

ZUR BIOSYNTHESE VON STEROIDDERIVATEN IM PFLANZENREICH—X.¹

ZUR SPIROSTANOL-BIOGENESE AUS Δ^4 -CHOLESTENON UND AUS ANDEREN MÖGLICHEN VORSTUFEN

RUDOLF TSCHESCHE, HERWIG HULPKER und RAINER FRITZ

Aus dem Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn

(Received 15 May 1968)

Abstract—Labelled 22-oxocholesterol or 22-(ξ)-hydroxycholesterol are not converted, in *Digitalis* plants, to tigogenin or gitogenin. 3(α)-T-desmosterol gives radioactive cholesterol, but not labelled spirostanols, while 4- ^{14}C -cholesteneone forms radioactive tigogenin and gitogenin. The biosynthesis of the spirostanols has to pass therefore through the 3-keto form. Tigogenin is metabolized little and forms, in *Digitalis* plants, no gitogenin and, in tomato plants, no tomatidine.

EINFÜHRUNG

Tschesche und Hulpke² konnten vor einiger Zeit nachweisen, daß Cholesterin in Form des Glucosids von *Digitalis lanata* in die Spirostanole Tigogenin und Gitogenin (II) und von Tomaten³ bzw. Kartoffel-Pflanzen⁴ in die Steroidalkaloide Tomatidin bzw. Solanidin eingebaut werden kann. Bennett und Heftmann⁵ erhielten mit freiem Cholesterin das gleiche Ergebnis für Spirostanole mit *Dioscorea* Pflanzen. Durch diese Versuche blieb die Frage unbeantwortet, auf welcher Stufe die Einführung der Sauerstofffunktionen an C-16, C-22 und C-27 in die Spirostanole erfolgt (I).

Der Abbau der Cholesterin-Seitenkette und die Bildung von Pregnenolon sind die entscheidenden Schritte bei der Biosynthese der Steroidhormone im tierischen Organismus. Dorfman und Mitarb.⁶ konnten feststellen, daß 3 α -T-22-Hydroxi-cholesterin in den Nebennieren Zwischenstufe auf dem Wege vom Cholesterin zum Pregnenolon darstellt, während 22-Keto-cholesterin vom Nebennieren-Enzymsystem nicht abgebaut wird. Auch in den Pflanzen *Haplopappus heterophyllus*⁷ und *Digitalis purpurea*⁸ ist der Abbau von Cholesterin zu Pregnenolon nachgewiesen worden, und in der Lilienart *Narthecium ossifragum*⁹ hat man 22-Hydroxi-cholesterin zusammen mit einem Steroidsaponin gefunden. Es lag die Vermutung nahe, daß 22-Hydroxi-cholesterin bzw. 22-Keto-cholesterin in Pflanzen ebenfalls zu Pregnenolon abgebaut werden könnten. Es wurde daher die Frage untersucht, ob *Digitalis lanata* und *Solanum lycopersicum* in der Lage sind, diese Verbindungen in Spirostanole und Spirosolanole umzuwandeln.

¹ R. TSCHESCHE und H. HULPKER, *Z. Naturf.* **23b**, 283 (1968).

² R. TSCHESCHE und H. HULPKER, *Z. Naturf.* **21b**, 494 (1966).

³ R. TSCHESCHE und H. HULPKER, *Z. Naturf.* **21b**, 893 (1966).

⁴ R. TSCHESCHE und H. HULPKER, *Z. Naturf.* **22b**, 791 (1967).

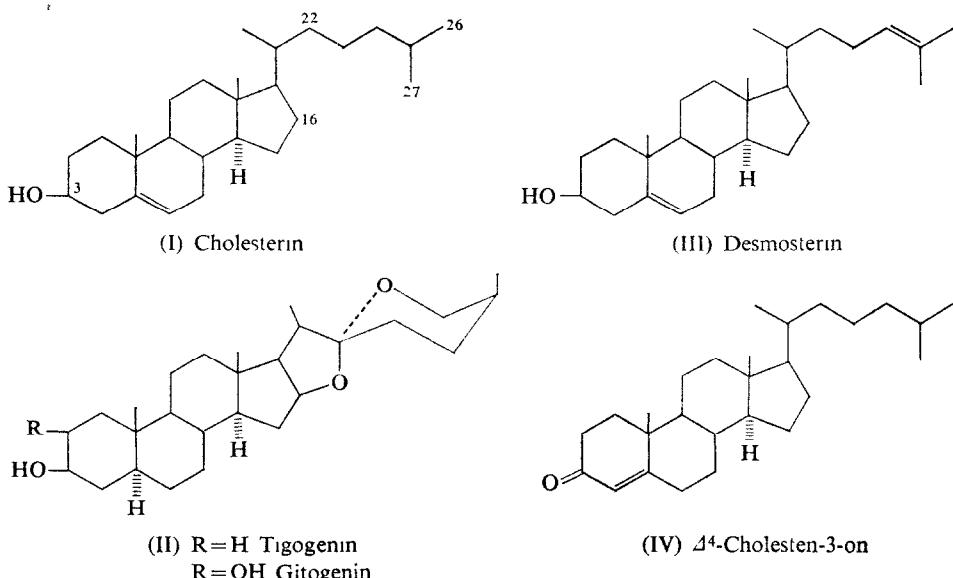
⁵ R. D. BENNETT und E. HEFTMANN, *Phytochem.* **4**, 577 (1965).

⁶ A. O. CHAUDHURI, Y. HARADA, K. SHIMIZU, M. GUT und R. I. DORFMANN, *J. Biol. Chem.* **237**, 703 (1962).

⁷ R. D. BENNETT und E. HEFTMANN, *Phytochem.* **6**, 747 (1965).

⁸ E. CASPI, D. O. LEWIS, D. M. PIATAK, K. V. THIMANN und A. WINTER, *Experientia* **XXII/8**, 506 (1966).

⁹ A. STABURSVIK, *Acta Chem. Scand.* **7**, 1220 (1953).



ERGEBNISSE

Das benötigte 22-Keto-cholesterin wurde auf folgendem Wege erhalten¹⁰: $^{14}\text{CO}_2$ wurde mit Isobutyl-Magnesiumbromid zur Isovaleriansäure-1- ^{14}C umgesetzt. Die Isovaleriansäure reduzierte man mit LiAlH_4 , der Isoamylalkohol wurde mit PBr_3 zur Reaktion gebracht und aus dem Isoamylbromid-1- ^{14}C die Grignardverbindung hergestellt, die mit ZnCl_2 in die zinkorganische Verbindung umgewandelt wurde.

(Isoamyl-1-¹⁴C)₂Zn wurde mit 3β-Acetoxy-Δ⁵-bisnorcholeinsäurechlorid zum 23-¹⁴C-22-Keto-cholesterin (6,2 mC/mM) umgesetzt. 22-Hydroxycholesterin erhielt man durch Reduktion des 22-Keto-cholesterins mit Natriumboranat in Dioxan/Methanol.

$^{23-14}\text{C}$ -22-Keto-cholesterin wurde in einer Menge entsprechend $1,6 \times 10^7$ Imp/min (gemessen mit dem fensterlosen Methandurchflusszähler FH 407 mit Handprobenwechsler Bl 503 der Fa. Friescke & Höpfner) je Pflanze über die Blattoberfläche nach der Methode von Bennett unter Heftmann⁵ folgenden ganzen Pflazen angeboten: (1) vier und elf Monate alten *Digitalis lanata*; (2) vier Wochen alten *Solanum lycopersicum*.

Die Inkubationszeit betrug jeweils 1,5 und 3 Wochen. Die Pflanzen wurden in einem Gewächshaus* bei einer Temperatur von 18–22° unter zusätzlicher Beleuchtung (15 Std./Tag) gehalten. 86–92% der auf die Blattoberfläche aufgetragenen Radioaktivität wurde von den Pflanzen aufgenommen.

Die Aufarbeitung der *Digitalis lanata* Pflanzen erfolgte zunächst durch Homogenisieren der Blätter und mehrmaliges Extrahieren mit Methanol. Die Auswertung der Radiochromatogramme (aufgenommen mit dem fensterlosen Scanner LB 2720 der Fa. Berthold) ergab, daß etwa 78 % des aufgenommenen 22-Keto-cholesterins metabolisiert worden waren.

* Wir möchten an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. M. Steiner für die Arbeitsmöglichkeit danken, die er uns im Gewächshaus des Instituts für Pharmakognosie Bonn eingeräumt hat. Herrn Gärtnermeister Echtle sei für die Betreuung der Pflanzen gedankt.

¹⁰ W. COLE und P. JULIAN, *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 1369 (1945).

Der Blattextrakt wurde über eine kurze Aktivkohle-Säule geschickt und die polare Glykosidfraktion mit Methanol eluiert. Anschließend erhielt man die unpolaren Bestandteile durch Elution mit Chloroform. Die Glykosidspaltung erfolgte mit einer Mischung aus 6n-H₂SO₄ und Äthanol (1:1), die mit Benzol überschichtet worden war. Es wurde 4 Stunden auf 100° erhitzt. Die durch Extraktion mit Benzol und CH₂Cl₂ gewonnenen Aglykone wurden mittels Schichtchromatographie auf Kieselgel G—(Merck)-Platten getrennt. Die Radiochromatogramme zeigten Radioaktivität an den Stellen, die dem Tigogenin und Gitogenin im R_f-Wert entsprachen. Die Tigogeninfaktion enthielt 1,1 % und die Gitogeninfaktion 0,3 % der aufgenommenen Radioaktivität. Bei der Kokristallisation mit authentischem inaktiven Tigogenin und Gitogenin verblieb jedoch die Aktivität quantitativ in den Mutterlaugen. Die Metaboliten konnten nicht näher identifiziert werden, es waren jedenfalls so aus 22-Keto-cholesterin keine Spirostanole entstanden.

Nach diesem Ergebnis wurde 23-¹⁴C-22-Keto-cholesterin *Solanum lycopersicum* angeboten. Die Pflanzen wurden nach 1,5 bzw. 3 Wochen zerkleinert und 48 Stunden unter Röhren mit 2%-iger Essigsäure extrahiert. Der Extrakt wurde mit wässr. Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion versetzt und das Alkaloid mit Isobutanol extrahiert. Nach dem Eindampfen der Isobutanolphase wurde zur Spaltung der Glykoside mit 1-n HCl eine Stunde unter Stickstoff am Rückfluß erhitzt, das Reaktionsgemisch mit 10%-iger KOH versetzt und das Tomatidin mit Chloroform extrahiert. Die TLC Untersuchung des Tomatidins im n-Heptan/Aceton 2:1 (zweimalige Entwicklung der Platten) und die Auswertung der Radiochromatogramme ergab im Tomatidin *keine Radioaktivität*. Bemerkenswert ist jedoch, daß auch die Tomatenpflanzen ca. 75 % des aufgenommenen 22-Keto-cholesterins metabolisiert hatten.

Nach den Ergebnissen von Dorfman und Mitarb.⁶ erschien es möglich, daß ein in der Seitenkette hydroxiliertes Cholesterin eine Vorstufe zu den Spirostanolen sein könnte. 23-¹⁴C-22-(ξ)-Hydroxi-cholesterin wurde 3,5 und 12 Monate alten *Digitalis lanata* Pflanzen über die Blattoberfläche appliziert. Nach drei Wochen wurden die Pflanzen aufgearbeitet und die Aglycone in der früher beschriebenen Weise² gewonnen. Es konnte ein Metabolit isoliert werden, der 0,9 % der aufgenommenen Radioaktivität enthielt. Aufgrund seines chromatographischen Verhaltens schien es sich um Tigogenin zu handeln, jedoch verblieb die Aktivität bei der Kokristallisation auch hier quantitativ in den Mutterlaugen. Auch 22-(ξ)-Hydroxi-cholesterin wird also zur Spirostanolbildung nicht verwertet. Zwischen den jungen und alten *Digitalis* Pflanzen ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede im Metabolisierungsgrad der applizierten Verbindungen. Sowohl nach der Applikation von 22-Keto-cholesterin an *Digitalis lanata* und an *Solanum lycopersicum* als auch von 22-(ξ)-Hydroxi-cholesterin fanden sich ca. 15–20 % als Ester in den unpolaren Fraktionen wieder. Durch Verseifung mit 5%-iger methanolischer KOH wurde 22-Keto-cholesterin und 22-Hydroxi-cholesterin zurückerhalten.

Während der Durchführung unserer Versuche erschien eine Arbeit von Joly und Tamm,¹¹ die feststellten, daß die 26- und 27-Methylgruppen in der 27-C-Vorstufe für die Spirostanolbildung nicht gleichwertig sind. Sie zogen den Schluß, daß eine Δ²⁴-Doppelbindung für die selektive enzymatische Hydroxilierung des C-27 notwendig sei und Cholesterin daher vielleicht nicht auf dem Hauptweg der Spirostanolbiogenese liege. Außerdem konnte gezeigt werden, daß kein Abbau der 27-C-Steroidseitenkette und Wiederaufbau der Spirostanolseitenkette erfolgt war.

¹¹ R. JOLY und CH. TAMM, *Tetrahedron Letters* **36**, 3535 (1967).

Wir haben daraufhin radioaktiv markiertes Desmosterin (III) auf folgendem Wege hergestellt: Desmosterin wurde mit Chromoxid in Aceton bei 0° oxidiert¹² und das entstandene Δ^5 -3-Keton mit NaBT₄ in Isopropanol bei Raumtemperatur zum 3 α -T-Desmosterin (spez. Akt. 0,43 mC/mg) reduziert. 3 α -T-Desmosterin wurde zwei 12 Monate alten *Digitalis lanata* in einer Menge entsprechend $5,4 \times 10^7$ Imp./min. je Pflanze über die Blattoberfläche angeboten. Nach 2 Wochen wurden die Pflanzen zerkleinert und zweimal mit Methanol unter 24-stündigem Röhren extrahiert. Die Pflanzen hatten in dieser Zeit 66% des auf die Blätter aufgetragenen Desmosterins aufgenommen. Der Methanolextrakt wurde über eine kurze Aktivkohle-Säule in eine Glykosidfraktion und in eine unpolare Fraktion getrennt. Die Glykosidspaltung erfolgte durch 4-stündiges Erhitzen mit 50 ml 3n wässr./äthanol. H₂SO₄, die mit 50 ml Benzol überschichtet worden war. Die in der üblichen Weise gewonnenen Aglycone wurden mittels TLC auf Kieselgel PF₂₅₄ (Merck)-Platten getrennt. Das gewonnene Tigogenin und Gitogenin enthielt keine Radioaktivität. Es konnte jedoch ein Metabolit isoliert werden, der sich durch TLC Vergleich in verschiedenen Lösungsmittelsystemen als Cholesterin erwies. Dabei hatten die Peaks der Radiochromatogramme die gleichen *R_f*-Werte wie das authentische Vergleichspräparat. Zur weiteren Sicherung des Ergebnisses wurde das radioaktive Cholesterin mit 150 mg inaktivem Material vermischt und sechsmal umkristallisiert. Nach der dritten Kristallisation blieb die spezifische Aktivität mit 335 ± 32 Imp./min. mg konstant. Eine quantitative Auswertung des Versuchs ergab, daß 0,16% des metabolisierten 3 α -T-Desmosterins in Cholesterin eingebaut worden war.

Da keine Radioaktivität in den Spirostanolen Tigogenin und Gitogenin gefunden werden konnte, muß man annehmen, daß vor der Hydrierung des Desmosterins bzw. des Cholesterins zu einem A/B-trans-Spirostanolprecursor die 3 β -OH-Gruppe zum Keton oxidiert worden ist und Desmosterin in Cholesterin übergehen kann.

In der letzten Zeit ist die wichtige Stellung des Progesterons als Zwischenstufe bei der Biogenese der Cardenolide und Pregnandervative erkannt worden.^{13, 14} Caspi und Hornby¹⁵ konnten durch gleichzeitige Applikation von 3 α -T-Pregnenolon und 4-¹⁴C-Pregnenolon an *Digitalis lanata* und Bestimmung des Isotopenverhältnisses im Digitoxigenin beweisen, daß die Oxidation am C-3 ein notwendiger Schritt bei der Biosynthese der Cardenolide ist. Wir konnten zur gleichen Zeit ebenfalls zeigen, daß nach Applikation von 3 α -T-Pregnenolon an *Digitalis lanata* keine radioaktiven Herzgifte entstehen.¹⁶ Vor einigen Jahren haben mehrere Arbeitsgruppen Untersuchungen über die Metabolisierung von Δ^4 -Cholesten-3-on (IV) angestellt. Rosenfeld und Hellmann berichteten über die Umwandlung von Cholestenon in Koprostanol durch Mikroorganismen des Darms.¹⁷ Nach intravenoser Injektion des Cholestenons in Ratten oder nach Behandlung mit Leber-Homogenaten konnte Cholestanol als Hauptmetabolit isoliert werden. Cholesterin entstand aus Cholestenon nicht.^{18, 19}

Aufgrund dieser Ergebnisse erschien es aussichtsreich, 4-¹⁴C-Cholestenon *Digitalis lanata* Pflanzen anzubieten, um zu prüfen, ob es in Tigogenin oder Gitogenin umgewandelt würde. 4-¹⁴C-Cholestenon (55,7 mC/mM) wurde in einer Menge entsprechend $13,34 \times 10^7$

¹² C. Djerassi, R. R. Engle und A. Bowers, *J. Org. Chem.* **21**, 1547 (1956).

¹³ H. H. Sauer, R. D. Bennett und E. Heftmann, *Phytochem.* **6**, 1521 (1967).

¹⁴ R. D. Bennett, H. H. Sauer und E. Heftmann, *Phytochem.* **7**, 41 (1968).

¹⁵ E. Caspi und G. M. Hornby, *Phytochem.* **7**, 423 (1968).

¹⁶ R. Tschesche, H. Hulpkre und M. Peters, unveröffentlicht.

¹⁷ R. S. Rosenfeld und L. Hellman, *J. Biol. Chem.* **233**, 1089 (1958).

¹⁸ W. M. Stokes, W. A. Fish und F. C. Hickey, *J. Biol. Chem.* **213**, 325 (1955).

¹⁹ F. M. Harold, S. Abraham und I. L. Chaikoff, *J. Biol. Chem.* **221**, 435 (1956).

Imp./min. drei 7 Monate alten *Digitalis lanata* Pflanzen über die Blattoberfläche appliziert. Nach drei Wochen wurden die Pflanzen zerkleinert und mit Methanol extrahiert. Die Blätter hatten in dieser Zeit 92 % der Radioaktivität aufgenommen. Die in der schon früher beschriebenen Weise gewonnenen Genine³ wurden schichtchromatographisch auf Kieselgel PF₂₅₄ (Merck)-Platten getrennt und die isolierten Spirostanole in verschiedenen Lösungsmittelsystemen TLC mit authentischen Vergleichspräparaten von Tigogenin und Gitogenin verglichen. Dabei hatten die Peaks der Radiochromatogramme die gleichen *R_f*-Werte wie die Vergleichsproben.

Zur Sicherung der Ergebnisse wurde ein Teil des radioaktiven Tigogenins und Gitogenins mit 100 mg bzw. 120 mg inaktivem Material vermischt und sechsmal umkristallisiert. Schon nach der zweiten Kristallisation blieb die spezifische Aktivität des Tigogenins mit 5230 ± 105 Imp./min. mg und des Gitogenins mit 5845 ± 152 Imp./min. mg konstant. Die quantitative Auswertung ergab, daß 1,4 % des metabolisierten Cholestenons in Tigogenin und 1,9 % in Gitogenin eingebaut worden war. Damit ist gezeigt, daß *Digitalis lanata* mit 3,3 %-iger Ausbeute Δ^4 -Cholestenon zum Aufbau der hydrierten A/B-trans-Spirostanole verwerten kann. Eine vorherige Hydrierung des Δ^4 -3-Ketons zu Cholesterin kann ausgeschlossen werden, da nach Applikation von 3 α -T-Desmosterin zwar Cholesterin, aber kein radioaktiven Spirostanole gebildet worden waren.

Während der Gehalt der *Digitalis lanata*-Pflanzen an Tigogenin etwa ein Drittel des Gitogeningehalts beträgt, entspricht die Verteilung der Radioaktivität in unserem Versuch nicht diesem Verhältnis. Man kann daher vermuten, daß die Hydroxilierung am C-2 im Gitogenin auf einer späteren biogenetischen Zwischenstufe nach Cholestenon erfolgt oder aber in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen in unterschiedlich hohem Ausmaß durchgeführt wird. Zur Klärung dieser Frage wurde die Metabolisierung des Tigogenins untersucht.

Das markierte Tigogenin wurde durch katalytische Hydrierung von Diosgenin mit ³H₂ in Essigester/Äther 2:1 und Pd/A-Kohle als Katalysator mit nahezu quantitativer Ausbeute erhalten. Die radiochemische Ausbeute betrug 40 mCi/mMol. Nach chromatographischer Trennung an mit AgNO₃ imprägnierten Platten wurde reines Tigogenin folgenden Pflanzen angeboten: (1) *Digitalis lanata* E., (2) *Digitalis purpurea* E., (3) *Solanum lycopersicum* L. (Kulturform: Hellfrucht). Zu den Versuchen wurden 4 Monate alte Pflanzen verwendet. Das aktive Steroid wurde auf dreifache Weise angeboten: (1) Über die Blattoberfläche den ganzen Pflanzen, (2) Hydrokultur von abgeschnittenen Blättern (Tigogenin), (3) Hydrokultur in einer Lösung von Tigogenin-3 β -D-glucosid. Die Pflanzen wurden jeweils nach 2-, 3- und 4-wöchiger Inkubationszeit in üblicher Weise aufgearbeitet. Die gewonnenen Extrakte wurden mittels Säulen- und Plattenchromatographie in charakteristische Fraktionen aufgetrennt, die auf radioaktiv markierte Inhaltsstoffe untersucht wurden. *Digitalis*-Arten: (1) Cardenolide (Digitoxigenin, Digoxigenin und Gitoxigenin), (2) Digitanoide (Digipurpurogenin I and II, Digifologenin), (3) Spirostanole (Gitogenin). Tomaten: (1) Tomatidin, (2) Δ^{16} -Pregnenolon (das K. Schreiber u.a.²⁰ in Tomaten vorgefunden haben).

Ganz allgemein fällt auf, daß Tigogenin von den Versuchspflanzen nur sehr wenig metabolisiert wird. Angebotenes Cholesterin und Δ^5 -Pregnenolon werden im deutlichen Gegensatz dazu intensiv metabolisiert. In allen Fällen wurde 80–95 % des angebotenen Tigogenins unverändert wiedergefunden. Ca. 10 % fanden sich als Tigogeninpalmmitat in den unpolaren Fraktionen wieder. Die Identifizierung gelang durch vergleichende Chromatographie mit synthetisierten Tigogenin-Fettsäureestern. (Myristat, Palmitat und Stearat)

²⁰ K. SCHREIBER und O. AURICH, *Phytochem.* 5, 706 (1967).

(reverse phase)²¹ Bei den Versuchen mit Tomatenpflanzen wurde keine weitere Metabolisierung festgestellt!

Bei den Versuchen mit *Digitalis* konnte ein Metabolit isoliert werden, dessen Gesamtmenge ca. 0,2% der angebotenen Menge an radioaktivem Tigogenin ausmachte. Aufgrund der chromatographischen Beweglichkeit schien es sich um Gitogenin zu handeln. Bei der Kokristallisation jedoch verblieb die Aktivität quantitativ in den Mutterlaugen. Der Metabolit konnte nicht in seiner Konstitution geklärt werden.

Die Tatsache, daß Tigogenin in keines der erwarteten Steroide umgewandelt wird, und im ganzen überhaupt nur sehr spärlich metabolisiert wird, läßt sich nur so deuten, daß *Tigogenin Endprodukt einer Biosynthesekette ist und nicht weiter wesentlich umgewandelt wird. Tigogenin ist auch nicht Zwischenstufe bei der Bildung des Gitogenins*, so daß für beide eine gemeinsame Vorstufe anzunehmen ist, auf der sich der Weg zum Tigogenin und zum Gitogenin verzweigt.

Danksagungen—Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft vielmals für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

²¹ *Biochemisches Taschenbuch*, Kapitel über Chromatographie, Springer Verlag, Berlin (1964).