

## VERGLEICH DER SPIROSTANOLBIOGENESE AUS CHOLESTANOL UND CHOLESTANON. KOPROSTANOL IST KEINE VORSTUFE FÜR CARDENOLIDE ODER SAPOGENINE\*

R. TSCHESCHE, R. FRITZ und G. JOSST

Aus dem Institut für Organische und Biochemie der Universität, Bonn

(Eingegangen am 19 July 1969)

**Abstract**—After the administration of  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -cholestanol and  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -cholestanone to *Digitalis lanata* plants, radioactive tigogenin and gitogenin were isolated.  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Cholestanol was converted to cholestanone and radioactive cholestanol was obtained from  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -cholestanone.  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Coprostanol was converted to coprostanone, but not to cardenolides or sapogenins.

VOR EINIGEN Jahren haben mehrere Arbeitsgruppen Untersuchungen über die Metabolisierung des  $\Delta^4$ -Cholesten-3-ons (I) durchgeführt. Als Hauptmetabolit der biochemischen Umwandlung von Cholestenon (I) durch Darmbakterien fanden Rosenfeld und Hellman Coprostanol neben Cholestanol und Koprostanon.<sup>1</sup> Nach intravenöser Injektion des  $\Delta^4$ -Cholestenons in Ratten oder bei Behandlung mit Leberhomogenaten konnte Cholestanol ( $5\alpha$ -H) als Hauptmetabolit neben beträchtlichen Mengen Cholestanon isoliert werden. Außerdem wurde nachgewiesen, daß Cholestanon in Cholestanol umgewandelt wird, während Cholesterin nicht aus  $\Delta^4$ -Cholestenon entsteht.<sup>2,3</sup> Johnson, Waters und Bennett fanden, daß in Kartoffelblättern die Reduktion des Cholesterins zum Cholestanol (III) über  $\Delta^4$ -Cholesten-3-on als Zwischenstufe verläuft.<sup>4</sup>

Vor kurzem konnten wir zeigen, daß  $\Delta^4$ -Cholestenon von *Digitalis* Pflanzen bei der Biogenese der Spirostane Tigogenin (IV) und Gitogenin (V) verwertet wird.<sup>5</sup> Die Untersuchung der Cyclohexan-Phase ergab nach der Aufarbeitung der Pflanzen bei Applikation von  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Cholestenon, daß Cholestenon sowohl in Cholestanon (3,6% des metabolisierten Cholestenons) als auch in Cholestanol umgewandelt wird. 2,5% des metabolisierten Cholestenons lagen als Cholestanol und 2,9% als Cholestanolester vor. Daraufhin wurde jetzt auch die Metabolisierung von  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Cholestanol und  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Cholestanon durch *Digitalis lanata*-Pflanzen untersucht, ferner wurde die Verwertung von Koprosterin geprüft.

\* Zur Biosynthese von Steroidderivaten im Pflanzenreich 12. Mitt.<sup>6</sup>

<sup>1</sup> R. S. ROSENFIELD und L. HELLMAN, *J. Biol. Chem.* **233**, 1089 (1958).

<sup>2</sup> W. M. STOKES, W. A. FISH und F. C. HICKEY, *J. Biol. Chem.* **213**, 325 (1955).

<sup>3</sup> F. M. HAROLD, S. ABRAHAM und J. L. CHAIKOFF, *J. Biol. Chem.* **221**, 435 (1956).

<sup>4</sup> D. F. JOHNSON, J. A. WATERS und R. D. BENNETT, *Arch. Biochem. Biophys.* **108**, 282 (1964).

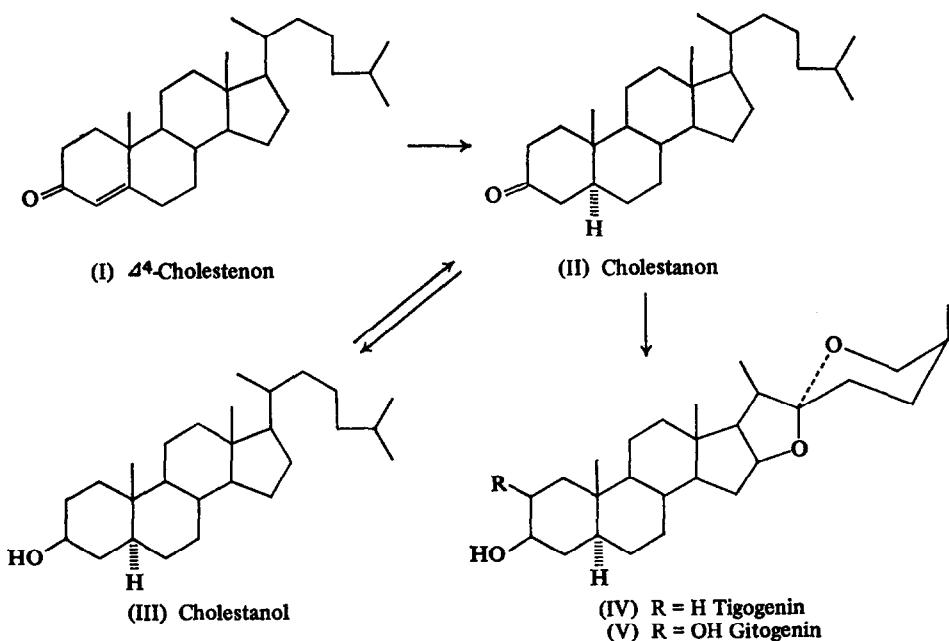
<sup>5</sup> R. TSCHESCHE, H. HULPE und R. FRITZ, *Phytochem.* **7**, 2021 (1968).

<sup>6</sup> 11. Mitt., R. TSCHESCHE, R. BECKER und R. HOMBACH, *Z. Naturforschg.* **23 b**, 1615 (1968).

## ERGEBNISSE

4-<sup>14</sup>C-Cholestanol wurde durch katalytische Hydrierung von 4-<sup>14</sup>C-Cholesterin (spez. Akt. 55,8 mc/mMol) in Cyclohexan/Eisessig (1:1) und PtO<sub>2</sub> als Katalysator erhalten. Die chromatographische Untersuchung des Hydrierungsproduktes auf AgNO<sub>3</sub>-imprägnierten Kieselgel-G-Platten ergab, daß quantitativ Cholestanol entstanden war.

4-<sup>14</sup>C-Cholestanol wurde in einer Menge entsprechend  $5,19 \times 10^7$  Imp/min (gemessen mit dem fensterlosen Methandurchflußzähler FH 407 mit Handprobenwechsler Bl 503 der Fa. Friescke & Höpfner) fünf 9 Monate alten *Digitalis lanata*-Pflanzen über die Blattoberfläche angeboten. Die Applikation erfolgte im Frühjahr. Die verwendeten Blätter wurden zweimal im Abstand von 3 Tagen mit einer Mischung aus Siliconöl und Petroläther 38–53° (1:1) besprüht und so eine 98,8%-ige Aufnahme des angebotenen 4-<sup>14</sup>C-Cholestanols erreicht.



Nach 24 Tagen wurden die Pflanzen\* geerntet, das nicht aufgenommene 4-<sup>14</sup>C-Cholestanol mit Essigester von den Blattoberflächen abgewaschen, die Blätter zerkleinert und mehrmals mit Methanol extrahiert. Der Methanolextrakt wurde im Vakuum eingeengt, der Rückstand mit Wasser verdünnt und zur Entfernung des Chlorophylls mehrmals mit Cyclohexan extrahiert. Anschließend wurden die Spirostanolglykoside der wässrigen Phase mit Isobutanol entzogen.

Die Glykosidspaltung erfolgte durch vierstündiges Erhitzen mit einer Mischung aus 6 n Schwefelsäure und Äthanol (1:1); diese Phase war mit Benzol überschichtet. Die in der üblichen Weise gewonnenen Aglykone wurden mittels mehrfacher Schichtchromatographie

\* 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 Aufzucht und Betreuung der Pflanzen gedankt.

<sup>7</sup> R. D. BENNETT, H. H. SAUER und E. HEFTMANN, *Phytochem.* 7, 41 (1968).

auf Kieselgel PF<sub>254</sub> (Merck)-Platten getrennt und gereinigt. Der dünnenschichtchromatographische Vergleich der isolierten, radioaktiven Spirostanole mit authentischen Vergleichsproben von Tigogenin und Gitogenin ergab, daß die Peaks der Radiochromatogramme (aufgenommen mit dem fensterlosen Scanner LB 2720 der Fa. Berthold) die gleichen  $R_f$ -Werte wie die Vergleichsproben zeigten.

Das radioaktive Tigogenin (35 mg) wurde mit 100 mg inaktivem Material und das aktive Gitogenin (126 mg) mit 153 mg inaktivem Gitogenin vermischt und fünfmal umkristallisiert. Nach der 2. Kristallisation blieb die spezifische Aktivität des Tigogenins mit  $1550 \pm 122$  Imp/min mg und die spez. Akt. des Gitogenins mit  $1287 \pm 43$  Imp/min mg konstant. Die Gesamtaktivität des Tigogenins betrug  $209 \cdot 250$  Imp/min und die des Gitogenins  $359 \cdot 073$  Imp/min.

Aus der Cyclohexanphase konnte ein Teil des applizierten Cholestanols unverändert zurückgewonnen werden. Unter dessen Berücksichtigung und auch des von den Blättern abgewaschenen Cholestanols ergab sich ein Metabolisierungsgrad von 76% ( $3,69 \times 10^7$  Imp/min). 0,57% des metabolisierten Cholestanols wurde in Tigogenin eingebaut sowie 0,97% in Gitogenin.

Mittels präparativer Schichtchromatographie der Cyclohexanphase konnte ein Metabolit isoliert werden, der durch chromatographischen Vergleich in verschiedenen Lösungsmittelsystemen als Cholestanon erkannt wurde. Von der zweiten bis zur fünften Kristallisation dieser Fraktion (120 mg) zusammen mit 100 mg inaktivem Cholestanon verblieb eine konstante spez. Akt. von  $5922 \pm 228$  Imp/min mg in den Kristallen und in den Mutterlaugen. Die Gesamtaktivität des Cholestanons betrug  $1,3 \times 10^6$  Imp/min (3,53% des metabolisierten Cholestanols). Ein weiterer Metabolit aus der Cyclohexanphase enthielt 9,8% der Aktivität des umgewandelten Cholestanols. Da durch Verseifung mit 5%-iger methanolischer KOH Cholestanol quantitativ zurückerhalten wurde, muß es sich um einen Cholestanolester handeln.

Bei einem parallelen Versuch wurde unter gleichen Bedingungen 4-<sup>14</sup>C-Cholestanon angeboten. 4-<sup>14</sup>C-Cholestanon (spez. Akt. 55,8 mc/mMol) wurde in einer Menge entsprechend  $6,97 \times 10^7$  Imp/min fünf 9 Monate alten *Digitalis lanata* Pflanzen über die Blattoberfläche appliziert. Nach 24 Tagen hatten die Pflanzen 88,6% des angebotenen 4-<sup>14</sup>C-Cholestanons aufgenommen. Nach Abzug des von den Blättern abgewaschenen Cholestanons und des in der Cyclohexanphase enthaltenen nicht umgewandelten Cholestanons ergab sich ein Metabolisierungsgrad von 66,3% ( $4,09 \times 10^7$  Imp/min).

Die Glykoside wurden wie angegeben isoliert und hydrolysiert. Durch präparative Schichtchromatographie im System *n*-Heptan/Aceton (4:1) und vierfache Entwicklung der Platten konnten radioaktives Cholestanol ( $R_f = 0,6$ ) und Tigogenin ( $5\alpha$ -H) ( $R_f = 0,5$ ) und durch Chromatographie im System Chloroform/Methanol (25:1, vierfache Entwicklung) radioaktives Gitogenin ( $5\alpha$ -H) ( $R_f = 0,55$ ) isoliert werden. Die Cholestanolfraktion (11 mg) wurde mit 70 mg inaktivem Material kokristallisiert. Von der ersten bis zur vierten Kristallisation blieb die spezifische Aktivität mit  $2545 \pm 102$  Imp/min mg konstant. Die Einbaurate in Cholestanolglykosid betrug 0,5%. Darüber hinaus wurde aus der Cyclohexanphase freies Cholestanol mit einer Gesamtaktivität von  $1,47 \times 10^6$  Imp/min (3,6% des metabolisierten Cholestanons) und Cholestanolester mit einer Gesamtaktivität von  $0,92 \times 10^6$  Imp/min (2,25% des metabolisierten Cholestanons) erhalten.

Die aktive Tigogeninfaktion (45 mg) wurde mit 100 mg inaktivem Tigogenin und die aktive Gitogeninfaktion (130 mg) mit 150 mg inaktivem Gitogenin bis zur konstanten spezifischen Aktivität der Kristalle und der Mutterlaugen umkristallisiert. Schon nach der

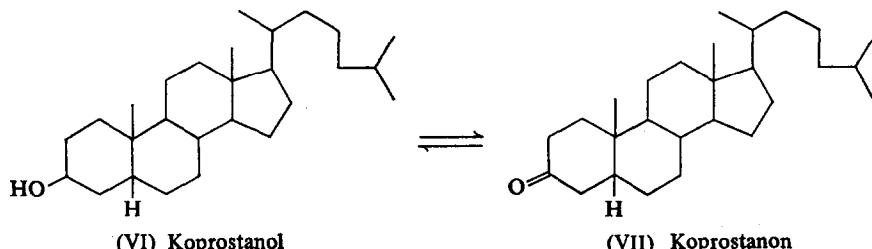
ersten Kristallisation wurde eine gleichbleibende spezifische Aktivität von  $6912 \pm 360$  Imp/min mg im Tigogenin und nach der zweiten Kristallisation eine spezifische Aktivität von  $8610 \pm 302$  Imp/min mg im Gitogenin gefunden. Die Gesamtaktivität des Tigogenins betrug  $1.002.240$  Imp/min (2,45 %-ige Einbaurate) und des Gitogenins  $2.410.800$  Imp/min (5,89 %-ige Einbaurate).

Durch diese Versuche ist gezeigt, daß *Digitalis lanata*-Pflanzen sowohl Cholestanol in Cholestanon (3,53 %) als auch umgekehrt Cholestanon in Cholestanol (6,35 %) umwandeln. Da die Einbaurate des Cholestanons in Spirostanole wesentlich höher als die des Cholestanols ist, erfolgt wahrscheinlich zuerst Hydrierung des  $\Delta^4$ -Cholestenons zum Cholestanon und anschließend der Aufbau der Spirostanolstruktur. Bei der Biogenese der Spirostanole aus Cholestanol dürfte ebenfalls eine Oxydation zum Cholestanon vorangehen, wie es im obigen Formelschema angegeben ist.

Bennett, Sauer und Heftmann konnten nach Applikation von  $4^{14}\text{C}$ -Progesteron an *Digitalis lanata* neben Cardenoliden auch  $5\alpha$ -H-Pregnan-3,20-dion und  $5\alpha$ -H-Pregnan- $3\beta$ -ol-20-on isolieren. Der erste Schritt dürfte hier die Isomerisierung der  $\Delta^4$ -Doppelbindung des Progesterons in die  $\Delta^5$ -Stellung und anschließende Hybrierung sein, auf welche die Reduktion der 3-Keto-Gruppe zum  $5\alpha$ -H-Pregnan- $3\beta$ -ol-20-on folgt. Auch bei diesen letztgenannten Metaboliten dürfte eine gegenseitige Umwandlung auftreten.<sup>7</sup> Diese Beobachtung ist deswegen bemerkenswert, weil Progesteron als Vorstufe der Cardenolide Digitoxigenin, Digoxigenin und Gitoxigenin angesehen wird, letztere aber die Ringe A und B *cis*-konfiguriert ( $5\beta$ -H) enthalten. Als Erklärung bietet sich an, daß in den Pflanzen bei der Absättigung der  $\Delta^4$ -Doppelbindung Ring A/B-*cis*-Derivate entstehen, von denen aus die Biogenese der Cardenolide weiter abläuft. Es ist bekannt, daß die ungewöhnliche Hybrierung  $\Delta^4$ -ungesättigter Steroide vorwiegend in die  $5\beta$ -H-Reihe führt. Die Bildung der  $5\alpha$ -H-Derivate dürfte aus einer  $\Delta^5$ -3-Ketostruktur erfolgen, bei deren Bildung wohl eine Isomerase beteiligt ist.

Die bisherigen Ergebnisse verschiedener Arbeitskreise deuteten auf eine Biogenesefolge Cholesterin →  $20\alpha$ -Hydroxycholesterin → Pregnenolon → Progesteron → Cardenolide hin. Caspi *et al.*<sup>8</sup> stellten kürzlich diesen Weg dadurch in Frage, daß sie nach Metabolisierung einer Mischung von  $4^{14}\text{C}$ -Cholesterin und  $7^{3}\text{H}$ - $20\alpha$ -Hydroxycholesterin bei *Digitalis lanata*-Pflanzen wohl  $^3\text{H}$ -markiertes, nicht aber  $^{14}\text{C}$ -markiertes Progesteron fanden. Sie schlossen daraus, daß entweder zunächst eine Spaltung der Seitenkette zwischen C-23 und C-24 eintritt oder aber unter Annahme eines Weges über die Pregnanstufe zumindest die Veränderungen um Cholesteringerüst, d.h. Hydrierung der  $\Delta^4$ -Doppelbindung und/oder Hydroxylierungen an C-14 bzw. C-12 und C-16 vorausgehen müßten.

Zur Prüfung dieser Vermutungen wurde  $4^{14}\text{C}$ -Koprostanol (VI) *Digitalis lanata*-Pflanzen angeboten.



<sup>8</sup> J. A. F. WICKRAMASINGHE, P. C. HIRSCH, S. M. MUNAVALLI und E. CASPI, *Biochemistry* 7, 3248 (1968).

Die Herstellung von (VI) erfolgte durch Hydrierung von 4-<sup>14</sup>C-Cholestenon (spezifische Aktivität 55,7 mc/mM) (I) zu Koprostanon (VII) mit 10% Pd auf Aktivkohle als Katalysator in Isopropanol/KOH<sup>9</sup> und erneuter Hydrierung von VII mit PtO<sub>2</sub> in Eisessig/HBr. Nach dieser Methode<sup>10</sup> wurde in einem Vorversuch 88% an Koprostanol (VI) erhalten, das von seinem C-3-Epimeren (Epikoprostanol) durch Verteilungschromatographie getrennt wurde.<sup>11</sup> Hierbei wurden präparative Dünnschichtplatten mit 2-Phenoxyäthanol imprägniert und dreimal in *n*-Heptan entwickelt. Das Imprägnierungsmittel ließ sich durch Chromatographie auf Kieselgel mit Cyclohexan/Essigester 3:2 wieder entfernen.

4-<sup>14</sup>C-Koprostanol ( $2,02 \cdot 10^7$  Imp/min) wurde drei 9 Monate alten *Digitalis lanata*-Pflanzen in der beschriebenen Weise appliziert. Nach 26 Tagen wurden die Pflanzen aufgearbeitet, der Methanolextrakt mit Cyclohexan ausgeschüttelt und danach mit Wasser verdünnt.

Aus der Cyclohexanphase wurde durch mehrfache Dünnschichtchromatographie Koprostanon ( $5\beta$ -H) (VII) isoliert, das durch Vergleich der *R*<sub>f</sub>-Werte und durch Kokristallisation mit authentischem Material identifiziert wurde. Die spezifische Aktivität des Koprostanons war 2160 Imp/min mg, seine Gesamtaktivität 216.000 Imp/min. Bei einem Metabolisierungsgrad von 78% errechnet sich ein Umsatz des metabolisierten Koprostanols von 0,138% in Koprostanon.

Zur Trennung der Cardenolidglykoside von den Spirostanolglykosiden bedienten wir uns eines Verfahrens von Euw-Reichstein,<sup>12</sup> nach dem sich bei der Verteilung die Cardenolidglykoside vorwiegend im Chloroformextrakt der wäßrigen Methanolphase und die Glykoside der Spirostanole im Chloroform-Äthanol-Extrakt befinden. Wir benutzten zur Spirostanol-Extraktion Isobutanol. Nach der Hydrolyse der Cardenolidglykoside mit 0,1 nHCl und der Spirostanolglykoside mit 6 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Äthan 1:1 wurden die Aglykone chromatographisch getrennt.

In der Cardenolid-Fraktion traten im Radiochromatogramm neben Koprostanol drei nicht identifizierte Peaks auf, die jedoch weder Digitoxigenin (VIII), Gitoxigenin (IX) noch Digoxigenin (X) zuzuordnen waren, wie sich eindeutig durch Ansprühen der Dünnschichtplatten mit Chromschwefelsäure und den Vergleich der Laufstrecken der Fluoreszenzonen mit den radioaktiven Zonen herausstellte.

In der Spirostanolphase trat lediglich Koprostanol auf, es waren weder Smilagenin noch Sarsasapogenin entstanden ( $5\beta$ -H-Derivate), die allerdings in Digitalis auch nicht vorkommen.

Unter gleichen Bedingungen wurde auch 4-<sup>14</sup>C-Cholesterin ( $2,23 \cdot 10^7$  Imp/min, spezifische Aktivität 55,8 mc/mM) appliziert, um die Einbauraten von Koprostanol und Cholesterin zu vergleichen. Durch Kokristallisation konnten Digitoxigenin (Einbaurate: 0,09% bezogen auf metabolisiertes Cholesterin) und chromatographisch Gitoxigenin und Digoxigenin nachgewiesen werden.<sup>8, 13</sup> Die vergleichsweise geringe Aktivität der beiden letzten Cardenolide konnte wegen der Fehlergrenze der Meßanordnung nicht quantitativ bestimmt werden.

Diese Versuche zeigen, daß Koprostanol und Koprostanon keine Zwischenstufen für die Biosynthese der Cardenolide darstellen und auch anscheinend für den Aufbau der

<sup>9</sup> G. SLOMP, JR., Y. F. SHEALY, J. L. JOHNSON, R. A. DONIA, B. A. JOHNSON, R. P. HOLYSZ, R. L. PEDERSON, A. O. JENSEN und A. C. OTT, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1216 (1955).

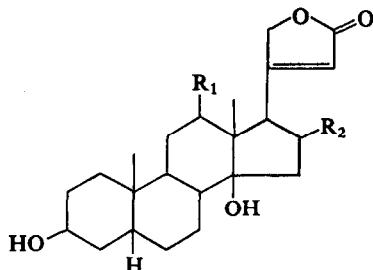
<sup>10</sup> L. RUZICKA, H. BRÜNGGER, E. EICHENBERGER und J. MEYER, *Helv. chim. Acta* **17**, 1415 (1934).

<sup>11</sup> D. I. CARGILL, *Analyst* **87**, 865 (1962).

<sup>12</sup> J. v. EUW und T. REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta* **47**, 711 (1964); J. v. EUW und T. REICHSTEIN, *Helv. chim. Acta* **49**, 1468 (1966.)

<sup>13</sup> R. TSCHESCHE, H. HULPKER und H. SCHOLTEN, *Z. Naturforschg.* **22b**, 677 (1967).

Spirostanole in Digitalis nicht verwendet werden. Der Einbau von Cholesterin, nicht aber von Coprostanol in Cardenolide deutet ferner darauf hin, daß auf der Cholesterinstufe keine Absättigung der  $\Delta^5$ -Doppelbindung erfolgen kann. Dieses Ergebnis spricht mehr für den bisher angenommenen Biosyntheseweg der Cardenolide über Pregnenolon und Progesteron.



- (VIII)  $R_1 = R_2 = H$  Digitoxigenin  
 (IX)  $R_1 = H, R_2 = OH$  Gitoxigenin  
 (X)  $R_1 = OH, R_2 = H$  Digoxigenin

Eine Erklärung der Befunde von Caspi und Mitarb.<sup>8</sup> könnte vielleicht darin gesucht werden, daß die Hydroxylierung des Cholesterins an C-20 ein relativ langsamer enzymatischer Prozess ist, der noch durch gleichzeitig zugefügtes  $2\alpha$ -Hydroxycholesterin stark inhibiert wird. Die Hemmung eines Enzymsystems durch sein Erfolgsprodukt ist vielfach beobachtet worden. Es wäre dann zu verstehen, daß kein  $^{14}C$ -markiertes Progesteron aus  $4-^{14}C$ -Cholesterin in den Pflanzen gefunden werden konnte.

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