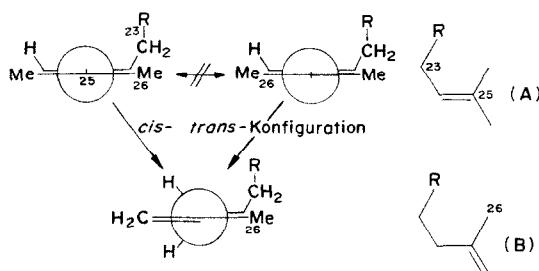
* Mitt. XX: "Zur Biosynthese von Steroidderivaten im Pflanzenreich". Mitt. XIX: Tschesche, R., Gütterl, H. W. und Josst, G. (1974) *Phytochemistry* 13, 137.

Tabelle 1

Applizierte	Appliz. resorb. Aktivität (Imp/min $\times 10^{-9}$)	spez. Aktivität des isolierten Convallamarogenins (Imp/min \cdot mg $\times 10^{-5}$)	Einbaurate in %
7 α -[3 H]-25-Hydroxycholesterol	1.45	1.06	(0.14)
7 α -[3 H]- $\Delta^{25(27)}$ -Cholestadien- 3 β -ol	1.26	0.93	0.43

eines Protons an C-24 unter Ausbildung eines Carbenium-Ions an C-25 (**4**) eingeleitet werden. Die Rückbildung der Doppelbindung an C-25 (**5**) vollzieht sich dann durch Abspaltung eines Protons an C-27 oder über die Absättigung des Carbenium-Ions durch OH^- unter Bildung von 25-Hydroxycholesterol (**6**) und anschließender Eliminierung von H_2O .

Ob hierbei die 25-Hydroxystufe als Zwischenverbindung durchlaufen wird, ließ sich durch Applikation dieser Verbindung selbst nicht eindeutig klären, da bei der Aufbereitung des Pflanzenextraktes in der Cyclohexanphase neben nichtmetabolisierter Testsubstanz auch die dehydratierte Form des applizierten tertiären Alkohols nachgewiesen werden konnte. Da Cholesterin als biogenetische Vorstufe jedoch nicht in Frage kommt, scheint eine C-25-Hydroxylase in *Convalaria majalis* nicht vorzukommen. Die Verschiebung der Doppelbindung dürfte daher der wahrscheinlichere Weg sein.



Schema 2. Newman-Projektion des Seitenkettenendes von Desmosterol (A) und $\Delta^{25(27)}$ -Cholestadien-3 β -ol (B)

Das OH-tragende C-26 in Convallamarogenin stammt vom C-3 der Mevalonsäure, die Isomerisierung der $\Delta^{24(25)}$ -Doppelbindung im Desmosterol nach $\Delta^{25(27)}$ im Convallamarogenin muß daher stereospezifisch verlaufen (Schema 2). Es ist nicht bekannt, welches der beiden endständigen Methylgruppen im Desmosterol, die *cis*-oder die

trans-ständige, vom C-3 der Mevalonsäure herrührt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die IR-Spektren wurden in CHCl_3 und die NMR-Spektren in CDCl_3 mit TMS als Standard gemessen. Die Aktivitätsmessung erfolgte mit dem fensterlosen Methandurchflußzähler FH 407 und dem Handprobenwechsler BL 503 von Frieseka und Hoepflner, die Aufnahme der Radiogramme mit dem Scanner LB 2720 in Kombination mit dem Methandurchflußzähler FH 524 von Berthold. Zur präparativen DC wurde Kieselgel PF₂₅₄ (Merck) verwendet mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Aceton}$ und $\text{AcOEt}/\text{Petrol}$ (Sdp. 50–70°) in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen.

25-Hydroxycholesterol, 0.2 g (0.37 mmol) 27-Nor-25-ketohydroxyacetat wurden mit 2.52 g (15.2 mmol) CH_3MgI in Et_2O unter N_2 4 h zum Sieden erhitzt, danach der Et_2O gegen wasserfreies Dioxan ausgetauscht und der Ansatz weitere 2 h erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit $\text{H}_2\text{O}_2(0^\circ)$, dann mit einer gesättigten NH_4Cl -Lösung versetzt, die Mischung 4 × Et_2O ausgeschüttelt, die vereinigten Ätherphasen getrocknet (Na_2SO_4) und der Äther abdestilliert. Die Umkristallisation des Rohproduktes aus MeOH ergab 0.162 g (85%) feine Nadeln. Schmp. 179–180. $[\text{Z}]_{\text{D}}^{25} = -38.6$. IR: keine Ketobande. NMR: 18-Me 0.65; 21-Me 1.02; 19-Me 1.05; 26- und 27-Me 1.38; 25-OH 2.5; 3-OH 2.65; 6-H 5.4 ppm. $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_2$ ber. 402.6 gef. *m/e* 402.

$\Delta^{5,25(27)}\text{-Cholestadien-3}\beta\text{-ol}$. 0.2 g (0.378 mmol) 27-Nor-25-ketcholesterylacetat, gelöst in Et_2O , wurden in eine vorbereitete Triphenylphosphinmethylenlösung (0.275 g = 1 mmol) unter N_2 bei Zimmertemperatur getropft und 1 h zum Sieden erhitzt. Anschließend tauschte man den Et_2O gegen Dioxan aus und erhitzte weitere 5 h. Zur Vervollständigung der Desacylierung wurde die Reaktionslösung mit 50 ml $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:2) und 10 ml einer 5%igen KOH versetzt und 1 h gekocht. Das Reaktionsprodukt wurde mit Et_2O extrahiert und schließlich das Rohprodukt aus MeOH umkristallisiert. Ausbeute 0.139 g (76%). Schmp. 130–131 C. $[\alpha]_D^{25} = -39.5$. IR: keine Ketobande; $\text{CH}_2=\text{CR}_2$ 885/cm. NMR: 18-Me 0.68; 21-Me 0.98; 19-Me 1.01; 26-Me, 1,7; 3-OH 2.31; 27- CH_2 4.68; 6-H 5.4 ppm. $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$ ber. 384.6 gel. m/e 384.

7α -[3 H]-25-Hydroxycholesterol und 7α -[3 H]- $\Delta^{5,25(27)}$ -Cholestanadien- β -ol. Ausgangsprodukt für beide Verbindungen bildete 27-Nor-25-ketocholesterylacetat. Dieses setzte man mit einer äquivalenten Menge *N*-Bromsuccinimid in Tetrachlorkohlenstoff in Gegenwart von Azo-bis-isobutyronitril bis zur beginnenden Gelbfärbung zum 7α -Brom-Derivat um. Das dabei ausgefallene Succinimid wurde abfiltriert und die beim Abkühlen auskristallisierende 7α -Brom-Verbindung abgetrennt, sie wurde mit einer geringen Menge Petrol gewaschen und sorgfältig getrocknet (NMR: 6-H 5.88; 7β -H 4.7). Den katalytischen Br-[3 H]-Austausch führte die Firma Amersham Buehler, Braunschweig durch. Das so markierte 27-Nor-25-ketocholesterylacetat wurde, wie bereits bei der Herstellung der Ver-

gleichssubstanzen beschrieben, zu den gewünschten Verbindungen umgesetzt und diese auf chromatographischem Wege isoliert und gereinigt.

Pflanzenversuche. Für jeden Versuch wurden je 2 Blätter von 5 Pflanzen (*Convallaria majalis*) mit Hilfe einer 2%igen wäßrigen Tween 20-Lösung von ihrer Wachsschicht befreit, dann wurde die äthanolische Lösung der markierten Verbindung aufgebracht und nach dem Verdunsten des EtOH mit einer Lösung Siliconöl/Petrol besprüht. Nach 4 Wochen wurde der nichtresorbierte Aktivitätsanteil von den kontaminierten Blättern mit Essigester abgespült, anschließend zerkleinerte man die Pflanze einschließlich der Wurzeln sorgfältig und extrahierte mit MeOH. Diesen Extrakt engte man ein, nahm den Rückstand mit H₂O auf und schüttelte die Lösung mit Cyclohexan aus. Die braunrot gefärbte wäßrige Phase enthielt das gewünschte Convallamarosid, das mit 3 N äthanolisch-wäßriger H₂SO₄ in der Siedehitze zum Convallamarogenin hydrolysiert wurde. Das Aglykon isolierte man durch mehrmägige präparative DC und cokristallisierte mit authentischer Vergleichssubstanz bis zur konstanten spezifischen Aktivität.

Anmerkungen—Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und Herrn Professor Dr. M. Steiner, Institut für Pharmakognosie der Universität Bonn, für die Benutzung des Gewächshauses.

LITTERATUR

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 Wulff, G. (1973) *Chem. Ber.* **106**, 3010.
3. Tschesche, R., Schwarz, H. und Snatzke, G. (1961) *Chem. Ber.* **94**, 1699.
4. Tschesche, R., Gütter, H. W. und Josst, G. (1974) *Phytochemistry* **13**, 137.
5. Ronchetti, F. und Russo, G. (1973) *Chem. Commun.* 184.