

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BIOSYNTHESE DER CYCLITE—XIII.*

VORKOMMEN UND BIOSYNTHESE VON CYCLITEN IN ASCLEPIADACEAE

H. KINDL und O. HOFFMANN-OSTENHOF

Organisch-Chemisches Institut der Universität Wien, Österreich

(Received 5 April 1966)

Zusammenfassung—Verbesserte Methoden zur Isolierung von Cycliten aus pflanzlichen Materialien und zu ihrer papierchromatographischen Trennung werden beschrieben. Mit Hilfe dieser empfindlichen Methoden wurden drei Arten der Asclepiadaceae auf ihren Gehalt an Cycliten untersucht. Neben den als Inhaltsstoffe bei einzelnen Arten dieser Familie bereits bekannten Verbindungen Condurit und L-Viburnit konnten folgende weitere Cyclite in manchmal beachtlichen Mengen nachgewiesen werden: meso-Inositol, D-Bornesit, Sequoyit, D-Inositol, D-Pinit und L-Leucanthemit; die zuletzt genannte Substanz ist ein Isomeres des Condurits und war bisher nur als Inhaltsstoff in einem Genus der Compositae gefunden worden. Die für L-Leucanthemit bisher postulierte Konstitution wurde bestätigt. Die an Geweben mit geringerem Stoffwechsel erhaltenen Werte wurden mit den Ergebnissen von Versuchen über den Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in die Cyclitfraktion in Blättern derselben Pflanzen verglichen. Auf diese Weise konnten Einblicke in die biogenetischen Beziehungen der Cyclite untereinander erhalten werden.

Abstract—Improved methods for the isolation of cyclitols from plant materials and their separation by paper chromatography are described. With the help of these sensitive methods three species of Asclepiadaceae have been analysed for their cyclitol content. Besides two compounds already known as constituents of single species of this plant family, namely conduritol and L-viburnitol, the following further cyclitols could be detected in sometimes remarkable amounts: meso-inositol, D-bornesitol, sequoyitol, D-inositol, D-pinitol and L-leucanthemitol. The last-named compound has so far only been found in one genus of the Compositae. The structure originally postulated for L-leucanthemitol was confirmed. Values obtained in tissues with a low rate of metabolism were compared with the results of incorporation experiments with labelled precursors in leaves of the same plants. These comparisons give some insight into the biogenetic interrelationship of the cyclitols.

EINLEITUNG

CYCLITE werden ebenso wie Terpene, Alkaloide und viele Phenylpropanabkömmlinge als Produkte des sogenannten Sekundärstoffwechsels aufgefasst. In letzter Zeit mehren sich allerdings die Befunde, nach welchen Cyclite nur in wenigen Fällen Exkrete bzw. Endprodukte des Kohlenhydrat-Stoffwechsels sind. Es scheint vielmehr, dass in den Pflanzen meist lebhafte gegenseitige Umwandlungen zwischen Kohlenhydraten und Cycliten erfolgen.

Mit Hilfe der radioaktiven Nuklide ist es heute möglich, derartige Stoffwechselvorgänge genauer zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wird diese Technik der Markierung mit radioaktiven Nukliden sehr hoher spezifischer Aktivität für die Bestimmung des Vorkommens, der Bildung und der Umwandlungen der Cyclite in der Pflanze auch bei kleinsten stationären Konzentrationen verwendet. So gelingt es durch Photoassimilation in einer Atmosphäre von $^{14}\text{CO}_2$ sehr hoher spezifischer Aktivität auch solche Cyclite zu charakterisieren, welche nur zu 10^{-3} Prozent in dem aus der Pflanze isolierbaren Cyclitgemisch enthalten sind, wenn die gesamte Cyclitfraktion ~ 1 Prozent des Trockengewichts der Pflanze darstellt.

* XII Mitteilung: H. KINDL und O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Z. Physiol. Chem.* im Druck.
1091

Weitere wichtige Aussagen sind durch den Vergleich von zwei grundsätzlich verschiedenen physiologischen Verhältnissen in der Pflanze zu erreichen. Bei der Analyse der Cyclitfraktion in Pflanzenteilen wie der Rinde und den Wurzeln findet man vor allem die keinen oder nur geringen weiteren Umsetzungen unterliegenden Produkte. Bei der Analyse nach kurz dauernder Applikation radioaktiver Vorstufen werden hingegen besonders die Anfangsschritte längerer Stoffwechselprozesse berücksichtigt und auch Zwischenprodukte von geringerer stationärer Konzentration erfasst.

Die Familie der Asclepiadaceae ist für die Biochemie der Cyclite aus verschiedenen Gründen von Interesse. Bereits 1904 isolierten Power und Tutin¹ aus *Gynemna sylvestre* ein Cyclohexanpentol, das später von Posternak und Schopfer² als L-Viburnit (I) (siehe Formelübersicht) identifiziert wurde. Plouvier³ suchte diesen Cyclit vergeblich in Blättern von Arten der Genera *Asclepias*, *Periploca*, *Tylophora* und *Vincetoxicum*. 1907 fand Kubler⁴ in der Condurango-Rinde, der Rinde von *Marsdenia condurango*, den Condurit (II); bis heute sind es ausschliesslich Pflanzen der Familie Asclepiadaceae, in welchen dieser Cyclit, ein Cyclohexentetrol, nachgewiesen wurde.

Die vorliegende Arbeit kann wegen der geringen Anzahl untersuchter Arten nicht als eine rein taxonomische Studie angesehen werden. Es lag uns vielmehr daran, in den untersuchten Arten und Materialien auch kleinste Mengen von Cycliten feststellen zu können und einen Überblick über die Stoffwechselbeziehungen dieser Substanzen zu erhalten.

Für unsere Untersuchungen standen uns zur Verfügung: Pflanzen von *Cynanchum vincetoxicum* (Schwalbenwurz) sowie die als Droge erhältlichen Wurzeln (*Radix vincetoxicii*) derselben Pflanze. Pflanzen von *Hoya carnosa* (Wachsblume) sowie die ebenfalls als Droge käufliche Rinde von *Marsdenia condurango* (Cortex condurango).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In den von uns untersuchten Arten konnten die folgenden Cyclite nachgewiesen werden (vgl. Formelübersicht): meso-Inosit (III), D-Bornesit (D-1-O-Methyl-meso-inosit) (IV), Sequoyit (5-O-Methyl-meso-inosit) (V), D-Inosit (VI), D-Pinit (4-O-Methyl-D-inosit) (VII), L-Viburnit (I), Condurit (II) sowie L-Leucanthemit (VIII).

Da bisher in den Asclepiadaceae nur in je einem Fall L-Viburnit und Condurit nachgewiesen worden waren, ist sowohl das scheinbar allgemeine Vorkommen von Condurit als auch die Auffindung einer so grossen Anzahl weiterer Cyclite bemerkenswert.

Von besonderem Interesse erscheint uns die Auffindung des L-Leucanthemits (VIII), der in allen drei untersuchten Arten vorkommt. Dieser Cyclit wurde bisher nur in 3 Species der Familie der Compositae nachgewiesen.⁵ Bei der Analyse der Neutralfraktion verschiedener Extrakte wurde eine Fraktion gefunden, die sich auf Grund ihres *R*_f-Wertes in den verschiedenen Chromatographiegemischen ähnlich wie eine Desoxypentose bzw. wie ein Dimethylinosit, Cyclohexantetrol oder Cyclohexentetrol verhielt. Da sich die unbekannte Verbindung nicht sublimieren liess, keine Entmethylierung möglich war und nach Oxydation zum Epoxid und saurer Hydrolyse vorwiegend muco-Inosit neben meso-Inosit erhalten wurde, konnte auf Grund der Regel von Henbest⁶ und der Bevorzugung der diaxialen

¹ F. B. POWER und F. TUTIN, *J. Chem. Soc.* **85**, 624 (1904).

² T. POSTERNAK und W. H. SCHOPFER, *Helv. Chim. Acta* **33**, 343 (1950).

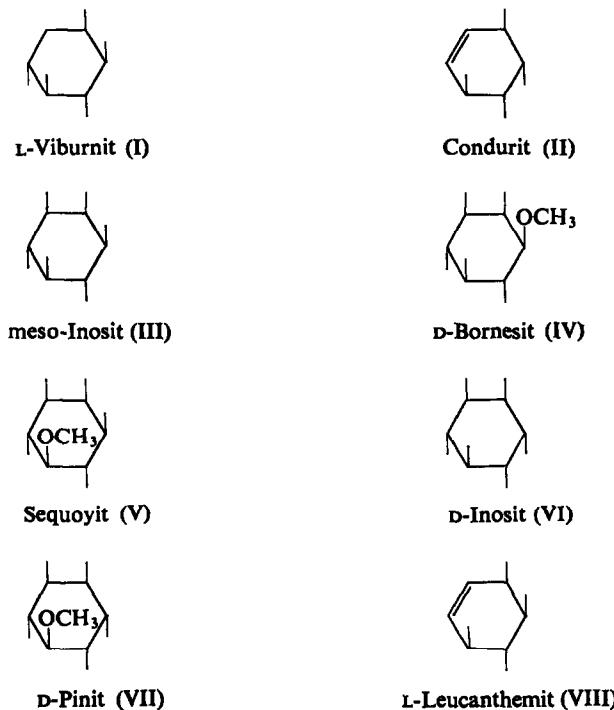
³ V. PLOUVIER, *C. R. Acad. Sci.* **242**, 2389 (1956).

⁴ K. KUBLER, *Arch. Pharm.* **246**, 623, 645 (1908).

⁵ V. PLOUVIER, *C. R. Acad. Sci.* **255**, 360 (1962).

⁶ H. B. HENBEST, R. G. PEARSON und F. G. BORDWELL, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1141, 1155 (1955).

Spaltung auf die Struktur eines 1,2,4/3-Cyclohexentetrols geschlossen werden. Die endgültige Identifizierung mit L-Leucanthemit gelang durch chromatographische Vergleiche mit authentischem DL-Leucanthemit und L-Leucanthemit,* sowie durch Vergleich des Schmelzpunktes der Substanz mit demjenigen einer von uns selbst aus *Chrysanthemum leucanthemum* isolierten Probe von L-Leucanthemit. L-Leucanthemit dürfte, wie verschiedene Untersuchungen zeigten, wesentlich häufiger vorkommen als bisher angenommen wurde.⁷



In Tabelle 1 sind Ergebnisse gegenübergestellt, welche einerseits bei der Analyse der Cyclitfraktion aus Wurzeln von *Cynanchum vincetoxicum* und andererseits bei der Bestimmung der Aktivität der einzelnen Anteile der Cyclitfraktion aus Blättern derselben Pflanze nach Photoassimilation in $^{14}\text{CO}_2$ erhalten wurden. Über die als C1 bzw. C16 sowie als "Pentit" bezeichneten Anteile wird im experimentellen Teil berichtet.

Auf Grund der Tabelle lassen sich einige Angaben über den Stoffwechsel der einzelnen Cyclite machen. So werden anscheinend Condurit (I), D-Inosit (VI) und D-Pinit (VII) nur langsam gebildet und unterliegen keinem bedeutendem Stoffwechsel; während sie in den Wurzeln in relativ hoher stationärer Konzentration vorliegen, sind die Aktivitäten nach Photoassimilation in den Blättern sehr gering. D-Bornesit (IV) zeigt genau das entgegengesetzte Verhalten; dieser meso-Inositolmethyläther wird zwar schnell gebildet, aber, wie wir auch bei anderen Untersuchungen feststellen konnten,⁸ sehr schnell wieder abgebaut, weshalb

* Wir danken Herrn Prof. Dr. M. Nakayama (Kyoto) für eine Probe synthetisch hergestellten DL-Leucanthemit und Herrn Dr. V. Plouvier (Paris) für eine Probe von L-Leucanthemit aus *Chrysanthemum leucanthemum*.

⁷ H. KINDL und O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Fortschr. Chem. Organ. Naturstoffe* im Druck.

⁸ H. KINDL und O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Monatsh. Chem.* im Druck.

seine stationäre Konzentration gering ist. Von Sequoyit (V) ist bekannt,⁹ dass er ein Zwischenprodukt bei der Bildung von D-Pinit (VII) und D-Inosit aus meso-Inosit (III) darstellt; seine stationäre Konzentration ist überaus gering. Auch meso-Inosit und L-Viburnit (I) werden vergleichsweise schnell gebildet, aber auch rasch abgebaut. Der Zuckeralkohol D-Mannit, ein ständiger Begleiter der Cyclite bei der Aufarbeitung, scheint in *Cynanchum vincetoxicum* eher ein Stoffwechselendprodukt zu sein und eine Speicherfunktion inne zu haben.

TABELLE 1. CYCLITE UND VERWANDTE SUBSTANZEN IN *Cynanchum vincetoxicum* (SCHWALBENWURZ)

Inhaltsstoff	Prozentuelle Zusammensetzung der aus den Wurzeln erhaltenen Cyclitfraktion	Verteilung der Radioaktivität der durch Photosynthese gebildeten Cyclite in ‰
C1 (C16)	10	45
Condurit	5	0,5
L-Leucanthemit	15	20
“Pentit”	15	2
D-Mannit	20	2
D-Pinit	7	1
D-Bornesit	3	10
Sequoyit	1	0,5
L-Viburnit	0,01	0,05
D-Inosit	5	0,02
meso-Inosit	12	10

TABELLE 2. CYCLITE IN *Hoya carnosa* (WACHSBLUME) NACH PHOTOASSIMILATION VON $^{14}\text{CO}_2$

Inhaltsstoff	Verteilung der Radioaktivität der Rohcyclitfraktion in ‰
H7 (entspricht C1)	8
Condurit	0,1
L-Leucanthemit	18
D-Pinit	15
“Pentit”	4
D-Bornesit	13
Sequoyit	4
D-Inosit	0,1
meso-Inosit	30

TABELLE 3. ÜBERFÜHRUNG VON MESO-INOSIT-2- ^3H IN VERSCHIEDENE CYCLITE IN BLÄTTERN VON *Hoya carnosa*

Cyclit	D-Inosit	D-Bornesit	Sequoyit	D-Pinit
Einbau in Prozenten	0,01	0,04	0,01	0,02

⁹ R. SCHOLDA, G. BILLIK und O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Monatsh. Chem.* **95**, 1311 (1964).

Nach Photoassimilation von $^{14}\text{CO}_2$ in Blättern von *Hoya carnosa* wird, wie Tabelle 2 zeigt, beträchtliche Aktivität in den Inositmethyläthern. Diese Pflanze hat offensichtlich ein stärkeres Methylierungsvermögen als *Cynanchum vincetoxicum*. Nach Applikation von ^3H markiertem meso-Inositol werden in Blättern von *Hoya carnosa* messbare Mengen verschiedener Methyläther gebildet (Tabelle 3), während ein analoger Versuch an *Cynanchum vincetoxicum* nur mehr Spuren dieser Verbindungen ergab, wobei gleichzeitig ein überaus starker Abbau des vorgegebenen meso-Inosits beobachtet wurde. In beiden Pflanzen konnte kein Einbau der Aktivität von meso-Inositol in L-Leucanthemit, Condurit oder L-Viburnit nachgewiesen werden.

Die Cyclitfraktion aus der Condurango-Rinde von *Marsdenia condurango* (Tabelle 4) unterscheidet sich vor allem dadurch von den bisher besprochenen Verhältnissen, dass Condurit (II) gegenüber L-Leucanthemit (VIII) wesentlich überwiegt und dass der Anteil an L-Viburnit (I) vergleichsweise gross ist.

TABELLE 4. ROHCYCLITFRAKTION AUS RINDE
VON *Marsdenia condurango* (CONDURANGO-RINDE)

	(%)
Condurit	65
L-Leucanthemit	3
“Pentit”	6
D-Pinit	3
L-Viburnit	8
D-Bornesit	1,5
Sequoyst	0,7
D-Inositol	2
meso-Inositol	3

Die vorgelegten Ergebnisse sind natürlich zu unvollständig, um endgültige Aussagen über die Verteilung der Cyclite in der Familie Asclepiadaceae zu erlauben. Immerhin scheinen gewisse Übereinstimmungen bei den einzelnen Arten der Familie vorzuliegen. So finden sich überall D-Methylcyclite (D-Bornesit, Sequoyit, D-Pinit) sowie meso-Inositol und D-Inositol, nicht aber L-Inositol bzw. dessen Methyläther, L-Quebrachit. Die Menge an L-Viburnit ist stark wechselnd; in bezug auf die Cyclohexentetrole scheint es, wenn wir neuere Untersuchungen¹⁰ an *Gymnema sylvestre*, wo Condurit gefunden wurde, in die Betrachtung einschliessen, dass das Verhältnis von Condurit zu L-Leucanthemit stark von den ökologischen Bedingungen abhängt. Bei tropischen Arten scheint Condurit vorzuwiegen, während bei Pflanzen aus gemässigten Zonen L-Leucanthemit dominiert.

Die Familie der Asclepiadaceae wird oft als eine Abwandlung der Apocynaceae angesehen, wobei die Unterschiede im wesentlichen die Morphologie der Blüten betreffen. Die hier vorliegenden Resultate und einige Angaben über das Vorkommen von Cycliten in Apocynaceae⁷ ermöglichen einen Vergleich der chemisch-taxonomischen Verhältnisse. In den verschiedenen Arten der Apocynaceae finden sich D-Inositol, L-Inositol, L-Quebrachit, D-Bornesit, L-Bornesit sowie der Dimethyläther Dambonit. Über ein Vorkommen von Cyclohexanpentolen oder Cyclohexentetrolen wurde nicht berichtet, was zumindest dahin

¹⁰ P. E. MANNI und J. E. SINSHEIMER, *J. Pharm. Sci.* **54**, 1541 (1965).

deutet, dass derartige Verbindungen nicht eine Hauptmenge der Cyclitfraktion darstellen. Die Unterschiede der Cyclitverteilung dieser beiden Familien scheint somit recht beachtlich zu sein. Nach Wettstein¹¹ werden Apocynaceae, Asclepiadaceae, Loganiaceae und Gentianaceae zu der Ordnung Contortae zusammengefasst. Da über die Cyclitverteilung in den zwei zuletzt genannten Familien noch kaum etwas bekannt ist, fehlen die Grundlagen für weitere taxonomische Vergleiche.

EXPERIMENTELLER TEIL

Gewinnung der Neutralfraktion aus sehr kleinen Mengen von Pflanzenmaterial

Die zerkleinerten Pflanzenteile werden 2 mal mit je 150 ml 90%igem Aceton und dann 2 mal mit je 100 ml 0.1 N HCl ausgekocht, wobei zuletzt 10 mg Cyclitträger (meistens meso-Inosit bzw. ein Testgemisch) zugesetzt werden. Dann engt man die vereinigten Extrakte im Vakuum auf 50 ml ein. Die wässrige Lösung wird mit Äther ausgeschüttelt, im Vakuum zur Trockene eingedampft, mit wenig Wasser in der Wärme aufgenommen, filtriert und mit Hilfe von Kationenaustauscher (Dowex 50 \times 4, H⁺-Form) und Anionenaustauscher (Dowex 1 \times 4, OH⁻-Form) in je einer Säule von 2 \times 30 cm entionisiert. Die erhaltene farblose Lösung wird auf 500 μ l eingeengt.

Gewinnung der Cyclitfraktion aus grösseren Mengen von Pflanzenmaterial

Das Pflanzenmaterial wird entfettet und in grossen Soxhlet-Extraktoren (ca. 3 l) mit Wasser extrahiert. Das Eluat mehrerer derartiger Ansätze engt man in einem Rotationsverdampfer auf ~ 2 l. ein. Bei pH 8, 80 und heftigem Rühren wird pulverisiertes Bleiacetat langsam hinzugegeben, bis ein Filtrat einer Probe keine weitere Fällung mehr ergibt. Anschliessend wird noch 1 hr gerührt und dann CO₂ eingeleitet. Das Filtrat kann mit Hilfe von zwei Austauschersäulen (je 10 \times 50 cm), die mit Kationenaustauscher (H⁺-Form) und Anionenaustauscher (OH⁻-Form) gefüllt waren, weitgehend entionisiert werden. Das Eluat wird auf 500 ml eingeengt, mit 0.2 g Na₂HPO₄ versetzt, auf pH 6.5 eingestellt und mit Hefe bei 30° mehrere Tage vergoren oder mit einer katalaschätilgen D-Glucoseoxydase-Präparation bei 28° unter Durchleitung von Luft von D-Glucose befreit. Manchmal erweist es sich als notwendig, nach der Vergärung 5 Stunden mit 1 N HCl zu kochen; es wird mit Tierkohle behandelt und durch mehrmaliges Einengen zur Trockene und Wiederaufnehmen mit Wasser die überschüssige HCl entfernt. In den anderen Fällen wird von der Hefe abzentrifugiert, mit Tierkohle erhitzt, abfiltriert und über Kationen- und Anionenaustauscher (2 \times 45 cm-Säulen) sorgfältig entionisiert. Das Eluat ergibt beim Einengen einen farblosen Sirup.

Schnellverfahren zur Identifizierung der Hauptcyclite in kleineren Pflanzenproben.

Ein g der getrockneten Probe bzw. 10 g frisches Pflanzenmaterial werden mit 30 ml Benzin 2 min im Homogenisator zerkleinert und dann zentrifugiert. Der Rückstand wird mit 50 ml siedendem Wasser 10 min im Homogenisator behandelt und anschliessend mit 100 mg Tierkohle, 100 mg Celite, 10 ml Kationenaustauscher und 10 ml Anionenaustauscher 10 min gerührt und hierauf bei 18.000 upm zentrifugiert. Der Überstand wird im Vakuum auf 1–2 ml eingeengt, mit einer Pipette in einen 5 ml Spitzkolben überführt und zur Trockene eingeengt. Nach Zugabe von 100 μ l Wasser werden der sirupartige Film über einer Mikroflamme gelöst und gleichzeitig die Wände gespült. Ein äquivalenter Teil (10 μ l) wird auf eine mit einer 0.20 mm dicken Celluloseschicht versehenen Dünnschichtplatte aufgetragen

¹¹ R. R. WETTSTEIN, *Handbuch der systematischen Botanik*, S. 744. Deuticke, Leipzig (1911).

und das Cyclit-Kohlenhydrat-Gemisch durch zweidimensionale Chromatographie (20 × 20 cm Platten, Kammersättigung) (A dann D oder E)* getrennt. Als Vergleich dient ein Dünn-schichtchromatogramm vom Testgemisch 2. Falls ein grosser Überschuss an D-Glucose den Nachweis der Cyclite unmöglich macht, muss mit einer Katalase enthaltenden D-Glucose-oxydase-Präparation unter Schütteln oder Durchleiten von Luft behandelt werden, die D-Gluconsäure wird dann durch Behandeln mit Austauschern und Zentrifugation eliminiert. Zur weiteren Anreicherung kann im liegenden Rohr fraktioniert sublimiert werden.

Auf trennung des Cyclitgemisches aus Cynanchum vincetoxicum

Das farblose, sirupöse Cyclitgemisch aus einem Ansatz von 2 kg kristallisierte nach wenigen Tagen zum Teil aus. Die Kristalle wurden abgesaugt und mehrmals aus Wasser umkristallisiert. Eine papierchromatographische Prüfung in A und D zeigte, dass die Kristalle eine Mischung von meso-Inosit und einer Fraktion C6 darstellten. Die vereinigten Mutterlaugen wurden zu einem dünnen Sirup eingeengt (20 ml) und mit 5 ml Aceton versetzt, die Lösung auf eine Cellulosesäule (12 × 70 cm aufgebracht und mit dem Elutionsgemisch A in 10 Fraktionen getrennt (C1–C10). C1 enthält eine mit alkalischem Silbernitrat reagierende, sublimierbare Verbindung mit einem den 2-Desoxypentosen ähnlichen R_f -Wert in A und E. Diese Verbindung wurde bisher auch in zahlreichen anderen Versuchen bei verschiedenen anderen Pflanzen festgestellt, konnte aber bisher noch nicht weiter untersucht werden. Es handelt sich dabei nicht um Glycerin, das häufig, aber bei höheren R_f -Werten, unter den hier geschilderten Bedingungen gefunden wurde.

C2 erwies sich als Mischung zweier chemisch sehr ähnlicher Verbindungen. Durch Chromatographie an einer sehr langen Cellulosesäule (2,5 × 170 cm) mit E gelang eine Trennung; die Fraktion mit höherem R_f -Wert ergab eine sirupöse Verbindung, die sich sublimieren lässt und nach kurzer Zeit kristallisierte (F = 141°). Die Analysen des kristallisierten Produktes und des daraus hergestellten Benzoats (F = 119°) zeigten das Vorliegen von 4 veresterbaren OH-Gruppen an. Chromatographischer Vergleich und Mischschmelzpunkt bewiesen die Identität mit Condurit. Die Fraktion mit niedrigerem R_f -Wert wurde mit C3 vereinigt; die Aufklärung der Struktur dieser Substanz erfolgte im Vergleich mit C14 und wird gesondert beschrieben. C4 und C5 enthalten mit alkalischer Silbernitrat-Lösung reagierende Substanzen, die nicht weiter untersucht wurden.

C6 kristallisierte beim Einengen aus; mehrmaliges Umkristallisieren und fraktionierte Sublimation ergaben ein Produkt vom F = 167°; das Hexaacetat schmolz bei 125°. Vergleichschromatogramme und Mischschmelzpunkt bewiesen, dass C6 mit D-Mannit identisch ist. Die weiteren Fraktionen C7 bis C10 enthielten neben Spuren von D-Bornesit und Sequoyit vorwiegend D-Inosit und meso-Inosit. Zur Trennung dieser Cyclite wurde auf mehreren grossen Bögen eines besonders dicken Papiers in D chromatographiert. Durch Chromatographie in B konnte die Anwesenheit von Scyllit ausgeschlossen werden.

Identifizierung der durch Photosynthese gebildeten Cyclite bei Cynanchum vincetoxicum

Nach den ersten beschriebenen Reinigungsstufen wurde die Neutralfraktion mit Testgemisch 1 (20 mg) verdünnt und in A (4 Bögen, 36 cm breit) chromatographiert. Es wurde in 5 Fraktionen unterteilt (C11–C16). C11 wurde mit 50 mg meso-Inosit verdünnt, umkristallisiert und 2 mal sublimiert. Anteile des Sublates wurden in A, B und F chromatographiert. Das Sublimat (C11 selbst enthielt noch zahlreiche nicht sublimierbare aktive Verbindungen) war reiner meso-Inosit; es konnte keine Spur von Scyllit gefunden werden.

* Mit A bis H werden Lösungsmittelgemische zur Chromatographie (Tabelle 5) bezeichnet.

C12 ergab bei Rechromatographie in D mehrere Aktivitäts-“peaks”, die durch weitere Chromatographie in B und C dem Sequoyoit, Bornesit und meso-Inosit zugeordnet werden konnten. Ein dem R_f -Wert des L-Viburnit entsprechender “peak” zeigte nach der Sublimation nur noch 2 Prozent der ursprünglichen Aktivität. Das Sublimat wurde mit 50 mg L-Viburnit verdünnt, sublimiert und 4 mal umkristallisiert, wobei eine konstante spezifische Aktivität des L-Viburnits erreicht wurde. In C12 war kein D-Inosit nachweisbar.

C13 wurde in C rechromatographiert. Bei der Sublimation eines aliquoten Teiles sank die Aktivität auf 0,1 Prozent des eingesetzten Wertes ab. Zweimaliges Umkristallisieren nach Verdünnen mit 100 mg D-Quercit zeigte deutlich, dass keine Markierung von D-Quercit in der Pflanze erfolgt war. C13 enthielt beträchtliche Mengen von Radioaktivität. Es handelt sich aber nicht um L-Quebrachit; dies konnte durch Verdünnen, Sublimieren und Umkristallisieren bewiesen werden. Hingegen waren geringe Mengen von aktivem D-Pinit nachweisbar.

C14 wurde 2 mal in E rechromatographiert; die Weiterverarbeitung wird gesondert beschrieben. C15 wurde 2 mal sublimiert und durch 3 malige Chromatographie in E von den überwiegenden Mengen C14 befreit. C15 ist mit C2 und somit mit Condurit identisch. C16 entspricht C1.

Identifizierung von C3 (C14)

Die Fraktion C3 wurde 2 mal mit Tierkohle behandelt, um Reste von den bei der Chromatographie mit dem technischen Aceton zurückbleibenden ölichen Verunreinigungen abzutrennen. Das klare, farblose Filtrat wurde zu einem dicken Sirup eingeeengt. Die Tatsache, dass C3 sich sublimieren liess und mit Hefe nicht vergärbar war, sprach für einen Cyclit, Desoxyhexit oder Desoxypentit. Da die Wanderungsgeschwindigkeit von C3 in verschiedenen Gemischen derjenigen eines Dimethylinosits entsprach, wurden 10 mg C3 mit 5 ml 25%iger HBr 5 hr. am Rückfluss gekocht. Bei der Chromatographie des entionisierten Gemisches in A und D konnte kein meso-Inosit festgestellt werden. C3 wurde in Pyridin mit Essigsäureanhydrid (2 hr, 50°) verestert und ergab ein Tetraacetat vom $F = 126$.

C14 wurde mit 20 mg C3 verdünnt und in wässriger Lösung mit Perphthalsäure behandelt. Nach der Entionisierung mit Kationen- und Anionenaustauscher wurde die Lösung eingeeengt und in A chromatographiert. Es konnten 2 Aktivitäts-“peaks” erhalten werden, wovon einer auf Grund des R_f -Wertes als muco-Inosit angesehen wurde. Der “peak” mit dem kürzeren R_f -Wert wurde eluiert, mit 50 mg myo-Inosit verdünnt, 2 mal sublimiert und 2 mal umkristallisiert. Bei diesen Operationen blieb die spez. Aktivität des meso-Inosits konstant. Alle diese Befunde sprechen dafür, dass C3 (C14) ein 1,2,4,3-Tetrahydroxycyclohexen ist. Es wurde in der Folge L-Leucantherit⁸ aus *Chrysanthemum leucanthemum* (Compositae) isoliert und damit C3 angeimpft; der Rückstand kristallisierte in kurzer Zeit durch ($F = 134$). Verschiedene Analysen und der Mischschmelzpunkt stimmten überein.

*Cyclite als Stoffwechselprodukte von meso-Inositol-2-³H, bzw. meso-Inositol-*u*-¹⁴C in *Cynanchum vincetoxicum**

Bei der Aufarbeitung wurden 50 mg Testgemisch I zugesetzt. Nach der Sublimation der Neutralfraktion wurde das farblose, teilweise kristallisierende Sublimat auf eine Kieselgelsäule (1,2 × 25 cm) aufgetragen. Es wurde mit einer Mischung *n*-Butanol-Pyridin-Wasser (10:3:1, v/v) entwickelt und entsprechend einem vorher angefertigten Dünnschichtchromatogramm von D-Pinit, Sequoyoit, D-Bornesit und meso-Inosit dann bei der Säulentrennung mehrere Fraktionen aufgefangen. Dadurch gelang eine vollständige Abtrennung von meso-

Inosit und die Herstellung von reinem D-Pinit und Sequoyit. In der an D-Bornesit reichen Fraktion, von der anschliessend mehrere Chromatogramme in C und D hergestellt wurden, war die Aktivität in dem Falle, wo meso-Inosit-2-³H appliziert worden war, auf die Höhe der Nachweisgrenze abgefallen. Die nach Applikation von meso-Inosit-u-¹⁴C erhaltene D-Bornesitfraktion war sehr schwach aktiv. Bei der zu Beginn vorgenommenen Säulentrennung enthielt eine der ersten Fraktionen reinen L-Leucanthemit. Es konnte hier keine Aktivität festgestellt werden.

Auf trennung des Cyclitgemisches aus Condurango-Rinde

Aus mehreren Ansätzen wurden 25 g Rohcyclite erhalten. Diese wurden auf einer Cellulosesäule (12 x 70 cm) mit A in 6 Fraktionen (M1-M6) getrennt. Die *R_f*-Werte für die verschiedenen Fraktionen konnten auf Grund von Papierchromatogrammen in A vorher ausgewählt werden. M1 enthielt nur eine Verbindung, die sich mit C1 identisch erwies. Die Analyse des nicht ganz trockenen Produktes weist auf die Zusammensetzung C₆H₁₄O₄ hin.

M2 enthielt reinen Condurit.

Mehrmalige Chromatographie von M3 in E zeigte, dass neben Condurit auch geringe Mengen von L-Leucanthemit in der Pflanze enthalten sind.

M4 ergab nach Reinigung mit Tierkohle farblose Kristalle vom F=178°, die sich sublimieren lassen, F=181°. Die Chromatographie zeigte, dass darin unter anderem noch Spuren von meso-Inosit enthalten waren. Das Sublimat wurde in Pyridin mit Cinnamoylchlorid 2 hr am Rückfluss gekocht, anschliessend mit Wasser zersetzt und die Neutralfraktion mit Chloroform extrahiert. Der Rückstand wurde in wenig Essigester aufgenommen, auf eine Kieselgelsäule (2,5 x 30 cm) aufgetragen und mit einer Mischung Essigester-Petroläther (5:1, v/v) eluiert. Das Eluat wurde über eine U.V.-Einheit und ein Steuergerät geleitet und so entsprechend der Extinktion bei 254 m μ fraktioniert. Es wurde in Benzol umkristallisiert und bei 130° sublimiert. So gelang die Reinigung eines Pentacinnamoylderivates vom F=137°. ($\lambda_{\text{max}}=280$ m μ , log $\epsilon=4,8$; log $\epsilon_{254\text{ m}\mu}=4,5$). Der freie Cyclit selbst war mit L-Viburnit identisch, wie durch Mischschmelzpunkt und Chromatographie in B, C und D bewiesen wurde. M5 und die Mutterlauge von M4 wurden eingeeignet und auf einer kleinen Cellulosesäule aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen ergaben nach fraktionierter Sublimation L-Viburnit, D-Inosit und meso-Inosit.

Die Fraktion M6 enthielt vorwiegend meso-Inosit.

Identifizierung der durch Photosynthese gebildeten Cyclite bei Hoya carnosa

Die nach oben beschriebenem Verfahren erhaltene Neutralfraktion (H1) wurde auf 4 Bögen Chromatographiepapier (je 36 cm Breite) aufgetragen. Zum Vergleich lief Testgemisch 1 mit; die Entwicklung erfolgte in A. Nach steigenden *R_f*-Werten wurde in 5 Zonen getrennt: H2, H3, H4, H5, H6, H7.

H2 wurde eluiert, sublimiert und als meso-Inosit identifiziert. Ein Chromatogramm in B zeigte, dass kein Scyllit anwesend war.

H3 wurde mit 10 mg Testmischung 2 verdünnt und sublimiert. Es bildeten sich 2 Zonen (H8 und H9), die durch Zerschneiden des Sublimationsrohres getrennt und nach dem Herauslösen in D chromatographiert wurden. H9 zeigte dabei einen der Lage des D-Bornesit entsprechenden Aktivitäts-“peak”. Diese Zone wurde eluiert, mit 20 mg D-Bornesit verdünnt und mehrmals umkristallisiert; dabei blieb die spez. Aktivität konstant. Dieser D-Bornesit

erwies sich in B und C als einheitlich. H8 bestand, wie mehrmalige Chromatographie bewies, aus D-Inosit und Sequoyit.

Bei der Sublimation von H4 wurden nur mehr weniger als 5 Prozent der eingesetzten Aktivität im Sublimat gefunden. Dieses zeigt beim Verdünnen und Umkristallisieren mit L-Viburnit bzw. D-Quercit einen starken Abfall der Aktivität im Kristallisat. Weitere Versuche ergaben, dass kein D-Quercit und nur sehr geringe Mengen L-Viburnit ($\sim 0,1$ Prozent bezogen auf die gesamte Menge des markierten Cyclitgemisches) in *H. carnosa* gebildet werden.

Mit einem weiteren Teil des Sublates aus H4 wurde die Identifizierung von L-Quebrachit versucht. Das Ergebnis war negativ.

H5 besteht, wie durch Verdünnung, Sublimation und Rechromatographie in D und G gezeigt wurde, vorwiegend aus D-Pinit. H6 wurde mit 5 mg Condurit verdünnt, sublimiert und in E chromatographiert. Die Aktivitätsspitze (H10) lag bei einem gegenüber Condurit kürzeren R_f -Wert. In der Folge wurde die dem Condurit zuzuordnende Aktivitätsschulter ausgeschnitten und 3 mal rechromatographiert, bis in E und G ein scharfer, dem Condurit entsprechender "peak" auftrat. H9 wurde ähnlich wie C3 (C14) analysiert und als L-Leucanthemit erkannt. H7 entspricht C16.

Stoffwechselprodukte von meso-Inosit-2- 3 H in Hoya carnosa

Die Chromatographie der Neutralfraktion in A ergab, dass vorwiegend markierte Verbindungen entstanden, die einen geringeren R_f -Wert als meso-Inosit besaßen; eine Identifizierung dieser Produkte wurde nicht vorgenommen. Durch Rechromatographie und durch Kristallisation nach Verdünnung liess sich nachweisen, dass meso-Inosit-2- 3 H hauptsächlich in D-Glucose und Fructose übergeführt worden war, während nur geringe Aktivität in Sequoyit, D-Bornesit und D-Pinit eingebaut wurde.

Papierchromatographie

Zur Papierchromatographie wurde meist das Papier 2043 b von der Fa. Schleicher und Schuell verwendet. Wenn Cyclitgemische von über 150 mg auf 4 Bögen (je 36 cm Breite) getrennt werden sollten, wurde auf Papier Nr. 866 bzw. 827 der Fa. Macherey, Nagel & Co. chromatographiert. Es empfiehlt sich, in diesen Fällen langsam laufende Chromatographiegemische zu verwenden und für ein kontinuierliches Nachlaufen des Gemisches zu sorgen.

Die in Tabelle 5 angegebenen Chromatographiegemische haben sich bei diesen Arbeiten bewährt.

Die einzelnen Zonen wurden meist nach Durchziehen des Chromatogrammes durch acetonische Silbernitrat-Lösung und 0,5 N alkoholische Natronlauge sichtbar gemacht. Nachdem die Flecken deutlich hervorgekommen waren, wurde das Chromatogramm 2 min in konz. NH_3 gewaschen und dann 20 min. in einem Tank mit fliessendem Wasser gespült.

Testgemisch 1: (meso-Inosit, D-Inosit, D-Pinit, L-Leucanthemit).

Testgemisch 2: (meso-Inosit, D-Bornesit, L-Quebrachit, Condurit).

Dünnschichtchromatographie

Die meisten der bei der Papierchromatographie beschriebenen Lösungsmittelgemische eignen sich sehr gut auch für die Chromatographie auf Cellulosepulverschichten (MN 400). Besonders A und E wurden hier herangezogen.

Zur Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-G-Schichten (Kammersättigung) wurde das Gemisch n-Butanol-Pyridin-Wasser (10:3:1, v/v) und als Entwickler Bleitetraacetat in Toluol verwendet.

TABELLE 5. CHROMATOGRAPHISCHE DATEN

Verbindung	Lösungsmittelgemische*							
	A	B	C	D	E	F	G	H
meso-Inositol	0,39	0,54	0,24	0,33	0,30	0,32	—	0,43
Scyllit	0,36	0,40	0,26	0,31	0,29	0,27	—	0,39
D- oder L-Inositol	0,58	0,51	0,44	0,50	0,48	0,42	—	0,56
epi-Inositol	0,44	0,87	—	—	—	—	—	—
muco-Inositol	0,83	0,70	—	—	—	—	—	—
Bornesit	0,69	1,31	0,62	0,60	0,55	0,67	—	0,89
Ononit	0,77	1,31	0,76	0,68	0,66	0,71	—	1,11
Sequoiyit	0,77	1,24	0,76	0,70	0,66	0,71	—	1,06
Quebrachit	0,98	1,21	—	0,74	0,92	0,98	—	1,03
Pinit	1,06	1,18	1,36	1,09	0,98	1,02	—	1,27
Dambonit	1,30	1,82	—	1,33	1,08	—	—	—
Viburnit	0,83	1,10	0,69	0,67	0,75	0,76	—	—
Quercit	0,96	1,00	1,00	0,88	0,90	0,98	1,06	—
Glucose	1,00	—	—	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Mannit	—	—	—	0,82	1,02	—	—	—
Fructose	1,20	—	—	1,15	1,26	1,33	1,25	—
Xylit	—	—	—	—	1,39	—	—	—
Leucanthemit	1,48	1,81	—	1,46	1,67	2,52	1,75	1,09
Condurit	1,58	1,45	—	1,64	1,88	2,32	2,16	1,00
2-Desoxyribitol	—	—	—	—	2,13	—	—	—
Fucose	—	—	—	—	1,60	—	—	—
Rhamnose	—	—	—	—	2,10	—	—	—
2-Desoxyribose	—	—	—	—	2,38	—	—	—
2-Desoxyglucose	—	—	—	—	2,04	—	—	—
2-Desoxygalaktose	—	—	—	—	1,76	—	—	—

* Es werden R_{glc} -Werte (bezogen auf den Wanderungsweg der D-Glucose) bzw. R_q -Werte (bezogen auf den Wanderungsweg des D-Quercites) in den verschiedenen Lösungsmittelgemischen (A–H) angeführt.

A: Aceton–Wasser (85:15, v/v),¹² R_{glc} -Werte.

B: Phenol–Wasser (80:20, v/v),¹² R_q -Werte.

C: Benzol–Dimethylformamid–Wasser (25:10:0,25, v/v),¹³ R_q -Werte.

D: Benzol–Pyridin–Wasser (5:6:1, v/v), R_{glc} -Werte.

E: *n*-Butanol–Pyridin–Wasser (10:3:3, v/v), R_{glc} -Werte.

F: Aceton–Phenol–Pyridin–Wasser (18:12:4:1, v/v), R_{glc} -Werte.

G: Cyclohexanol–Äthanol–Wasser (8:3:1, v/v), R_{glc} -Werte.

H: Essigester–Dimethylsulfoxid–Pyridin (4:1:1, v/v), R_{glc} -Werte.

Säulenchromatographie

Für Trennungen an Cellulosesäulen mit Aceton–Wasser (85:15, v/v) folgten wir weitgehend den Angaben von Angyal und McHugh.¹⁴ In vielen Fällen wurden bei niedrigeren R_f -Werten Mischungen mit steigendem Wassergehalt zur Elution verwendet. Die Fraktionen wurden nach dem Eindampfen in wenig Wasser aufgenommen, in der Hitze mit Celite und Tierkohle behandelt und anschliessend zentrifugiert, um die durch die Verwendung von technischem Aceton auftretenden öligen Beimengungen abzutrennen. In einigen Fällen war es notwendig, die wässrige Lösung mit Benzol auszuschütteln.

¹² T. POSTERNAK, *The Cyclitols*, p. 22. Hermann, Paris (1965).

¹³ H. KINDL und O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Biochem. Z.* 339, 374 (1964).

¹⁴ S. J. ANGYAL und D. J. McHUGH, *J. Chem. Soc.* 3682 (1957).

Sublimation

Die Sublimation wurde im "liegenden Rohr"¹⁵ bei einem Vakuum von 10^{-3} Torr durchgeführt. Die Sublimationstemperatur liegt für meso-Inosit und Scyllit bei 210–240°, für die Methyläther, Cyclohexanpentole und Cyclohexentetrole bei 160–200°.

Bestimmung der Radioaktivität

Die Radioaktivität der Chromatogramme wurde entweder mit einem Endfensterzählrohr über einen automatischen Chromatogramm-“scanner” gemessen oder nach Zerschneiden in einzelne Zonen im Flüssigkeitsszintillationszähler (Toluolszintillator) bestimmt. Die Aktivität verschiedener kristallisierter Cyclite und anderer aktiver Substanzen wurde unter Berücksichtigung des "quench"-Effektes im Flüssigkeitsszintillationszähler (Bray'scher Szintillator) bestimmt.

Photosynthese in $^{14}CO_2$ und Applikation von meso-Inosit-2- 3H bzw. -u- ^{14}C

Die Photosynthese wurde gegenüber früheren Versuchen¹⁶ etwas variiert. (Abb. 1). Die mit Wasser gefüllte, zur Aufnahme der Pflanzen bestimmte Vase V sitzt mit Hilfe ihrer drei Dornen, die am Ende plangeschliffen sind, auf dem Gefäß G auf, welches $Ba^{14}CO_3$ (1–5 mC; 30 mC/mMol) und das mit 35 %iger $HClO_4$ gefüllte Becherglas B enthält.

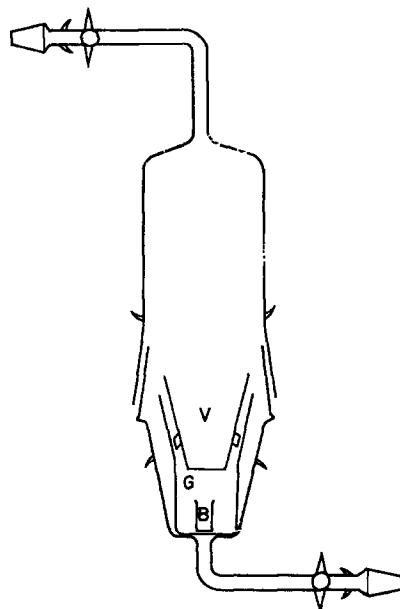


ABB. 1.

In der Neutralfraktion werden nach der Photosynthese ~20–30 Prozent der vorgegebenen Aktivität gefunden. Die Cyclitfraktion enthält bei sehr schwankenden Mengen 2–6 Prozent der eingesetzten Radioaktivität. Die Applikation von radioaktivem meso-Inosit wurde an abgeschnittenen Blättern vorgenommen, die während der Infusionsdauer (2–5 Tage) mit Leuchtstoffröhren beleuchtet wurde.

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

¹⁵ G. BILLEK und H. KINDL, *Monatsh. Chem.* **93**, 85 (1962).

¹⁶ G. BILLEK und H. KINDL, *Atompraxis* **8**, 167 (1962).