

with a tertiary hydroxyl group, suggests that the tertiary hydroxyl group is at C-2, causing H-3 to resonate as a singlet, as in 2-hydroxy fissinolide, which occurs in the same plant. The chemical shift ascribed to H-3 is unusual; in 2-hydroxy fissinolide it is at δ 5.1, whereas in 2-acetoxy fissinolide it is at δ 5.51; the extra deshielding by the acetate accounts for the extra shift in the latter case.

To summarise, the evidence so far quoted above is in agreement with the structure of 2-hydroxyswietenolide 3-acetate, with the exception that the 5-6 coupling is unusually high, the resonance of H-3 is unusually far downfield, and that there is an extra oxygen atom. The IR spectrum of compound E in CHCl_3 shows no ketonic carbonyl near 1710 cm^{-1} , as found in swietenolide, but two lactone, or ester, absorptions near 1740 cm^{-1} , which can be attributed to the methyl ester and the ring D lactone, and the 1780 cm^{-1} absorption. It seems therefore that the C-1 carbonyl is missing, and is replaced by a lactone.

The conclusion therefore is that compound E is the Baeyer-Villiger oxidation product of 2-hydroxy swietenolide 3-acetate. Since two ring A lactones have already been isolated from this plant, methyl ivorensate and the Baeyer-Villiger product of mexicanolide, this conclusion is not surprising.

There remain two possible structures, that in which the oxygen is inserted between C-1 and C-2, and that in which the oxygen is inserted between C-1 and C-10. Two lines of evidence show that the former is correct. Firstly, the attachment of a lactone oxygen to C-2 explains the downfield position of H-3; secondly if the lactone oxygen were attached at C-10, the resonance of the 10-Me group would be shifted downfield by some 20 Hz (cf. methyl ivorensate and mexicanolide Baeyer-Villiger product in ref. [1]). In swietenolide diacetate, the 10-Me group resonates at 70 Hz [4], whereas those in compound E resonate at 52, 61, 75 and 76 Hz. Whichever of these is to be assigned to Me-10, it is not shifted downfield by any significant amount.

Compound E is thus represented by the formula (10), with a lactone between C-1 and C-2. The unusual coupling constant of 10 Hz between H-5 and H-6 can be explained by the expansion of ring A from a

6- to a 7-membered ring. The consequent ring buckling alters the position of C-4 considerably and reduces the steric crowding of C-6 and C-7, allowing much greater mobility to the side chain. The IR absorption of the ring A lactone at 1780 cm^{-1} is presumably due to the bridged nature of the 7-membered lactone ring, with some consequent steric strain, as in the other cases we have reported [2].

The structure 10 explains the instability of compound E to alkali, the 7-membered lactone ring would be expected to open easily, giving an α -acetoxy ketone which may then hydrolyse and undergo isomerisation to give a mixture of the four possible isomeric ketols. The inactivity to pyridine and acetic anhydride is also explained, since a 6-hydroxy group is known to be sterically hindered to acetylation.

Compound E was isolated with di-isopropyl ether, and the possibility occurred to us that it might be an artefact produced by oxidation of the natural 2-hydroxy fissinolide with peroxide accidentally present in the ether; in this case the accompanying Baeyer-Villiger product of mexicanolide would also be an artefact. This still remains possible, although it does not explain the presence of the 6-hydroxy group in compound E. Attempts to oxidise 2-hydroxy fissinolide with peroxides in di-isopropyl ether, or in other ways, have proved unavailing, while if compound E is an artefact, it must be produced by a high-yield reaction in order to give the amount obtained from the probable amount of precursor present.

Although the matter is not settled, we favour the view that compound E is not an artefact and this would not be the first case in which rare natural products have been found difficult to obtain again.

REFERENCES

- Adesogan, E. K. and Taylor, D. A. H. (1970) *J. Chem. Soc. (C)* 1710.
- Connolly, J. D., Okorie, D. A., de Wit, L. D. and Taylor, D. A. H. (1976) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 909.
- Connolly, J. D., Henderson, R., McCrindle, R., Overton, K. H. and Bhacca, N. S. (1965) *J. Chem. Soc.* 6935.
- Ohochuku, N. S. and Taylor, D. A. H. (1969) *J. Chem. Soc.* 864.

Phytochemistry, 1977, Vol. 16, pp. 1849-1851. Pergamon Press. Printed in England.

3-KETOSTEROIDE IN SOJA-SUSPENSIONSKULTUREN

NIKOLAUS WEBER

Bundesanstalt für Fettforschung, D-4400 Münster (Westf.), Germany

(Revised received 10 May 1977)

Key Word Index—*Glycine max*; Leguminosae; suspension culture; 3-ketosteroids.

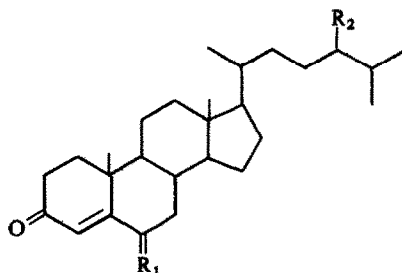
Abstract—The following steroids were found in soybean suspension cultures: ergost-4-en-3-one, stigmast-4-en-3-one, stigmasta-4, 22-dien-3-one, ergost-4-en-3, 6-dione, stigmast-4-en-3, 6-dione and stigmasta-4, 22-dien-3, 6-dione.

EINLEITUNG

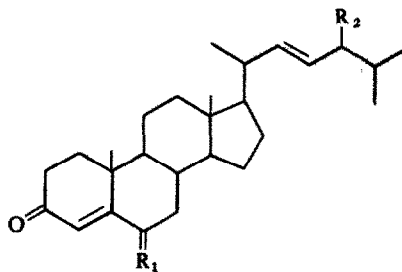
Typische und wohlbekannte Produkte des Sterolstoffwechsels höherer Pflanzen und deren Zellkulturen sind Sterole, Sterylester, Sterylglykoside und acylierte

Sterylglykoside [1, 2]. Über Ketosteroid mit Δ^4 -3-on- und Δ -3,6-dion-Struktur sowie intakter Seitenkette in Geweben höherer Pflanzen und in pflanzlichen Zellkulturen ist dagegen nur wenig bekannt [3-15]. So

wurden Ketosteroiden mit Δ^4 -3,6-dion-Struktur bisher nur in Kalluskulturen von *Stephania cepharantha* [4] nachgewiesen und solche mit 6β -Hydroxy- Δ^4 -3-on-Struktur nur in der Rinde von *Melia azedarach* [5]. Ketosteroiden mit der Δ^4 -3-on-Gruppierung wurden außer in den erwähnten Pflanzen noch in Kalluskulturen von *Apocynum cannabinum* [6] sowie in der Rinde von *Pinus taeda* [7] und in *Quassia amara* [8] gefunden.



- (1) $R_1 = H$, $R_2 = Me$
 (2) $R_1 = H$, $R_2 = Et$
 (4) $R_1 = O$, $R_2 = Me$
 (5) $R_1 = O$, $R_2 = Et$



- (3) $R_1 = H$, $R_2 = Et$
 (6) $R_1 = O$, $R_2 = Et$

In biochemischen Untersuchungen wurde über die Oxidation von $[4-^{14}C]$ -Cholesterin zu $[4-^{14}C]$ -Cholest-4-en-3-on in Blättern [9] und Sprossen [10] von *Solanum tuberosum* sowie in Zellkulturen von *Dioscorea deltoidea* [11] berichtet. Es wurde ferner gefunden, daß $[4-^{14}C]$ -Cholest-4-en-3-on als Vorstufe für die Bildung der Saponine in *Digitalis lanata* dient [12]. Schließlich wurde noch über die Fähigkeit von Blatt- [13] und Kallushomogenaten [14, 15] zur Bildung von Steroiden mit Δ^4 -3-on-Struktur berichtet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Soja-Suspensionskulturen wurden zwei Klassen von Ketosteroiden mit intakter Seitenkette gefunden: (1) Verbindungen mit Δ^4 -3-on- und (2) solche mit Δ^4 -3,6-dion-Struktur. Diese Substanzen wurden auf Grund ihrer UV-Spektren, ihrer Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens sowie mit Hilfe dünnschicht- und gaschromatografischen Vergleichs identifiziert.

Es gibt Hinweise darauf, daß Ketosteroiden mit Δ^4 -3-on-Struktur die ersten Zwischenprodukte der Biosynthese von gesättigten Steroidsapogeninen und -alkaloiden sind [10, 12, 16]. Andererseits mag ihre Biosynthese einen Seitenweg oder eine Sackgasse des pflanzlichen Sterolstoffwechsels darstellen [11]. Über die Funktion der Ketosteroiden mit Δ^4 -3,6-dion-Struktur in Pflanzen ist dagegen bisher noch nichts bekannt.

In Bakterien ist die enzymatische Umwandlung der Sterole mit intakter Seitenkette zu Steroiden mit der Δ^4 -3-on-Gruppe besonders während der letzten Jahre intensiv untersucht worden [17]; über das Vorkommen dieser Substanzen in Tieren ist jedoch wenig bekannt [18–20].

Es ist unwahrscheinlich, daß die gefunden Ketosteroiden durch Oxidation bei der Isolierung entstanden sind. Typische Autoxidationsprodukte der Sterole sind vielmehr die Steroid-7-hydroperoxide und deren Folgeprodukte, 7-Keto- sowie 5- und 7-Hydroxysteroiden [21, 22]. Eine enzymatische Synthese der 3-Ketosteroiden durch Soja-Lipoxygenase bei der Homogenisierung der Zellen scheidet ebenfalls aus, da bekanntlich auch dabei Steroid-7-hydroperoxide und deren Folgeprodukte entstehen [23].

EXPERIMENTELLES

Soja-Suspensionskulturen wurden in B5-Medium [24] in einen 29 l-Air-Lift-Fermenter bei 30° unter Belüftung mit 0.4 l. Luft/l. Medium $\times$ min gezogen, nach dem Abnutschen in 100 g-Portionen eingefroren und bis zur Extraktion bei –40° aufbewahrt. Δ^4 -3-on-Steroiden wurden aus den entsprechenden Sterolen mit Hilfe von Cholesterinoxidase enzymatisch hergestellt [25], Δ^4 -3,6-dion-Steroiden durch Oxidation mit K-Bichromat in HOAc [26].

Extraktion. Die tiefgefrorenen Soja-Zellen, 3500 g Frischgewicht, wurden in 200 g-Portionen mit heißem *iso*-PrOH und $CHCl_3$ extrahiert [27], der Extrakt bei 40° unter N_2 zur Trockne eingedampft und der Rückstand dreimal mit $CHCl_3$ -MeOH (9:1) bei 40° extrahiert: 12,4 g Gesamtlipide.

Säulenchromatografie der Gesamtlipide. Je 2 g der Gesamtlipide wurden an 200 g Kieselgel 40 (Merck) fraktioniert. Die entsprechenden Fraktionen von sechs parallelen Versuchen wurden vereinigt. Die Elution mit Hexan-Et₂O (19:1) und (9:1) ergab Sterylester und Triglyceride (1.4 g), mit Hexan-Et₂O (4:1) Sterylester, Triglyceride und Fettsäuren (0.6 g), mit Hexan-Et₂O (1:1) Ketosteroiden und Methylsterole (0.15 g) und Sterole (0.7 g), mit Et₂O polarere Sterole (0.5 g), mit Et₂O-MeOH (9:1) acylierte Sterylglykoside und Sterylglykoside und mit MeOH Phospholipide und andere polare Lipide (6.4 g). Die Fraktionen wurden in $CHCl_3$ gelöst, mit einigen Kristallen BHT versetzt und bis zur Weiterverarbeitung unter N_2 bei 0° aufbewahrt.

Säulenchromatografie an Florisil. Die Ketosteroid- und Methylsterol-Fraktion, 0.15 g, wurde an 10 g Florisil (Merck) aufgetrennt. Die Elution mit Hexan und Hexan-Et₂O (19:1) ergab Sterylester und Triglyceride (0.02 g), mit Hexan-Et₂O (9:1) Methylsterole (0.04 g), mit Hexan-Et₂O (4:1) Methylsterole und Ketosteroiden (0.02 g), mit Hexan-Et₂O (1:1), Et₂O und Et₂O-MeOH (9:1) Ketosteroiden und Sterole (0.04 g).

Präparative Dünnschichtchromatografie. Je 5–10 mg der Methylsterole und Ketosteroiden enthaltenden Fraktionen der Florisil-Chromatografie wurden bandenförmig auf Si Gel H-Platten, Schichtdicke 0.3 mm, aufgetragen und zweimal in Hexan-EtOAc (17:3) entwickelt. Nach Detektion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens am Plattenrand wurden die einzelnen Banden abgeschabt und mit $CHCl_3$ eluiert: 3.5 mg (A) als farblose Nadelchen aus EtOAc (λ_{max}^{EtOH} nm (log ϵ) 242 (4, 17) und 1,2 mg (B) als gelbe Plättchen aus EtOAc (λ_{max}^{EtOH} nm (log ϵ) 253 (4, 0)).

TLC. (A) und (B) waren dünnschichtchromatographisch einheitlich; Si Gel H, Hexan-EtOAc (17:3), R_f (A) 0.47, (B) 0.41 oder CH_2Cl_2 -Me₂CO (23:2), R_f (A) 0.63, (B) 0.69, Detektion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens und Chromschwefelsäure (200°).

Gas-Chromatographie. (A) und (B), 1% ig in EtOAc, wurden gaschromatographisch analysiert: 1,8 m $\times$ 2 mm Glassäule gepackt mit 10% OV-17, FID, isotherm bei 265°, 50 ml He/min. Die Chromatogramme von (A) und (B) zeigten jeweils drei Komponenten. Mit Hilfe von Vergleichssubstanzen konnten

sie identifiziert werden als (A): Δ -Ergosten-3-on (28.8%) (1), Δ^4 -Stigmasten-3-on (53.7%) (2) und $\Delta^{4,22}$ -Stigmastadien-3-on (17.5%) (3); R_f (min) (1) 11.5, (2) 13.6 und (3) 12.1. (B): Δ^4 -Ergosten-3, 6-dion (21.2%) (4), Δ^4 -Stigmasten-3, 6-dion (70.5%) (5) und $\Delta^{4,22}$ -Stigmastadien-3, 6-dion (8.3%) R_f (min) (4) 18.1 (5) 21.7, (6) 19.1.

Anerkennung—Diese Untersuchungen wurden vom Bundesministerium für Forschung und Technologie, 5300 Bonn-Bad Godesberg, im Rahmen des Projektes "Ungewöhnliche Lipide aus pflanzlichen Zellkulturen" (Kennzeichen NZK 04) unterstützt. Herrn Professor M. H. Zenk, Universität Bochum, danke ich für die Soja-Suspensionskulturen und Frl. Elisabeth Bock für geschickte Mithilfe.

LITERATUR

- Grunwald, C. (1975) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **26**, 209.
- Radwan, S. S. und Mangold, H. K. (1976) *Adv. Lipid Res.* **14**, 171.
- Stohs, S. J. und Rosenberg, H. (1975) *Lloydia* **38**, 181.
- Itokawa, H., Akasu, M. und Fujita, M. (1973) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **21**, 1386.
- Nair, M. G. und Chang, F. C. (1973) *Phytochemistry* **12**, 903.
- Lee, P. K., Carew, D. P. und Rosazza, J. (1972) *Lloydia* **35**, 150.
- Rowe, J. W. (1965) *Phytochemistry* **4**, 1.
- Lavie, D. und Kaye, I. A. (1963) *J. Chem. Soc.* 5001.
- Johnson, D. F., Waters, J. A. und Bennett, R. D. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.* **108**, 282.
- Heftmann, E. und Weaver, M. L. (1974) *Phytochemistry* **13**, 1801.
- Stohs, S. J. (1977) *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application* (Barz, W., Reinhard, E. and Zenk, M. H., eds.) Springer-Verlag, Heidelberg p. 142.
- Tschesche, R., Hulphe, H. und Fritz, R. (1968) *Phytochemistry* **7**, 2021.
- Stohs, S. J. und Haggerty, J. A. (1973) *Phytochemistry* **12**, 2869.
- Stohs, S. J. und El-Olemy, M. M. (1971) *J. Steroid Biochem.* **2**, 293.
- Stohs, S. J. und El-Olemy, M. M. (1971) *Phytochemistry* **10**, 2987.
- Heftmann, E. (1974) *Lipids* **9**, 626.
- Smith, A. G. und Brooks, C. J. W. (1976) *J. Steroid Biochem.* **7**, 705.
- Heftmann, E. (1970) *Steroid Biochemistry*. Academic Press, New York.
- Holloway, P. W. (1970) *Lipid Metabolism* (Wakil, S. J., ed.), p. 371. Academic Press, New York.
- Blomstrand, R. und Guertler, J. (1968) *Arkiv Kemi* **30**, 233.
- Smith, L. L., Teng, J. I., Kulig, M. J. und Hill, F. L. (1973) *J. Org. Chem.* **38**, 1763.
- Smith, L. L., Matthews, W. S., Price, J. C., Bachman, R. C. und Reynolds, B. (1967) *J. Chromatogr.* **27**, 187.
- Teng, J. I. und Smith, L. L. (1976) *Bioorganic Chem.* **5**, 99.
- Gamborg, O. L. und Wetter, L. R. (1975) *Plant Tissue Culture Methods*, p. 90. National Research Centre of Canada, Saskatoon, Saskatchewan.
- Smith, A. G. und Brooks, C. J. W. (1974) *J. Chromatogr.* **101**, 373.
- Fieser, L. F. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4377.
- Kates, M. (1972) *Techniques of Lipidology*, p. 350. North Holland, Amsterdam.

Phytochemistry, 1977, Vol. 16, pp. 1851–1852. Pergamon Press. Printed in England.

PHLOROGLUCINOL DERIVATIVES OF *CALLISTEMON LANCEOLATUS* LEAVES

MAURI LOUNASMAA*, H-S. PURI† and CARL-JOHAN WIDÉN‡

*Laboratory for Chemistry of Natural Products, c/o Technical Research Centre, Chemical Laboratory, SF-02150 Espoo 15, Finland; †Pharmacognosy Research Units, Botany Department, Panjab University, Chandigarh 160014, India; ‡Department of Pharmacognosy, University of Helsinki, SF-00170 Helsinki 17, Finland

(Received 25 April 1977)

Key Word Index—*Callistemon lanceolatus*; Myrtaceae; phloroglucinol derivatives; myrtucommulone A.

The shrubs and trees belonging to the family Myrtaceae flourish in the tropics and subtropics of both the old and new worlds. A particularly large number of species are found in Australia and the surrounding archipelago, where some 600 *Eucalyptus* species alone are known. Only one species, *Myrtus communis* L., is known in the Mediterranean area [1]. The leaves of Myrtaceous plants are pitted with schizogenously developed cavities containing essential oils, composed mainly of monoterpenes, sesquiterpenes and cyclic β -triketones [1]. The β -triketones of several species are derivatives of tetramethylated phloroglucinol ring (e.g., flavesone and leptospermone) [2].

From *M. communis* two polycyclic phloroglucinol

derivatives, myrtucommulone A and B, which are structurally related to the phloroglucinol derivatives of *Dryopteris* ferns [3–5], kouso flowers [6–9] and kamala [10], have recently been reported [11]. In connection with our investigation of naturally occurring phloroglucinol derivatives [3–10] we have examined several Myrtaceous plants from India. In the present communication we report results for *Callistemon lanceolatus* *Eucalyptus citriodora*, *Psidium guajava* and *Syzygium cumini*.

Preliminary analysis of these plants (leaves and bark were treated separately) indicated phloroglucinol derivatives only in the leaves of *C. lanceolatus*, which were then further investigated. Isolation of the crude phloroglucinol derivatives by the MgO-method [3–5], followed by column chromatographic purification and recrystallization yielded a small amount of yellow crystals, which melted at 183–185°. These were identical (Mmp, TLC, IR, PMR, MS) with the recently isolated myrtucommulone A* (*vide supra*) for which the structure 1 has been proposed [11].

§Present address: Institute of Pharmaceutical Chemistry, University of Kuopio, SF-70101 Kuopio 10, Finland.

*The authors thank Prof. Y. Kashman, Department of Chemistry, University of Tel-Aviv, for supplying a sample of myrtucommulone A.