

BIOGENESE VON CARDENOLID-GLYCOSIDEN IN *CONVALLARIA MAJALIS*: UMWANDLUNGEN AUF DER MONOGLYCOSIDSTUFE

WOLFGANG KUBELKA*, BRIGITTE KOPP*, KURT JENTZSCH* und HELMUT RUIS†

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

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

(Eingegangen 30 October 1976)

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

Abstract—The sequence periplorhamnoside → convallatoxol → convallatoxin → convalloside, i.e. stepwise oxidation of C-19 followed by glucosidation, is one of the major biosynthetic routes of cardenolide metabolism in *Convallaria majalis*. Two different pathways lead to lokundjoside: one involving 5β-hydroxylation of rhodexin A, the other involving 11α-hydroxylation of periplorhamnoside. Glucosidation takes place mainly with convallatoxin and to a smaller extent with convallatoxol and rhodexin A.

EINFÜHRUNG

Die Cardenolid-Glycoside von *Convallaria majalis* leiten sich-soweit bisher bekannt—von den fünf Geninen Periplogenin (1), Strophanthidol (2), Strophanthidin (3), sowie Sarmentogenin (4) und Bipindogenin (5) ab, die sich entweder in der Oxidationsstufe des C-Atoms 19 unterscheiden oder in der Anzahl bzw. Position der Hydroxylgruppen.

Nur drei dieser Genine (1-3) konnten bisher in sehr kleiner Menge als solche aus *Convallaria* isoliert werden [1], die Hauptmenge liegt in Form von Monoglycosiden (gebunden an Rhamnose, Gulomethylose oder Allomethylose) oder von Diglykosiden (mit endständiger Glucose) vor (Tab. 1).

Um Einblick in den Verlauf der Biogenese der wichtigsten Monoglykoside zu erhalten, hatten wir in

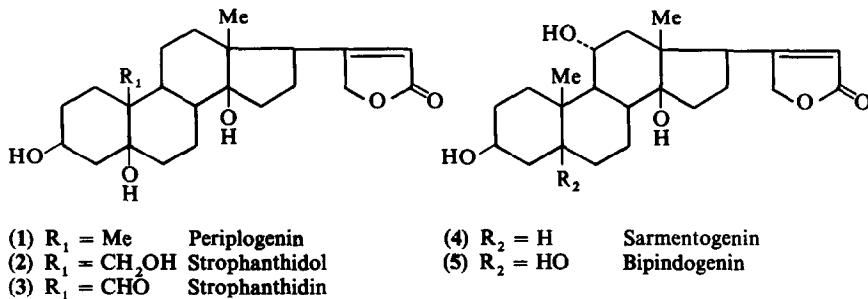


Tabelle 1. Aus *Convallaria majalis* bisher isolierte Reinglycoside bekannter Struktur und ihr Anteil am Gesamt-Cardenolidgehalt [1, 2]

	Rhamnose	Rhamnose + Glucose	Gulomethylose	Allomethylose
Periplogenin	Periplorhamnosid 3%		Perigulosid 2%	Peripallosid 1%
Strophanthidol	Convallatoxol 10-40%	Convallatoxolosid 4-40%	Desglucocheirotoxol 5%	Strophanollosid 2%
Strophanthidin	Convallatoxin 5-40%	Convallosid	Desglucocheirotoxin 3-20%	Strophallosid 1,5%
Sarmentogenin	Rhodexin A 2%	Rhodexosid 2%		
Bipindogenin	Lokundjosid 2-30%			

Es ist bekannt, daß die Glykosid-Zusammensetzung bei einzelnen *Convallaria*-Populationen sehr unterschiedlich sein kann; trotzdem sind zur Orientierung die bisher bekannten Richtwerte angegeben.

einem ersten Versuch eine Verbindung mittlerer Oxidationsstufe, nämlich Convallatoxol, vorgegeben [3]. Als Folgeprodukt ließ sich die oxidierte Verbindung Convallatoxin isolieren; daraus konnte man schließen, daß die Biosynthese von niederen zu höheren Oxidationsstufen verläuft.

Allerdings ist schon früher die Reduktion von Strophanthidin zu Strophanthidol durch den Pilz *Psilocybe semperfervia* [4], bzw. von Convallatoxin zu Convallatoxol durch tierische Enzyme [5, 6] beschrieben worden. Es war daher zu prüfen, ob nicht doch auch in *Convallaria* eine Reaktion in dieser Richtung (Convallatoxin → Convallatoxol) möglich ist; verläuft hingegen die Biosynthese nur über eine schrittweise Oxidation des C-19, so sollte auch die Vorstufe der Reaktion Convallatoxol → Convallatoxin, also der Schritt Periplorhamnosid → Convallatoxol, nachzuweisen sein.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, einen Bildungsweg für Lokundjosid, ebenfalls ein Hauptglycosid von *Convallaria*, aufzufinden. Dazu sollte festgestellt werden, auf welcher Stufe die Hydroxylgruppen an C-5 und C-11 eingeführt werden. Verschiedene Arbeiten [7–9] haben gezeigt, daß die Hydroxylierung von Steroiden an einem nicht aktivierten sekundären C-Atom durch direkten Austausch des Wasserstoffatoms gegen die Hydroxylgruppe erfolgt. Der Einbau der Hydroxylgruppe kann dabei auf verschiedenen Stufen stattfinden: Bei *Digitalis lanata* fanden Tschesche und Mitarb., daß die Hydroxylierung an C-12 auf der Cardenolidstufe möglich ist, die Einführung der Hydroxylgruppe an C-16 aber bereits auf der Pregnanstufe erfolgen muß [10]. Andere Untersuchungen [11, 12] weisen darauf hin, daß Lanatosid A durch Hydroxylierung an C-12 in Lanatosid C übergeführt werden kann, daß also diese Reaktion auf der Stufe der Tetraglycoside verlaufen kann. Bei *Convallaria* sollte zunächst Vorgabe von Periplorhamnosid zeigen, ob die OH-Gruppe an C-11 auf der Monoglycosidstufe eingeführt wird (Periplorhamnosid → Lokundjosid).

Eine Hydroxylierung des tertiären C-5 auf der Monoglycosidstufe (Rhodexin A → Lokundjosid) war eher nicht zu erwarten: Zwar vermögen Pilze (*Absidia orchidis* und *Mucor parasiticus* [13–15], Digitoxigenin in Periplogenin umzuwandeln, d.h. durch Pilzenzyme kann die 5β-OH-Gruppe in Cardenolide ohne Änderung der Konfiguration eingeführt werden. Bei höheren Pflanzen galt aber das Vorliegen einer Doppelbindung an C-5 als Voraussetzung für eine Hydroxylierung an dieser Stelle [16, 17], in *Strophanthus kombé* und *Helleborus niger* findet nämlich die Einführung der 5β-OH-Gruppe bereits auf der C-21-Stufe (Δ^5 -Pregnenol-3β-20-on) durch Wasseranlagerung an die Doppelbindung statt [18–20]. Wir erwarteten daher als Folgeprodukt von Rhodexin A lediglich die glucosidierte Verbindung Rhodexosid.

ERGEBNISSE

Für alle Versuche wurden Glycoside verwendet, die wir aus *Convallaria* isoliert, anschließend durch Tritierung im Laktonring nach Haberland und Mitarb. [21] markiert* und durch präparative Papierchromatographie

gereinigt hatten. Die Lösung der markierten Präkursoren wurde Ende April in 2–8 Blätter von *Convallaria* einsaugen gelassen; 8–14 Tage später arbeiteten wir das Material auf und ermittelten die Menge der gebildeten Folgeprodukte, deren Identifizierung durch Papier- und Dünnschichtchromatographie mit mehreren Fließmitteln, zusätzlich durch enzymatische Spaltung oder Acetylierung vorgenommen wurde.

Glucosidierung von Convallatoxin

Eine wässrige Lösung von 15 mg Convallatoxin-³H (10,34 mCi/mMol, entsprechend $6,44 \times 10^8$ dpm) wurde zur Applikation an acht *Convallaria*-Blätter verwendet. Nach 10-tägigem Stoffwechsel ließ sich radiochromatographisch außer nicht umgesetztem Convallatoxin nur eine stärker polare Substanz, nämlich Convallosid, nachweisen ($1,25 \times 10^8$ dpm, entsprechend 19,5% der eingesetzten Convallatoxin-³H-Menge), die Zone von Convallatoxol wies keine Aktivität auf.

Folgeprodukte von Convallatoxol

Nach der Applikation von Convallatoxol-³H (32,5 mCi/mMol, entsprechend $4,74 \times 10^7$ dpm) hatten wir Convallatoxin ($3,03 \times 10^6$ dpm, entsprechend 6,4% Einbau) nachweisen können [3]; daneben zeigte eine Zone mit dem R_f -Wert von Convallosid bzw. Convallatoxolosid Aktivität ($4,4 \times 10^5$ dpm, entsprechend 1% der eingesetzten Menge). Da sich diese beiden Diglycoside chromatographisch schlecht trennen lassen, war eine eindeutige Identifizierung zunächst nicht möglich. Enzymatischer Abbau des Gemisches mit β -Glucosidase lieferte aber Convallatoxin und Convallatoxol im Verhältnis 2:1. Dieses Ergebnis läßt erkennen, daß Convallatoxol nicht nur zu Convallatoxin oxydiert, sondern zu einem geringen Teil (ca 0,35%) auch zu Convallatoxolosid glucosidiert wird.

Periplorhamnosid: Präcursor von Convallatoxol und Lokundjosid

Applikation von 15,3 mg Periplorhamnosid-³H (1,43 × 10^9 dpm, entsprechend 23,06 mCi/mMol) an acht *Convallaria*-Blätter lieferte nach 14 Tagen auf dem Papierchromatogramm fünf radioaktive Zonen mit den R_f -Werten von Periplorhamnosid, Convallatoxol, Convaltoxin, Lokundjosid und Glucoperiplorhamnosid. Die Aktivität des isolierten Convallatoxol-³H betrug $2,35 \times 10^7$ dpm, entsprechend einer Einbaurate von 1,7% Convallatoxin-³H war in geringerer Menge gebildet worden; die Einbaurate entsprach 0,12% des verabreichten Periplorhamnosids ($1,76 \times 10^6$ dpm), bzw. 6,0% bezogen auf die direkte Vorstufe Convallatoxol.

Die Zone von Lokundjosid zeigte $3,64 \times 10^6$ dpm, entsprechend 0,26% der eingesetzten Periplorhamnosid-³H-Menge. Das Verhältnis der Einbauraten von Periplorhamnosid für Convallatoxol (1,7%) und für Lokundjosid (0,26%) entspricht ungefähr der prozentuellen Beteiligung dieser Glycoside am Gesamtcardenolidgehalt der verwendeten Pflanzen, bei denen Lokundjosid ca 5% Convallatoxol aber etwa 25% des Gesamtgehaltes ausmachte.

Das Papierchromatogramm wies weiters Aktivität auf der Höhe von Glucoperiplorhamnosid auf (ca 4×10^5 dpm, also weniger als 0,03% der eingesetzten Menge an Periplorhamnosid-³H). Aus Mangel an Glucoperiplorhamnosid konnte aber eine sichere Identifizierung in diesem Fall nicht durchgeführt werden.

* Nur Convallatoxol wurde durch Reduktion von Convallatoxin mit NaBT₄ und durch Photoassimilation mit ¹⁴CO₂ hergestellt.

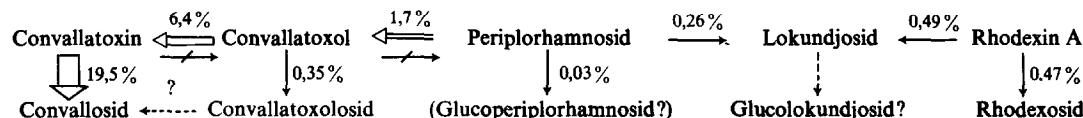
Rhodixin A: Hydroxylierung zu Lokundjosid, Glucosidierung zu Rhodexosid

Vorgabe von Rhodixin A-³H (5,6 mg, entsprechend 8,69 mCi/mMol bzw. $2,02 \times 10^8$ dpm) an acht *Convallaria*-Blätter führte scheinbar nur zu einem einzigen Folgeprodukt mit dem R_f -Wert von Rhodexosid. Mehrfache Papier- und Dünnschichtchromatographie erlaubte jedoch eine Auftrennung in zwei Substanzen: Lokundjosid ($9,75 \times 10^5$ dpm, entsprechend 0,49% Einbau) und Rhodexosid ($9,45 \times 10^5$ dpm, entsprechend 0,47% Einbau).

DISKUSSION

Unsere Ergebnisse brachten zunächst den Nachweis, daß in *Convallaria majalis* aus Periplorhamnosid durch schrittweise Oxidation an C-19 Convallatoxol und Convallatoxin gebildet werden, daß also die Folge $\text{CH}_3 \rightarrow \text{CH}_2\text{OH} \rightarrow \text{CHO}$ auf der Monoglycosidstufe einen Hauptweg der Biosynthese darstellt; eine Reaktion in umgekehrter Richtung ließ sich nicht beobachten. Periplorhamnosid nimmt bei der Biogenese der *Convallaria*-Glycoside eine Schlüsselstellung ein: es ist nicht nur Vorläufer von Convallatoxol, sondern auch von Lokundjosid, das daraus durch α -Hydroxylierung des C-11 entsteht.

Ein zweiter Bildungsweg für Lokundjosid ließ sich—eher unerwartet—mit dem Befund nachweisen, daß Lokundjosid auch durch Hydroxylierung von Rhodixin A in Stellung 5 gebildet werden kann; *Convallaria* verfügt demnach offenbar wie gewisse Pilze über ein Enzymsystem, das den Austausch von Wasserstoff gegen Hydroxyl am tertiären C-5 ermöglicht. In weiteren Versuchen müßten daher vor allem Vorläufer von Periplorhamnosid und Rhodixin A gesucht werden.



Schema 1. Biosynthesewege in *Convallaria majalis*.

Die Glucosidierung der besprochenen Monoglycoside verläuft mit sehr unterschiedlichen Ausbeuten: Periplorhamnosid wird—wenn überhaupt—nur in sehr geringem Ausmaß zu Glucoperiplorhamnosid umgesetzt; dieses Ergebnis steht im Einklang damit, daß unsere Versuche, Glucoperiplorhamnosid in *Convallaria* nachzuweisen, bisher negativ verlaufen sind.

Obwohl auch Convallatoxol nur zu einem kleinen Teil glucosidiert wird (fast die 20-fache Menge wird durch Oxidation in Convallatoxin übergeführt), dürfte dies der Hauptweg für die Entstehung von Convallatoxolosid sein. Die hohe Einbaurate von Convallatoxin in Convallosid weist darauf hin, daß Convallosid in der Hauptsache aus Convallatoxin durch Glucosidierung entsteht; man kann aber nicht ausschließen, daß daneben kleine Mengen von Convallosid durch Oxidation von Convallatoxolosid gebildet werden. Die Folge Periplorhamnosid → Convallatoxol → Convallatoxin → Convallosid stellt somit einen der wichtigsten Biosynthesewege der Cardenolate in *Convallaria* dar.

Rhodixin A wird etwa in gleicher Menge zu Lokundjosid hydroxyliert und zu Rhodexosid glucosidiert. Für

Lokundjosid stehen Ergebnisse noch aus; Glucosidierung ist tauch hier zu erwarten, da Glucolokundjosid zwar noch nicht isoliert, aber chromatographisch bereits nachgewiesen werden konnte.

EXPERIMENTELLES

Für die PC wurde Papier Schleicher & Schüll 2043 b MgI 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 (4:1); (c) Toluol-*n*-BuOH (2:1), wassergesättigt, 35% stationäre Phase. (d) $\text{CHCl}_3-\text{THF}-\text{HCONH}_2$ (100:100:13) [22]; (e) C_6H_6 , gesättigt mit HCONH_2 , Papier 5 Min in $\text{HCONH}_2-\text{Me}_2\text{CO}$ (1:4) imprägniert. TLC: Si gel G Merck; Systeme: (f) $\text{CHCl}_3-\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ (7:3:1), Unterphase. (g) $\text{CHCl}_3-\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$ (9:1:1), Unterphase. Die Auszählung der radioaktiven Zonen erfolgte mit Hilfe eines 4 π -Papierchromatogramm-Scanners der Fa. Tracerlab bzw. nach Auskratzen vom TLC in Aquasol (New England Nuclear) im Flüssigzintillationszähler (Fa. Beckman LS-230).

Tritiierung [21] von Rhodixin A. 14,0 mg kristallines und chromatographisch reines Rhodixin A wurden in 0,5 ml DMF gelöst und 65 μl tritiertes Wasser (Radiochemical Centre, Amersham, 5Ci/ml) gesetzt. Als basischen Katalysator verwendeten wir 0,3 ml Triäthylamin. Das Reaktionsgemisch wurde 6 Stunden im verschlossenen Gefäß auf 70° erhitzt. Nach dem Abkühlen neutralisierten wir mit 0,6 N HOAc, brachten die Lösung unter verminderter Druck zur Trockene und reinigten den Rückstand durch PC (System a). Auszählung mittels PC-Scanner ergab $5,05 \times 10^8$ dpm, entsprechend 16,21 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ Rhodixin A.

Markierung von Periplorhamnosid und Convallatoxin. Erfolgte ebenfalls nach der oben angegebenen Vorschrift unter Berücksichtigung der Mengenverhältnisse.

Verabreichung der markierten cardenolate, Isolierung der Folgeprodukte. Wie in [3] angegeben.

Acetylierung von Lokundjosid-³H. Den nach Elution vom PC erhaltenen Rückstand lösten wir in 0,4 ml $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$ p.A., versetzten mit 0,3 ml Ac_2O p.A. und ließen das Reaktionsgemisch 48 Stunden bei Zimmertemperatur verschlossen stehen. Anschlie-

ßend wurde unter verminderter Druck zur Trockene eingedampft und der Rückstand über H_2SO_4 conc. im Exsiccator belassen, bis der Geruch nach $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$ verschwunden war. Das Rohacetat wurde—gelöst in $\text{CHCl}_3-\text{MeOH}$ (1:1)—für PC und TLC verwendet.

Enzymatische Spaltung mit β -Glucosidase [23]. Das isolierte Diglycosid lösten wir in 0,5 ml Acetatpuffer vom pH = 4,99 nach Walpole [24] (eine Mischung von gleichen Teilen 0,06 N HOAc und 0,14 N NaOAc-Lösung), fügten 2,5 mg β -Glucosidase zu und ließen die Lösung verschlossen bei 30° stehen. Nach 48 Stunden wurde mit dem gleichen Volumen EtOH versetzt und 3 Min im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Filtration dampften wir den EtOH ab, setzten 3 ml H_2O zu und extrahierten das Cardenolid durch Ausschütteln mit 3 mal 5 ml CHCl_3 -EtOH (9:1). Der Rückstand der organischen Phase wurde für die PC verwendet.

Identifizierung der Folgeprodukte. Convallosid aus Convallatoxin: die Identität des isolierten Convallosids-³H wurde durch PC des Diglycosides (System a, Laufzeit 30 Stunden) sowie des nach enzymatischer Spaltung mit β -Glucosidase erhaltenen Convallatoxins-³H (System d, Laufzeit 16 Stunden) sichergestellt.

Convallosid und Convallatoxolosid aus Convallatoxol. Die Identifizierung der beiden Diglykoside erfolgte durch PC (System a, Laufzeit 30 Stunden). Die PC der nach enzymatischer

Spaltung mit β -Glucosidase resultierenden Monoglycoside Convallatoxin und Convallatoxol erfolgte im System d und nach erneuter Elution im System c.

Convallatoxol aus Periplorhamnosid. Das isolierte Convallatoxol- 3 H chromatographierten wir im System d, nach anschließender Elution im System a und nach erneuter Elution im System c, um die Identität des Folgeproduktes zu sichern.

Lokundjosid aus Periplorhamnosid. Durch PC im System d und —nach erneuter Elution—in System a konnte das Folgeprodukt eindeutig als Lokundjosid identifiziert werden. Ein Teil des erhaltenen Präparates (2×10^6 dpm) wurde anschließend acetyliert und die Identität des hergestellten Lokundjosid- 3 H-acetates durch PC im System e sowie durch TLC im System g gesichert.

Lokundjosid aus Rhodexin A. Die Identifizierung von Lokundjosid- 3 H (und gleichzeitige Abtrennung von Rhodexosid- 3 H) erfolgte durch TLC im System f und PC im System d. Zur Sicherung der Identität wurde die Lokundjosid-Zone mit MeOH eluiert, der Rückstand (9×10^5 dpm) acetyliert und das Reaktionsprodukt im System e und nach Elution im System g chromatographiert.

Rhodexosid aus Rhodexin A. Die Identität von Rhodexosid- 3 H wurde durch PC im System d sowie durch PC des nach enzymatischer Spaltung mit β -Glucosidase erhaltenen Rhodexin A- 3 H im System b und nach erneuter Elution im System a gesichert.

REFERENCES

- Kubelka, W., Kopp, B. und Jentzsch, K. (1975) *Pharm. Acta Helv.* **50**, 353.
- Kubelka, W. (1971) *Planta Med.* **19**, 153.
- Kubelka, W., Kopp, B., Jentzsch, K. und Ruis, H. (1974) *Phytochemistry* **13**, 1805.
- Weiss-Berg, E. und Tamm, Ch. (1963) *Helv. Chim. Acta* **46**, 2435.
- Lauterbach, F. (1964) *Arch. Exp. Path. Pharmak.* **247**, 71.
- Zathurecky, L., Krupa, V. und Rochova, M. (1966) *Pharmazie* **21**, 322.
- Varma, K. R. und Caspi, E. (1970) *Phytochemistry* **9**, 1539.
- Hayano, M. (1962) *Oxygenases* (Hayaishi O. ed.). Academic Press, New York.
- Aberhart, D. J., Lloyd-Jones, J. G. und Caspi, E. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1065.
- Tschesche, R., Becker, R. und Hombach, R. (1968) *Z. Naturforsch.* **23b**, 1615.
- Nánási, P., Lenkey, B. und Tétényi, P. (1974) *Planta Med.* **26**, 359.
- Wichtl, M. und Freier, R. (1976) *Oesterr. Apotheker Ztg.* **30**, 275.
- Nozaki, Y., Masuo, E. und Sato, D. (1962) *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* **26**, 399.
- Nozaki, Y. (1961) *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)* **25**, 515 und 879.
- Ishii, H. (1961) *J. Pharm. Soc. (Jap.)* **81**, 153.
- Tschesche, R. und Brassat, B. (1965) *Z. Naturforsch.* **20b**, 707.
- Tschesche, R. (1972) *Proc. R. Soc. Lond. B.* **180**, 187.
- Sauer, H. H., Bennett, R. D. und Heftmann, E. (1968) *Phytochemistry* **7**, 1534.
- Sauer, H. H., Bennett, R. D. und Heftmann, E. (1969) *Phytochemistry* **8**, 69.
- Tschesche, R., Scholten, H. und Peters, M. (1969) *Z. Naturforsch.* **24b**, 1492.
- Haberland, G. und Maerten, G. (1969) *Naturwissenschaften* **56**, 516.
- Kaiser, F. (1955) *Chem. Ber.* **88**, 556.
- Stamm, O. A. (1963) *Helv. Chim. Acta* **46**, 3008.
- Walpole, G. S. (1914) *J. Chem. Soc.* **105**, 2501.