

## Untersuchungen über die Biosynthese der Cyclite, 25. Mitt.:

### Vorkommen und Bildung von Condurit in *Marsdenia*-Arten<sup>1, 2</sup>

Von

**H. Kindl** und **O. Hoffmann-Ostenhof**

Aus der Lehrkanzel für Biochemie der Universität Wien

(Eingegangen am 15. Juni 1970)

Bei einer systematischen Untersuchung verschiedener tropischer Asclepiadaceae wurde gefunden, daß *Marsdenia abyssinica*, *M. zambesica*, *M. erecta*, *M. angolensis* sowie *Dragea Faulknerae* Condurit als Hauptcyclit enthalten. Im Zusammenhang mit früheren Ergebnissen bedeutet das, daß Condurit nur in der Unterfamilie Cynanchoideae der Asclepiadaceae zu finden ist; diese sehr geringe Verbreitung steht im deutlichen Gegensatz zu derjenigen des Isomeren, L-Leucanthevit, der zumindest spurenweise in fast allen grünen Pflanzen nachweisbar ist.

Applikationsversuche mit radioaktiv markierten möglichen Vorläufern von Condurit an *Marsdenia abyssinica* ergaben Einbau von D-Glucose und D-Galaktose in den Cyclit; wahrscheinlich werden die Hexosemoleküle intakt, d. h. ohne vorhergehende Fragmentierung, in Condurit eingebaut. Mit wesentlich besserer radiochemischer Ausbeute als die beiden Hexosen wird aber L-Leucanthevit in Condurit inkorporiert. Dieser Befund läßt die Epimerisierung von L-Leucanthevit zu Condurit als letzten Schritt der Biosynthese von Condurit vermuten.

#### *Studies on the Biosynthesis of the Cyclitols, XXV: Occurrence and Formation of Conduritol in Marsdenia Species*

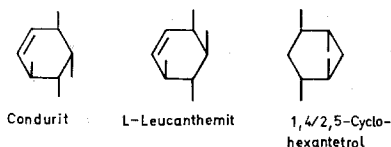
A systematic study of tropical Asclepiadaceae shows that *Marsdenia abyssinica*, *M. zambesica*, *M. erecta*, *M. angolensis*, and *Dragea Faulknerae* contain conduritol as their main cyclitol component. Taking earlier reports into consideration, these findings mean that conduritol can be found only in the subfamily Cynanchoideae of the Asclepiadaceae. This very restricted distribution is in contrast to that of its isomer, L-leucanthevit, which—at least in traces—can be detected in almost all green plants.

<sup>1</sup> Herrn Prof. Dr. E. Broda zu seinem 60. Geburtstag in freundschaftlicher Verehrung zugeeignet.

<sup>2</sup> 24. Mitt.: H. Hofmann, I. Wagner und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. 350, 1465 (1969).

Infusion experiments with  $^{14}\text{C}$ -labelled possible precursors of conduritol in *Marsdenia abyssinica* showed incorporation of D-glucose and D-galactose into the cyclitol. The hexose molecules seem to be built in into conduritol as such, i.e. without being fragmented previously. L-Leucanthemitol is incorporated into conduritol with a much better radiochemical yield than the two hexoses. This result suggests that the last step in the biosynthesis of conduritol is an epimerization of L-leucanthemitol to conduritol.

Der optisch inaktive Condurit (1,4/2,3-Tetrahydroxycyclohexen) ist ein natürlich vorkommender Cyclit, dessen Struktur von *Dangschat* und *Fischer*<sup>3</sup> sowie *Kern* und Mitarb.<sup>4</sup> aufgeklärt wurde. Von den 10 möglichen stereoisomeren Cyclohexentetrolen ist als Naturstoff neben Condurit nur noch der sehr weit verbreitete L-Leucanthemit aufgefunden worden. Als natürlich vorkommende weitere Cyclite mit 4 Hydroxylfunktionen sind das aus verschiedenen Algenarten isolierte D-1,4/2,5-Cyclohexantetrol<sup>5</sup> sowie — mit einigem Vorbehalt — der seinerzeit aus der Zuckerrübe isolierte Betit, angeblich ein Cyclohexantetrol mit nicht völlig geklärter Struktur<sup>6</sup>, zu nennen.



Obwohl Condurit bereits 1908 von *Kubler*<sup>7</sup>, der sich damals vor allem mit den Steroidglykosiden der Asclepiadaceae beschäftigte, aus wäßrigen Extrakten der Condurango-Rinde isoliert wurde, ist bisher über die Biosynthese der Substanz nichts bekannt. Das mag vielleicht daran liegen, daß die ursprüngliche Entdeckung nur ein Nebenbefund einer anders gerichteten Forschung war. Es könnte aber auch darin begründet sein, daß die Condurango-Rinde wohl ein Handelsprodukt ist, daß sie aber von der lediglich in recht unzugänglichen Regionen am Oberlauf des Amazonas gedeihenden Pflanze *Marsdenia condurango* stammt und daß außerdem bisher nur wenige andere, meist ebenfalls tropische Pflanzen, welche Condurit enthalten, bekannt waren<sup>8</sup>. Die einzige in gemäßigt-

<sup>3</sup> *G. Dangschat* und *H. O. L. Fischer*, *Naturwiss.* **27**, 756 (1939).

<sup>4</sup> *W. Kern*, *W. Fricke* und *H. Steger*, *Arch. Pharm.* **278**, 145 (1940).

<sup>5</sup> *J. D. Ramanathan*, *J. S. Craigie*, *J. McLachlan*, *D. G. Smith* und *A. G. McInnes*, *Tetrahedron Letters* **14**, 1527 (1966); *J. S. Craigie*, *J. McLachlan* und *R. D. Tochter*, *Canad. J. Bot.* **46**, 605 (1968).

<sup>6</sup> *E. O. Lippmann*, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **34**, 1159 (1901).

<sup>7</sup> *K. Kubler*, *Arch. Pharmaz.* **278**, 145 (1940).

<sup>8</sup> Vgl. dazu *H. Kindl* und *O. Hoffmann-Ostenhof*, *Fortschr. Chem. organ. Naturst.* **24**, 149 (1966).

tem Klima wachsende, Condurit bildende Pflanze, *Cynanchum vince-toxicum* (Schwalbenwurz), enthält nur sehr geringe Mengen dieses Cyclits.

In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir Vorkommen des Condurits in weiteren *Marsdenia*-Arten sowie Untersuchungen über die Biosynthese von Condurit. Zur Lokalisierung der Aktivität im Condurit-Molekül wurde ein Abbauweg ausgearbeitet, der im Schema dargestellt ist. Die Ergebnisse der Abbauversuche machen es wahrscheinlich, daß Condurit aus einer intakten Hexoseeinheit entsteht.

Markierter L-Leucantheimit wird in der Pflanze mit relativ hoher radiochemischer Ausbeute in Condurit eingebaut.

### Materialien und Methoden

Sämtliche Pflanzenmaterialien wurden uns von Herrn Prof. Dr. T. Reichstein (Basel) zur Verfügung gestellt, wofür wir unseren herzlichen Dank aussprechen.

Für das Studium der Biosynthese von Condurit erwies sich *Marsdenia abyssinica* am besten geeignet. Diese Pflanze wurde aus Samen gezogen; die Samen wurden angefeilt und dann bei 30° ankeimen gelassen. Die Keimlinge wurden ausgesetzt und bei 20° unter Beleuchtung mit 12 Stunden Dunkelintervall wachsen gelassen. Die Biosynthese-Versuche wurden an Blättern von etwa 30 cm hohen Pflanzen vorgenommen, die 5—8 Monate alt waren.

Von den angewandten markierten Substanzen wurden D-Glucose-2-<sup>14</sup>C, D-Glucose-3-<sup>3</sup>H und D-Galaktose-1-<sup>14</sup>C vom Radiochemical Centre, Amersham, England, bezogen. L-Leucantheimit-u-<sup>14</sup>C wurde durch Photoassimilation von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in *Chrysanthemum leucanthemum* hergestellt und durch mehrfache Papierchromatographie und fraktionierte Sublimation im Hochvak. gereinigt. Ein aliquoter Anteil der Präparation wurde dazu verwendet, um nach Zusatz von inaktivem Condurit, zweimaliger Chromatographie und sechsmaligem Umkristallisieren aus Methanol die Reinheit des so hergestellten markierten L-Leucantheimits zu prüfen. Es ergab sich, daß diese Präparation weniger als 0,03% markierten Condurit enthielt.

Die Applikation, die Isolierung der Cyclitfraktion, die chromatographische Trennung und Reinigung der Cyclite sowie die Messung der Radioaktivität wurden nach bereits veröffentlichten Methoden<sup>9</sup> vorgenommen.

Zur Lokalisierung der Radioaktivität im biosynthetisch aus markierten Vorstufen erhaltenen Condurit wurde dieser in papierchromatographisch reiner Form mit 300 mg inaktivem Condurit verdünnt und dann zweimal aus Methanol—Benzol umkristallisiert. Das so gereinigte Produkt wurde dann in 35 ml 15proz. Essigsäure gelöst und bei 60° mit 500 mg Zinkstaub versetzt. Nach 6stdg. Rühren wurde abfiltriert, das Filtrat im Vak. zur Trockne eingedampft, dann in wenig Wasser aufgenommen und mit Kationenaustauscher (Dowex-50, H<sup>+</sup>-Form, 100—200 mesh, 15 ml Schüttvolumen) behandelt. Es wurde abfiltriert, gut nachgewaschen, im Vak. eingeengt und nach intensiver Trocknung aus Methanol—Benzol auskristallisieren gelassen; Ausb. 255 mg Dihydrocondurit.

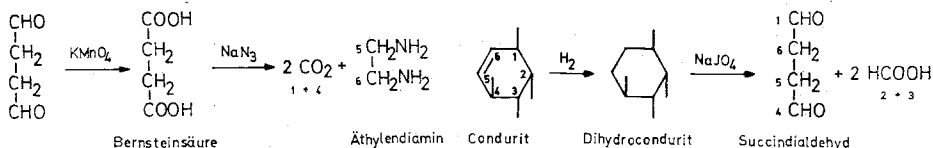
Die gesamte erhaltene Menge von Dihydrocondurit wurde in 10 ml Wasser gelöst, mit einer Lösung von 1,1 g NaJO<sub>4</sub> in 15 ml Wasser versetzt

<sup>9</sup> H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof, Phytochem. 5, 1091 (1966).

und dann 4 Stdn. bei 20° im Dunkeln stehengelassen. Die Lösung wurde mehrfach ausgeäthert und sowohl die Ätherschicht als auch die wäbr. Schicht weiterverarbeitet. Nach Einengen der Ätherschicht werden 75% des Rückstandes mit einer Lösung von 170 mg  $\text{KMnO}_4$  in Aceton versetzt, nach 1 Stde. das Aceton abgedampft, mit Wasser aufgenommen, der ausgefallene Braunstein mit  $\text{NaHSO}_3$  reduziert und die Lösung wieder mehrfach ausgeäthert. Nach Abdampfen des Äthers wurde der Rückstand durch Sublimieren gereinigt; er besteht aus Bernsteinsäure, die nach der Methode von Phares<sup>10</sup> weiter abgebaut wird.

25% des Rückstandes werden in Wasser aufgenommen und mit Hydroxylamin bei pH 5,5 in das Dioxim übergeführt, das dann durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (2 mm dick) mit Benzol—Essigester (4 : 1) als Laufmittel gereinigt wird.

Aus der wäbr. Schicht nach der Perjodatoxidation läßt sich nach Ansäuern auf pH-Werte unter 1,0 die Ameisensäure durch Destillation gewinnen. Man neutralisiert das Destillat durch Titrieren mit  $\text{NaOH}$ , setzt 300 mg inaktives Natriumformiat hinzu und stellt daraus nach Gabriel<sup>11</sup> den p-Bromphenacyl-ester her. Die Überprüfung der Reinheit dieses Esters erfolgt mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ —Petroläther (10 : 1, v/v) als Laufmittel.



## Ergebnisse

**Vorkommen von Condurit:** Es wurden folgende Pflanzenmaterialien auf Cyclite untersucht: *Marsdenia abyssinica* Hochstr. Schltr. = *Dragea abyssinica* (Samen); *M. zambesica* = *Dragea macrantha* Klotzsch. (Wurzeln); *M. erecta* = *Cionura erecta* (Blätter und Samen); *M. angolensis* N. E. Br. (Stengel); *Dragea Faulknerae* (Wurzeln).

In allen diesen Materialien wurde Condurit als Haupt-cyclit gefunden; daneben enthalten sie durchwegs *myo*-Inosit, geringere Mengen von L-Viburnit und L-Leucanthemit (in *M. abyssinica* z. B. entspricht die Menge an L-Leucanthemit etwa 4% derjenigen des Condurits).

**Einbau von Hexosen in das Cyclohexenskelett des Condurits.** Um zu prüfen, ob Hexosen in Condurit eingebaut werden, wurden an *Marsdenia abyssinica* mehrere Einbauversuche mit verschiedenen selektiv markierten Präparationen von D-Glucose und D-Galaktose durchgeführt. Beide Hexosen werden mit ungefähr gleicher radiochemischer Ausbeute in den Cyclit eingebaut; sechs derartige Versuche ergaben keinen signifikanten

<sup>10</sup> E. F. Phares, Arch. Biochem. Biophys. **33**, 173 (1951).

<sup>11</sup> O. Gabriel, J. Biol. Chem. **241**, 924 (1966).

Unterschied zwischen den Einbauraten für die beiden Monosaccharide.

Obwohl dieser Einbau verhältnismäßig gering ist (weniger als 0,1%), war es doch mit Hilfe des im methodischen Teil beschriebenen Abbaus zur Lokalisierung der Aktivität in den einzelnen Teilen des Condurits möglich zu zeigen, daß die Hexosen als Einheit, d. h. ohne vorhergehende Fragmentierung, in den Condurit übergehen. So führt Vorgabe von D-Glucose-2-<sup>14</sup>C (100  $\mu$ Ci, 5 mCi/mMol) zu einem Condurit, der die Markierung bevorzugt in den Stellungen 1 und 4 trägt. Bei Infusion von D-Galaktose-1-<sup>14</sup>C findet sich der Großteil der Aktivität in den Positionen 5 und 6 des Condurits. Diese Verhältnisse sind in Tab. 1 dargestellt. Bei einer vorhergehenden Fragmentierung der Hexosen, etwa durch Spaltung in zwei C<sub>3</sub>-Einheiten wäre eine andere Verteilung der Aktivität zu erwarten gewesen. Diese Ergebnisse sprechen nun sehr deutlich für den Einbau des kompletten unfragmentierten Hexose-Moleküls in den Condurit, wobei die in Anbetracht der eher langen Applikationszeit (2 Tage) geringe Aktivitätsverschmierung (Randomisierung) beachtenswert ist.

Diese Vorstellung wird auch noch durch Applikationsversuche mit D-Glucose-2-<sup>14</sup>C-3-<sup>3</sup>H mit einem Verhältnis von <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C von 2,5 erhärtet (Tab. 2). Der daraus entstandene Condurit hatte ein Verhältnis der beiden Isotopen von 2,9; in der nach dem Biosyntheseversuch zurückgewonnenen D-Glucose war dasselbe Verhältnis auf 2,65 angestiegen. Bei selektivem Abbau wurde gefunden, daß die <sup>3</sup>H-Aktivität zu 90% in den C-Atomen 3 und 4 des Condurits lokalisiert war; der p-Bromphenacyl-ester der Ameisensäure enthält den am C-3 des Condurits gebundenen Wasserstoff in stabiler Form, wie das seinerzeit *Gabriel*<sup>11</sup> in ähnlichen Versuchen nachgewiesen hat. Das Verhältnis <sup>3</sup>H : <sup>14</sup>C im Ameisensäure-ester war 300 : 1.

*Einbau von L-Leucanthemit in Condurit.* Eine nach dem im methodischen Teil beschriebenen Verfahren hergestellte Präparation von u-<sup>14</sup>C-markiertem L-Leucanthemit (3,5  $\mu$ Ci, 810  $\mu$ Ci/mMol) wurde bei Pflanzen von *Marsdenia abyssinica* appliziert. Die Aktivität des vorgegebenen L-Leucanthemits wurde zu 1,7% in den Condurit eingebaut gegenüber einem Einbau von weniger als 0,1% bei D-Glucose oder D-Galaktose.

### Diskussion

Die hier angeführten Befunde über das Vorkommen von Condurit müssen gemeinsam mit früheren Berichten<sup>8</sup> betrachtet werden. In diesem Zusammenhang darf erwähnt werden, daß in unserem Laboratorium seit mehreren Jahren alle auf ihre Cyclite untersuchten Pflanzen auch routinemäßig auf das Vorkommen von Condurit geprüft werden.

Tabelle 1. Radioaktivitätsverteilung im Condurit nach Applikation von 100  $\mu$ Ci D-Galaktose-1- $^{14}$ C bzw. D-Glucose-2- $^{14}$ C

Verbindung	repräsentiert folgende C-Atome des Condurits	Condurit aus D-Galaktose-1- $^{14}$ C		Condurit aus D-Glucose-2- $^{14}$ C			
		Menge mMol	Spezif. Akt. nCi/mMol der Akt.	Menge mMol	Spezif. Akt. nCi/mMol der Akt.		
Condurit	1—6	2,0	34	100	2,0	31	100
Dihydrocondurit	1—6	1,4	32	94	1,8	30	97
Ameisensäure	2 und 3	2,1	1,5	9	2,7	1,5	10
Bernsteinsäure	1, 4, 5 und 6	0,5	14	82	0,6	26	84
CO <sub>2</sub> aus Bernsteinsäure	1 und 4	0,8	2	12	0,9	11	71

Tabelle 2. Radioaktivitätsverteilung im Condurit nach Applikation von D-Glucose-2- $^{14}$ C-3- $^3$ H

Verbindung	repräsentiert folgende C-Atome des Condurits	repräsentiert die H-Atome an folgenden C-Atomen des Condurits		Menge mMol	Spezif. Akt. nCi/mMol $^{14}$ C	Spezif. Akt. nCi/mMol $^3$ H	Prozente der Aktivität $^{14}$ C	Prozente der Aktivität $^3$ H
		H-Atome	C-Atome					
Condurit	1—6	1—6	1—6	2,0	17	49	100	100
Dihydrocondurit	1—6	1—6	1—6	1,7	18	49	106	100
Ameisensäure	2 und 3	2 und 3	2 und 3	2,6	< 0,1	22	< 1	98
Succindialdehyd	1, 4, 5 und 6	1, 4, 5 und 6	1, 4, 5 und 6	0,1	16	3	94	6
Bernsteinsäure	1, 4, 5 und 6	5 und 6	5 und 6	0,5	16	4	94	8
CO <sub>2</sub> aus Bernsteinsäure	1 und 4	—	—	0,7	7	—	—	83

Bisher wurde Condurit ausschließlich in der Familie Asclepiadaceae, und zwar in deren Unterfamilie Cynanchoideae, nachgewiesen, wobei sein Vorkommen besonders für die Tribus Tylophoreae der genannten Unterfamilie charakteristisch zu sein scheint.

Diese sehr eingeschränkte Verbreitung des Condurits steht in einem deutlichen Gegensatz zu derjenigen seines Isomeren, des L-Leucantheimits, der bisher in allen grünen Pflanzen, wo er gesucht wurde, sogar in Algen — wenn auch überall in verhältnismäßig geringer Menge — nachweisbar war. Im *Marsdenia abyssinica* finden wir Condurit bevorzugt im Latex; es mag erwähnt werden, daß Cyclite in der den Asclepiadaceae nahe verwandten Familie Apocynaceae regelmäßig einen Bestandteil des Latex-Serums darstellen.

Die Ergebnisse der Einbauversuche zum Studium der Biosynthese des Condurits, über die hier berichtet wird, machen es vor allem wahrscheinlich, daß Condurit sich biogenetisch von einer Hexose ableitet, die ohne vorhergehende Fragmentierung in das Cyclitmolekül übergeführt wird.

Die Symmetrie des Condurit-Moleküls macht es zwar nur möglich, die Aktivität an Atompaaaren (C-1 und C-4, C-2 und C-3, C-5 und C-6) zu lokalisieren. Trotzdem schließen die mit Hilfe des hier beschriebenen Abbauges erhaltenen Ergebnisse eine Fragmentierung vor dem Einbau weitgehend aus.

Die stereochemischen Verhältnisse würden D-Galaktose als einen möglichen Vorläufer nahelegen. Dieser Zucker in markierter Form wird auch tatsächlich in Condurit eingebaut, allerdings ist die Einbaurrate ziemlich gering und nicht signifikant verschieden von derjenigen für markierte D-Glucose. Aus den Ergebnissen können wir also entnehmen, daß die Pflanze ein aktives Enzymsystem besitzt, das diese beiden Zucker ineinander überführen kann.

Als besonders bedeutsam erscheint uns, daß unsere Pflanze die Aktivität von L-Leucantheimit mit vergleichsweise sehr hoher radiochemischer Ausbeute in Condurit einbaut. Aus noch unveröffentlichten Versuchen aus diesem Laboratorium können wir annehmen, daß L-Leucantheimit aus D-Glucose durch Kondensation von C-1 mit C-6 entsteht, wobei möglicherweise ein Desoxyprodukt als Zwischenstufe beteiligt ist. Es wäre somit vorstellbar, daß primär L-Leucantheimit entsteht, der dann in denjenigen Pflanzen, die zur Biosynthese von Condurit imstande sind, durch eine Epimerisierung in diesen umgelagert wird.

Für eine solche Reaktionsfolge spricht vor allem, daß wir in sämtlichen Pflanzen, die Condurit enthalten, auch L-Leucantheimit finden, und weiters, daß Epimerisierungen analoger Art bei der Biosynthese der Cyclite sehr häufig sind. Es darf hier an die Epimerisierungen von

Sequoyit zu D-Pinit<sup>12</sup>, von *myo*-Inosit zu D-*chiro*-Inosit<sup>13</sup>, L-*chiro*-Inosit<sup>14</sup> und *scyllo*-Inosit<sup>15</sup> sowie diejenige von Laminit zu Mytilit<sup>16</sup> erinnert werden.

Ein weiteres Argument für D-Glucose als näheren Vorläufer und den Weg über L-Leucanthemit zu Condurit, dessen Stichhaltigkeit allerdings erst experimentell überprüft werden müßte, ist das vor kurzem bekanntgewordene Vorkommen von Derivaten von D-Chinovose (6-Desoxy-D-glucose), einem möglichen Zwischenprodukt bei der Bildung von L-Leucanthemit, in einer *Marsdenia*-Art, die allerdings auch andere Desoxyzucker und ihre Derivate enthält<sup>17</sup>.

Die vorliegenden Ergebnisse erlauben somit noch keine endgültige Aussage über den Biosyntheseweg, der von der Hexose zum Condurit führt, wenngleich unsere Ergebnisse die Reaktionsfolge von D-Glucose über L-Leucanthemit zum Condurit als wesentlich plausibler erscheinen lassen als Wege, die von D-Galaktose direkt zum Condurit führen. Weitere Experimente zur endgültigen Klärung dieser Fragen und zu einer Charakterisierung der Teilschritte der Condurit-Biosynthese sind geplant.

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

<sup>12</sup> R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **335**, 180 (1964); Mh. Chem. **95**, 1311 (1964); H. Ruis und O. Hoffmann-Ostenhof, Europ. J. Biochem. **7**, 442 (1948).

<sup>13</sup> H. Ruis, G. Wöber und O. Hoffmann-Ostenhof, Abstr. of Papers, 6th Meeting Eur. Fed. Biochem. Soc., Madrid 1969, Abstr. Nr. 363.

<sup>14</sup> R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **95**, 541, 1305 (1964).

<sup>15</sup> T. Posternak, W. H. Schopfer, B. Kaufmann-Boetsch und S. Edwards, Helv. chim. Acta **46**, 3676 (1963); R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **339**, 28 (1964); D. J. Candy, Biochem. J. **103**, 666 (1967).

<sup>16</sup> G. Wöber und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **101**, 1861 (1970).

<sup>17</sup> A. Saner und H. Allgeier, Helv. chim. Acta **52**, 1655 (1969); A. Saner, C. Zerlentis, W. Stöcklin und T. Reichstein, Helv. chim. Acta **53**, 221 (1970).