

Untersuchungen über die Biosynthese der Cyclite, 3. Mitt.:

Bildung von Methyläthern des L-Inosits aus meso-Inosit in Blättchen von *Artemisia vulgaris* und *Artemisia dracunculus*

Von

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

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 28. Januar 1964)

Einbauversuche, die mit meso-Inosit-(G)- ^{14}C und Glucose- $1\text{-}^{14}\text{C}$ an Blättchen von *Artemisia vulgaris* und *Artemisia dracunculus* vorgenommen wurden, zeigen, daß meso-Inosit in die in diesen Pflanzen vorkommenden Cyclite — in *A. vulgaris* L-Quebrachit und L-Inosit, in *A. dracunculus* L-Pinit, L-Inosit und Sequoyit — wesentlich stärker eingebaut wird als Glucose. Es kann daraus geschlossen werden, daß meso-Inosit ein Zwischenprodukt beim Aufbau der genannten Cyclite ist und es keinen von dem des meso-Inosits unabhängigen Biosyntheseweg für L-Inosit und seine Derivate in diesen Pflanzen gibt.

Einleitung

In der 1. Mitt. dieser Serie¹ berichteten wir, daß meso-Inosit in Blättchen von Inkarnatklée (*Trifolium incarnatum*) mit guter Ausbeute in D-Pinit, den 5-Methyläther des D-Inosits, eingebaut wird, wobei es auch gelang, die möglichen Zwischen- bzw. Nebenprodukte der Umwandlung, D-Inosit und Sequoyit, zu isolieren. Auf Grund dieser Ergebnisse halten wir es für wahrscheinlich, daß in der genannten Pflanze meso-Inosit eine Vorstufe bei der Biosynthese der anderen Cyclite darstellt.

Es erschien uns von Interesse, mit Hilfe gleichartiger Methoden die Biosynthese von Methyläthern des L-Inosits in dazu fähigen höheren Pflanzen zu untersuchen, um festzustellen, ob meso-Inosit auch hier als Vorstufe fungieren kann. Für diese Experimente wurden zwei *Artemisia*-

¹ R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **335**, 180 (1964).

Arten ausgewählt. In *Artemisia vulgaris* finden sich verhältnismäßig große Mengen von L-Quebrachit (2-O-Methyl-L-inosit)², während nach Plouvier³ L-Pinit (5-O-Methyl-L-inosit) lediglich in *Artemisia dracunculus* vorkommt. In eigenen Versuchen konnten wir feststellen, daß diese zwei Inhaltsstoffe nicht die einzigen Cyclite in den beiden *Artemisia*-Arten sind. In *A. vulgaris* konnten neben L-Quebrachit etwa um eine Größenordnung geringere Mengen von meso-Inosit und L-Inosit nachgewiesen werden, während *A. dracunculus* außer L-Pinit ebenfalls um etwa eine Größenordnung geringere Mengen von meso-Inosit sowie noch kleinere Mengen von Sequoyit und Spuren von L-Quebrachit enthält.

Die in der vorliegenden Mitteilung berichteten Ergebnisse machen es tatsächlich wahrscheinlich, daß — ebenso wie bei der Biosynthese von D-Pinit und den Nebencycliten in *Trifolium incarnatum* — meso-Inosit in den untersuchten *Artemisia*-Arten die Vorstufe der L-Inositmethyläther und des L-Inosits selbst darstellt.

Experimenteller Teil

1. Mikromodifikation der Herstellung von meso-Inosit-(G)-¹⁴C durch Photosynthese

Für die Infusionsversuche wurde neben meso-Inosit-(G)-¹⁴C mit einer spezifischen Aktivität von 194 000 dpm/mg, dessen Herstellung an anderer Stelle¹ beschrieben wurde, auch eine Präparation mit einer wesentlich höheren spezifischen Aktivität verwendet, die auf folgendem Weg erhalten wurde:

In einer 20 ml fassenden Kammer⁴ wurde ein Blättchen frisch geschnittener Petersilie in ¹⁴CO₂-Atmosphäre (Gesamtaktivität 2,06 mC) 3 Tage assimilieren gelassen. Die Isolierung erfolgte im wesentlichen nach der zitierten Methode¹, nur wurden bereits vor dem Zerkochen des Petersilienblättchens 22 mg reiner inaktiver meso-Inosit hinzugegeben, weiters wurde der Trockenrückstand nach Passieren der Austauschersäulen papierchromatographisch gereinigt und sublimiert.

Von dem Blättchen wurden 99,86% der angebotenen Aktivität aufgenommen. Nach Sublimation konnten 10,91 mg meso-Inosit einer Gesamtaktivität von 47,9 Mio. dpm und einer spezifischen Aktivität von 2,52 Mio. dpm/mg isoliert werden. Die radiochemische Ausbeute war somit 1,05%, also mehr als das Doppelte des mit unserer früheren Methode Erhaltenen.

2. Glucose-1-¹⁴C

Die Herstellung erfolgte nach der bei Murray und Williams⁵ angegebenen Vorschrift.

² V. Plouvier, Ann. pharm. franç. 7, 192 (1949).

³ V. Plouvier, C. r. hebdomad. Sé. Acad. Sci. Paris 243, 1913 (1956).

⁴ G. Billek und H. Kindl, Atompraxis 8, 167 (1962).

⁵ A. Murray, III, und D. L. Williams, Org. Synthes. with Isotopes. S. 991. Interscience, New York, 1958.

3. Infusion der radioaktiven Produkte in die Blättchen der beiden *Artemisia*-Arten

Es wurde analog zu dem in unserer vorhergehenden Mitt.¹ beschriebenen Verfahren gearbeitet. Die Infusionsdauer ergab sich aus der Haltbarkeit der Blättchen; bei beginnendem Turgorverlust wurden die Versuche abgebrochen und die Blättchen aufgearbeitet.

4. Isolierung der Cyclitfraktion aus den Blättchen von *Artemisia vulgaris* nach Infusion radioaktiver Vorstufen und Aufarbeitung auf die einzelnen Cyclite

Die über P_2O_5 getrockneten Blättchen (0,8 g) wurden mit Quarzsand fein verrieben und mit 95proz. Aceton im Soxhlet-Apparat erschöpfend extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand zwischen 10 ml $CHCl_3$ und 15 ml Wasser verteilt. Die Chloroform-Schichte wurde abgetrennt und die wäßrige Phase noch dreimal mit je 10 ml $CHCl_3$ ausgeschüttelt, darauf durch ein feuchtes Filter filtriert, mit etwas Wasser nachgewaschen, und die Lösung im Vak. im Rotationsverdampfer auf 3 ml eingengt. Zu der übrigbleibenden braungelben Flüssigkeit wurde dann eine 10proz. Lösung von basischem Bleiacetat (Liquor plumbi subacetici, DAB VI) tropfenweise hinzugegeben, bis auf weiteren Zusatz keine gelben Flocken mehr ausfielen. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit 2 ml Wasser gewaschen und nach Trocknen auf Radioaktivität geprüft; nach Infusion von markiertem meso-Inosit zeigte er fast keine Aktivität.

Das Filtrat wurde mit Wasser auf das Doppelte verdünnt, durch zwei Austauschersäulen von je 6 cm³, deren erste Dowex 50 W \times 4 in der H⁺-Form und die zweite Dowex 1 \times 4 in der OH⁻-Form enthielt, hindurchgeschickt und mit 200 ml Wasser nachgespült. Man verdampfte die vereinigten Flüssigkeiten im Vak. im Rotationsverdampfer zur Trockene. Der Rückstand wurde neben Testflecken von meso-Inosit, L-Inosit und L-Quebrachit (Abstände zwischen den Auftragungen 8 cm) auf ein 30 cm breites Papierchromatogramm (SS 2043 b) aufgebracht und absteigend mit Aceton—Wasser (80:20) aufgetrennt. Ein 5 cm breiter Streifen des Chromatogramms wurde im Chromatogramm-„scanner“ gemessen. Die Lage der einzelnen Cyclite wurde durch die Testflecken, die auf übliche Weise⁶ sichtbar gemacht wurden, festgelegt und das Chromatogramm in die Zonen der einzelnen Cyclite zerschnitten. Jede einzelne der ausgeschnittenen Zonen wurde viermal je 30 Min. mit Wasser eluiert und die vereinigten Eluate der einzelnen Cyclite zur Trockene eingedampft.

Da im Gemisch Aceton—Wasser (80:20) eine Trennung von L-Quebrachit und etwa daneben vorliegendem L-Pinit nicht möglich ist, wurde die eluierte und zur Trockene eingedampfte L-Quebrachit-Fraktion nochmals auf einem durchlaufenden Papierchromatogramm im Gemisch Aceton—Wasser (90:10) aufgetrennt. Dabei wurde aber kein Pinit gefunden; der L-Quebrachit war radiochemisch rein. Die dem L-Quebrachit entsprechende Zone des Chromatogramms wurde dann noch einmal mit Wasser eluiert und der nach Eindampfen verbleibende Rückstand bei 0,001 Torr und 170° im liegenden Rohr sublimiert. (Wegen der geringen Mengen konnten L-Inosit und meso-Inosit nicht durch Sublimation gereinigt werden.)

⁶ W. E. Trevelyan, D. P. Procter und J. S. Harrison, Nature [London] 166, 444 (1950).

Aliquote Teile der Proben der einzelnen Cyclite wurden in unendlich dünner Schichte auf Al-Plättchen aufgebracht und unter einem Endfensterzählrohr gemessen.

5. Isolierung der Cyclitfraktion aus den Blättchen von *Artemisia dracunculus* nach Infusion radioaktiver Vorstufen und Aufarbeitung auf die einzelnen Cyclite

Hier wurde von 0,3 g über P_2O_5 getrockneten Blättchen ausgegangen; die Aufarbeitung erfolgte analog zu der bei *A. vulgaris* angegebenen Methode. Der auf diesem Wege neben L-Inosit und Sequoyit erhaltene L-Pinit wurde durch Papierchromatographie im Gemisch Aceton—Wasser (90:10) auf eine etwaige Verunreinigung mit L-Quebrachit geprüft, erwies sich aber als radiochemisch einheitlich, obwohl wir in Vorversuchen mit inaktiven Pflanzen ein Vorkommen von Spuren von L-Quebrachit in dieser Pflanze papierchromatographisch nachgewiesen hatten.

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse unserer Versuche sind in den Tab. 1 bis 5 dargestellt. Die Tab. 1 und 2, die an sich gleichartige Experimente unter allerdings wesentlich voneinander abweichenden Bedingungen zusammenfassen, zeigen deutlich die Variationsbreite derartiger Einbauversuche.

Tabelle 1. Verteilung der Aktivität auf die einzelnen Cyclite in *Artemisia vulgaris* nach Infusion von $1,74 \mu C$ meso-Inosit-(G)- ^{14}C (spezif. Akt. $1,14 \mu C/mg$); Infusionsdauer 17 Tage

| Isolierter Cyclit | Aktivität in dpm | Prozente der infundierten Aktivität | Spezif. Aktivität in dpm/mg |
|-------------------|------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| meso-Inosit | 32 550 | 0,84 | 23 600 |
| L-Inosit | 31 680 | 0,82 | 17 400 |
| L-Quebrachit | 526 000 | 13,6 | 30 200 |

Tabelle 2. Verteilung der Aktivität auf die einzelnen Cyclite in *Artemisia vulgaris* nach Infusion von $0,8 \mu C$ meso-Inosit-(G)- ^{14}C (spezif. Akt. $0,087 \mu C/mg$); Infusionsdauer 8 Tage

| Isolierter Cyclit | Aktivität in dpm | Prozente der infundierten Aktivität | Spezif. Aktivität in dpm/mg |
|-------------------|------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| meso-Inosit | 247 000 | 14,4 | 165 000 |
| L-Inosit | < 100 | — | — |
| L-Quebrachit | 45 700 | 2,59 | 16 300 |

In dem in Tab. 1 dargestellten Experiment wurde mit markiertem meso-Inosit einer relativ hohen spezifischen Aktivität gearbeitet; die Infusionsdauer war lange. Hier wurde eine sehr hohe Einbaurate in den L-Quebrachit beobachtet; daneben wurden geringere Aktivitäten in L-Inosit und in meso-Inosit gemessen. In Tab. 2 ist ein Versuch zu-

sammengefaßt, bei dem meso-Inosit einer geringeren spezifischen Aktivität zur Anwendung gelangte und die Infusionsdauer relativ kurz war. Hier ist der Einbau in L-Quebrachit beträchtlich geringer; der größte Teil der Aktivität wurde im meso-Inosit wiedergefunden, der offen-

Tabelle 3. Verteilung der Aktivität auf die einzelnen Cyclite in *Artemisia vulgaris* nach Infusion von 68,5 μC D-Glucose-1- ^{14}C (spezif. Akt. 2,54 $\mu\text{C}/\text{mg}$); Infusionsdauer 10 Tage

| Isolierter Cyclit | Aktivität in dpm | Prozente der infundierten Aktivität | Spezif. Aktivität in dpm/mg |
|-------------------|------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| meso-Inosit | 41 900 | 0,027 | 10 200 |
| L-Inosit | 27 300 | 0,018 | 13 000 |
| L-Quebrachit | 418 000 | 0,27 | 13 500 |

sichtlich nur zum Teil am Stoffwechsel teilnahm. In diesem Versuch konnte im L-Inosit überhaupt keine meßbare Aktivität gefunden werden.

Auf Grund der berichteten Ergebnisse muß es wohl als wahrscheinlich angesehen werden, daß meso-Inosit in *Artemisia vulgaris* eine Vorstufe

Tabelle 4. Verteilung der Aktivität auf die einzelnen Cyclite in *Artemisia dracunculus* nach Infusion von 1,16 μC meso-Inosit-(G)- ^{14}C (spezif. Akt. 1,14 $\mu\text{C}/\text{mg}$); Infusionsdauer 8 Tage

| Isolierter Cyclit | Aktivität in dpm | Prozente der infundierten Aktivität | Spezif. Aktivität in dpm/mg |
|-------------------|------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| meso-Inosit | 213 000 | 8,5 | 1 065 000 |
| L-Inosit | 33 000 | 1,31 | 110 000 |
| Sequoyit | 40 300 | 1,60 | 23 400 |
| L-Pinit | 40 700 | 1,62 | 13 800 |

Tabelle 5. Verteilung der Aktivität auf die einzelnen Cyclite in *Artemisia dracunculus* nach Infusion von 68,5 μC D-Glucose-1- ^{14}C (spezif. Akt. 2,54 $\mu\text{C}/\text{mg}$); Infusionsdauer 10 Tage

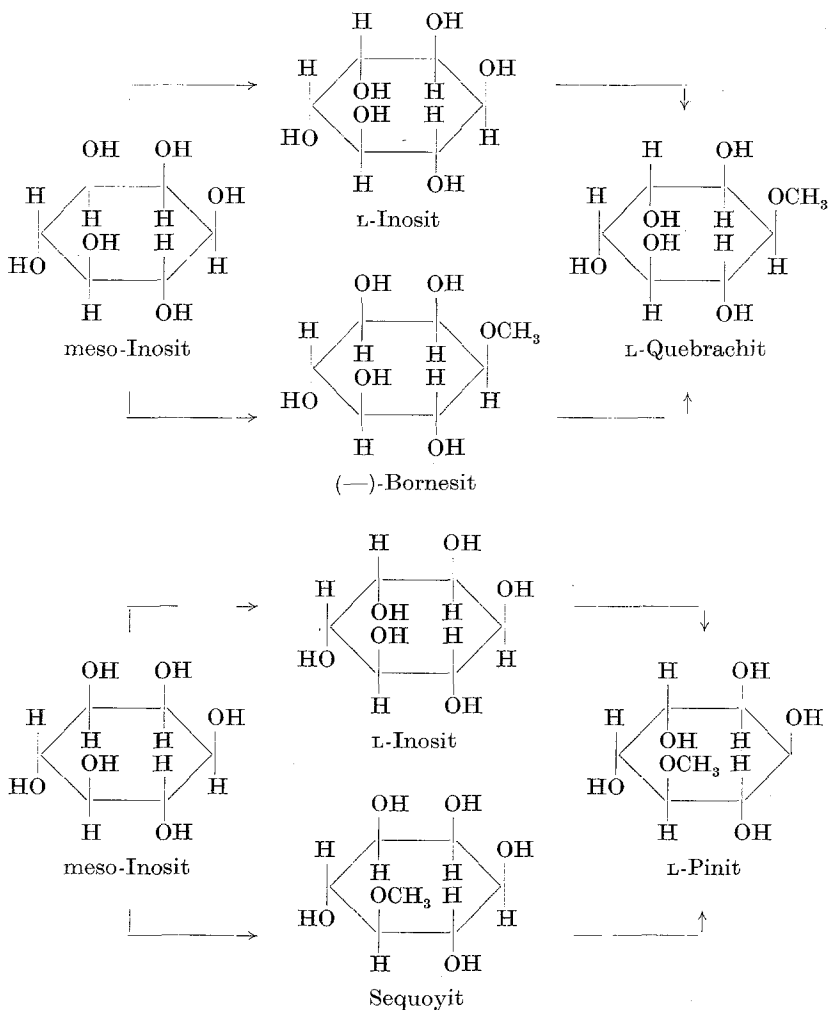
| Isolierter Cyclit | Aktivität in dpm | Prozente der infundierten Aktivität | Spezif. Aktivität in dpm/mg |
|-------------------|------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| meso-Inosit | 30 600 | 0,020 | 20 400 |
| L-Inosit | 52 200 | 0,035 | 12 400 |
| Sequoyit | 29 000 | 0,019 | 5 900 |
| L-Pinit | 252 000 | 0,17 | 11 900 |

des L-Quebrachits ist; diese Vorstellung wird auch durch die in Tab. 3 gebrachten Daten über den Einbau markierter D-Glucose in die Cyclite gestützt. Glucose wird in die Cyclite in einem wesentlich geringeren Ausmaß eingebaut als meso-Inosit.

Zu weitgehend analogen Schlüssen führen die Ergebnisse der Einbauversuche in die Cyclite von *Artemisia dracunculus*, die in den Tab. 4 und 5

zusammengefaßt sind. Obwohl hier die Einbaurate des markierten meso-Inosits in den die Hauptmenge der Cyclite ausmachenden L-Pinit nur 1,62% beträgt, ist sie doch fast um eine Größenordnung höher als diejenige der markierten Glucose. Hier wird meso-Inosit beträchtlich in die in geringeren Mengen vorliegenden Cyclite L-Inosit und Sequoyit eingebaut.

Unsere seinerzeit¹ aufgestellte Arbeitshypothese, daß es für die Biosynthese der Cyclite einen einheitlichen Aufbauweg gibt, der über meso-Inosit führen sollte, wird durch die vorgelegten Resultate unterstützt. Eine direkte Umwandlung von Glucose in L-Inosit, die der Konfigurationsübereinstimmung entsprechend sogar durch einfachen Ringschluß eingebaut.



erfolgen könnte, ist nach den vorliegenden Daten recht unwahrscheinlich. Die Verhältnisse sind hier offenbar denjenigen, die wir früher bei der Biosynthese von D-Pinit in *Trifolium incarnatum* aufgezeigt haben, sehr ähnlich.

Die Umwandlung des meso-Inosits in die beiden Methyläther sollte in zwei Hauptschritten verlaufen, wobei im Falle der Synthese des L-Quebrachits L-Inosit oder der in dieser Pflanze noch niemals aufgefundene (—)-Bornesit als Zwischenprodukte fungieren müßten.

Bei der Umwandlung des meso-Inosits in L-Pinit kommen sowohl L-Inosit als auch Sequoyit als Zwischenprodukte in Frage.

Aus unseren Daten lassen sich keine Aussagen darüber machen, ob in den beiden Reaktionswegen primär eine Epimerisierung des meso-Inosits zum L-Inosit erfolgt, der dann methyliert wird, oder ob zuerst die Methylierung zum 1- bzw. 5-Methyläther des meso-Inosits stattfindet und die Epimerisierung die Folgereaktion darstellt. Untersuchungen zur Klärung dieser Fragen sind in Vorbereitung.

Herrn Dr. *H. Kindl* danken wir für seine hilfreiche Diskussion. Die Durchführung der Untersuchungen wurde wesentlich durch einen Förderungsbeitrag der *Ludwig Boltzmann*-Gesellschaft unterstützt, wofür wir unseren Dank aussprechen.