

BEITRÄGE ZUR BIOCHEMISCHEN 14 β -HYDROXYLIERUNG VON C₂₁-STEROIDEN ZU CARDENOLIDEN*

RUDOLF TSCHESCHE und ULRICH KLEFF

Aus dem Institut für Organische- und Biochemie der Universität Bonn, BRD

(Eingegangen 26. März 1973. Angenommen 20. April 1973)

Key Word Index—*Digitalis lanata*; Scrophulariaceae; cardenolide biogenesis; 14 β -hydroxylation; 7-³H- $\Delta^{8(14)}$ -5 β -pregnen-3,20-dione; 7 α -³H-pregnenolone.

Abstract—It has been demonstrated that 7-³H- $\Delta^{8(14)}$ -5 β -pregnen-3,20-dione (I) and 7 α -³H-pregnenolone (II), but not 6-³H- Δ^7 -progesterone (III) were utilized for the biogenesis of digitoxigenin by plants of *Digitalis lanata*. These results are discussed in relation to the 14 β -hydroxylation of the cardenolides.

EINFÜHRUNG

WAHREND hinsichtlich Progesteron und Pregnenolon als Vorstufen der Cardenolidbiogenese keine Zweifel bestehen und die 2 zusätzlichen C-Atome zur Bildung des Lactonringes vermutlich in Form von Acetyl- oder Malonyl-CoA zur C₂₃-Stufe eingeführt werden,¹ ist zwar über das Problem der 14 β -Hydroxylierung dieser Stoffklasse verschiedentlich gearbeitet worden, ohne daß aber entscheidende Erkenntnisse erzielt werden konnten. Eingehend haben sich mit dieser Frage Caspi und Mitarb.² befaßt, sie erwogen zunächst eine 14 α -Hydroxylierung, Abspaltung von Wasser zur Δ^{14} -Doppelbindung (oder auch nach $\Delta^{8(14)}$), Epoxydierung in β und Öffnung des Epoxidringes zu einem 14 β -Hydroxyl. Damit verändert sich zugleich die Verknüpfung der Ringe C/D von *trans* nach *cis*.

Gegen diese Vorstellungen sprechen folgende Gründe. Einmal berichten die genannten Autoren selbst, daß 1-³H-14 α -Hydroxy-progesteron von *Digitalis*-Pflanzen nicht zur Digitoxigeninsynthese verwertet wird, eine Inversion des 14 α -OH nach β demnach auszuschließen ist. Zum anderen kommen Verbindungen mit einer Δ^{14} -Doppelbindung nicht in Frage, da Δ^{14} -Progesteron, wie wir zeigen konnten,³ nicht ausgenutzt wird. Ferner haben Canonica und Mitarb.⁴ weder mit 15 β -³H-4-¹⁴C-Progesteron noch mit 15 α ,15 β ,21,21,21-³H₅-4-¹⁴C-Pregn-5-en-3 β -ol-20-on einen Einbau in Cardenolide feststellen können. Die beiden ³H an C-15 werden nicht von der 14 β -Hydroxylierung erfaßt. Aberhart und Caspi⁵ haben ferner eine $\Delta^{8(14)}$ -Zwischenstufe in Erwägung gezogen; dabei sollte eventuell die 14 β -OH-Gruppe von der Seitenkette her eingeführt werden. Pflanzenversuche hierzu liegen jedoch anscheinend nicht vor.

Daß die 14 β -Hydroxylierung auf der Pregnanstufe abläuft, ergibt sich aus der Wirksamkeit von 5 β -Pregnan-3 β ,14 β -diol-20-on⁶ und 5 β -Pregnan-3 β ,14 β ,21-triol-20-on,⁷ die

* Mitt. XVIII: "Zur Biosynthese von Steroidderivaten im Pflanzenreich". Mitt. XVII: TSCHESCHE, R. und LEINERT, J. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1619.

¹ TSCHESCHE, R. (1972) *Proc. R. Soc. (London)* **180**, 187.

² CASPI, E. und LEWIS, D. O. (1968) *Phytochem.* **7**, 683.

³ TSCHESCHE, R., HOMBACH, R., SCHOLTEN, H. und PETERS, M. (1970) *Phytochemistry* **9**, 1505.

⁴ CANONICA, L., RONCHETTI, F. und RUSSO, G. (1970) *Chem. Commun.* 1675.

⁵ ABERHART, D. J. und CASPI, E. (1971) *J. Chem. Soc. C*, 2069.

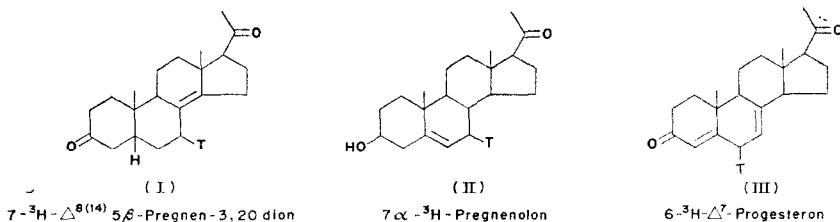
⁶ TSCHESCHE, R., HULPKE, H. und SCHOLTEN, H. (1967) *Z. Naturforsch* **22b**, 677.

⁷ TSCHESCHE, R., BECKER, R. und HOMBACH, R. (1968) *Z. Naturforsch* **23b**, 1615.

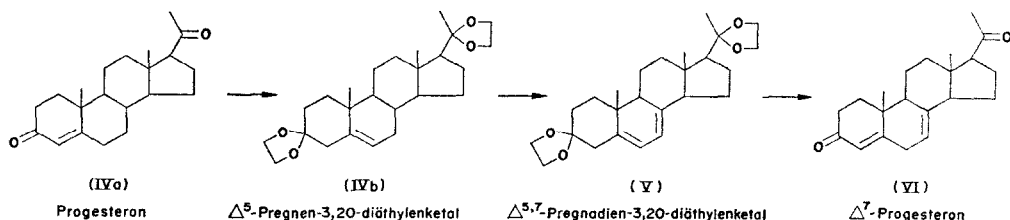
beide keine Doppelbindung im Ring *B* enthalten. Auch $5\beta,14\beta$ -Pregnan-3 β -ol-20-on³ hatte nur eine sehr bescheidene Aktivität bei der Cardenolidbiogenese gezeigt, so daß es nicht wahrscheinlich ist, daß dieses eine Zwischenstufe auf dem Hauptweg der Biogenese darstellt.

HERSTELLUNG DER VERSUCHSSUBSTANZEN

Nachdem die bisherigen Versuche eine 14β -Hydroxylierung vom Ring *D* her ausschliessen, haben wir zwei im Ring *B* substituierte Pregnanderivate hergestellt und auf ihre Brauchbarkeit zur Cardenolidbiogenese bei *Digitalis lanata*-Pflanzen geprüft. Es wurden synthetisiert: $7\text{-}^3\text{H-}\Delta^{8(14)}\text{-}5\beta$ -Pregnen-3,20-dion (I) und $6\text{-}^3\text{H-}\Delta^7$ -Progesteron (III).



Die Verbindung (II) ($7\alpha\text{-}^3\text{H-Pregnenolol}$) ist im Handel erhältlich* und wurde als solche eingesetzt. $6\text{-}^3\text{H-}\Delta^7\text{-Progesteron}$ (III) wurde aus Progesteron (IVa) bereitet.⁸ Zunächst wurde das Diäthylenketal (IVb) hergestellt, dabei wird die Δ^4 -Doppelbindung nach Δ^5 verschoben, Allylbromierung und anschließende Dehydrobromierung liefert ein $\Delta^{5,7}$ -Dien (V), aus dem bei der Deketalisierung die Δ^5 -Doppelbindung nach Δ^4 zurückwandert und die Δ^7 -Position erhalten bleibt. Die Wanderung der Doppelbindung ist mit einer intermediären Protonierung verbunden, so daß eine Tritierung an C-6 möglich wird.



Verbindung (I) wurde aus Δ^7 -Progesteron (VI)⁸ hergestellt. Es ließ sich in Pyridin mit einem Pd/C-Katalysator hydrieren,⁹ wobei keine Veränderung an der Δ^7 -Doppelbindung eintrat. Die Hydrierung an Δ^4 führt zu einem Gemisch von gleichen Teilen 5α - und 5β -Verbindung (VII), die auf Dünnschichtplatten getrennt werden konnten. Das 5β -Derivat erlaubte mit einem Pt-Katalysator in Essigsäure eine Verschiebung der Δ^7 -Doppelbindung nach $\Delta^{8(14)}$ (VIII).¹⁰ Der Vorgang ist mit einer intermediären Protonierung verbunden, so daß an C-7 ^3H eingebaut werden kann. Allerdings ist die Position des ^3H an C-7 nicht sicher als α auszumachen, Analogieschlüsse sprechen jedoch vorwiegend für diese Stellung.

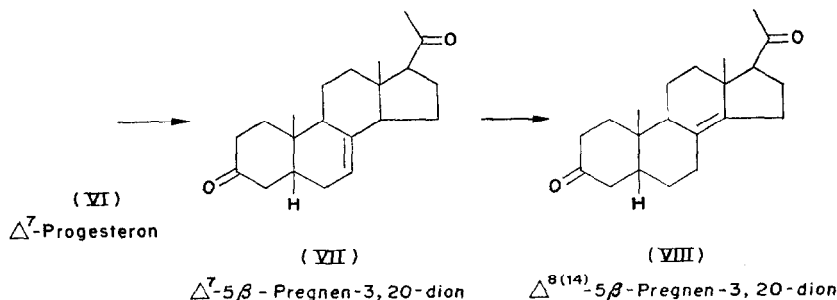
* Standardverfahren der Firma Amersham Buchler GmbH & Co KG, D 3300 Braunschweig, Postfach 1120.

⁸ ANTONUCCI, R., BERNSTEIN, S., LENHARD, R., SAX, K. J. und WILLIAMS, J. H. (1952) *J. Org. Chem.* **17**, 1369.

⁹ FREIFELDER, H. (1971) *Practical Catalytic Hydrogenation*, p. 132, Wiley-Interscience, London.

¹⁰ WIELAND, H. und BENEND, W. (1943) *Ann. Chem.* **554**, 1.

Im inaktiven $\Delta^{8(14)}$ -Derivat (VIII) ließ sich im NMR der Verlust eines vinyllischen Protons erkennen, die Doppelbindung konnte durch den Molekularpeak in der Massenspektrometrie gesichert werden. Die Position der Doppelbindung als $\Delta^{8(14)}$ ergibt sich aus dem Vergleich der NMR-Werte für die Protonen an C-18 und C-19 mit den nach Zürcher¹¹ berechneten Werten für die $\Delta^{8(9)}$ - und $\Delta^{8(14)}$ -Verbindung, die nur mit letzterer hinreichend übereinstimmen.



ERGEBNISSE

Die durch ^3H markierten Pregnanderivate I–III wurden *Digitalis-lanata*-Pflanzen zusammen mit $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Analogen in der früher beschriebenen Weise⁴ angeboten. Die Tabelle 1 gibt die nach 21 Tagen erhaltenen Ergebnisse wieder.

TABELLE 1. METABOLISIERUNG DER PREGNANDERIVATE IN *Digitalis lanata* PFLANZEN NACH 21 TAGEN

	Applizierte Aktivität (dpm $\times 10^{-8}$)	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$		Einbau
		vorher	nachher	
7- ^3H - $\Delta^{8(14)}$ -5 β -Pregnen-3,20-dion (I)	1,74	6,7	2,9	43 %
4- ^{14}C -Progesteron	0,26			
7 α - ^3H -Pregnenolon (II)	10,9	13,3	6,8	51 %
4- ^{14}C -Pregnenolon	0,82			
6- ^3H - Δ^7 -Progesteron (III)	1,70	1,28	0	—
4- ^{14}C -Progesteron	1,33			

Die Ergebnisse zeigen, daß nur die Verbindungen I und II zur Cardenolidbiogenese verwertet werden, nicht aber das Derivat III. Zwar verschwinden bei der Metabolisierung ca. 50% des Tritiums, der Rest findet sich im isolierten Digitoxigenin (IX) wieder. Über die Ursache dieses Verlustes kann nichts ausgesagt werden, doch ist zu bedenken, daß beide Substanzen nicht mit gleicher Geschwindigkeit metabolisiert werden müssen. Auch kann der Verlust allein methodisch begründet sein.

DISKUSSION

Da die Verbindung I sich als eine Vorstufe für Digitoxigenin (IX) herausgestellt hat, erhebt sich die Frage, in welcher Weise von ihr aus die 14 β -Hydroxylierung erfolgen könnte. Eine einfache Wasseranlagerung scheint bei der tertiären Natur der C-Atome 8 und 14

¹¹ ZÜRCHER, R. F. (1963) *Helv. Chim. Acta* **46**, 2054.

¹² JANIÁK, P. ST., WEISS, EK., EUW, J. v. und REICHSTEIN, T. (1963) *Helv. Chim. Acta* **46**, 374.

Δ^5 -Pregnen-3,20-diäthylenketal. 5 g Progesteron wurden mit 50 ml frisch destilliertem Äthylenglykol in 700 ml Toluol und mit 200 mg *p*-Toluolsulfonsäure zum Sieden erhitzt. Zunächst destilliert man ca. 400 ml Toluol ab und entfernt anschließend restliches H₂O über ein mit CaH₂ gefülltes Soxhlet. Das Toluol wurde abdestilliert, der Rückstand mit CH₂Cl₂ aufgenommen, die Lösung mit 2%-iger NaHCO₃-Lösung gewaschen, noch einmal mit H₂O ausgeschüttelt und getrocknet (Na₂SO₄). Nach Abdampfen des CH₂Cl₂ verblieb ein schwachgelbes Öl, aus dem in Aceton-MeOH gelöst, Kristalle erhalten werden konnten. Ausbeute: 4,5 g (70%) Schmp. 180–182°. Im IR war keine Ketobande feststellbar. NMR.*) 19-H 0,78 (0,79); 18-H 1,03 (1,04); 21-H 1,28; Ketal 3,90; 6-H 5,28, ppm. C₂₅H₃₈O₄, ber. 402,6 gef. *m/e* 402, 303 (M-99, 55%); 340 (M-62, 60%).

$\Delta^{5,7}$ -Pregnadien-3,20-diäthylenketal. 1 g Δ^5 -Pregnen-3,20-diäthylenketal wurden in 25 ml CCl₄ gelöst. Nach Zugabe von 0,5 g *N*-Bromsuccinimid und 0,2 g Azo-bis-isobutyronitril erhitzte man am Rückflußkühler zum Sieden bis zur leichten Braunfärbung (ca. 5 Min.). Danach wurde sofort ca. 1 g 1,8-Bis-(dimethylamino)-naphthalin hinzugegeben. Nach weiteren 10 Min. Sieden der Lösung wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert und anschließend der CCl₄ abdestilliert. Den Rückstand löste man in 50 ml Benzol und erhitzte weitere 20 Min. mit 1,8-Bis-(dimethylamino)-naphthalin. Der gesamte Versuch wurde unter N₂ ausgeführt. Nach dem Abkühlen der Lösung entfernte man die Base mit 5%-iger HCl und wusch mit NaHCO₃-Lösung neutral. Nach Ausschütteln mit H₂O wurde getrocknet (Na₂SO₄). Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels verblieb ein gelbliches Öl, aus dem mit Aceton weiße feine Nadeln vom Schmp. 188° erhalten werden konnten. Ausbeute: 0,44 g (45%) IR: keine Ketobande. NMR: 19-H 0,959 (0,967); 18-H 0,715 (0,734); 21-H 1,28; Ketal 3,91; 6-, 7-H 5,37 (J 6,5 Hz), ppm. C₂₅H₃₆O₄, ber. 400,5 gef. *m/e* 400, 301 (M-99, 85%); 338 (M-62, 75%).

Δ^7 -Progesteron. Man löste 200 mg $\Delta^{5,7}$ -Pregnadien-3,20-diäthylenketal in 10 ml 70%-iger HOAc und erhitzte 30 Min. unter N₂ mit Rückflußkühler. Nach dem Abkühlen wurden 50 ml Eiswasser hinzugegeben, nach 3 Stunden war der Niederschlag vollständig. Er ließ sich jetzt gut filtrieren und lieferte nach mehrmaligem Umkristallisieren aus wässrigem Aceton blättchenförmige Kristalle vom Schmp. 121°. Ausbeute: 110 mg (70%). UV: $\lambda_{\max}$ (MeOH) = 237 nm. IR: C–C 1620/cm, α,β -unges. C–O 1660/cm (s); C–O 1700/cm (m). NMR: 19-H 1,193 (1,178); 18-H 0,567 (0,550); 21-H 2,14; 7-H 5,25; 4-H 5,82, ppm. C₂₁H₂₈O₂, ber. 312,5 gef. *m/e* 312.

Δ^7 -5 β -Pregnen-3,20-dion. 80 mg Δ^7 -Progesteron wurden in 4 ml Pyridin gelöst und 20 mg Pd/C (10%) hinzugegeben. Die Hydrierung erfolgte bei Raumtemperatur (30 Stunden), anschließend wurde CH₂Cl₂ hinzugefügt, der Katalysator abfiltriert und das Pyridin mit 5%-iger HCl ausgewaschen. Nach Neutralisieren mit NaHCO₃ wurde die Lösung getrocknet (Na₂SO₄). Die Trennung des Rohproduktes erfolgte mit Benzol/Essigester (9:1) auf DC-Platten unter zweimaliger Entwicklung. Die oberste Zone enthielt das gesuchte Produkt, Schmp. 154–156, Ausbeute 25 mg (30%). NMR: 18-H 1,026 (1,035); 19-H 0,550 (0,541); 7-H 5,25, ppm. IR: C–O 1700, 1720/cm. C₂₁H₃₀O₂, ber. 314,5 gef. *m/e* 314.

$\Delta^{8(14)}$ -5 β -Pregnen-3,20-dion. Zu 110 mg Δ^7 -5 β -Pregnen-3,20-dion in 5 ml HOAc gelöst, gab man 20 mg PtO₂ und hydrierte mit H₂ unter Normaldruck 3 Stunden bei 60°. Der Katalysator wurde abfiltriert, die Lösung mit NaHCO₃ neutralisiert und die Substanz mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die organische Phase wusch man mehrmals mit H₂O, trocknete (Na₂SO₄) und dampfte das Lösungsmittel ab. Das Rohprodukt ließ sich auf DC-Platten trennen, Laufmittel: Benzol/Aceton (10:1), Schmp. 148–152°. Ausbeute: ca. 60 mg (55%). IR: C–O 1700/cm, 1720/cm. NMR: 19-H 0,90 (0,91); 18-H 0,85 (0,83); 21-H 2,14, ppm. keine Vinyl-Protonen. C₂₁H₃₀O₂, ber. 314,5, gef. *m/e* 314.

(I)-7-³H- $\Delta^{8(14)}$ -5 β -Pregnen-3,20-dion. Die Verbindung ließ sich nach dem Standardverfahren TR3 der Firma Amersham Buchler GmbH herstellen*). Zur Synthese wurde $\Delta^{4,7}$ -Pregnadien-3,20-dion über PtO₂ katalytisch tritiert. (II)-7³H-Pregnenolon wurde von der oben erwähnten Firma bezogen*). (III) 6-³H- Δ^7 -Progesteron entstand nach dem Standardverfahren TR1* unter Protonierung des $\Delta^{5,7}$ -Pregnadien-3,20-diäthylenketals mit 70%-iger Essigsäure ³H₂O. Die als Standard angebotenen 4-¹⁴C-Progesteron und 4-¹⁴C-Pregnenolon wurden von der erwähnten Firma käuflich erworben*.

Pflanzenversuche. Für jeden Versuch benutzte man vier Pflanzen von *Digitalis lanata*. Fünf gut ausgebildete Blätter wurden zunächst markiert, anschließend mit einer 2%-igen wässrigen Lösung von Tween 20 gewaschen. Auf die so präparierten Blätter wurde mit einer feinen Spritze die in 0,5 ml Aceton gelöste Substanz möglichst in die Blattspreiten aufgetragen. Nach dem Eintrocknen sprühte man eine Lösung von Siliconöl in Petroläther (1:1) auf. Der letztgenannte Vorgang wurde nach zwei Tagen wiederholt. Die Pflanzen blieben 21 Tage im Gewächshaus bei ca. 25°. Zur Isolierung wurden sämtliche Blätter der *Digitalis lanata* Pflanzen kurz über der Wurzel abgeschnitten. Die mit aktivem Material behandelten Blätter sonderte man ab und wusch die nicht eingeschnittenen Aktivität mit Essigester ab. Darauf wurden alle Blätter mit einem Ultra-Turrax in methanolischer Lösung fein zerkleinert, man filtrierte vom Ungelösten, dieses wurde im Soxhlet mit MeOH extrahiert. Beide methanolischen Lösungen wurden vereinigt und eingedampft, der Rückstand mit H₂O aufgenommen und das Gemisch mit Cyclohexan ausgeschüttelt. Es wurde so lange extrahiert, bis das gesamte Chlorophyll entfernt war und eine gelblichbraune wässrige Phase zurückblieb. Die Cardenolidglykoside wurden der wässrigen Phase mit CHCl₃ entzogen und anschließend mit CHCl₃-

* In Klammern berechnete Werte nach Zürcher.¹¹

MeOH, 2:1 und CHCl_3 -MeOH, 3:2 extrahiert. Zur Hydrolyse der Cardenolidglykoside wurde das CHCl_3 eingedampft, mit 25 ml MeOH und 25 ml 2 N H_2SO_4 20 Min. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach Neutralisation mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung wurde das MeOH abdestilliert und die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die weitere Trennung der Cardenolide erfolgte durch zweimalige präparative DC mit CHCl_3 -MeOH, 9:1 als Laufmittel und anschließender fünfmaliger Cokristallisation mit reinem Digitoxigenin, bis sich ein konstantes $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis herausgebildet hatte.

Anmerkungen—Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung der Arbeit und Herrn Professor Dr. M. Steiner, Institut für Pharmakognosie der Universität Bonn, für die Erlaubnis zur Benutzung des Gewächshauses.