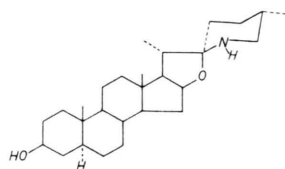


glykosids Tomatin. SANDER und GRISEBACH konnten zeigen, daß 1-¹⁴C-Na-Acetat durch junge Tomatenpflanzen in Tomatin eingebaut wird⁶. Es wurde daher jungen Tomatenpflanzen 4-¹⁴C-Cholesterin angeboten, um zu prüfen, ob Tomatidin daraus gebildet würde.



Tomatidin

In unseren Versuchen wurden die größten Blätter von 4 Wochen alten Tomatenpflänzchen [*Solanum lycopersicum* („Hellfrucht“)] mit einer wäßrigen Lösung von 2% TWEEN 20 gewaschen. In die Blattspreite wurde eine alkoholische Lösung von 4-¹⁴C-Cholesterin mit einer kleinen Pipette aufgetragen. Nach dem Eintrocknen besprühte man mit einer Mischung von Siliconöl/Petroläther 1:1. Durch diese Oberflächenbehandlung wird die applizierte Substanz vor Luftoxidation geschützt und gleichzeitig nahezu vollständig in die pflanzlichen Gewebe eingeschleppt⁷. Nach 7 bzw. 14 Tagen wurden die Pflanzen oberhalb der Wurzel abgeschnitten und nach Zerkleinerung 48 Stdn. mit 2-proz. Essigsäure unter Rühren extrahiert⁸. Der Extrakt wurde mit wäßrigem Ammoniak versetzt und das Alkaloid mit Isobutanol extrahiert. Der Auszug wurde eingedampft

und zur Spaltung der Glykoside mit 1-n. HCl am Rückfluß erhitzt. Es zeigte sich, daß ca. 30% des applizierten 4-¹⁴C-Cholesterins metabolisiert worden war, 1% war in Tomatidin inkorporiert worden (bei 14-tägiger Inkubation 1,5%). Tomatidin sowie das daraus dargestellte *O,N*-Diacetat wurde durch dünnstichtchromatographischen Vergleich mit authentischen Proben identifiziert. (Die Radiochromatogramme wurden mit dem Scanner LB 2720 der Fa. Berthold ausgezählt.)

Nach Reindarstellung durch präparative Plattenchromatographie wurde das erhaltene Tomatidin mit 100 mg inaktivem authentischem Material versetzt und die Mischung 9-mal aus Methanol/Ammoniak umkristallisiert. Die 2. bis 9. Kristallfraktion zeigte eine gleichbleibende konstante spezifische Aktivität.

Tomatidin: 430 ± 12 Imp/mg min,

Tomatidin *O,N*-Diacetat: 340 ± 10 Imp/mg min.

(Die Aktivitäten wurden mit dem fensterlosen Methandurchflußzähler FH 407 der Fa. Frieske und Höpfner gemessen. Zählausbeute 12%.) Zur weiteren Sicherung der erhaltenen Ergebnisse wurde das Tomatidin durch Abbau nach MARKER⁹ in Δ^{16} -Allopregnen-3 β -ol-20-on übergeführt. Das verbleibende Pregnangerüst enthielt die gesamte Radioaktivität.

Tomatenpflanzen¹⁰ sind somit in der Lage, Cholesterin zur Biosynthese von Tomatidin heranzuziehen. Es bleibt offen, ob die Biosynthese über Spirostanol-Derivate verläuft oder ein paralleler Weg beschritten wird.

⁶ H. SANDER u. H. GRISEBACH, Z. Naturforschg. **13 b**, 755 [1958].

⁷ R. D. BENNETT u. E. HEFTMANN, Phytochemistry **4**, 577 [1965].

⁸ R. KUHN u. I. LÖW, Chem. Ber. **85**, 416 [1952].

⁹ Y. SATO, A. KATZ u. E. MOSETTIG, J. Amer. chem. Soc. **74**, 538 [1952].

¹⁰ Wir möchten an dieser Stelle Herrn Professor Dr. M. STEINER, Institut für Pharmakognosie, Bonn, vielmals für die Überlassung eines Gewächshauses danken. Herrn Gärtnermeister ECHTLE sei für die Betreuung der Pflanzen gedankt.

Zur Biosynthese von Steroid-Derivaten im Pflanzenbereich

5. Mitt. ¹: Versuche zur Aufklärung von Zusammenhängen zwischen der Digitanol- und Cardenolidbiosynthese

R. TSCHESCHE und B. BRASSAT

Organisch-Chemisches Institut der Universität Bonn

(Z. Naturforschg. **21 b**, 894—895 [1966]; eingegangen am 6. Juni 1966)

In zahlreichen Pflanzen aus den Familien der Asclepiadaceen und Scrofulariaceen sind Steroid-Derivate mit 21 C-Atomen gefunden worden, die als gemeinsame Strukturmerkmale eine 3 β -OH-Gruppe, eine

Sauerstofffunktion an C-20 und im Steroidgerüst bis zu drei weitere Sauerstofffunktionen enthalten. Die 3 β -OH-Gruppe dieser sogenannten Digitanol-Derivate^{2,3} ist im nativen Zustand glykosidiert.

Die biochemische Bedeutung dieser Substanzklasse ist bislang ungeklärt. 1960 haben TSCHESCHE und SNATZKE⁴ die Vermutung ausgesprochen, daß sie im Δ^5 -Pregnenol-3 β -on-20 eine gemeinsame biogenetische Vorstufe haben. Nachdem TSCHESCHE und LILIENWEISS⁵ der Nachweis der Biosynthese von radioaktiv markierten Cardenoliden aus 21-¹⁴C-Pregnenolonglucosid an *Digitalis lanata* gelungen war, erschien es denkbar, daß es sich bei den stärker hydroxylierten Digitanolen um Zwischen- oder Nebenprodukte bei der Cardenolid-Biosynthese handelt.

¹ 4. Mitt.: R. TSCHESCHE u. H. HULPKE, Z. Naturforschg., im Druck.

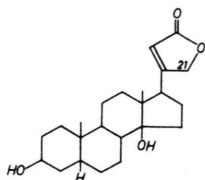
² R. TSCHESCHE, Angew. Chem. **73**, 727 [1961].

³ R. TSCHESCHE, Bull. Soc. chim. France **1965**, 1219.

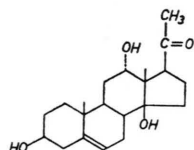
⁴ R. TSCHESCHE u. G. SNATZKE, Liebigs Ann. Chem. **636**, 105 [1960].

⁵ R. TSCHESCHE u. G. LILIENWEISS, Z. Naturforschg. **19 b**, 265 [1964].

Zur Überprüfung dieser Zusammenhänge behandeln wir Blätter von *Digitalis purpurea* mit $21\text{-}^{14}\text{C}$ -Pregnenolonglucosid. Diese Pflanze enthält neben Digitoxigenin (I) und anderen Cardenoliden das Digipurpurin-Derivat Digipurpurogenin (II) in Form seines Tridigitoxosids Digipurpurin, das in *Digitalis lanata* nicht vorkommt.



I Digitoxigenin



II Digipurpurogenin

Die Applikation erfolgte durch Einstellen der abgeschnittenen Digitalisblätter in eine wäßrige Lösung des radioaktiven Pregnenolonglucosids. Die Blätter blieben während der Inkubationszeit im Gewächshaus bei 18 bis 22 °C unter zusätzlicher künstlicher Beleuchtung (15 Stdn./Tag) *. Die eingesetzte Aktivität betrug 0,65 mC = $1,7 \cdot 10^8$ Imp./Min. (gemessen im fensterlosen Methandurchflußzähler FH 407 mit Handprobenwechsler BL 503 der Fa. Friesecke & Höpfner). Nach 11 Tagen hatten die Blätter 15,5% der Aktivität aufgenommen.

Die Aufarbeitung geschah zunächst durch Homogenisieren und mehrmaliges Extrahieren mit Methanol. Die Herstellung eines Radiochromatogramms und die Abschätzung der Peakflächen ergab, daß mindestens 70% des aufgenommenen $21\text{-}^{14}\text{C}$ -Pregnenolonglucosids metabolisiert worden waren.

Aus dem Extrakt wurden Chlorophyll und andere stark lipophile Substanzen durch Phasenverteilung zwischen Methanol/Wasser und Cyclohexan entfernt. Zur weiteren Anreicherung schüttelte man die wasserhaltige Phase mit Chloroform aus.

Im Interesse einer einfachen Auftrennung des Gemisches schien es angebracht, die Glykoside einer sauren Spaltung zu unterwerfen. Allerdings bewirkt die Säurebehandlung außerdem eine Umlagerung der im nativen Digipurpurogenin enthaltenen 12α -Hydroxygruppe nach 12β . Durch geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen ließ sich diese Umlagerung jedoch praktisch quantitativ gestalten, so daß bei der weiteren Auftrennung des Substanzgemisches die 12β -Hydroxyverbindung Digipurpurogenin II als einheitliches Folgeprodukt anfiel.

Die erhaltenen Aglykone ließen sich durch Phasenverteilung zwischen Wasser/Methanol und Chloroform von den Zuckern trennen. Aus dem Eindampfdruckstand der schweren Phasen wurde durch Säulenchromatographie an SiO_2 mit Chloroform und steigenden Mengen Essigester als Laufmittel sowie anschließende Schichtchro-

matographie an Kieselgel G (Merck) eine Digipurpurogenin II enthaltende Fraktion gewonnen. Nach Mischen mit authentischem Digipurpurogenin II und Acetylieren des Substanzgemisches mit Acetanhydrid in Pyridin fiel durch Kristallisation reines Digipurpurogenin II-acetat an, welches keine nachweisbare Radioaktivität enthielt. Aus der von den Pflanzen aufgenommenen Aktivität und der bei der Acetylierung eingesetzten Substanzmenge ergibt sich unter Berücksichtigung der Empfindlichkeit der benutzten Zählapparatur und der Reproduzierbarkeit der Meßwerte für die Einbaurate der Radioaktivität in das Digipurpurin der Pflanze ein Höchstwert von $1,1 \cdot 10^{-3}$ Prozent.

Aus einer weiteren bei der chromatographischen Anreicherung der Aglykone anfallenden Fraktion ließ sich radioaktives Digitoxigenin isolieren. Durch Cokristallisation sowohl des Digitoxigenins als auch seines Acetats mit authentischem inaktivem Material gelangte man in allen Fällen zu Präparaten, deren spezifische Aktivität sich bei weiterem Umkristallisieren nicht mehr änderte und für die Kristalle und die eingedampften Mutterlaugen den gleichen Wert besaß. Die Einbaurate betrug hier mindestens 0,12 Prozent. Damit erhält die von TSCHESCHE und LILLENWEISS ⁵ an *Digitalis lanata* beobachtete Biosynthese von Digitoxigenin aus Pregnenolonglucosid auch für *Digitalis purpurea* ihre Bestätigung.

Die Entstehung des radioaktiven Digitoxigenins könnte man auch dadurch erklären, daß die Pflanze das angebotene Pregnenolon abbaut, wobei die markierte Acetylgruppe in Form von $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA wieder zum Aufbau von Steroiden verwendet wird. In diesem Fall müßte sich Radioaktivität im gesamten Steroidgerüst des Digitoxigenins nachweisen lassen. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde das Digitoxigenin nach einer Vorschrift von v. EUW und REICHSTEIN ⁶ abgebaut. Dabei konnte die gesamte Radioaktivität im Butenolidring lokalisiert werden, und zwar ausschließlich im C-21. Damit gewinnt die Vermutung an Gewicht, daß der Aufbau des Butenolidrings der Cardenolide durch Angliederung von Malonyl-Co-A bewirkt wird. Während der Gehalt der Pflanze an Digipurpurogenin etwa ein Zehntel des Digitoxigeningehalts — bezogen auf die Molzahlen — beträgt, entsprechen die Gesamtaktivitäten beider Substanzen bei weitem nicht diesem Zahlenverhältnis. Die im Digitoxigenin nachgewiesene Aktivität liegt mindestens um das Hundertfache höher als die Gesamtaktivität des Digipurpurogenins. Auf Grund dessen ist nicht anzunehmen, daß die Biosynthese beider Substanzen miteinander gekoppelt ist.

Aus den vorliegenden Befunden geht jedoch nicht eindeutig hervor, daß zwischen Pregnenolon und Digipurpurin kein biogenetischer Zusammenhang besteht. Möglicherweise entsteht Digipurpurin nicht in den Blättern der Pflanze. Denkbar ist auch, daß seine Biosynthese auf bestimmte Entwicklungsphasen der Pflanze oder auf bestimmte Jahreszeiten beschränkt ist. Versuche, diese Fragen zu klären, sind aufgenommen worden.

* Herrn Prof. Dr. M. STEINER, Direktor des Pharmakognostischen Instituts der Bonner Universität, sei auch an dieser Stelle herzlich für die Erlaubnis zur Benutzung des Gewächshauses gedankt.

⁶ J. v. EUW u. T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta 47, 711 [1964].