

## ZUR BIOGENESE DES TIGOGENINS IN *DIGITALIS LANATA* UND DES SOLASODINS IN *SOLANUM LACINIATUM*\*†

RUDOLF TSCHESCHE und GERHARD PIESTERT

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

(Eingegangen 6 Mai 1974)

**Key Word Index**—*Digitalis lanata* Ehrh.; Scrophulariaceae; spirostanol biogenesis; 20 $\alpha$ -hydroxycholesterol; tigenin; *Solanum laciniatum*; Solanaceae; spirosolan-alkaloid biogenesis; 20 $\alpha$ -hydroxycholesterol; 26-amino-dihydrososin; solasodine.

**Abstract**—7 $\alpha$ -[<sup>3</sup>H]-20-hydroxycholesterol was converted by *Digitalis lanata* plants into tigenin. 7 $\alpha$ -[<sup>3</sup>H]-20-hydroxycholesterol and 7 $\alpha$ -[<sup>3</sup>H]-26-amino-dihydrososin were utilized for the biogenesis of solasodine by plants of *Solanum laciniatum*. These results are discussed in relation to spirostanol and spirosolan alkaloid biogenesis.

### EINFÜHRUNG

Während bei der biogenetischen Bildung des Spiroketal systems der Spirostanole die direkte stereospezifische Hydroxylierung des Cholesterols in den Positionen 16 $\beta$ - und 26 bzw. 27 [1–4] als gesichert gelten darf, stand bisher aus, in welcher Weise die 22-Ketogruppe eingeführt wird. Es ist bekannt, daß sich der Abbau der Seitenkette des Cholesterols [5,6] zum Pregnenolon über seine 20 $\alpha$ -Hydroxyverbindung vollzieht, es schien daher denkbar, daß dieses Derivat auch Zwischenstufe auf dem Wege zu den Spirostanolen sein könnte. Die 22-Ketogruppe in ihrer ketalisierten Form würde dann aus dem 20 $\alpha$ -Hydroxycholesterol in mehreren Stufen gebildet werden. Wir haben daher 20 $\alpha$ -Hydroxycholesterol markiert und *Digitalis lanata* angeboten, um einen eventuellen Einbau zu prüfen. Ferner haben wir auch markiertes 26-Amino-dihydrososin hergestellt, um auch dessen Verwertung bei der Biogenese der Spirosolan-alkaloide zu untersuchen.

### ERGEBNIS UND DISKUSSION

#### Biogenese des Spirostanols

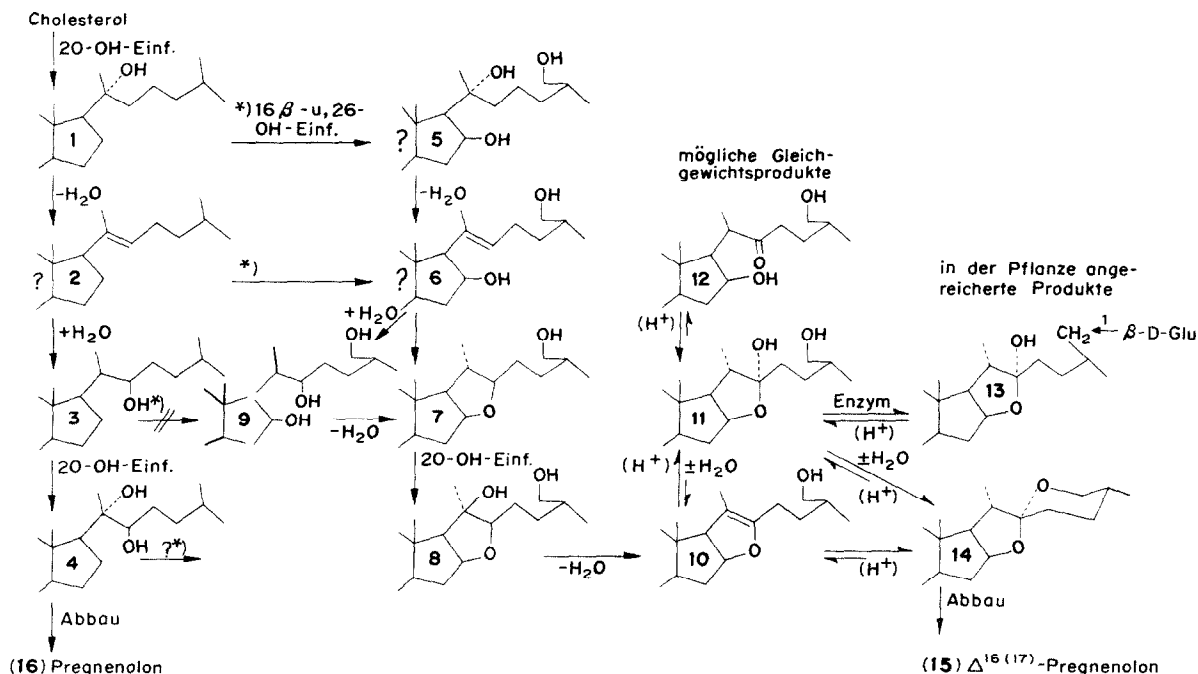
7 $\alpha$ -[<sup>3</sup>H]-20 $\alpha$ -Hydroxycholesterol entsprechend einer Menge von  $2,71 \cdot 10^8$  Imp/min wurden an *Digitalis lanata* appliziert und von der Pflanze in einem Zeitraum von 36 Tagen zu 80% resorbiert. Die Verwertung zu Tigenin erfolgte mit einer Einbaurate von 0,178% (spez. Aktivität:  $1,12 \cdot 10^4$  Imp/min · mg).

Das neben Tigenin isolierte Gitogenin enthielt keine Aktivität, 7 $\alpha$ -[<sup>3</sup>H]-20 $\alpha$ -Hydroxycholesterol wird also allein zur Biogenese des Tigenins verwertet.

Aufgrund dieses Ergebnisses könnte erst ein E-, dann F-Ringschlußmechanismus in Betracht gezogen werden, bei dem zunächst über die Hydroxylierung an C-20 und Dehydratisierung zum  $\Delta^{20(22)}$ -Derivat (6) der E-Ringschluß zum Furostanol (7) erfolgt (Schema 1). Ein solches Furostanol-3 $\beta$ -26-diol [7] stellt einen experimentell gesicherten Precursor bei der Bildung von Tigenin in *Digitalis*-Pflanzen dar. Durch erneute Hydroxylierung von C-20 (8) und Dehydratisierung bildet sich das Furostenolderivat (10). In saurem Medium stehen dieser cyclische Enoläther und das Spiroketal miteinander im Gleichgewicht.

\* Mitt. XXI: "Zur Biosynthese von Steroidderivaten im Pflanzenreich". Mitt. XX: *Phytochemistry* 00, 000–000. Anmerkungen—Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

† Herrn Prof. Dr. Macmilian Steiner, Bonn, herzlich zum 70. Geburtstag gewidmet.



Schema 1. Biogenese des Spiroketal systems der Spirostanole.

Gestützt wird diese Hypothese durch das Vorkommen von  $\Delta^5$ -Furosten-3 $\beta$ ,20,26-triol in einer Trilliumart [8]. Diese Verbindung läßt sich *in vitro* durch Behandeln mit verdünnter Säure in Diosgenin überführen.

Durch die Umwandlung von 3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,22,26-Tetrahydroxycholest-5-en [9] in Diosgenin bei einer *Dioscorea*-Art muß auch die Bildung des Furan-Ringes durch Dehydratisierung der OH-Gruppe an C-22 in Betracht gezogen werden. Über das 22-Hydroxycholesterol erfolgt zwar der Abbau zum Pregnenolon, es wird jedoch nicht zur Bildung von Tigogenin in *Digitalis lanata* Pflanzen verwertet [10]. Die 22-Hydroxygruppe entsteht möglicherweise durch Addition von H<sub>2</sub>O an die  $\Delta^{20(22)}$ -Doppelbindung. Ein 22-Ketocholesterol [6, 10] scheidet ebenfalls als Metabolit aus. Reaktionen an C-22 zu Spirostanolen sind daher wohl nur dann möglich, wenn eine Hydroxylierung an C-16, bzw. C-26 bereits erfolgt ist. Das derzeitige Untersuchungsergebnis zur Biogenese des Spirostanol-Grundgerüsts und einen daraus abgeleiteten Biogeneseweg zeigt Schema 1.

#### Biogenese der Spirosolan-Alkaloide

Ob auch bei der Biogenese der Spirosolan-Alkaloide die E- und F-Ringverknüpfung zu dem

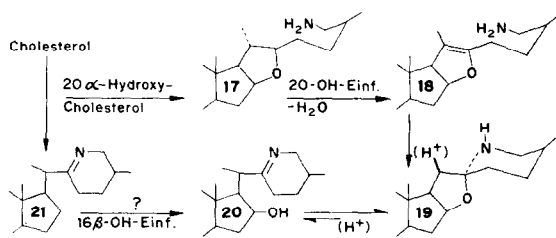
Azaoxaspiransystem über 20 $\alpha$ -Hydroxycholesterol und eventuell über ein 26-Aminofurostanol verläuft, wurde durch Applikation markierter Verbindungen an *Solanum laciniatum* geprüft.

Da beide Verbindungen zu Solasodin metabolisiert werden, kann für die Bildung des Azaoxaspiransystems (19) ein wie in Schema 1 dargelegter Weg angenommen werden. Beim 26-Amino- $\Delta^{20(22)}$ -furostenol (18) schließt sich bei der Behandlung mit Säure *in vitro* der F-Ring [11] (19) (Schema 2). In saurem Milieu ist als möglicher Gleichgewichtspartner der Spirosolan-Alkaloide nicht ein solches 26-Amino- $\Delta^{20(22)}$ -furostenol, sondern das Azomethin (20) mit offenem E-Ring anzusehen.

Durch die Auffindung des Verazins [12] (21) als Nebenalkaloid in *Veratrum album*, das nach einer 16 $\beta$ -OH-Einführung (20) in ein Spirosolan-Alkaloid übergehen würde, muß daher auch ein Reaktionsweg über die primäre Schließung des F-Ringes diskutiert werden. Da 16 $\beta$ -Hydroxy-[1] und 16 $\beta$ ,26-Dihydroxycholesterol [4] zwar zu den Spirostanolen, nicht aber zu Spirosolan-Alkaloiden metabolisieren, darf angenommen werden, daß die Einführung der 26-NH<sub>2</sub>-Gruppe ein vielleicht der 16 $\beta$ -Hydroxylierung vorausgehender Schritt sein kann.

Tabelle 1. Metabolisierung zu Solasodin in *Solanum laciniatum* nach 5 Wochen

Applizierte Substanz	Appliz. resorb. Aktivität Imp/min $\times 10^{-8}$	Spez. Aktivität des isolierten Solasodins Imp/min · mg $\times 10^{-4}$	Einbaurrate in %
$7\alpha$ - $^3\text{H}$ -20 $\alpha$ -Hydroxycholesterol	2,01 1,53	0,40	0,31
$7\alpha$ - $^3\text{H}$ -26-Amino-dihydrodiosgenin	8,05 4,86	0,43	0,11



Schema 2.

## EXPERIMENTELLES

Die IR-Spektren wurden in  $\text{CHCl}_3$  und die NMR-Spektren in  $\text{CDCl}_3$  mit TMS als Standard aufgenommen. Die Aktivitätsmessungen erfolgten mit dem fensterlosen Methandurchflußzähler FH 407 und dem Handprobenwechsler BL503 von Frieske und Hoepfner, die Aufnahme der Radiogramme mit dem Scanner LB 2720 in Kombination mit dem Methandurchflußzähler FH 524 von Berthold. Zur präparativen DC wurde Kieselgel PF<sub>254</sub> (Merck) verwendet und als Laufmittel dienten die Systeme  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Aceton}$  und  $\text{AcOEt}/\text{Petrol}$ . (Sdp. 50–70°) in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen.

**20 $\alpha$ -Hydroxycholesterol.** 1 g (2,8 mMol) Pregnenolonacetat, gelöst in  $\text{Et}_2\text{O}$ , wurden tropfenweise zu einer vorbereiteten Isohexyl MgBr-Lösung (50 mMol) zugegeben und der Ansatz 5 St unter Rückfluß erhitzt. Danach tauschte man den  $\text{Et}_2\text{O}$  gegen wasserfreies Dioxan aus und kochte die Lösung weitere 12 hr. Nach dem Abkühlen hydrolysierte man durch Hinzufügen von  $\text{H}_2\text{O}$  (0°) und gab schließlich eine 50%ige  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung zu. Die Reaktionslösung wurde mit  $\text{Et}_2\text{O}$  ausgeschüttelt, die Ätherphasen gewaschen, getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ) und der  $\text{Et}_2\text{O}$  abgezogen. Aus dem kristallinen Rückstand ließ sich mit Hilfe der präparativen DC die gewünschte Verbindung in reiner Form isolieren. Ausbeute: 0,89 g (79,5%). Schmp. 138–140°. IR: keine Ketobande, NMR: 18-Me 0,80; 26-Me 0,88; 19-Me 0,99; 21-Me 1,25; 6-H 5,38 ppm.  $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_2$  ber. 402,6 gef.  $m/e$  402; 384 (M-18).

**$7\alpha$ -[ $^3\text{H}$ ]-20 $\alpha$ -Hydroxycholesterol.**  $7\alpha$ -[ $^3\text{H}$ ]-Pregnenolon wurde von der Firma Amersham/Buchler GmbH Braunschweig bezogen und—wie bei der Herstellung der Vergleichssubstanz beschrieben—zum  $7\alpha$ -[ $^3\text{H}$ ]-20 $\alpha$ -Hydroxycholesterol umgesetzt.

**26-Aminodihydrodiosgenin; (a) Dihydrodiosgenin.** Zu 20 g (0,15 Mol) wasserfreies  $\text{AlCl}_3$  in  $\text{Et}_2\text{O}$  wurden unter Rühren und Eiskühlung 1,4 g (0,035 Mol)  $\text{LiAlH}_4$  zugefügt. Diese Reaktionslösung versetzte man tropfenweise mit einer  $\text{Et}_2\text{O}$  Lösung von 1,5 g (3,5 mMol) Diosgenin, rührte 45 min bei 0° und erhitzte danach 2 hr unter Rückfluß. Um den Reagenzüber-

schuß zu zerstören, gab man  $\text{AcOEt}$ ,  $\text{MeOH}$  und zuletzt  $\text{H}_2\text{O}$  zu. Die wäßrige Phase wurde mit  $\text{HCl}$  angesäuert, man trennte die ätherische Phase ab und dampfte ein. Den Rückstand kristallisierte man aus Aceton um. Ausbeute: 1,27 g (84%). Schmp. 164–167°. NMR: 18-Me 0,8; 21-Me 0,95; 19-Me 1,01; 16-H und 22-H 3,38 und 3,45; 3-H 4,3; 6-H 5,3 ppm.

**(b) 26-Joddihydrodiosgenin.** 1,2 g (2,9 mMol) Dihydrodiosgenin, gelöst in 10 ml Pyridin wurden bei 0° unter Rühren mit 2,3 g (0,012 Mol) *p*-Toluolsulfonylchlorid versetzt, der Ansatz wurde 25 h bei 0° gerührt und anschließend mit 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt. Die Isolierung des Ditosylates erfolgte nach dem üblichen Verfahren. NMR: 18-Me 0,8; 27-Me 0,85; 21-Me 0,95; 19-Me 1,03; 6 Protonen Me- 2,45; 16-H und 22-H 3,8 bzw. 3,9; 8 Protonen H-O 7,5 ppm. 2,06 g des Ditosylat-Prohproduktes in 15 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 60 ml Aceton gelöst, hydrolysierte man bei 2stündigem Kochen und weiterem 15stündigem Stehen bei 0° zum Monotosylat. NMR: 3 Protonen Me- 2,45; 4 Protonen H- 7,5 ppm. 1,55 g Monotosylat wurden 60 Stunden bei Zimmertemperatur mit 0,87 g (5,8 mMol)  $\text{NaI}$  in 10 ml Methyläthylketon gerührt, anschließend wurde der Ansatz mit 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt, das Reaktionsprodukt mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen und wie üblich aufbereitet. Ausbeute: 1,4 g. Schmp. 115–117°. NMR: 2 Protonen 26- $\text{CH}_2$  3,2 ppm.

**(c) 3 $\beta$ -Acetyl-26-phthalimidodihydrodiosgenin.** 1,4 g 26-Joddihydrodiosgenin (Rohprodukt) und 0,541 g (2,92 mMol) K-Phthalimid in 6 ml DMF rührte man 70 h bei Zimmertemperatur. Man verdünnte anschließend mit 50 ml 10%iger  $\text{NaCl}$ -Lösung, trennte das ausgefallene Produkt durch Filtration ab und trocknete es. Auswaage: 1,45 g. Schmp. 148–151° (mehrmals aus  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  umkristallisiert). NMR: 26- $\text{CH}_2$  3,45; H- 7,75 ppm. 26-Phthalimidodihydrodiosgenin wurde in 25 ml Essigsäureanhydrid 10 min zum Sieden erhitzt, nach 15 h Stehen bei Zimmertemperatur wurde wie üblich aufbereitet. Die Reinigung erfolgte über präparative DC. Ausbeute 1,03 g (68% gesamt). Schmp. 126–131°. NMR: 18-Me 0,8; 27-Me 0,85; 21-Me 0,95; 19-Me 1,03; Me-CO 2,02; 26- $\text{CH}_2$  3,45; 16-H und 22-H 3,5 und 3,6; 3-H 4,3; 6-H 5,3; H-O 7,75.  $\text{C}_{37}\text{H}_{48}\text{O}_5\text{N}$  ber. 587,7 gef.  $m/e$  587.

**(d) 26-Aminodihydrodiosgenin.** 250 mg (0,425 mMol) 3 $\beta$ -Acetyl-26-phthalimidodihydrodiosgenin wurden mit 215 mg (4,25 mMol) Hydrazinhydrat in 10 ml  $\text{MeOH}$  zunächst 4 h bei 60° und anschließend weitere 15 h bei Zimmertemperatur hydrazinolysiert. Isolierung und Reinigung des 26-Aminodihydrodiosgenins erfolgte mit Hilfe präparativer DC. Ausbeute: 160 mg (94%). Schmp. 144–148°. NMR: 18-Me 0,8; 27-Me 0,91; 21-Me 0,93; 19-Me 1,0; 26- $\text{NH}_2$  1,2; 26- $\text{CH}_2$  2,5; 16-H und 22-H 3,3 und 3,4; 3-H 4,3; 6-H 5,3 ppm.  $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{O}_2\text{N}$  ber. 415,6 gef.  $m/e$  415.

**$7\alpha$ -[ $^3\text{H}$ ]-26-Aminodihydrodiosgenin.** 3 $\beta$ -Acetyl-26-phthalimidodihydrodiosgenin setzt man mit einer äquivalenten Menge N-Bromsuccinimid in  $\text{CCl}_4$  in Gegenwart katalytischer

Mengen Azobis-isobutyronitril bis zur beginnenden Gelbfärbung zum 7 $\alpha$ -Brom-Derivat um. Das dabei ausfallende Succinimid wurde abfiltriert und die beim Abkühlen auskristallisierende 7 $\alpha$ -Brom-Verbindung abgetrennt, sie wurde mit Petroläther gewaschen und sorgfältig getrocknet. (NMR: 6-H 5,88; 7 $\beta$ -H 4,7 ppm) Den katalytischen Br  $\rightarrow$  [ $^3$ H]-Austausch führte die Firma Amersham/Büchler, Braunschweig durch. 3 $\beta$ -Acetyl-7 $\alpha$ -[ $^3$ H]-26-phthalimidodihydrodiosgenin wurde wie bereits beschrieben - zum 7 $\alpha$ -[ $^3$ H]-26-Aminodihydrodiosgenin hydrazinolysiert.

*Pflanzenversuche.* Für jeden Versuch wurden je 3 Blätter von 5 Pflanzen (*Digitalis lanata*, *Solanum laciniatum*) mit Hilfe einer 2%igen Tween 20-Lösung von ihrer Wachsschicht befreit und auf die so vorbehandelte Blattoberfläche die markierte Substanz, gelöst in wenig EtOH, aufgebracht und durch Besprühen mit Siliconöl/Petroläther fixiert. Nach Ablauf einer Inkubationszeit von jeweils 5 Wochen spült man die auf der Blattoberfläche verbliebene Aktivität mit AcOEt ab, zerkleinert sorgfältig die Pflanze und extrahiert mit MeOH/H<sub>2</sub>O. Diese jeweiligen Extrakte engt man ein und schüttelt sie mit Cyclohexan aus. Die wäßrige Phase enthält den gewünschten Inhaltsstoff, der mit 3N äthanolisch-wäßriger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in der Siedehitze hydrolysiert wurde. Nach Neutralisation destillierte man das EtOH ab und extrahierte die wäßrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Aus dem Rückstand ließen sich die gesuchten Substanzen durch mehrmalige präparative DC isolieren, die jeweils mit inaktiver, authentischer Vergleichssubstanz bis zur konstanten spezifischen Aktivität kokristallisiert wurden.

## LITERATUR

1. Tschesche, R. und Leinert, J. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1619.
2. Bennett, R. D., Heftmann, E. und Joly, R. A. (1970) *Phytochemistry* **9**, 349.
3. Joly, R. und Tamm, C. (1967) *Tetrahedron Lett.* **36**, 3535.
4. Tschesche, R. und Fritz, R. (1970) *Z. Naturfor.* **25b**, 590.
5. Shimizu, K., Gut, M. und Dorfman, R. J. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 699.
6. Chaudhuri, A. C., Harada, Y. K., Gut, M., Shimizu, K. und Dorfman, R. J. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 703.
7. Cannonica, L., Ronchetti, F. und Russo, G. (1972) *Phytochemistry* **11**, 243.
8. Marker, R. E., Wagner, R. B., Ulshofer, P. R., Wittbecker, E. L., Goldsmith, D. P. J. und Ruof, C. H. (1943) *J. Am. Chem. Soc.* **65**, 1205.
9. Tomita, Y. und Uomori, A. (1971) *Chem. Comm.* 284.
10. Tschesche, R., Hulpke, H. und Fritz, R. (1968) *Phytochemistry* **7**, 2021.
11. Uhle, C. (1961) *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 1460.
12. Adam, G., Schreiber, K., Tomko, J. und Vassova, A. (1967) *Tetrahedron Lett.* **23**, 167.
13. Pettit, G. R. und Bowyer, J. (1960) *J. Org. Chem.* **25**, 184.