

Untersuchungen über die Biosynthese der Cyclite, 8. Mitt.:

Der Mechanismus der Umwandlung von meso-Inosit in
D-Pinit und D-Inosit in *Trifolium incarnatum*¹

Von

R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 30. Juni 1964)

In Fortsetzung früherer Arbeiten aus unserem Laboratorium^{2, 3} wurden Einbauversuche mit markierten möglichen Vorstufen von D-Pinit und D-Inosit in Blättchen von *Trifolium incarnatum* vorgenommen. Dabei zeigte sich, daß sowohl Sequoyit als auch 5-O-Methyl-(+)-*vibo*-inosose mit ausgezeichneter radiochemischer Ausbeute in D-Pinit eingebaut werden. Damit konnte der Biosyntheseweg des D-Pinit ausgehend von meso-Inosit genau festgelegt werden; er verläuft über Sequoyit und 5-O-Methyl-(+)-*vibo*-inosose. Markierte (+)-*vibo*-Inosose wird in den Blättchen der Pflanze in D-Inosit übergeführt; es kann aber nicht mit Sicherheit behauptet werden, daß dieser Reaktion eine biologische Bedeutung zukommt. Es ist vielmehr anzunehmen, daß zumindest die Hauptmenge des in der Pflanze vorkommenden D-Inosits durch Entmethylierung von D-Pinit entsteht.

In continuation of earlier work^{2, 3} the incorporation of isotopically labelled potential precursors into D-pinitol and D-inositol was studied in leaflets of *Trifolium incarnatum*. Sequoyitol as well as 5-O-methyl-(+)-*vibo*-inosose were shown to be incorporated into D-pinitol in excellent yield and have thus been clearly established as intermediates in the biosynthesis of D-pinitol from meso-inositol. In the leaflets of *Trifolium incarnatum*

¹ 7. Mitt.: R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **95**, 1305 (1964.)

² R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **335**, 180 (1964).

³ R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. (im Druck).

labelled (+)-*vibo*-inosose proved to give rise to D-inositol. It is not claimed, however, that the latter reaction is of biological importance, because at least the larger portion of the D-inositol occurring in the plant appears to arise from D-pinitol by demethylation.

In früheren Mitteilungen dieser Reihe^{2, 3} wurde berichtet, daß *meso*-Inosit-(*G*)-¹⁴C in Blättchen des Inkarnatklees *Trifolium incarnatum* mit um mehr als eine Größenordnung besserer radiochemischer Ausbeute in D-Pinit eingebaut wird als radioaktiv markierte D-Glucose oder D-Galaktose, was die Schlußfolgerung nahelegt, daß *meso*-Inosit oder eine daraus sehr leicht entstehende Substanz ein Zwischenprodukt bei der Biosynthese des D-Pinit ist. Es konnte weiters gezeigt werden, daß markierter D-Inosit nicht in D-Pinit eingebaut wird, während infundierter D-Pinit zum Teil zu D-Inosit entmethyliert wird. Aus diesen Ergebnissen ließ sich der Bildungsweg des D-Inosits und der anderen in *Trifolium incarnatum* vorkommenden Cyclite ausgehend vom *meso*-Inosit weitgehend präzisieren. Die einzige bisher offene Frage war, ob *meso*-Inosit primär zu Sequoyit methyliert wird, worauf die Epimerisierung zu D-Pinit über die entsprechende methylierte Inosose [5-O-Methyl-(+)-*vibo*-inosose] erfolgt oder ob zuerst die Oxydation des *meso*-Inosits zur (+)-*vibo*-Inosose stattfindet und dann auf dieser Stufe die Methylierung mit nachfolgender Reduktion zum D-Pinit einsetzt.

Zur Klärung dieser Frage wurden die möglichen Zwischenprodukte der Umwandlung von *meso*-Inosit in D-Pinit, nämlich Sequoyit, 5-O-Methyl-(+)-*vibo*-inosose und (+)-*vibo*-Inosose in markierter Form hergestellt und mit diesen Einbauversuchen an Blättchen des Inkarnatklees vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen eindeutig, daß die Methylierung des *meso*-Inosits der Primärschritt der Umwandlung von *meso*-Inosit in D-Pinit ist.

Experimenteller Teil

1. Herstellung der für die Einbauversuche benötigten radioaktiv markierten Verbindungen

a) *Sequoyit*-(*G*)-¹⁴C. Diese Substanz wurde nach einer von uns bereits an anderer Stelle beschriebenen photosynthetischen Methode^{1, 3} hergestellt.

b) *5-O-Methyl*-(+)-*vibo*-inosose-¹⁴C. Für die Darstellung dieser Verbindung gingen wir von photosynthetisch hergestelltem D-Pinit-(*G*)-¹⁴C aus³. Wir folgten im wesentlichen der Methode von *Heyns* und *Paulsen*⁴, die von *Anderson* und *Post*⁵ für die Anwendung auf die optisch aktiven Inosite und ihre Methyläther modifiziert worden war.

⁴ *K. Heyns* und *H. Paulsen*, Chem. Ber. **86**, 833 (1953).

⁵ *L. Anderson* und *G. Post*, Abstr. 124th Meeting Amer. Chem. Soc., S. 12D (1958).

30 mg D-Pinit-(*G*)- ^{14}C ($4,6 \cdot 10^6$ dpm) wurden in einem 10-ml-Belüftungs-kolben in 3 ml Wasser gelöst, mit 200 mg frisch bereitetem Katalysator (10% Pt auf Norit) versetzt und der Kolben mit einem Rückflußkühler versehen. Man erhitzte die Mischung auf einem thermostatierten Wasserbad (Badtemp. 80°) und saugte mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe Luft durch, wobei die Pumpe derart eingestellt war, daß die Lösung heftig aufwallte. Nach 10 Stdn. wurde die Oxydation abgebrochen, der Katalysator durch Filtrieren entfernt, der Filter gut nachgewaschen und die vereinigten Lösungen bei vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde auf ein 30 cm breites Papierchromatogramm aufgebracht und absteigend mit Aceton—Wasser (90:10) aufgetrennt (Laufzeit 20 Stdn.). Die Bestimmung der Aktivität im Chromatogramm-„scanner“ ergab zwei scharfe Maxima, die auf Grund von Testflecken eindeutig 5-O-Methyl-(+)-*vib*o-inosose und dem Ausgangsstoff D-Pinit entsprachen. Nebenprodukte wurden nicht aufgefunden. Bei Extraktion der Zone, welche die 5-O-Methyl-(+)-*vib*o-inosose enthielt, wurden 15,4 mg dieses Produktes mit $2,45 \cdot 10^6$ dpm isoliert (radiochem. Ausb. 53,2%).

Zur eindeutigen Identifizierung der Substanz nahmen wir eine Reduktion mit NaBH_4 vor, bei welcher der Theorie entsprechend ein Gemisch von D-Pinit und Sequoyit entstehen sollte, die mit Hilfe unserer Methoden leicht papierchromatographisch nachgewiesen werden können: 7,7 mg 5-O-Methyl-(+)-*vib*o-inosose ($1,225 \cdot 10^6$ dpm) wurden in 1 ml Wasser gelöst und mit 25 mg NaBH_4 versetzt. Nach 1stdg. Stehen wurde 1 Tropfen Essigsäure hinzugefügt und die Lösung bei vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde mehrmals mit etwas Methanol versetzt und wieder zur Trockene eingedampft. Dann wurde mit Wasser aufgenommen und über eine Austauschersäule, die Dowex 50W \times 8 in der H^+ -Form enthielt, geschickt. Lösung und Spülflüssigkeiten wurden vereint und zur Trockene eingedampft; der Rückstand wurde auf ein Papierchromatogramm aufgetragen und mit Aceton—Wasser (80:20) absteigend aufgetrennt (Laufzeit 5 Stdn.). Die Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung im Chromatogramm-„scanner“ ergab zwei scharfe Maxima, die eindeutig D-Pinit und Sequoyit zugeordnet werden konnten, daneben fanden sich zwei sehr schwache „peaks“ in den Zonen, welche *meso*-Inosit und D-Inosit entsprachen. Nach Extraktion der Hauptzonen wurden 271 000 dpm im D-Pinit und 604 000 dpm im Sequoyit gemessen.

e) (+)-*vib*o-Inosose-(*G*)- ^{14}C . Hier wurde nach der gleichen Methode vorgegangen, wie oben bei der Herstellung von 5-O-Methyl-(+)-*vib*o-inosose beschrieben ist; als Ausgangsmaterial diente D-Inosit-(*G*)- ^{14}C , der nach einer an anderer Stelle beschriebenen Methode³ durch Entmethylierung von D-Pinit erhalten worden war.

Um die Natur des Produktes ganz sicher feststellen zu können, wurde hier vorerst ein inaktiver Vorversuch vorgenommen und dann das Phenylhydrazon der (+)-*vib*o-Inosose hergestellt.

1 g reiner D-Inosit wurde in 60 ml Wasser gelöst und in einem 250 ml fassenden mit 1 g frisch hergestellten Katalysator (10% Pt auf Norit) versetzt. Der Kolben war mit einem dünnen, bis zum Boden reichenden Einleitrohr versehen. Man ging dann ebenso wie bei der Herstellung des methylierten Produktes vor; die Oxydation wurde nach 10 Stdn. abgebrochen, der Katalysator abgesaugt und die Lösung bei vermindertem Druck auf 7 ml eingengt.

Die bei der Oxydation erhaltene Mischung wurde mit Eis gekühlt und mit einer Lösung von 1,6 g Phenylhydrazin in 3 ml 50proz. Essigsäure 40 Min. unter Kühlung geschüttelt. Dabei entstand ein ziegelrotes Produkt, von dem durch Absaugen 0,66 g isoliert wurden. Dieses wurde in wenig Äthanol suspendiert, wieder abgesaugt und mit wenig Äthanol nachgewaschen. Durch Umkristallisieren aus Methanol erhielt man 0,40 g farblose Kristalle, Schmp. 197°.

2. Infusion der Vorstufen in die Blättchen von *Trifolium incarnatum*. Isolierung der Cyclitfraktionen daraus und Aufarbeitung auf die einzelnen Cyclite

Sowohl die Infusion als auch die Isolierung der Cyclitfraktionen und die Auftrennung in ihre Bestandteile wurden genau nach den bereits beschriebenen Methoden^{2, 3} vorgenommen.

Ergebnisse

Die Resultate der Einbauversuche mit Sequoyit-(*G*)-¹⁴C und 5-O-Methyl-(+)-*vibo*-inosose-(*G*)-¹⁴C, die in Tab. 1 dargestellt sind, zeigen eindeutig, daß *Trifolium incarnatum* imstande ist, Sequoyit und 5-O-Methyl-(+)-*vibo*-inosose in *D*-Pinit überzuführen. Die radiochem. Ausb. in diesen

Tabelle 1. Versuche über den Einbau von Sequoyit-(*G*)-¹⁴C und 5-O-Methyl-(+)-*vibo*-inosose-(*G*)-¹⁴C in *D*-Pinit in Blättchen von *Trifolium incarnatum*

Infundierte Substanz	Gesamtaktivität, dpm	Spez. Aktivität, dpm/mg	Isolierter <i>D</i> -Pinit			Bemerkungen
			Gesamtaktivität, dpm	Spez. Aktivität, dpm/mg	Radiochem. Ausb. %	
Sequoyit	68 000	21 250	49 500	8 110	72,8	Infusionsdauer 8 Tage; es wurden 5 Blättchen verwendet. 9,6% des eingesetzten Sequoyits wurden unverändert wiedergewonnen.
Sequoyit	2 640 000	1 320 000	1 420 000	117 300	53,8	Infusionsdauer 10 Tage; es wurden 10 Blättchen verwendet; 15,3 % des eingesetzten Sequoyits wurden unverändert wiedergewonnen.
5-Methyl- -O-(+)- <i>vibo</i> -inosose	1 230 000	72 700	384 000	44 900	31,2	Infusionsdauer 7 Tage; es wurden 10 Blättchen verwendet. Neben der Aktivität in <i>D</i> -Pinit konnten 6,9% der eingesetzten Aktivität in <i>D</i> -Inosit wiedergefunden werden.

Versuchen ist ganz ausgezeichnet. Im Experiment mit 5-O-Methyl-(+)-*vibo*-inosose wurde neben D-Pinit auch eine nicht unbeachtliche Menge D-Inosit gefunden.

Wie in Tab. 2 gezeigt wird, erfolgt in der Pflanze leicht die Reduktion von (+)-*vibo*-Inosose zu D-Inosit; bemerkenswerterweise wurde hier

Tabelle 2. Versuche über den Einbau von (+)-*vibo*-Inosose- $G-^{14}C$ in D-Inosit in Blättchen von *Trifolium incarnatum*. Versuchsdauer 7 Tage; es wurden 10 Blättchen verwendet

Eingesetzte (+)- <i>vibo</i> -Inosose		Isolierter D-Inosit			Bemerkungen
Gesamtaktivität, dpm	spez. Aktivität, dpm/mg	Gesamtaktivität, dpm	spez. Aktivität, dpm/mg	Radiochem. Ausb. %	
2 570 000	540 000	1 290 000	168 000	50,2	Neben der Aktivität in D-Inosit konnten 1,75% der eingesetzten Aktivität in D-Pinit wiedergefunden werden.

daneben auch etwas Aktivität in D-Pinit wiedergefunden, obwohl frühere Versuche eindeutig gezeigt hatten, daß D-Inosit in der Pflanze nicht zu D-Pinit methyliert wird.

Diskussion

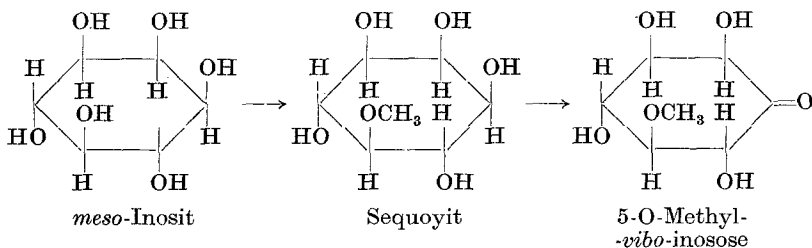
Hier soll eingangs auf die Methoden hingewiesen werden, mit welchen wir die beiden für unsere Versuche erforderlichen Inososen hergestellt haben. Bereits *Anderson* und *Post*⁵ haben erkannt, daß die katalyt. Luftoxydation in Analogie zu der bereits länger bekannten Oxydation der Inosite mit Hilfe von *Acetobacter suboxydans* ausschließlich axiale Hydroxylgruppen angreift; im Gegensatz zu der letzteren Methode kommt aber die katalyt. Luftoxydation nach Bildung einer Ketogruppe zum Stillstand. Wir haben diese Tatsache dazu ausgenützt, um die von uns postulierten möglichen Zwischenprodukte der D-Pinit synthese in *Trifolium incarnatum*, nämlich (+)-*vibo*-Inosose und 5-O-Methyl-(+)-*vibo*-inosose, in radioaktiv markierter Form herzustellen.

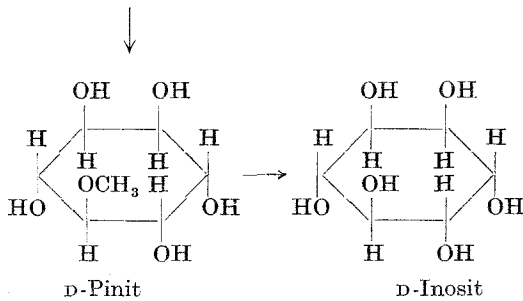
Um wirklich sicher zu gehen, daß wir mit Hilfe dieser Methode tatsächlich 5-O-Methyl-(+)-*vibo*-inosose erhalten — es ist ja an sich nicht einzusehen, warum ausschließlich die Hydroxylgruppe am C-3-Atom des D-Pinit oxydiert wird — haben wir die von uns im Papierchromatogramm isolierte Verbindung der Reduktion mit NaBH₄ unterworfen. Dabei wurden tatsächlich D-Pinit und Sequoyit als Hauptprodukte gefunden; die geringen Mengen entstandenen *meso*-Inosits und D-Inosits lassen darauf schließen, daß unter den Bedingungen der Reduktion die Produkte zu einem sehr kleinen Teil entmethyliert werden. In Übereinstimmung mit *Anderson* und *Post*⁵ kann das Ergebnis dieses Versuchs

als ein Beweis für die Struktur der durch katalytische Oxydation von *D*-Pinit entstandenen 5-O-Methyl-(+)-*vibo*-inosose gewertet werden. Daß bei der Reduktion mehr als doppelt so viel Sequoyit als *D*-Pinit entsteht, ist damit zu erklären, daß Verbindungen mit axialen Hydroxylgruppen einen höheren Energieinhalt besitzen als solche mit äquatorialen. Das Verhältnis der beiden Produkte ist deutlich zugunsten des energetisch auf einer niedrigeren Stufe liegenden Sequoyits verschoben.

Was nun die Ergebnisse der Einbauversuche betrifft, so kann man daraus und aus den Resultaten unserer früheren Arbeiten mit Sicherheit den Aufbauweg des *D*-Pinit ausgehend vom *meso*-Inosit formulieren. Der Primärschritt ist die Methylierung des *meso*-Inosits zum Sequoyit, welcher dann über die 5-O-Methyl-(+)-*vibo*-inosose zum *D*-Pinit epimerisiert wird. Da *D*-Inosit als Zwischenprodukt bereits nach unseren früheren Ergebnissen³ auszuschließen war, war die einzige offene Frage, ob die Methylierung bereits beim *meso*-Inosit oder erst bei der (+)-*vibo*-Inosose erfolgt. Die in Tab. 2 gezeigten Ergebnisse zeigen nun, daß die letztgenannte Verbindung in der Pflanze fast ausschließlich zu *D*-Inosit reduziert wird. Daß dabei geringe Mengen *D*-Pinit gefunden werden, während eine Methylierung von *D*-Inosit zu jener Verbindung sicher nicht stattfindet, könnte z. B. darauf zurückzuführen sein, daß die Pflanze imstande ist, die (+)-*vibo*-Inosose auch zu *meso*-Inosit zu reduzieren, woraus dann auf dem normalen Wege *D*-Pinit entstehen sollte. Es muß aber als sehr fraglich angesehen werden, ob (+)-*vibo*-Inosose tatsächlich in der Pflanze als Zwischenprodukt vorkommt. Die Bildung von *D*-Inosit in der Menge, in welcher er in *Trifolium incarnatum* vorkommt, läßt sich jedenfalls leicht durch die in früheren Versuchen³ nachgewiesene Entmethylierung des *D*-Pinit in der Pflanze erklären.

Unsere Resultate erlauben es nun, die Umwandlung von *meso*-Inosit in die anderen Cyclite in *Trifolium incarnatum* in folgender Weise darzustellen:





Herrn Dr. *H. Kindl* danken wir für hilfreiche Diskussion.

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