

Untersuchungen zur Biogenese der Cardenolide in *Convallaria majalis* L.: Umwandlungen auf der Geninstufe

Cardenolide Biogenesis in *Convallaria majalis* L.

Brigitte Kopp *, Wolfgang Löffelhardt ** und Wolfgang Kubelka *

* Institut für Pharmakognosie der Universität Wien

** Institut für Allgemeine Biochemie der Universität Wien und
Ludwig Boltzmann-Forschungsstelle für Biochemie, Wien

Z. Naturforsch. 33 c, 646–650 (1978); eingegangen am 17. Juli 1978

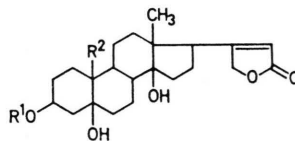
Convallaria majalis L., [19-³H]Strophanthidol, [19-³H]Strophanthidin,
Cardenolide Biogenesis, Translocation

[19-³H]Strophanthidol, fed to leaves of whole plants of *Convallaria majalis* L., was translocated to the rhizomes and roots. Oxidation to [19-³H]strophanthidin took place in the leaves only. No labelled glycosides of strophanthidol and strophanthidin were found; thus, the aglycones are not precursors of the respective glycosides. It is assumed that the first glycosidation occurs at the C-21 level.

Einleitung

Die Biogenese des Steroidanteils der Cardenolidglykoside ist in großen Zügen bereits aufgeklärt [1–5]. Wir haben in früheren Arbeiten die biogenetischen Umsetzungen der herzaktiven Glykoside in *Convallaria majalis* auf der Monoglykosidstufe untersucht und konnten zeigen, daß Biosyntheseschritte wie die Hydroxylierung der C-Atome 5 und 11 und die schrittweise Oxidation des C-Atoms 19 auf der Monoglykosidstufe stattfinden; nach diesen Reaktionen stellt die abschließende Glucosidierung der Monoglykoside die Fortsetzung im Biogeneseweg dar [6–8]. Unbeantwortet blieb bei bisher allen Untersuchungen die Frage, auf welcher Stufe (C₂₁ = Pregnan- oder C₂₃ = Aglykonstufe) die erste Glykosidierung des Steroids eintritt.

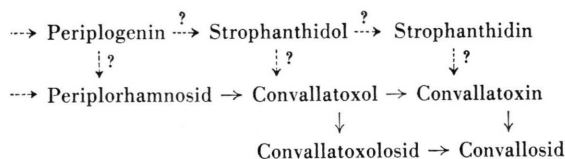
Nachdem wir bei der Isolierung der schwach polaren Cardenolide aus *Convallaria majalis* [9] auch die Aglykone Periplogenin, Strophanthidol und Strophanthidin in geringer Menge aufgefunden haben (Abb. 1), stellte sich die Frage, ob diese Substanzen direkte biogenetische Vorstufen der Convallaria-Glykoside sind. Die niedrige Konzentration dieser Zwischenprodukte ließe sich auf rasch erfolgende Glykosidierung zurückführen. Daß Genine mit verschiedener Oxidationsstufe am C-19 isoliert wurden, könnte auf eine Zweigleisigkeit des Bio-



R ¹ =H	R ² =CH ₃	Periplogenin
R ¹ =H	R ² =CH ₂ OH	Strophanthidol
R ¹ =H	R ² =CHO	Strophanthidin
R ¹ =rhamnosyl	R ² =CH ₃	Periplorhamnosid
R ¹ =rhamnosyl	R ² =CH ₂ OH	Convallatoxol
R ¹ =rhamnosyl	R ² =CHO	Convallatoxin

Abb. 1.

syntheseweges hindeuten (Schema 1), wie dies auch im Fall der Digitalisglykoside nachgewiesen wurde [10].



Schema 1.

Es wäre aber auch denkbar, daß die aus *Convallaria majalis* isolierten Genine im Zeitraum zwischen der Ernte der Pflanzen und der Extraktion der Cardenolide durch Einwirkung von Glykosidasen entstanden sind.

Eine Antwort auf diese Fragestellung ließ sich durch Verabreichung eines radioaktiv markierten Genins erwarten. Strophanthidol – das Aglykon mit der mittleren Oxidationsstufe am C-Atom 19 – schien uns für eine Applikation am geeignetsten,

weil diese Substanz einer radioaktiven Markierung leicht zugänglich und überdies am besten wasserlöslich ist.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial: Aus früheren Untersuchungen war bekannt, daß *Convallaria majalis* zu Beginn der Blütezeit den höchsten Cardenolidgehalt aufweist [11]. Um von der Vegetationsperiode der Freilandpflanzen unabhängig zu sein, verwendeten wir für unsere Versuch „Eiskeimlinge“ (Blütezeit Juli), die im Glashaus unseres Institutes gezogen wurden. Der Cardenolidgehalt dieser Pflanzen liegt vergleichsweise zu dem von Freilandpflanzen derselben Population um etwa 50% höher (0,44% Gesamtcardenolidgehalt, bezogen auf Trockengewicht).

[19-³H]Strophanthidol:

5 mg Strophanthidin (Fp. 144–146 °/230 bis 235 °C), gelöst in 0,5 ml 75 proz. Dioxan, wurden in eine Lösung von 25 mCi NaBT₄ (Radiochemical Centre, Amersham; 293 mCi/mmol = 7,7 mCi/mg) in 1,8 ml 75-proz. Dioxan eingebracht. Nach 5-stündigem Stehen bei 20 °C stellen wir mit 1 N H₂SO₄ auf pH = 3 ein und entfernten das Dioxan im Vakuum unter Zugabe von 2mal 2 ml Wasser. Die wäßrige Lösung wurde 3mal mit 15 ml Chloroform-Alkohol (9:1) ausgeschüttelt und der Rückstand der organischen Phase durch DC (Kieselgel F-254 PSC-Fertigplatten Merck, System: Chloroform-Methanol-Wasser 75:25:10, Unterphase) gereinigt. Die Auszählung des radiochromatographisch einheitlichen Produktes ergab $1,20 \times 10^9$ dpm, entsprechend 108 µCi/mg Strophanthidol (= 43,8 mCi/mmol).

Applikation von [19-³H]Strophanthidol an abgeschnittene Blätter von *Convallaria majalis*:

Ein Teil des radiochromatographisch einheitlichen Strophanthidols ($3,50 \times 10^7$ dpm) wurde in 0,4 ml 20-prozentigem Alkohol gelöst. Die Lösung ließen wir von fünf am Blattstiel abgeschnittenen Blättern von *Convallaria majalis* (Länge ca. 10 cm) einsaugen; nach 2 Stunden war die Lösung vollständig aufgenommen. Unter wiederholter Wasserzugabe blieben die Blätter 8 Tage im Laboratorium (Tageslicht) stehen.

Applikation von [19-³H]Strophanthidol an ganze *Convallaria*-Pflanzen:

6 kräftige Blätter von 3 Einzelpflanzen* wurden mit einer Lösung von 2% Tween 20 in Wasser gewaschen. $8,56 \times 10^7$ dpm des Precursors wurden in 0,3 ml 40-prozentigem Alkohol gelöst und mit Hilfe einer Pasteurpipette auf die vorbehandelten Blattspreiten appliziert. Nach dem Eintrocknen der alkoholischen Lösung besprühten wir die Blätter mit einer Mischung von Petroläther-Siliconöl (1:1) [12]. Das nach Verdampfen des Petroläthers verbliebene Siliconöl wurde rasch aufgenommen und war innerhalb eines Tages von der Blattoberfläche verschwunden.

Isolierung und Identifizierung des Folgeproduktes:

Nach 8 Tagen wurden die Blätter der ganzen Pflanzen kurz über dem Rhizom abgeschnitten und nicht aufgenommener Precursor von den Blattspreiten mit 70-prozentigem Alkohol abgewaschen. Die Blätter aus beiden Versuchen wurden jeweils zerschnitten und getrennt 2mal mit je 30 g Alkohol heiß extrahiert, der Rückstand der Alkohollösung in 20 ml Wasser gelöst und zur Entfernung von Ballaststoffen 2mal mit je 5 ml Benzol ausgeschüttelt. Mit 3mal 30 ml Chloroform-Alkohol (9:1) und 3mal 30 ml Chloroform-Alkohol (3:2) extrahierten wir die Cardenolide.

Die unterirdischen Anteile (Rhizome mit Wurzeln) aus dem oben beschriebenen Versuch mit „Einzelpflanzen“ wurden analog aufgearbeitet.

Der Rückstand der organischen Phase aus den 3 Extraktionen wurde – gelöst in Chloroform-Methanol (1:1) – für die PC verwendet (Schleicher und Schüll, 2043 b Mgl, System: Toluol-*n*-Butanol 9:1, wasergesättigt, 35% stationäre Phase). Neben der Hauptmenge an Ausgangsmaterial (Strophanthidol, hRF = 40) war auf den Papierchromatogrammen beider Blattextrakte eine weitere radioaktive Zone nachweisbar (hRF = 62) mit gleicher Laufstrecke wie Strophanthidin. Diese Zone des Folgeproduktes schnitten wir aus dem PC aus, extrahierten wiederholt mit Chloroform-Methanol (1:1) und chromatographierten nochmals (DC, Kieselgel 60 F-254 Fertigplatte Merck, System: Chloroform-Me-

* Abweichend von der botanischen Bedeutung bezeichnen wir als „Einzelpflanze“ einen einzelnen Sproß mit ausgegrabenem Rhizomteil und anhaftenden Wurzeln.

thanol-Wasser 8:2:1, Unterphase). Das Folgeprodukt wurde wiederum eluiert, ein aliquoter Teil mit inaktivem Strophanthidin vermischt und aus Methanol-Wasser bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität umkristallisiert.

Einen weiteren aliquoten Teil des Folgeproduktes lösten wir zusammen mit 1 mg inaktivem Strophanthidin in 0,4 ml Pyridin p. a., versetzten mit 0,3 ml Essigsäureanhydrid p. a. und ließen das Reaktionsgemisch 48 Stunden bei Zimmertemperatur verschlossen stehen. Anschließend wurde unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft und der Rückstand über konz. Schwefelsäure belassen, bis der Geruch nach Pyridin verschwunden war. Das Rohacetat – gelöst in Chloroform-Methanol (1:1) – wurde für den chromatographischen Vergleich mit Strophanthidinacetat verwendet (DC: Kieselgel 60 F-254, Merck-Fertigplatte, System: Chloroform-Methanol-Wasser 9:1:1, Unterphase; PC: Schleicher und Schüll, 2043 b Mgl, imprägniert mit Aceton-Formamid 4:1, System: Benzol, formamid-gesättigt).

Die papierchromatographische Auftrennung des Extraktes aus Rhizom und Wurzel (Schleicher und Schüll, 2043 b Mgl; System: Toluol-*n*-Butanol 9:1, wassergesättigt, 35% stationäre Phase) zeigte nur eine radioaktive Zone ($hR_f = 40$). Diese wurde aus dem PC ausgeschnitten, eluiert und rechromatographiert (DC: Kieselgel 60 F-254 Fertigplatte Merck, System: Chloroform-Methanol-Wasser 8:2:1, Unterphase, $hR_f = 50$), wiederum eluiert und nochmals chromatographiert (DC: Kieselgel 60 F-254 Fertigplatte Merck, System: Essigsäureäthylester-Methanol 95:5, $hR_f = 30$).

Nach Acetylierung chromatographierten wir das Rohacetat (DC: Kieselgel 60 F-254 Fertigplatte

Merck, System: Chloroform-Methanol-Wasser 9:1:1, Unterphase). Es zeigte gleiche Laufstrecke wie die Vergleichssubstanz Strophanthidol-3,19-diacetat.

Zu allen Versuchen wurden Blindproben angesetzt, der Austausch an Tritium war jedoch unter der Nachweisgrenze.

Messung der Radioaktivität:

Die Auszählung der radioaktiven Zonen der PC erfolgte mit Hilfe eines 4 π -PC-Scanners der Fa. Tracerlab.

Die Aktivität auf den DC-Platten wurde mittels eines DC-Scanners mit 2 π -Meßkopf (Fa. Berthold) bestimmt.

Die kristallinen Proben wurden im Flüssigszintillationszähler (Fa. Beckman LS-230) ausgewählt.

Ergebnisse und Diskussion

Wenn Strophanthidol eine direkte Vorstufe in der Biogenese einiger Cardenolidglykoside in *Convallaria majalis* darstellt, so sind nach Vorgabe dieses Precursors Glykoside des Strophanthidols bzw. des Oxidationsproduktes Strophanthidin zu erwarten. Eine Reduktion von Strophanthidol und dessen Glykosiden war nach den Befunden früherer Untersuchungen [6–8] auszuschließen. Durch die Variation der Applikationsmethoden sollte versucht werden, die Aufnahme und Umsetzungsrate zu optimieren und auch Aussage über einen möglichen Transport von Metaboliten innerhalb intakter Pflanzen zu erhalten.

Die nach der Verabreichung von [19-³H]Strophanthidol erhaltenen Befunde zeigen die Tabn. I und II.

Precursor	Akt. [μ Ci]	spez. Akt. [μ Ci/ μ mol]	Folgeprodukt	Akt. [dpm]	Einbau [%]
[19- ³ H]Strophanthidol	15,9	266	[19- ³ H]Strophanthidin	$1,75 \times 10^5$	0,50

Tab. I. Einbau von [19-³H]Strophanthidol in Strophanthidin nach Applikation an abgeschnittene *Convallaria*-Blätter.

Akt. d. Vorstufe [μ Ci]	spez. Akt. [μ Ci/ μ mol]	Pflanzenteil	Isolierte Substanz	Akt. [dpm]	Einbau bzw. Translokation [%]
38,58	266	Blätter	[19- ³ H]Strophanthidin	$3,11 \times 10^5$	0,036
		Wurzeln Rhizome	[19- ³ H]Strophanthidol	$3,04 \times 10^6$	0,355

Tab. II. Stoffwechsel von [19-³H]-Strophanthidol nach Applikation über die Blattspreite ganzer *Convallaria*-Pflanzen.

Bei beiden Applikationsmethoden konnte als einziges Folgeprodukt das oxidierte Genin Strophanthidin isoliert werden. Für eine Glykosidierung fanden wir keine Anhaltspunkte: die Zonen der entsprechenden Rhamnoside, Gulomethyloside und Al-lomethyloside auf den Papierchromatogrammen waren stets frei von Aktivität.

In *Convallaria majalis* ist nach den erhaltenen Befunden die Oxidation des C-Atoms 19 von der Hydroxymethyl- zur Formylgruppe auch auf der Geninstufe möglich. Das die Umwandlung Conval-latoxol-Convallatoxin katalysierende Enzym – eine NAD^+ -abhängige Dehydrogenase [8] – scheint demnach nicht streng spezifisch in bezug auf das Substrat zu sein. So wie die Hydroxylierung des C-12 bei Digitalisglykosiden sowohl auf der Pregnan- als auch auf der Cardenolidstufe möglich ist [13], kann in *Convallaria majalis* die Oxidation des C-19 sowohl auf der Genin- als auch auf der Monoglyko-sidstufe stattfinden.

Die Umsetzungsrate von Strophanthidol ist um etwa das 10fache (nach der ersten Applikations-methode) und mehr als das 100fache (nach der zweiten Verabreichungsart) niedriger als die Ein-baurate des Strophanthidolglykosides [6, 7]. Der geringe Umsatz kann verschiedene Ursachen haben: Einmal wird das relativ unpolare Aglykon von der Pflanze schlechter aufgenommen als das besser was-serlösliche Glykosid. Zum anderen liegt aber offen-bar die beobachtete Umsetzung auf der Geninstufe nicht im direkten Biosyntheseweg der Cardenolid-glykoside und besitzt daher nur zweitrangige Be-deutung. Darauf deutet das Fehlen radioaktiv mar-kierter Glykoside bei den erwähnten Experimenten hin.

Bemerkenswert scheint noch der Befund, daß nach Applikation von $[19\text{-}^3\text{H}]$ Strophanthidol an die Blatt-spreiten ganzer Pflanzen dieses Genin auch in den unterirdischen Organen nachzuweisen war. Es muß demnach ein Transport von Strophanthidol aus dem Blatt in Rhizom und Wurzel stattgefunden haben. Aber auch in diesen Pflanzenteilen war keine Glyko-sidierung des Aglykons feststellbar.

Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse kann ge-schlossen werden, daß weder Strophanthidol noch Strophanthidin Zwischenprodukte der Cardenolid-biogenese sind, da sie keine Vorläufer der Glykoside Conval-latoxol und Convallatoxin darstellen.

Da bisher über den Metabolismus von Cardeno-lid-Aglykonen kaum Untersuchungen vorliegen, ist auch noch unbekannt, wann es zur Glykodisierung des Steroidanteiles kommt. Einige Befunde weisen aber darauf hin, daß bereits C_{21} -Verbindungen durch Glykosidierung in eine besser wasserlösliche Form übergeführt werden. In mehreren cardenolid-führenden Pflanzen – wie beispielsweise in *Digi-talis lanata* und *Digitalis purpurea* [14–17], in *Nerium odorum* [18] oder *Adonis amurensis* [19] – sind neben herzaktiven Substanzen auch C_{21} -Glykoside aufgefunden worden, wobei einige dieser Verbindungen an C-14 β -hydroxyliert sind wie alle Cardenolide. Über eine Funktion dieser Glykoside hinsichtlich der Biosynthese herzwirksamer Substan-zen gibt es bisher kaum Untersuchungen. Bekannt ist nur, daß in Keimlingen von *Digitalis lanata* vor dem Einsetzen der „Cardenolidproduktion“ vorerst Di-gitanolglykoside gebildet werden [14].

Der Nachweis von 5β -Pregnan- $3\beta,21\beta$ -diol-20-on-monoglucosid u. a. in Suspensionskulturen von *Digi-talis purpurea* [20] nach Vorgabe von 5β -Pregnan- $3,20$ -dion sowie die Isolierung verschieden substitu-ierter Pregnanglucoside aus Zellkulturen von *Digi-talis purpurea* [21] nach Applikation von ^{14}C -Pro-gesteron sprechen ebenfalls dafür, daß eine erste Glykosidierung auf der C_{21} -Stufe stattfindet.

Nach Verabreichung von $[^{14}\text{C}]$ Progesteron an ganze Pflanzen von *Digitalis lanata* wurden als Fol-geprodukte Substanzen extrahiert, die nach anschlie-ßender Säurehydrolyse als C_{21} -Verbindungen und Cardenolidaglykone [22] identifiziert wurden; auch hier scheint Glykosidierung eingetreten zu sein.

Bei *Convallaria majalis* letztlich konnten wir fest-stellen, daß die Genine Strophanthidol und Stro-phanthidin keine direkten biogenetischen Vorläufer der herzwirksamen Glykoside sind. Mit hoher Wahr-scheinlichkeit erfolgt demnach die erste Glykosi-dierung noch vor der Bildung des Laktonringes.

[1] J. v. Euw u. T. Reichstein, Helv. Chim. Acta **49**, 1468–1474 (1966).

[2] E. Caspi, O. Lewis, D. M. Piatak, K. V. Thimann u. A. Winter, Experientia **22**, 506–507 (1966).

[3] R. Tschesche, Planta Med. Suppl. **4**, 34–39 (1971).

[4] R. Tschesche u. U. Kleff, Phytochemistry **12**, 2375–2380 (1973).

[5] H. H. Sauer, R. D. Bennett u. E. Heftmann, Phyto-chemistry **7**, 1543–1546 (1968).

- [6] W. Kubelka, B. Kopp, K. Jentzsch u. H. Ruis, *Phytochemistry* **13**, 1805–1808 (1974).
- [7] W. Kubelka, B. Kopp, K. Jentzsch u. H. Ruis, *Phytochemistry* **16**, 687–690 (1977).
- [8] W. Löffelhardt, B. Kopp u. W. Kubelka, *Phytochemistry* **17**, 1581–1584 (1978).
- [9] W. Kubelka, B. Kopp u. K. Jentzsch, *Pharm. Acta Helv.* **50**, 353–359 (1975).
- [10] R. Tschesche, R. Hombach, H. Scholten u. M. Peters, *Phytochemistry* **9**, 1505–1515 (1970).
- [11] B. Kopp, Dissertation Universität Wien (1975).
- [12] R. Tschesche, G. Piestert u. H. W. Güttel, *Phytochemistry* **14**, 129–131 (1975).
- [13] R. Tschesche u. R. Becker, *Z. Naturforsch.* **25b**, 107–109 (1970).
- [14] R. Tschesche, *Angew. Chem.* **73**, 727–735 (1961).
- [15] C. W. Shoppee u. A. V. Robertson, *J. Chem. Soc.* **1962**, 3610–3624.
- [16] R. Tschesche u. G. Büschauer, *Liebigs Ann. Chem.* **603**, 59–75 (1957).
- [17] H. Mitsuhashi u. T. Nomura, *Steroids* **3**, 271–276 (1964).
- [18] T. Yamauda, M. Hara u. K. Mihashi, *Phytochemistry* **11**, 3345–3347 (1972).
- [19] S. Yoshimasa u. H. Mitsuhashi, *Lloydia* **41**, 1–16 (1978).
- [20] M. Hirotani u. T. Furuya, *Phytochemistry* **14**, 2601–2606 (1975).
- [21] T. Furuya, K. Kawaguchi u. M. Hirotani, *Phytochemistry* **12**, 1621–1626 (1972).
- [22] R. D. Bennett, H. H. Sauer u. E. Heftmann, *Phytochemistry* **7**, 41–50 (1968).