Zur Biosynthese von Steroid-Derivaten im Pflanzenreich

16. Mitt.¹: Beiträge zur Spirostanol-Biogenese in *Digitalis lanata* und Spirosolanol-Biogenese in *Solanum lycopersicum*

RUDOLF TSCHESCHE und RAINER FRITZ

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn

(Z. Naturforsch. **25 b**, 590—591 [1970]; eingegangen am 28. Februar 1970)

5.6-³H-16 β .26-Dihydroxy-cholestanol wird von *Digitalis lanata*-Pflanzen in die Spirostanole Tigogenin und Gitogenin eingebaut. *Solanum lycopersicum*-Pflanzen verwerten 4-¹⁴C-Cholestanon für die Biosynthese des Tomatidins, während 5.6-³H-16 β .26-Dihydroxy-cholestanol nicht hierbei ausgenutzt wird.

Vor einiger Zeit konnten wir nachweisen, daß bei der Biogenese der in den Ringen A/B *trans*-verknüpften Spirostanole aus Cholesterin vor der Hydrierung der Δ^5 -Doppelbindung die 3 β -OH-Gruppe zum Keton oxydiert wird². Weitere Versuche mit Cholestanon und Cholestanol ergaben, daß auch diese Verbindungen von *Digitalis lanata*-Pflanzen zur Biogenese herangezogen werden³. Nachdem unsere Versuche mit 22-Keto-cholesterin als Precursor für Spirostanole und Spirosolanole negativ verlaufen waren, erschien es notwendig, ein an C-16 und C-26 hydroxyliertes Cholestanol *Digitalis lanata*-Pflanzen anzubieten, um zu prüfen, ob es in Tigogenin (**1**) und Gitogenin (**2**) eingebaut würde.

Versuche mit *Digitalis lanata*

Zur Synthese der markierten Verbindung wurde Diosgenin nach der Methode von Clemmensen reduziert und so 16 β .26-Dihydroxy-cholesterin in 30-proz. Ausbeute erhalten⁴. Das markierte 16 β .26-Dihydroxy-cholestanol (**3**) wurde durch katalytische Hydrierung des 16 β .26-Dihydroxy-cholesterins mit Tritium in Eisessig/Cyclohexan 1:1 und PtO₂ als Katalysator gewonnen. Die chromatographische Reinigung erfolgte an Kieselgel-G-Platten, die mit AgNO₃ imprägniert worden waren.

5.6-³H-16 β .26-Dihydroxy-cholestanol (spezifische Aktivität 0,44 mC/mg) wurde in einer Menge entsprechend 3·10⁸ Imp/min (gemessen mit dem fensterlosen Methandurchflußzähler FH 407 der Fa. Friesoecke & Höpfner, Zählausbeute für ³H: 9%, für ¹⁴C: 65%) an fünf 6 Monate alten *Digitalis lanata*-Pflanzen in der früher beschriebenen Weise über die Blattoberflächen appliziert. Der Versuch wurde im Herbst durchgeführt.

Nach 4 Wochen wurden die Pflanzen geerntet, das nicht aufgenommene 5.6-³H-16 β .26-Dihydroxy-cholestanol von den Blättern abgewaschen, Blätter und Wurzeln zerkleinert und mehrmals mit Methanol extrahiert. Auf Grund des ziemlich polaren Charakters der applizierten Verbindung wurden nur 4,2% der auf die Blattoberflächen aufgetragenen Aktivität in die Pflanzen eingeschleppt. Die Spirostanolglykoside wurden wie früher beschrieben isoliert und hydrolysiert⁴ und die Aglykone mittels Säulen- und Schichtchromatographie getrennt und gereinigt. Um die Verluste an radioaktivem Tigogenin und Gitogenin bei den Trennoperationen zu verringern, setzte man vorher nichtmarkiertes Material zu.

Die radioaktive Tigogeninfraction wurde schließlich mit 130 mg inaktivem Tigogenin bis zur konstanten spezifischen Aktivität in den Kristallen und Mutterlaugen umkristallisiert. Die spez. Akt. war 830 ± 39 Imp/min·mg, entsprechend einer Gesamtaktivität von 307 000 Imp/min im Tigogenin. Die Einbaurate des 5.6-³H-16 β .26-Dihydroxy-cholestanols in Tigogenin betrug 2,5%, bezogen auf den von den Blättern aufgenommenen Teil der applizierten Verbindung.

Nach der Kokristallisation der radioaktiven Gitogeninfraction mit 100 mg inaktivem Gitogenin war die spezifische Aktivität 345 ± 10 Imp/min·mg, entsprechend einer Gesamtaktivität von 140,415 Imp/min. Die Einbaurate der applizierten Verbindung in Gitogenin betrug 1,1 Prozent.

¹ 15. Mitt.: R. TSCHESCHE u. R. BECKER, Z. Naturforsch. **25 b**, 107 [1970].

² R. TSCHESCHE, H. HULPKE u. R. FRITZ, Phytochem. **7**, 2021 [1968].

³ R. TSCHESCHE, R. FRITZ u. G. JOSST, Phytochem. **9**, 371 [1970].

⁴ R. E. MARKER u. E. ROHRMANN, J. Amer. chem. Soc. **61**, 846 [1939].

Durch diese Versuche ist gezeigt worden, daß *Digitalis lanate*-Pflanzen 16β .26-Dihydroxy-cholestanol für die Biogenese von Tigogenin und Gitogenin verwerten. Während bei unseren früheren Versuchen zur Biogenese der Spirostanole^{2, 3, 5}, Gitogenin immer höhere Einbauraten in bezug auf die angebotenen markierten Verbindungen aufwies, liegt in diesem Versuch das umgekehrte Verhältnis vor. Man darf daher vermuten, daß der Hauptbiogeneseweg für Gitogenin nicht über das 16β .26-Dihydroxy-cholestanol verläuft, sondern daß vorher die OH-Gruppe an C-2 eingeführt und dieses 2α -Hydroxy-cholestanol-Derivat dann in der Seitenkette hydroxyliert wird.

Versuche mit *Solanum lycopersicum*

Tomatidin

$4\text{-}^{14}\text{C}$ -Cholestanon (spez. Akt. $55,8 \text{ mC/mMol}$) wurde in einer Menge entsprechend $3,44 \cdot 10^7 \text{ Imp/min}$ an fünf 4 Wochen alte Tomaten-Pflanzen über die Blattoberflächen appliziert. Der Versuch wurde im November bei zusätzlicher künstlicher Beleuchtung (15 Stdn./Tag) im Treibhaus bei einer Temperatur von 18 bis 22°C durchgeführt. Nach 20 Tagen wurden die Pflanzen geerntet und das nicht aufgenommene $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Cholestanon (10,5%) von den Blättern abgewaschen. Die Pflanzen wurden zerkleinert und mit 3-proz. Essigsäure unter 48-stdg. Rühren extrahiert. Die Isolierung und Reindarstellung des Tomatidins erfolgte in der früher beschriebenen Weise⁶.

Die chromatographisch gereinigte Tomatidinfraktion (37,2 mg) wurde mit 140 mg inaktivem Tomatidin versetzt und aus Methanol/Ammoniak bis zur konstanten spezifischen Aktivität in den Kristallen und den Mutterlaugen umkristallisiert.

Die spez. Akt. betrug $3058 \pm 90 \text{ Imp/min} \cdot \text{mg}$, entsprechend einer Gesamtaktivität der Tomatidinfraktion von 541.266 Imp/min . Die Einbaurate im Tomatidin betrug 1,76%, bezogen auf das von den Blättern aufgenommene $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Cholestanon.

Nachdem der Biogeneseweg für Spirostanole und das Tomatidin bis zur Cholestanon-Zwischenstufe als gleichlaufend festgestellt werden konnte, blieb zu prüfen, ob auch 16β .26-Dihydroxy-cholestanol zur Biosynthese des Tomatidins verwertet wird.

$5\text{-}^3\text{H}$ - 16β .26-Dihydroxy-cholestanol wurde dreimal im Abstand von je einer Woche sechs 7 Wochen alten Tomaten-Pflanzen über die Blattoberfläche angeboten, und zwar in einer Menge von insgesamt $18,3 \cdot 10^8 \text{ Imp/min}$. Der Versuch wurde im Dezember/Januar im Gewächshaus bei zusätzlicher künstlicher Beleuchtung durchgeführt. Nach 40 Tagen wurden die Pflanzen geerntet und wie vorher erwähnt, aufgearbeitet.

Die Pflanzen hatten etwa das Doppelte der Blattmasse neu gebildet als vor Beginn des Versuchs vorhanden gewesen war. Nach Berücksichtigung des von den Blättern abgewaschenen $5\text{-}^3\text{H}$ - 16β .26-Dihydroxy-cholestanols ergab sich, daß nur 6,8% der Verbindung in die Pflanzen eingeschleppt wurde. Durch chromatographische Trennung wurden 78,6 mg annähernd reines Tomatidin gewonnen, das eine gewisse Radioaktivität enthielt. Bei der Kokristallisation mit inaktivem Tomatidin verblieb diese jedoch quantitativ in den Mutterlaugen. Obwohl $5\text{-}^3\text{H}$ - 16β .26-Dihydroxy-cholestanol von den Tomaten-Pflanzen sehr stark metabolisiert worden war, war kein Einbau dieser Verbindung in Tomatidin festzustellen.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft sehr für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Ebenso gebührt unser Dank Herrn Prof. Dr. M. STEINER, Direktor des Pharmakognostischen Instituts der Universität Bonn, für die freundliche Erlaubnis zur Benutzung des Gewächshauses.

⁵ R. TSCHESCHE u. H. HULPKE, Z. Naturforsch. **21b**, 494 [1966].

⁶ R. TSCHESCHE u. H. HULPKE, Z. Naturforsch. **21b**, 893 [1966].