

ÜBER DIE WEITERE UMWANDLUNG VON α -PINEN IN PINUS PONDEROSA
=====

W. S c h w e e r s

Institut für Holzchemie und chemische Technologie des Holzes
der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft

205 Hamburg 80

(Received in Germany 10 July 1968; received in UK for publication 24 July 1968)

Über die Entstehung der mono- und bicyclischen Monoterpene in Kiefern sind zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden (1,2,3,4). Wenig untersucht ist bisher jedoch die Frage, ob mono- oder bicyclische Monoterpene in der Kiefer einem weiteren Stoffwechsel unterliegen oder als Stoffwechsellendprodukte zu betrachten sind. Ein Hinweis darauf, daß solche Terpene einem weiteren Stoffwechsel unterliegen, gab SHUKOV (5). Er untersuchte nach Applikation von $^{14}\text{CO}_2$ an Kiefern die Aktivität von Terpenfraktionen aus den Nadeln in Abhängigkeit von der Zeit. Aus der raschen Abnahme der zunächst in den Terpenen gefundenen Aktivität nach Beendigung der $^{14}\text{CO}_2$ Applikation schloß er auf einen weiteren Stoffwechsel der Terpene und gibt ihre mittlere biologische Lebensdauer mit ca. 10 Tagen an. Der Schluß ist jedoch nicht zwingend, da eine Weiterproduktion von Terpenen nach Beendigung der Aufnahme von $^{14}\text{CO}_2$ zu einer Aktivitätsverdünnung führt und überdies Terpene durch Verdunstung von der Kiefer abgegeben werden können, wodurch ein scheinbarer Stoffwechsel vorgetäuscht wird.

Um an einem Beispiel experimentell nachzuprüfen, ob tatsächlich eine Umwandlung von Terpenen im Rahmen des Stoffwechsels der Kiefern möglich ist, wurde auf biosynthetischem Weg radioaktiv markiertes α -Pinen hergestellt, das dann anderem Pflanzenmaterial angeboten wurde, aus dem nach einer gewissen Stoffwechselzeit andere Terpene und eine Säurefraktion isoliert und auf Aktivität untersucht wurden.

Darstellung von ^{14}C - α -Pinen

Es wurde 1 mC ^{14}C Carboxyl-Na-acetat in 10 ml Wasser gelöst und durch die Schnittflächen

von frisch geschnittenen Pflänzchen von Pinus muricata, die in Reagenzgläser eingesetzt und in einer Glaskammer untergebracht waren, aufsaugen gelassen. Das Frischgewicht des Pflanzenmaterials betrug ca. 20 g. Die Aufnahme der aktiven Lösung war nach 2 Tagen beendet.

Es wurde danach mehrmals Wasser in die Reagenzgläser nachgegeben und die Pflänzchen weitere 3 Tage unter Belichtung und Durchsaugen von Luft in der Glaskammer belassen. Die abgesaugte Luft wurde zunächst durch mehrere mit 2 n NaOH beschickte Waschflaschen und dann durch eine weitere, mit einer Bariumhydroxidlösung beschickte Flasche geleitet. Dann wurde die Luft durch 2 Flaschen mit auf 150° geheizter Chromschwefelsäure geleitet und darin das vom Pflanzenmaterial abgegebene flüchtige organische Material zu CO₂ verbrannt, das anschließend in einer mit Bariumhydroxidlösung beschickten Flasche als Bariumkarbonat gefällt wurde. Das Bariumkarbonat erwies sich als aktiv und besaß etwa 1,5 % der im Versuch eingesetzten Aktivität. Damit ist gezeigt, daß aus den Versuchspflanzen laufend flüchtiges aktives organisches Material abgegeben wird.

Nach Ablauf der 5 Tage wurde das Pflanzenmaterial zerkleinert, mit 250 ml 1n Lauge übergossen und dann 100 µl inaktives α-Pinen als Trägermaterial zugesetzt. Nun wurde unter Einschaltung eines Abscheiders für ätherische Öle 4 Stunden am Rückfluß gekocht und die ätherischen Öle mit Aether aus dem Abscheider gespült; die Lösung wurde über Natriumsulfat getrocknet und der Aether über eine Kolonne abgezogen. Aus dem Rückstand wurde α-Pinen gaschromatographisch präparativ abgetrennt (Autopräp A 700; Säule SE 30; 20 %; 20' x 3/8"; 130°; 120 ml He/min). Es besaß eine spezifische Aktivität von 92.757 I/Min/mM. Zur Reinheitsprüfung wurde es auf einem analytischen Gaschromatographen (Perkin-Elmer F 6) auf einer Säule 11 G 20 untersucht. Es erwies sich als frei von Verunreinigungen.

Zur weiteren Verwendung wurden 35 µl des aktiven α-Pinen mit 100 µl inaktivem α-Pinen verschnitten. Das α-Pinen besaß nun eine spezifische Aktivität von $\frac{92.757 \times 35}{135} = 24.048$ I/Min/mM.

Applikation von ¹⁴C-α-Pinen an Pinus ponderosa

Um zu prüfen, ob α-Pinen in Kiefern einem weiteren Stoffwechsel unterliegt, wurde das aktive Produkt an Pflanzenmaterial von P. ponderosa appliziert. P. ponderosa wurde ausgewählt, da in dieser Kiefer neben α-Pinen auch andere Terpene, nämlich hauptsächlich

β -Pinen und Δ^3 -Caren gebildet werden.

Da die Applikation eines wasserunlöslichen Materials an die Pflanze direkt schwer möglich ist, wurde das aktive α -Pinen analog der von BATTLE u. LOOMIS (6) beschriebenen Methode einem Pflanzenbrei zugesetzt. Hierzu wurden ca. 30 g Material von P. ponderosa unter Zusatz von 100 ml Wasser und 10 g Kieselgur in einem Mixer zerkleinert und dem so erhaltenen breiigen Material das α -Pinen zugegeben. Der Ansatz wurde 3 Tage unter steter Belichtung gerührt.

Isolierung von β -Pinen und Δ^3 -Caren

Es wurden dem Ansatz 100 μ l inaktives β -Pinen und 100 μ l inaktives Δ^3 -Caren zugesetzt und aus dem Ansatz die ätherischen Öle gewonnen. Aus ihnen wurde gaschromatographisch β -Pinen und Δ^3 -Caren abgetrennt. Auf der präparativen Säule OS 138, 20' x 3/8" gelang keine vollständige Trennung der Terpene voneinander. Wie eine Untersuchung des abgetrennten β -Pinen auf einer Säule 11 G 20 mit Hilfe des analytischen Gaschromatographen ergab, enthielt es noch 0,3 % α -Pinen. Im Δ^3 -Caren wurden noch 0,23 % α -Pinen und 1,25 % β -Pinen gefunden. Bei der nun folgenden Bestimmung der Aktivitäten von β -Pinen und Δ^3 -Caren waren diese Verunreinigungen zu berücksichtigen.

Die spez. Aktivität des als Verunreinigung vorhandenen α -Pinen kann maximal 24.048 I/Min/mM betragen; praktisch wird sie etwas darunter liegen, da eine Verdünnung des eingesetzten α -Pinen im Versuch durch das in der P. ponderosa vorhandene α -Pinen eintritt.

Folgende Aktivitäten wurden gemessen:

β -Pinen: 887,3 I/Min/mM (mit 0,3 % α -Pinen)

Δ^3 -Caren: 1167,2 I/Min/mM (mit 0,23 % α -Pinen und 1,25 % β -Pinen)

Unter Berücksichtigung des Gehaltes von 0,3 % α -Pinen im β -Pinen ergibt sich damit folgende Aktivität:

β -Pinen: $887,3 - \frac{24.048}{100} \cdot 0,3 = 815,2$ I/Min/mM

Für das Δ^3 -Caren ergibt sich unter Berücksichtigung von 0,23 % α -Pinen und 1,25 % β -Pinen:

Δ^3 -Caren: $1167,2 - \frac{24.048}{100} \cdot 0,23 - \frac{815,2}{100} \cdot 1,25 = 1000,8$ I/Min/mM

Weiterhin wurde auch die Aktivität der aus dem Pflanzenmaterial isolierbaren Säurefraktion untersucht. Hierzu wurde nach Abtrennung der ätherischen Öle durch Wasserdampf-

destillation der verbleibende Rückstand mit 30 mg Abietinsäure als Trägersubstanz versetzt und erschöpfend mit Aether extrahiert. Der Extrakt wurde mehrmals mit 0,5 n Natronlauge ausgezogen; die alkalischen Auszüge wiederholt mit Aether ausgeschüttelt und dann mit verd. HCl angesäuert. Dann wurde erneut mit Aether erschöpfend extrahiert, der Extrakt über Natriumsulfat getrocknet, der Aether entfernt und die verbleibende Säurefraktion auf Aktivität geprüft. In der Säurefraktion wurde eine Aktivität von 105,67 I/Min/mM CO₂ ermittelt.

Nach Applikation von aktivem α -Pinen an P. ponderosa wird als im Zuge des Stoffwechsels aktives β -Pinen, aktives Δ^3 -Caren und aktive Säure gebildet. Die Ergebnisse zeigen, daß das α -Pinen weiter umgewandelt wird und stützten damit die von SHUKOV ausgesprochene Vermutung.

Alle Aktivitätsmessungen wurden durch Verbrennung der Proben und Messen des CO₂ in der Gasphase durchgeführt.

Literaturverzeichnis

- 1 W.SANDERMANN, K.BRUNS, Naturw. 49, 258 (1962)
- 2 W.SANDERMANN, W.SCHWEERS, Tetrahedron Letters 7, 259 (1962)
- 3 W.SANDERMANN, W.SCHWEERS, Tetrahedron Letters 7, 257 (1962)
- 4 D.V.BANTHORPE, K.W.TURNBULL, Chem.Comm. 6, 177 (1966)
- 5 G.V.SHUKOV, Radioisotopes in Scientific Res. Vol. IV, S.535, Pergamon Press, 1958
- 6 J.BATTAILE, W.D.LOOMIS, Biochim.biophys.Acta 51, 545 (1961)