

## Untersuchungen über die Biosynthese der Cyclite, 16. Mitt.:

Versuche über die Bildung und den Stoffwechsel von  
D-Bornesit in Boraginaceae und Leguminosae<sup>1</sup>

Von

H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 26. September 1966)

Einbauversuche mit radioaktiv markiertem *myo*-Inosit an *Borago officinalis* und *Myosotis caucasica* (Boraginaceae) sowie an *Lathyrus odoratus* und *Medicago sativa* (Leguminosae) machen es sehr wahrscheinlich, daß D-Bornesit durch direkte Methylierung aus *myo*-Inosit entsteht. Im Winter läßt sich nur eine relativ geringe Überführung von *myo*-Inosit in D-Bornesit nachweisen, hingegen werden beide Substanzen schnell zu nichtcyclischen Verbindungen abgebaut. Im Frühjahr wird *myo*-Inosit schnell zu D-Bornesit methyliert, während der Abbau beider Cyclite anscheinend langsamer erfolgt. In allen genannten Pflanzen konnten neben größeren Mengen von D-Bornesit auch *myo*-Inosit und L-Leucanthemit nachgewiesen werden.

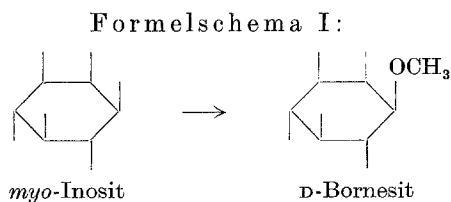
Incorporation experiments with radioactively labelled *myo*-inositol in *Borago officinalis* and *Myosotis caucasica* (Boraginaceae) and in *Lathyrus odoratus* and *Medicago sativa* (Leguminosae) make it very probable that D-bornesitol is formed through direct methylation of *myo*-inositol. In winter the transformation of *myo*-inositol to D-bornesitol is relatively slow, whereas both substances are rapidly degraded to non-cyclic compounds. In spring the methylation of *myo*-inositol to D-bornesitol proceeds quickly; at this time the degradation seems to be much slower than in winter. It could be shown that besides higher amounts of D-bornesitol all the named plants also contain *myo*-inositol and L-leucanthemitol.

D-Bornesit (D-1-O-Methyl-*myo*-inosit) wurde erstmalig von Plouvier<sup>2</sup> in verschiedenen Arten von *Lathyrus* (Leguminosae) aufgefunden; spätere

<sup>1</sup> 15. Mitt.: H. Kindl, R. Scholda und O. Hoffmann-Ostenhof, Phytochemistry (im Druck).

<sup>2</sup> V. Plouvier, C. r. hebdomad. Sé. Acad. Sci. Paris **241**, 983 (1955).

Arbeiten des gleichen Autors<sup>3</sup> zeigten, daß dieser Cyclit auch in der Familie Boraginaceae weit verbreitet ist. Seine Konfiguration wurde von Post und Anderson<sup>4</sup> aufgeklärt; (siehe Formelschema I).



Unsere bisherigen Untersuchungen über die Bildung der Methyläther der Inosite, die u. a. auch durch die interessanten Vorstellungen von Loewus<sup>5</sup>, wonach diesen Substanzen eine Rolle bei der Biosynthese der Pectine zukommen könnte, veranlaßt waren, haben ergeben, daß Sequoyit und D-Ononit durch direkte Methylierung aus *myo*-Inosit entstehen<sup>6, 7</sup>. Ebenso werden die Methyläther des *L-chiro*-Inosits, L-Quebrachit und L-Pinit, unmittelbar durch Methylierung ihres Grundkörpers gebildet<sup>8</sup>. Hingegen entsteht D-Pinit durch Epimerisierung aus Sequoyit<sup>9</sup>.

In der vorliegenden Arbeit sollen Versuche über die Biosynthese von D-Bornesit in je zwei Arten der Leguminosae (*Lathyrus odoratus* und *Medicago sativa*) und der Boraginaceae (*Borago officinalis* und *Myosotis caucasica*) berichtet werden. Die im Verlauf der Untersuchungen beobachtete Erscheinung, daß sowohl *myo*-Inosit als auch D-Bornesit in den Pflanzen offensichtlich einem von der Jahreszeit abhängigem intensiven Abbau unterliegen können, veranlaßte uns dazu, diese Verhältnisse quantitativ zu studieren und zu versuchen, die Natur der aus den genannten Cycliten entstehenden Produkte zu bestimmen. Schließlich wurde die Cyclitfraktion der einzelnen Pflanzen eingehender untersucht, um die Verteilung der Substanzen in den genannten Arten festzulegen und eventuelle biogenetische Beziehungen zu erkennen.

#### Methoden und Materialien

D-Glucose-*u*-<sup>14</sup>C und die einzelnen uniform-<sup>14</sup>C-markierten Cyclite wurden durch Photoassimilation in einer <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Atmosphäre aus verschiedenen zu

<sup>3</sup> V. Plowier, C. r. hebdomad. Sé. Acad. Sci. Paris **247**, 2190 (1958).

<sup>4</sup> G. Post und L. Anderson, J. Amer. chem. Soc. **84**, 471, 478 (1962).

<sup>5</sup> F. A. Loewus, Federat. Proc. **24**, 855 (1965).

<sup>6</sup> R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **335**, 180 (1964).

<sup>7</sup> H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **345**, 257 (1966).

<sup>8</sup> R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **95**, 1305 (1964).

<sup>9</sup> R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **339**, 28 (1964).

Tabelle 1. Versuche über den Einbau der Aktivität aus markierten möglichen Vorstufen in D-Bornesit in den Blättern verschiedener Boraginaceae und Leguminosae

Versuch Nr.	Vorstufe	Menge (mg)	Aktivität ( $\mu$ C)	Pflanze	Menge, g	Zeit	Dauer des Stoffwechsels (Tage)	Einbau in D-Bornesit, %
1	D-Glucose- <i>u</i> - <sup>14</sup> C	10	5	<i>Borago officinalis</i>	15	Februar	3	0,02
2	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - <sup>14</sup> C	5	2	<i>B. officinalis</i>	15	Februar	3	0,12
3	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - <sup>14</sup> C	5	5	<i>B. officinalis</i>	10	Mai	5	4,8
4	<i>myo</i> -Inosit-2- <sup>3</sup> H	5	5	<i>B. officinalis</i>	10	Mai	5	4,6
5	D-Glucose- <i>u</i> - <sup>14</sup> C	10	5	<i>Myosotis caucasica</i>	20	Mai	5	0,32
6	D-Glucose- <i>u</i> - <sup>14</sup> C	10	5	<i>M. caucasica</i>	20	Mai	5	0,02
7	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - <sup>14</sup> C	30	12	<i>M. caucasica</i>	10	Jänner	5	0,01
8	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - <sup>14</sup> C	15	6	<i>M. caucasica</i>	10	Februar	3	0,22
9	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - <sup>14</sup> C	15	6	<i>M. caucasica</i>	10	April	3	3,2
10	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - <sup>14</sup> C	5	2	<i>M. caucasica</i>	20	Mai	5	12,8
11	Sequoyit- <i>u</i> - <sup>14</sup> C	2	3,5	<i>M. caucasica</i>	10	Mai	5	0
12	D-Ononit- <i>u</i> - <sup>14</sup> C	10	5	<i>M. caucasica</i>	10	Mai	5	0
13	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - <sup>14</sup> C	15	6	<i>Lathyrus odoratus</i>	10	Februar	3	0,14
14	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - <sup>14</sup> C	5	2	<i>L. odoratus</i>	10	Mai	5	8,9
15	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - <sup>14</sup> C	15	6	<i>Medicago sativa</i>	10	Februar	3	0,01
16	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - <sup>14</sup> C	5	2	<i>M. sativa</i>	15	Mai	3	9,2
17	<i>myo</i> -Inosit-2- <sup>3</sup> H	5	5	<i>M. sativa</i>	15	Mai	3	8,7
18	D-Glucose- <i>u</i> - <sup>14</sup> C	10	5	<i>M. sativa</i>	10	Mai	5	0,71

Tabelle 2. Abbau von markiertem *myo*-Inosit und *D*-Bornesit in Blättern von Boraginaceae

Versuch Nr.	Applizierte Verbindung	Menge mg	Aktivität $\mu\text{C}$	Pflanze	Menge, g	Zeit	Dauer (Tage)	Aktivität in der zurückgewonnenen Cyclifraktion, %
1	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - $^{14}\text{C}$	5	2	<i>Myosotis caucasica</i>	10	Jänner	4	1,8
2	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - $^{14}\text{C}$	5	2	<i>M. caucasica</i>	10	Februar	4	3,9
3	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - $^{14}\text{C}$	15	6	<i>M. caucasica</i>	10	April	6	15
4	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - $^{14}\text{C}$	5	2	<i>M. caucasica</i>	10	Mai	6	28
5	<i>myo</i> -Inosit-2- $^3\text{H}$	5	5	<i>M. caucasica</i>	10	Mai	6	31
6	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - $^{14}\text{C}$	5	2	<i>Borago officinalis</i>	5	Februar	3	2,5
7	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - $^{14}\text{C}$	5	2	<i>B. officinalis</i>	5	Mai	6	22
8	<i>D</i> -Bornesit- <i>u</i> - $^{14}\text{C}$	5	1	<i>M. caucasica</i>	10	Jänner	3	1,1
9	<i>D</i> -Bornesit- <i>u</i> - $^{14}\text{C}$	5	1	<i>M. caucasica</i>	10	Februar	3	2,9
10	<i>D</i> -Bornesit- <i>u</i> - $^{14}\text{C}$	5	1	<i>M. caucasica</i>	10	Mai	10	22
11	<i>D</i> -Bornesit- <i>u</i> - $^{14}\text{C}$	5	1	<i>B. officinalis</i>	10	Februar	4	2,1

deren Synthese geeigneten Pflanzen nach bereits beschriebenen Methoden<sup>10</sup> hergestellt; *myo*-Inosit-2- $^3\text{H}$  wurde durch Reduktion von 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon mit  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  gewonnen<sup>7</sup>.

Die Applikation der radioaktiven Vorstufen, die Isolierung der Cyclite, die Reinheitskriterien für die Cyclite sowie die Bestimmung der Radioaktivität wurden ebenfalls von uns bereits ausführlich beschrieben<sup>10</sup>.

### Ergebnisse

Die Resultate der Einbauversuche an den verschiedenen Pflanzen sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Es zeigt sich allgemein, daß die Aktivität von *myo*-Inosit-*u*- $^{14}\text{C}$  etwa eine Größenordnung besser in *D*-Bornesit eingebaut wird als diejenige von *D*-Glucose-*u*- $^{14}\text{C}$ . Die Tatsache, daß die Aktivitäten von *myo*-Inosit-*u*- $^{14}\text{C}$  und *myo*-Inosit-2- $^3\text{H}$  etwa gleich gut in *D*-Bornesit eingebaut werden, weist darauf hin, daß *myo*-Inosit unmittelbar als Einheit in *D*-Bornesit übergeführt wird. Die negativen Ergebnisse der Einbauversuche mit *D*-Ononit-*u*- $^{14}\text{C}$  und Sequoyit-*u*- $^{14}\text{C}$  deuten dahin, daß die Pflanze keinen Mechanismus für deren Entmethylierung zu *myo*-Inosit besitzt.

Aus Tab. 1 kann aber auch entnommen werden, daß die Unterschiede im Verhalten der einzelnen Pflanzen geringer sind als die jahreszeitlichen Ver-

<sup>10</sup> H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof, *Phytochemistry* 5, 1091 (1966).

schiedenheiten. Die Einbauraten im Mai sind durchwegs um mehr als eine Größenordnung höher als im Februar. In Tab. 2 sind die Ergebnisse von Versuchen, diese Verhältnisse quantitativ zu behandeln, zu finden. Von im Januar oder im Februar appliziertem *myo*-Inosit- $u$ - $^{14}C$  konnten nur ganz wenige Prozente der Aktivität in der Cyclitfraktion wiedergewonnen werden, was bedeutet, daß der Rest einem Abbau oder Umbau zu anderen Stoffklassen unterliegt. Im  $CO_2$  ließen sich nur Aktivitäten unter 1% feststellen. Pflanzen von 5 bis 10 g Frischgewicht können in 2 Tagen bis zu 30 mg *myo*-Inosit abbauen. Im April und Mai wurden wesentlich größere Aktivitätsmengen (bis über 30%) in der Cyclitfraktion wiedergefunden.

Analoge Versuche mit *D*-Bornesit ergaben, daß auch dieser Cyclit dem gleichen Schicksal eines Abbaus bzw. Umbaus in andere Stoffklassen unterliegt, wobei ebenfalls eine jahreszeitliche Abhängigkeit feststellbar war.

Versuche, die aus *myo*-Inosit bzw. *D*-Bornesit entstandenen Substanzen zu identifizieren, ergaben, daß aus *myo*-Inosit vorwiegend Neutralstoffe entstehen, von denen *D*-Glucose, *D*-Fructose und Saccharose nachgewiesen werden konnten. Aus *D*-Bornesit werden hingegen Substanzen gebildet, die in der Anionenfraktion wiederzufinden sind und über deren Natur wir noch keine exakte Aussage machen können. Eine Entmethylierung von *D*-Bornesit zu *myo*-Inosit oder eine Weitermethylierung zu Dambonit (vgl. die folgende Mitteilung) konnte in den hier untersuchten Arten nicht festgestellt werden.

Tabelle 3. Zusammensetzung der Cyclitfraktion in den untersuchten Pflanzen

Pflanze	Bisher bekannte Cyclit-Inhaltsstoffe <sup>11</sup>	Neu gefundene Cyclit-Inhaltsstoffe
<i>Borago officinalis</i>	<i>D</i> -Bornesit	<i>myo</i> -Inosit <i>L</i> -Leucanthemit
<i>Myosotis caucasica</i>		<i>D</i> -Bornesit <i>myo</i> -Inosit <i>L</i> -Leucanthemit
<i>Medicago sativa</i>	<i>D</i> -Ononit <i>D</i> -Pinit	<i>D</i> -Bornesit <i>myo</i> -Inosit <i>L</i> -Leucanthemit
<i>Lathyrus odoratus</i>	<i>D</i> -Bornesit	<i>myo</i> -Inosit <i>L</i> -Leucanthemit

Als Nebenbefund darf angemerkt werden, daß wir niemals einen Einbau der Aktivität aus *myo*-Inosit- $u$ - $^{14}C$  oder anderen eingesetzten markier-

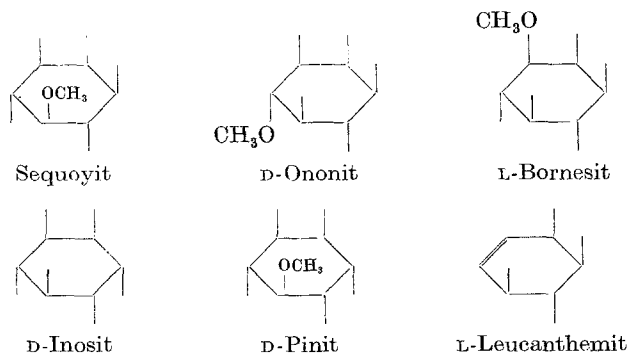
ten Cycliten in *L*-Leucantheimit, der in allen vier Pflanzen enthalten ist, beobachteten; hingegen wird die Aktivität von *D*-Glucose-*u*-<sup>14</sup>C in diesem Cyclit wiedergefunden. Von Interesse mag auch die Beobachtung sein, daß in *Myosotis caucasica* die Aktivität von markiertem *myo*-Inosit auch in *D*-Pinit und *D*-Ononit überführt wird, was genau den Verhältnissen bei anderen Arten<sup>6, 7</sup> entspricht.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Cyclitfraktionen aus den vier genannten Arten ist in Tab. 3 zusammengefaßt.

### Diskussion

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen vor allem, daß in den untersuchten Pflanzen *D*-Bornesit durch unmittelbare Methylierung von *myo*-Inosit entsteht (Formelschema I). Die Verhältnisse sind hier somit völlig analog denjenigen, welche wir bei der Bildung von Sequoyit<sup>6</sup> und *D*-Ononit<sup>7</sup> gefunden haben. Es muß angenommen werden, daß in den genannten Arten der Boraginaceae und Leguminosae ein Enzym, wahrscheinlich vom Typus der Methyltransferasen, vorliegt, welches spezifisch die Hydroxylgruppe in Stellung 3 des *myo*-Inosits methyliert. Sollte, wie das sehr wahrscheinlich ist, auch die Bildung von *L*-Bornesit, der vorwiegend in Apocynaceae vorkommt<sup>11</sup>, auf gleiche Weise vor sich gehen, so kann man auf die Existenz von vier verschiedenen spezifischen Methyltransferasen schließen, welche *myo*-Inosit in den Positionen 1, 3, 5 und 6 methylieren (vgl. Formelschema II). Eine Versuchsreihe mit dem Zweck, diese Methyltransferasen aus den entsprechenden Pflanzen zu isolieren und ihre Donor- und Akzeptorspezifität zu charakterisieren, ist zur Zeit in Durchführung.

### Formelschema II:



<sup>11</sup> Vgl. dazu *H. Kindl* und *O. Hoffmann-Ostenhof*, Fortschr. Chem. organ. Naturst. **24**, 149 (1966).

Die untersuchten Arten sind, wie aus den Resultaten bei verschiedenen experimentellen Anordnungen — Einbauversuche mit Sequoyit- $u$ - $^{14}\text{C}$  und  $D$ -Ononit- $u$ - $^{14}\text{C}$  sowie Untersuchung der Abbauprodukte von  $D$ -Bornesit- $u$ - $^{14}\text{C}$  — hervorgeht, offensichtlich nicht zur Entmethylierung der Methyläther des *myo*-Inosits imstande. Wie wir wissen, wird  $D$ -Pinit in verschiedenen Pflanzen zu  $D$ -*chiro*-Inosit entmethyliert, was nach den vorliegenden Befunden<sup>9</sup> den ausschließlichen oder zumindest wichtigsten Biosyntheseweg für  $D$ -*chiro*-Inosit darstellt; diese Entmethylierung scheint somit ein Sonderfall zu sein.

Der bemerkenswert starke Stoffwechsel von *myo*-Inosit in jungen Pflanzen, wie wir ihn hier beschrieben haben, scheint insoweit nichts Außergewöhnliches zu sein, als wir ihn auch in zahlreichen anderen Arten höherer Pflanzen (*Astilbe chinensis*, *Bergenia crassifolia*, *Spinacia oleracea* und *Nerium oleander*) beobachten konnten.

Der Abbau von  $D$ -Bornesit in den Pflanzen, der ohne faßbare zyklische Zwischenprodukte zu offenkettigen Kohlenhydratderivaten mit Säurecharakter, die möglicherweise zu den Klassen der Uronsäuren und Zuckersäuren gehören, führt, mag einen Hinweis für die Richtigkeit der eingangs erwähnten Hypothese von *Loewus*<sup>5</sup> darstellen. Nach dieser sind die Methyläther des *myo*-Inosits die Vorstufen für die Methylgalakturonsäure-Einheiten des Pectins.

Die berichtete Beobachtung, daß die Aktivität aus markiertem *myo*-Inosit nicht in  $L$ -Leucanthemeit eingebaut wird, stimmt mit den Ergebnissen mehrerer analoger Versuche an anderen Pflanzenarten, die wir in letzter Zeit durchgeführt haben, überein.  $L$ -Leucanthemeit wird, wie wir feststellen konnten, in den Pflanzen in einer gewissen Analogie zur Biosynthese des *myo*-Inosits durch eine Ringschlußreaktion aus  $D$ -Glucose gebildet, worüber wir in einer der folgenden Mitteilungen dieser Reihe berichten werden.

Die vorliegende Arbeit wurde durch einen Förderungsbeitrag der Ludwig Boltzmann-Gesellschaft in großzügiger Weise unterstützt, wofür wir unseren Dank aussprechen.