

ZUR BIOGENESE DES AZA-OXA-SPIRAN-SYSTEMS DER STEROIDALKALOIDE VOM SPIROSOLAN-TYP IN SOLANACEEN*

RUDOLF TSCHESCHE und MANFRED SPINDLER

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, Max-Planck-Straße 1, D-5300 Bonn

(Received 5 July 1977)

Key Word Index—*Solanum dulcamara*; *S. laciniatum*; Solanaceae; soladulcidine; solasodine; biosynthesis; steroidal alkaloids.

Abstract— $5\alpha,6\text{-}^3\text{H}_2$ -Solacongestidine und $5\alpha,6\text{-}^3\text{H}_2$ -(22S)-dihydrosolacongestidine administered to *Solanum dulcamara* as well as $16\text{-}^3\text{H}_2$ -(22S:25R)-22,26-epimino-cholest-5-en-3 β -ol (25-isodihydroverazine) und $7\alpha\text{-}^3\text{H}$ -(22S:25R)-22,26-epimino-cholest-5-en-3 β ,16 β -diol administered to *Solanum laciniatum* were converted to coladulcidine and solasodine, respectively. These results are discussed in relation to spirosolane alkaloid biosynthesis.

EINFÜHRUNG

Alle bisher gefundenen Steroidalkaloide vom Spirosolan-Typ, zu denen z.B. das Solasodin (1), das Soladulcidin (2) und das Tomatidin (3) gehören, enthalten die C-27-Methylgruppe in äquatorialer Position. Im Gegensatz dazu kommen bei den analog aufgebauten Spirostanol-Sapogeninen sowohl äquatoriale (z.B. Diosgenin (4)) wie axiale (z.B. Yamogenin (5)) Positionen vor. In den letzten Jahren wurden eine Reihe von C-27-Steroidalkaloiden gefunden, die durch ein 22,26-Epimino-cholestan-Gerüst charakterisiert sind, z.B. Solacongestidin (6) [1], Veralosidin (7) [2a, b], Verazin (8) [3], Solaphyllidin (9) [4] und Teinemin (10) [5], bei denen sich die C-27-Methylgruppe ebenfalls in äquatorialer Lage befindet. In diesem Zusammenhang ist die Hypothese geäußert worden [6], daß sich bei der Biosynthese der Spirosolanoide zunächst der F-Ring schließt, und zwar in der Weise, daß die C-27-Methylgruppe stets in die energieärmere äquatoriale Position orientiert wird, und erst anschließend Cyclisierung von Ring E unter Bildung des Aza-Oxa-Spiran-Systems erfolgt.

Dies wird unterstützt durch das Auftreten von Stereoisomerie an C-22. So ist die 22(N)-Bindung bei 25R-Konfiguration α -ständig (z.B. 22R:25R im Soladulcidin), bei 25S-Konfiguration jedoch β -ständig orientiert (z.B. 22S:25S im Tomatidin).

Die bisherigen Ergebnisse zur Spirosolanol-Biogenese sprechen dafür, daß die Funktionalisierung der Seitenkette des Cholesterols mit Einführung einer Hydroxygruppe an C-26 beginnt, da die (25R)- bzw. (25S)-Hydroxy- 5α -cholestanole jeweils stereospezifisch zu Soladulcidin [7] bzw. Tomatidin [8] umgewandelt wurden, während 16 β -Hydroxy- 5α -cholestanol [9], 22-Keto- 5α -cholestanol [10] und 16 β -Hydroxy-22-keto- 5α -cholestanol [11] nicht metabolisiert wurden.

In diesem Zusammenhang sei auf die Isolierung von aussagekräftig ist. Die sich dabei ergebende Prioritätenfolge ist in Schema 1 zusammengefaßt.

Cholesterol-Derivaten aus *S. tuberosum* [12] und *Veratrum grandiflorum* [13] durch Kaneko und auf jüngste Untersuchungen der Biosynthese von Tomatidin und Solanidin bzgl. des 16 β -H-Atoms durch Canonica [14] verwiesen.

Ob nun tatsächlich eine primäre Cyclisierung des F-Ringes im Verlauf der Biogenese der Spirosolan-Alkaloide erfolgt, wurde durch Applikation von $5\alpha,6\text{-}^3\text{H}_2$ -markiertem Solacongestidin (11) und (22S)-Dihydrosolacongestidin (12) an *S. dulcamara* sowie von $16\text{-}^3\text{H}_2$ -(22S:25R)-22,26-Epimino-cholest-5-en-3 β -ol ((22S)-25-Isodihydroverazin) (13) und von $7\alpha\text{-}^3\text{H}$ -(22S:25R)-22,26-Epimino-cholest-5-en-3 β ,16 β -diol (14) an *S. laciniatum* überprüft.

Die Precursor wurden nach Adam u.a. [15] synthetisiert und durch katalytische Tritiierung der C=C—Doppelbindung (11 und 12), durch Desulfurierung des 16-Thioketals (13) sowie durch $7\alpha\text{-Br}/^3\text{H}$ -Austausch (14) markiert.

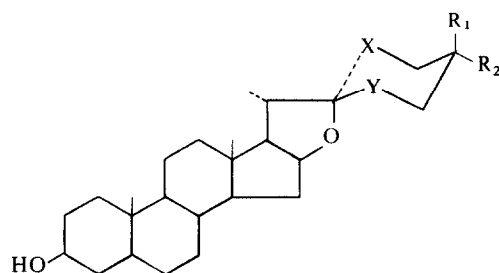
ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Alle angebotenen Precursor wurden—in unterschiedlichem Maß—von *S. dulcamara* zu Soladulcidin bzw. von *S. laciniatum* zu Solasodin metabolisiert (Tabelle 1). Um die biosynthetische Leistung der Pflanzen während der (zu verschiedenen Zeiten durchgeführten) Applikationsversuche zu kontrollieren, wurde jeweils $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Cholesterol (von gleicher spezifischer Aktivität) als Standardprecursor coappliziert. Die dabei beobachteten Unterschiede zeigen, daß ein Vergleich der Einbauraten der ^3H -Precursor nur in Relation zu ^{14}C -Cholesterol aussagekräftig ist. Die sich dabei ergebende Prioritätenfolge ist in Schema 1 zusammengefaßt.

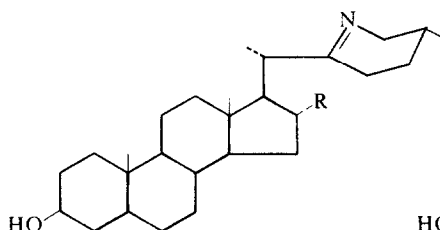
Auch wenn ein quantitativer Vergleich nur mit Vorbehalt möglich ist, sprechen die Ergebnisse deutlich für eine—nach Funktionalisierung der Seitenkette des Cholesterols—primäre Bildung von Ring F des Aza-Oxa-Spiran-Systems der Spirosolan-Alkaloide.

Die relativen Einbauraten deuten darauf hin, daß die 16 β -Hydroxy-Gruppe unmittelbar vor der Cyclisierung

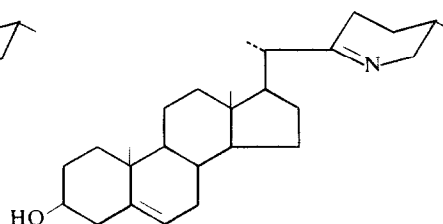
*Mitteilung 23. 'Zur Biosynthese von Steroidderivaten im Pflanzenreich'. Mitt. 22. Tschesche, R., Goossens, B. und Töpfer, A. (1976) *Phytochemistry* 15, 1387.



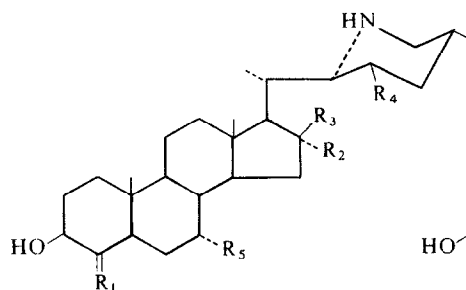
- (1) Δ^5 ; X = NH; Y = CH₂; R₁ = H; R₂ = Me
 (2) 5α H; X = NH; Y = CH₂; R₁ = H; R₂ = Me
 (3) 5α H; X = CH₂; Y = NH; R₁ = H; R₂ = Me
 (4) Δ^5 ; X = O; Y = CH₂; R₁ = H; R₂ = Me
 (5) Δ^5 ; X = O; Y = CH₂; R₁ = Me; R₂ = H



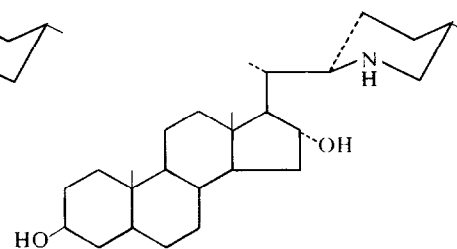
- (6) 5α H; R = H
 (7) Δ^5 ; R = OH
 (11) $5\alpha,6$ -³H₂; R = H



(8)



- (9) 5α H; R₁ = O; R₂ = OAc; R₃ = H; R₄ = OH; R₅ = H
 (12) $5\alpha,6$ -³H₂; R₁ = H₂; R₂ = H; R₃ = H; R₄ = H; R₅ = H
 (13) Δ^5 ; R₁ = H₂; R₂ = ³H; R₃ = ³H; R₄ = H; R₅ = H
 (14) Δ^5 ; R₁ = H₂; R₂ = H; R₃ = OH; R₄ = H; R₅ = ³H

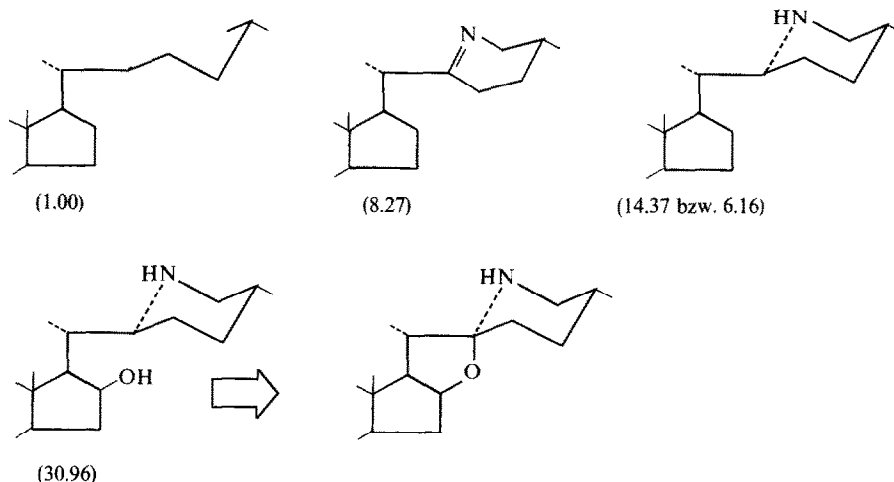


(10)

Tabelle 1

Appl. Precursor	Resorb. ³ H-Aktiv. (dpm)	Spezif isoliert. (dpm/mMol)	Aktiv. d. Zielprod.s ³ H-Prec. s. (%)	Absol. Einbaurate des ¹⁴ C-Prec.s (%)	³ H-Einbaurate/ ¹⁴ C-Einbaurate
Applikationen an <i>S. dulcamara</i> :					
$5\alpha,6$ - ³ H ₂ -Solacongestidin (11)	2.4·10 ⁹	1.3·10 ⁶ (Sd)	0.00918	0.00111	8.27
$5\alpha,6$ - ³ H ₂ -Dihydrosolacongestidin (12)	4.6·10 ⁹	8.8·10 ⁶ (Sd)	0.07101	0.01153	6.16
Applikationen an <i>S. laciniatum</i> :					
16- ³ H ₂ -(22S:25R)-22,26-Epimino-cholest-5-en-3 β -ol (13)	3.1·10 ⁸	6.1·10 ⁵ (Ss)	0.41714	0.02902	14.37
7 α - ³ H-(22S:25R)-22,26-Epimino-cholest-5-en-3 β -16 β - diol (14)	9.5·10 ⁸	7.7·10 ⁶ (Ss)	0.32226	0.01041	30.96

(Sd = Soladulcidin; Ss = Solasodin).



Schema 1.

zum Spiran-system eingeführt wird. Dies entspricht den bisherigen Ergebnissen zur Hydroxylierung der 16 β -Position bei den Steroidalkaloiden.

Der in Relation zu Cholesterol annähernd gleich große Einbau des Solacongestidins wie des Dihydrosolacongestidins und des 25-Isodihydroverazins lassen eine biogenetische Priorität nicht erkennen. Der deutliche Einbau des Solacongestidins zeigt aber des intermediäre Auftreten eines sp²-Hybrids an C-22 an. Dies ist möglicherweise von Bedeutung für die Ausbildung der an C-22 zutreffenden Stereoisomerie, da ein sp²-Hybrid geeigneter erscheint, eine stereospezifische Cyclisierung zu ermöglichen.

Auf Grund dieser Ergebnisse sowie im Zusammenhang mit den natürlich vorkommenden Steroidalkaloiden des entsprechenden Typs erscheint die primäre Cyclisierung zu 22,26-Epimino-cholestan-Verbindungen biogenetisch vorherrschend. Der von uns früher gefundene Einbau eines (25*R*)-26-Aminofurostanols in Solasodin durch *S. laciniatum* [16] dürfte eher einen Nebenweg darstellen, der nach Oxidation zum 22-Hydroxy-Derivat und Cyclisierung zum Solasodin führt.

Der relativ schwache absolute Einbau des Solacongestidins und des Dihydrosolacongestidins wie auch des Cholesterols in Soladulcin durch *S. dulcamara* beruht darauf, daß die untersuchten Pflanzen nur wenig Soladulcin synthetisierten. Soweit dies lediglich in den Wurzeln vorlag [17], haben zusätzliche Transportwege die Einbaurate ohnehin vermindert.

Die Cyclisierung zum 22,26-Epimino-cholestan-System kann auf verschiedene Weise erfolgen. Untersuchungen zur Klärung dieser Frage sind in unserem Arbeitskreis in Vorbereitung. Die sich auf Grund der bisherigen Ergebnisse abzeichnende Biogenese-folge ist im Schema 2 zusammengefaßt.

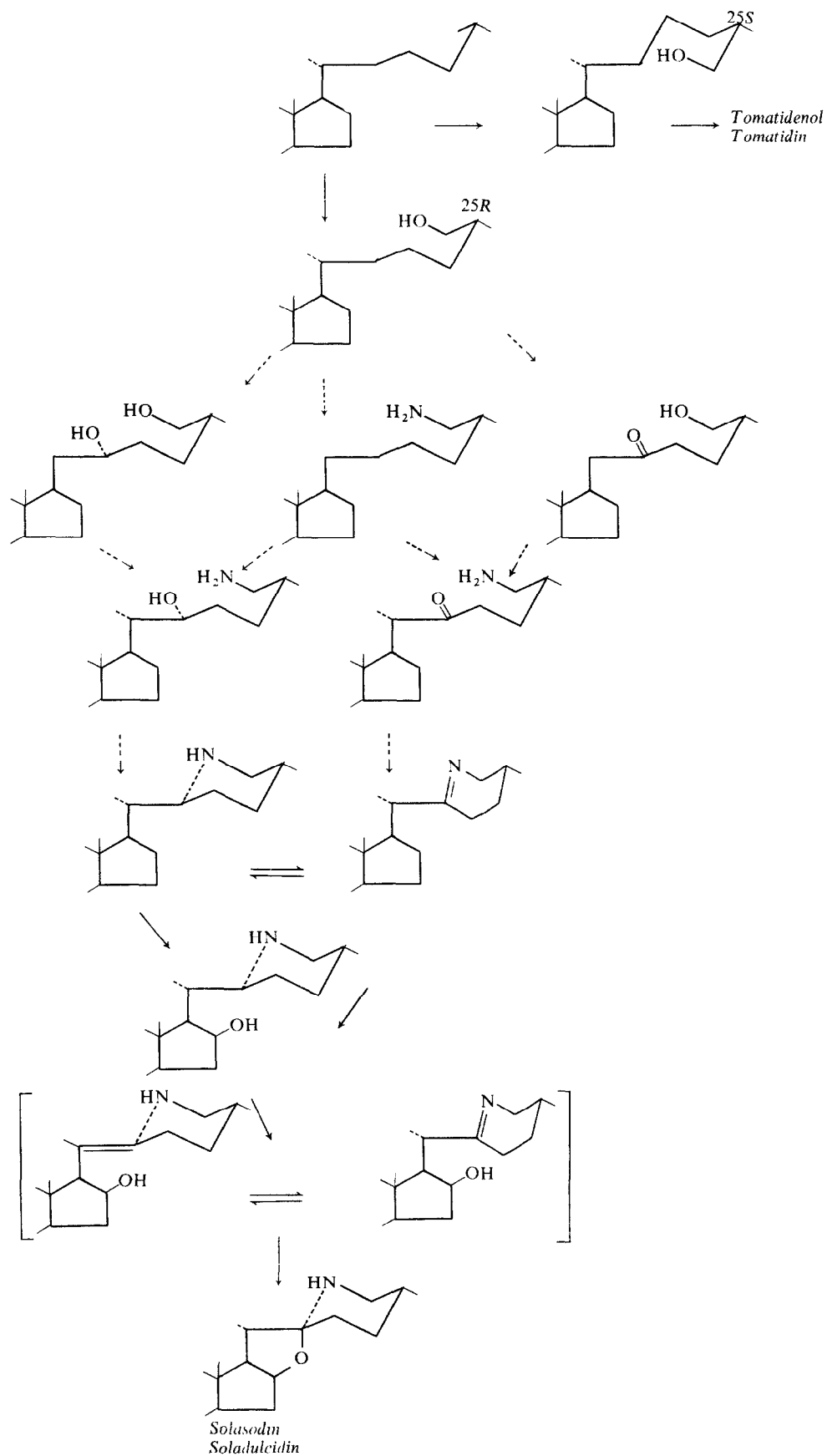
EXPERIMENTELLER TEIL

Die Aktivitätsmessung erfolgte mit dem Flüssigszintillationszähler SL 4000 der Fa. Intertechnique (mit eingebautem Rechner). Als Szintillationsflüssigkeit wurde eine Lösung von 5 g PPO und 0.1875 g POPOP in 2.5 l Toluol (Merck 8317) verwendet. Die physikalischen Daten der synthetisierten Substanzen stimmten mit den von Adam [15] angegebenen überein.

Das als Endprodukt erhaltene Solacongestidin war mit einer Probe der von Y. Sato aus *Solanum congestiflorum* isolierten natürlichen Substanz nach DC, Misch-F.p. und MS identisch. Die Markierungen wurden von der Fa. Amersham Buchler, Braunschweig, durchgeführt. Zur Addition an die C=C-Doppelbindung wurde 5,6-Dehydro-(22*S*)-dihydrosolacongestidin in Dioxan gelöst und bei RT und Atmosphärendruck mit Pd/C (10%) tritiert. Aus dem radioaktiven Produkt wurde durch N-Chlorierung und anschließende HCl-Abspaltung mit Diazabicycloundecen [18] das markierte Solacongestidin hergestellt. Zur Desulfurierung wurde das bei der Synthese entstehende (22*S*,25*R*)-22,26-Acetylepimino-cholest-5-en-3 β -ol-16-on-thioetheral eingesetzt. Wie üblich hergestellter Ra/Ni der Aktivität W2 wurde 2 Tage mit ³H₂ ausgetauscht, bevor die Tritierung durchgeführt wurde. Anschließend Verseifung der N-Acetylgruppe [19] lieferte (13). Zur Markierung in 7 α -Position wurde das (22*S*:25*R*)-3 β ,16 β -Diacetoxy-22,26-acetylepimino-cholest-5-en mit N-Bromsuccinimid in Allylstellung bromiert und das getrocknete Produkt sofort zur Tritierung an Pd/CaCO₃ (5%) in Essigester eingeschickt. Verseifung mit methanolischer KOH lieferte (14). Die erhaltenen ³H-markierten Substanzen wurden chromatographisch gereinigt und Identität mit inaktivem Material festgestellt. Das 4-¹⁴C-Cholesterol (spezifische Aktivität > 50 mCi/mMol) wurde käuflich erworben.

Pflanzenversuche. Die radioaktiven Precursor wurden, in wenig Ethanol gelöst, auf die von der Wachsschicht befreiten Blätter aufgetragen und mit Siliconöl/Petrol (1:1) fixiert. Nach 4 wöchigem Wachstum wurde das gesamte Pflanzenmaterial incl. Wurzeln wie beschrieben [7] aufgearbeitet. Die Reinigung der Aglykone erfolgte bei der Aufarbeitung des *S. dulcamara*-Extraktes zusätzlich über gleichmäßig mit AgNO₃-haltigem Kieselgel (Merck PF₂₅₄) beschichtete Platten zur Abtrennung begleitender Steroidalkaloide [20]. Die isolierten Aglykone wurden mit authentischer Vergleichssubstanz jeweils bis zur Aktivitätskonstanz kokristallisiert. Das Saatgut für *S. dulcamara* wurde vom Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn und für *S. laciniatum* vom Zentralinstitut für Genetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben, DDR, zur Verfügung gestellt.

Anmerkungen.—Wir danken Herrn Dr. D. F. Johnson, National Institute of Health, Bethesda, für die freundliche Überlassung der Vergleichssubstanz aus dem Nachlaß von Dr. Y. Sato. Herrn Prof. Dr. H. Kating, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn, danken wir für die Erlaubnis zur Benutzung des Gewächshauses sowie Herrn Gärtnermeister Echtle für die Hilfe bei der Aufzucht der Pflanzen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.



Schema 2.

LITERATUR

1. Sato, Y., Sato, Y., Kaneko, H., Bianchi, E. und Kataoka, H. (1969) *J. Org. Chem.* **34**, 1577.
- 2a. Khashimov, A. M., Shakirov, R. und Yunusov, S. Yu. (1970) *Khim. Prir. Soedin.* **6**, 339; (b) Ubaidullaev, K. A., Shakirov, R. und Yunusov, S. Yu. (1974) *Khim. Prir. Soedin.* **10**, 678; vgl. Harrison, D. M. (1976) *Alkaloids* **6**, 285.
3. Adam, G., Schreiber, K., Tomko, J. und Vassova, A. (1967) *Tetrahedron* **23**, 167.
4. Usubillaga, A., Seelkopf, C., Karle, J. L., Daly, J. W. und Witkop, B. (1970) *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 700.
5. Kaneko, K., Seto, H., Motoki, C. und Mitsuhashi, H. (1975) *Phytochemistry* **14**, 1295.
6. Schreiber, K. (1968) *The Alkaloids* (Manske, R. H. F. ed.) Vol. X, p. 1. Academic Press, New York.
7. Tschesche, R., Goossens, B. und Töpfer, A. (1976) *Phytochemistry* **15**, 1387.
8. Ronchetti, F., Russo, G., Ferrara, G. und Vecchio, G. (1975) *Phytochemistry* **14**, 2423.
9. Tschesche, R. und Leinert, J. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1619.
10. Tschesche, R., Hulpke, H. und Fritz, R. (1968) *Phytochemistry* **7**, 2021.
11. Töpfer, A. (1975) Dissertation Universität Bonn.
12. Kaneko, K., Terada, S., Yoshida, N. und Mitsuhashi, H. (1977) *Phytochemistry* **16**, 791.
13. Kaneko, K., Tanaka, M. W. und Mitsuhashi, H. (1977) *Phytochemistry* **16**, 1247.
14. Canonica, L., Ronchetti, F., Russo, G. und Sportoletti, G. (1977) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 286.
15. Adam, G., Voigt, D. und Schreiber, K. (1971) *J. Prakt. Chem.* **313**, 45.
16. Tschesche, R. und Piestert, G. (1975) *Phytochemistry* **14**, 435.
17. Rönsch, H. und Schreiber, K. (1966) *Ann. Chem.* **694**, 169.
18. Havel, M. und Černý, V. (1975) *Coll. Czech. Chem. Commun.* **40**, 3199.
19. Tschesche, R. und Spindler, M. (1978) *Chem. Ber.* im Druck.
20. Rozumek, K.-E. (1969) *J. Chromatog.* **40**, 97.