

ZUR EINFÜHRUNG DES STICKSTOFFS UND ZUM GEMEINSAMEN VORKOMMEN VON 25(R)- UND 25(S)- STEROIDALKALOIDEN IN SOLANACEEN*†

RUDOLF TSCHESCHE, BERNHARD GOOSSENS und ALFRED TÖPFER

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

(Eingegangen 27 February 1976)

Key Word Index—*Solanum laciniatum*; *S lycopersicum*; Solanaceae; biosynthesis; solasodine; soladulcidine; tomatidine

Abstract—25(RS)-25,26- $^3\text{H}_2$ -4- ^{14}C -cholesterol was administered to *Solanum lycopersicum* and *S laciniatum* plants; measurements of the $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ratio of the recovered alkaloids tomatidine, soladulcidine and solasodine indicate that a direct replacement of the C-26 (or C-27) hydroxyl group by an amino group during biosynthesis, rather than transamination of a C-26-oxo-intermediate, can be postulated. Furthermore, the results show that C-25 is not involved and thus the configuration at C-25 of the spirostanol alkaloids is determined by the C-26 (or C-27) hydroxylating enzyme. This conclusion is supported by the fact that 25(R)-5 α ,6- $^3\text{H}_2$ -cholestane-3 β ,26-diol applied to *S lycopersicum* plants was incorporated only in soladulcidine but not in tomatidine.

EINFÜHRUNG

Frühere Untersuchungen zur Biosynthese der Spirostanole [1-3] lassen den Schluß zu, daß die Einführung des Stickstoffs sich direkt und die Hydroxylierung des Cholesterols in der Position 26 anschließt. Der weitere Biosyntheseweg, insbesondere die indirekte Oxydation des C-22-Atoms als Grundlage für die Bildung des Aza-Oxa-Spiransystems [4, 5], dürfte weitgehend analog der Biosynthese der Spirostanole verlaufen. Während jedoch bei den Spirostanolen auf Grund der Blockierung der 26-Hydroxy-Funktion durch Glucose zunächst der E-Ring zum Tetrahydrofurostanol [6] gebildet wird und teilweise erst bei Hydrolyse *in vitro* die eigentlichen Spirostanole generiert werden [7, 8], muß bei den Spirostanolen auch die primäre Schließung des F-Ringes in der Pflanze in Betracht gezogen werden. (Vorkommen von Steroidalkaloiden des Verazin-Typs in *Veratrum album* [9]).

Ob nun die Hydroxylgruppe an C-26 direkt gegen eine Aminogruppe ausgetauscht wird, wie Bennett und Heftmann [10] für die Bildung des Holaphyllamins (3β -Amino-pregn-5-en-20-on) aus Pregnenolon diskutieren, oder ob die Zwischenstufe eines C-26-sp²-Hybrids—z.B. eines Aldehydes, auf den durch Transaminierung Stickstoff übertragen wird—durchlaufen wird, ist nicht bekannt.

Die Applikation von 25(RS)-25,26- $^3\text{H}_2$ -4- ^{14}C -Cholesterol bietet durch Messung des $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Aktivitätsverhältnisses der isolierten Spirostanole die Möglichkeit, einmal den biosynthetischen Reaktionsablauf an C-26 hinsichtlich der Einführung des Stickstoffs zu erhellen und

läßt zum anderen vorteilhafterweise gleichzeitig eine Entscheidung darüber zu, ob die Stufe einer $\Delta^{25(26)}$ -Doppelbindung durchlaufen wird, wobei eine mögliche C-26-Oxo-Zwischenstufe—in Analogie zur indirekten Oxydation des C-22—über eine C-25 Hydroxylierung mit anschließender Dehydratisierung gebildet werden könnte. Der Verbleib der Tritiumaktivität an C-25 bringt weiterhin Klarheit darüber, ob für die Bildung der 25(R) und 25(S)-Konfiguration in derselben Pflanze zwei verschiedene Enzyme anzunehmen sind, durch deren hydroxylierenden Angriff auf C-26 einerseits bzw. C-27 andererseits die Konfiguration (25(R) oder 25(S)) des entstehenden Steroidalkaloids festgelegt wird.

Bei Verlust der Tritiumaktivität an C-25 muß möglicherweise eine Enolform als biosynthetische Zwischenstufe in Betracht gezogen werden, die sich bei oder nach der Weiteroxydation nur aus einer bestimmten (C-26) Hydroxymethylgruppe bilden könnte und als identische Vorstufe für beispielsweise Tomatidin (25(S)) (1) einerseits und Soladulcidin (25(R)) (2) andererseits gelten kann. (Beide Steroidalkaloide sind nebeneinander vorliegend in *Lycopersicon pimpinelli-folium* [11] gefunden worden.)

Die hinsichtlich dieses letztgenannten Problems aus der Applikation des 25(RS)-25,26- $^3\text{H}_2$ -4- ^{14}C -Cholesterols durch statistische Betrachtungen zu erwartenden Ergebnisse sollten noch durch die Applikation von 25(R)-5 α ,6- $^3\text{H}_2$ -Cholestan-3 β ,26-diol und *Solanum lycopersicum* überprüft werden können.

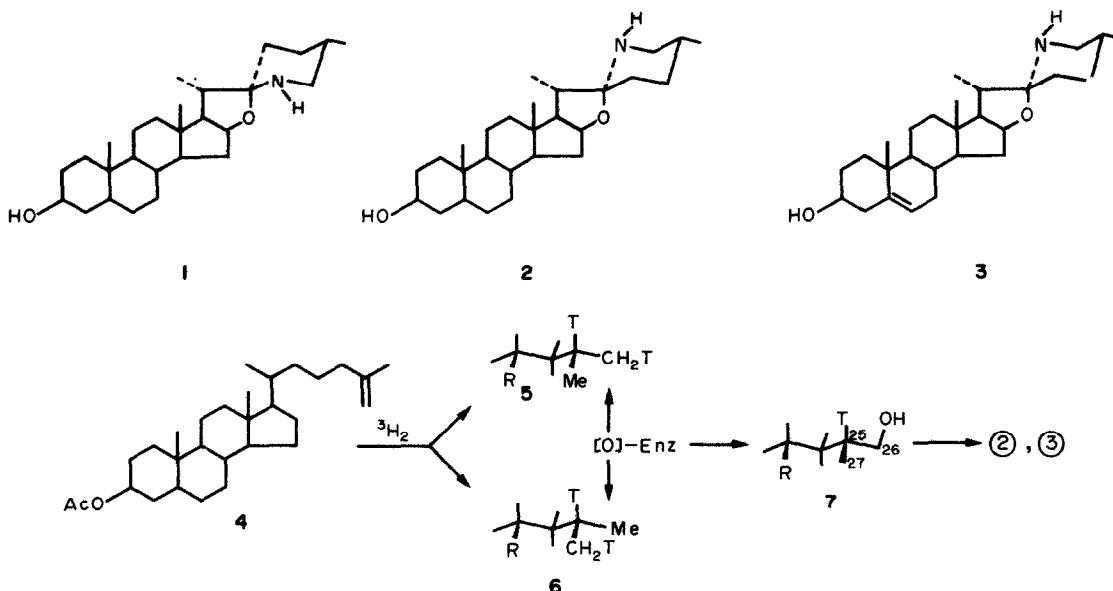
ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Statistische Aspekte zur Applikation von 25(RS)-25,26- $^3\text{H}_2$ -4- ^{14}C -Cholesterol

Bei der homogenen Tritiierung von 3β -Acetoxy- $\Delta^{5,25(26)}$ -Cholestadien (4) mit Tristriphenylphosphinrhodium (I) chlorid kann aufgrund der freien Drehbarkeit

* Mitt. 22. "Zur Biosynthese von Steroidderivaten im Pflanzenreich." Mitt. 21 Tschesche, R. und Piestert, G. *Phytochemistry* 14, 435 (1975).

† Herrn Prof. Dr. Dr. med. h.c. H. H. Inhoffen herzlichst mit allen guten Wünschen zum 70. Geburtstag gewidmet.



der Seitenkette angenommen werden, daß sich die beiden entstehenden Tritiumisomere $25(S)$ - $25,26\text{-}^3\text{H}_2$ -Cholesterin (5) und $25(R)$ - $25,27\text{-}^3\text{H}_2$ -Cholesterin (6) in gleichem Verhältnis bilden werden. (Dennoch a priori nicht feststellbare Abweichungen vom statistischen Isomerenverhältnis von 50:50 können durch vergleichende Aktivitätsvermessung der Zielprodukte mit unterschiedlicher Konfiguration an C-25 korrigiert werden, was sich wegen gleicher minimaler ^3H -Abfallraten bei den Zielprodukten erübrigte.)

Bei einer statistischen Betrachtung des primären Hydroxylierungsschrittes an C-26 ist zu erwarten, daß bei einem Sechstel der Moleküle mit späterer $25(R)$ -26-OH-Konfiguration (7) die an der zu hydroxylierenden Methygruppe lokalisierte ^3H -Aktivität verloren gehen wird, sofern bei der enzymatischen Hydroxylierung ein Isotopeeffekt vernachlässigt werden kann. Bei einem folgenden direkten Austausch der Hydroxylgruppe gegen eine Aminofunktion sollte das erreichte $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Aktivitätsverhältnis konstant bleiben, und es wäre mit einem relativen Abfall der Gesamttritiumaktivität bei diesem Reaktionsmechanismus um ein Zwölftel = 8.3% zu rechnen. (Sollte bei der enzymatischen Hydroxylierung

die Lösung der C-H Bindung geschwindigkeitsbestimmend sein, so würde die Einbeziehung eines primären Isotopeneffektes in die Rechnung einen relativen Tritiumverlust zwischen den Extremen 8.3 und 16.6% verursachen.)

Bei direkter Weiteroxydation der 26-OH-Gruppe wird ein weiterer Wasserstoff (bzw. Tritium) vom C-26 abstrahiert; dies würde einen relativen Abfall der Gesamttritiumaktivität um ein Sechstel = 16.6% (bei einem Isotopeneffekt mehr als 16.6%) bewirken. Bei indirekter Weiteroxydation der C-26-Hydroxylgruppe über einen C-25-Hydroxylierungs-Eliminierungsmechanismus oder bei Enolisierung einer möglichen Aldehydzwischenstufe ist ein Absinken der Gesamttritiumaktivität um zwei Drittel = 66.6% relativ zur ^{14}C -Aktivität zu erwarten. (analog gelten diese Betrachtungen für die Bildung der S-Konfiguration).

Applikation an *Solanum*

Der relative Abfall der Gesamttritiumaktivität um ca 7% bei den Zielprodukten Tomatidin (1) und Solasodin (3) zeigt, daß bei der Einführung des Stickstoffs in das Spirosolangerüst ein direkter Austausch der C-26 bzw.

Tabelle 1. Applikation an *Solanum*

Applikation an <i>S. lycopersicum</i> Precursor und Zielprodukte	^3H -Aktivität	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis	rel. ^3H -Verlust
25(RS)-25,26- $^3\text{H}_2$ -4- ^{14}C -Cholesterin (Precursor)	7.2×10^9 dpm	132:1	—
Tomatidin (1)	1.6×10^7 dpm/mM	123:1	6.8%
Soladulcidin (2)	3.4×10^6 dpm/mM	125:1	5.3%
25(R)- $5\alpha,6\text{-}^3\text{H}_2$ -Cholestan-3 β ,26-diol (Precursor)	2.6×10^9 dpm	—	—
Tomatidin (1)	—	—	—
Soladulcidin (2)	1.6×10^8 dpm/mM	—	—
Applikation an <i>S. laciniatum</i> Precursor und Zielprodukt	^3H -Aktivität	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis	rel. ^3H -Verlust
25(RS)-25,26- $^3\text{H}_2$ -4- ^{14}C -Cholesterin (Precursor)	5.5×10^{10} dpm	109:1	—
Solasodin (3)	2.0×10^7 dpm/mM	102:1	6.9%

C-27 Hydroxylgruppe gegen -NH_2 in Betracht zu ziehen ist, wobei die Hydroxylgruppe möglicherweise durch vorhergehende Phosphorylierung aktiviert worden ist [Tabelle 1].

Die Bildung einer 26-Aldehyd-Zwischenstufe, auf die durch Transaminierung Stickstoff übertragen wird, scheint nach den vorliegenden Versuchsergebnissen nicht wahrscheinlich. Aus dem Verbleib der Tritiumaktivität an C-25 bei allen drei Zielprodukten läßt sich die Folgerung ziehen, daß die Konfiguration des Endproduktes an C-25 durch den Angriff des hydroxylierenden Enzyms festgelegt wird. Die letztere Schlußfolgerung wird durch das Ergebnis der Applikation von 25(R)- $5\alpha,6\text{-}{}^3\text{H}_2$ -Cholestan- $3\beta,26$ -diol und *Solanum lycopersicum* gestützt, da nur Soladulcidin (**2**), nicht aber Tomatidin (**1**) (markiert) isoliert werden konnte.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Aktivitätsmessung erfolgte mit einem Flüssig-Szintillationszähler (Betawechseler BF 5000) der Firma BERTHOLD, Quenchkorrektur und rechnerische Auswertung [12] der Meßdaten mit dem angeschlossenen Rechnersystem DIEHLalphatronic. Als Szintillationsflüssigkeit wurde eine Lösung von 5 g PPO und 0.1875 g POPOP in 2.5 L Toluol (MERCK 8317) verwendet.

Precursors:

25(RS)-25,26- ${}^3\text{H}_2$ -Cholesterin [13]: 27-Nor-25-oxo-cholesterol- 3β -acetat [14, 15] wurde mit Triphenylphosphinmethylen zu $\Delta^{5,25(26)}$ -Cholestan- 3β -ol [16] umgesetzt und reacytiert (4), welches in homogener Katalyse mit Tristriphenylphosphinrhodium(I)chlorid [17] bei der Firma Amersham Buchler Braunschweig tritiert wurde. DC-Reinigung und Verseifung lieferte den gewünschten Precursor. Die massenspektroskopische Vermessung des analog hergestellten deuterierten Produktes zeigte keinen Isotopenaustausch (no isotopic scrambling).

25(R)- $5\alpha,6\text{-}{}^3\text{H}_2$ -Cholestan- $3\beta,26$ -diol: Durch Reduktion von Kryptogenin wurde 25(R)-Cholest-5-en- $3\beta,26$ -diol [18] erhalten, welches von der Firma Hoechst katalytisch mit Pd-C in EtOH [19] tritiert wurde.

Pflanzenversuche. Die radioaktiven Precursors, gelöst in wenig Aethanol, wurden bei *S. lycopersicum* jeweils 6 jungen Pflanzen mit Hilfe einer Mikrospritze in die Blattachsen injiziert; bei *S. laciniatum* wurde die alkoholische Lösung des Precursors gleichmäßig auf die von der Wachsschicht befreiten Blattoberflächen der oberen Blätter von 6 jungen Pflanzen aufgebracht und mit Silikonöl/Petroläther fixiert. Nach 4 Wochen wurde der nicht resorbierbare Aktivitätsanteil von den kontaminierten Blättern mit Essigester abgespült, anschließend die Pflanzen einschließlich der Wurzeln sorgfältig zerkleinert und mit 5% Essigsäure und Methanol extrahiert. Der eingegangte

Extract wurde mit Cyclohexan ausgeschüttelt, die wässrige Phase mit Benzol überschichtet und mit 1 N äthanolischem Salzsäure eine Stunde unter Rückfluß hydrolysiert. Die einrotrierte Methylenchloridphase des ammoniakalisch gemachten Hydrolysates wurde mit Essigester durch Kieselgel filtriert, die Aglycone durch mehrmalige präparative DC isoliert und mit authentischer Vergleichssubstanz bis zur konstanten Aktivität kokristallisiert.

Anmerkung—Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Stiftung Stipendiensonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

LITERATUR

1. Tschesche, R. und Fritz, R. (1970) *Z. Naturforsch.* **25b**, 590.
2. Tschesche, R. und Leinert, J. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1619.
3. Ronchetti, F., Russo, G., Ferrara, G. und Vecchio, G. (1975) *Phytochemistry* **14**, 2423.
4. Tschesche R. und Piestert, G. (1975) *Phytochemistry* **14**, 435.
5. Tschesche, R. und Goossens, B. in Vorbereitung.
6. Canonica, L., Ronchetti, F. und Russo, G. (1972) *Phytochemistry* **11**, 243.
7. Schreiber, K., Ripperger, H. und Budzikiewicz, H. (1965) *Tetrahedron Letters* 3999.
8. Tschesche, R. und Wulff, G. (1973) in *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, Bd. 30, S. 461 ff, Hrsg. W. Herz, Wien.
9. Adam, G., Schreiber, K., Tomko, J. und Vassova, A. (1967) *Tetrahedron* **23**, 167.
10. Bennett, R. D. und Heftmann, E. (1965) *Phytochemistry* **4**, 873.
11. Schreiber, K. und Aurich, O. (1966) *Phytochemistry* **5**, 707.
12. Tykva, R. Messung mehrfachmarkierter Proben (1974) in *Anwendung von Isotopen in der Organischen Chemie und Biochemie*, Bd. II, H. Simon (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin.
13. Burstein, S., Zamoscianyk, H., Co, N., Adelson, M., Prasad, D. S. M., Greenberg, A. und Gut, M. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* **231**, 223.
14. Ruzicka, L. und Fischer, W. H. (1937) *Helv. Chim. Acta* **20**, 1291.
15. Tschesche, R., Goossens, B., Piestert, G. und Töpfer, A. (1976) *Tetrahedron*, (im Druck).
16. Bergmann, W. und Dusza, J. P. (1958) *J. Org. Chem.* **23**, 459.
17. Young, J. F., Osborn, J. A., Jardine, F. H. und Wilkinson, G. (1965) *Chem. Commun.* 131.
18. Scheer, I., Thompson, M. J. und Mosettig, E. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4733.
19. Augustine, R. L. und Reardon, E. J. (1969) *Org. Prep. Proc.* **1**, 107.