

281. H. v. Euler und Edvard Brunius: Zur Kenntnis der Nucleosidasen (I).

[Aus d. Allgem. Chem. Laborat. d. Universität Stockholm.]

(Eingegangen am 8. Juni 1927.)

Die Gruppe der von P. A. Levene und Medigreceanu¹⁾ 1911 entdeckten und dann von Levene, M. Yamagawa und I. Weber²⁾ weiter beschriebenen Nucleosidasen wurde in den Kreis unserer Untersuchung gezogen, da sich durch die Arbeiten von Euler und Myrbäck³⁾ Beziehungen der Co-Zymase zu den Nucleosiden ergeben hatten. Die Bereitung gereinigter und hinsichtlich der Aktivität definierter Nucleosidase-Lösungen zum Studium der Co-Zymase war also der ursprüngliche Zweck unserer Untersuchung. Nachdem sich ergeben hatte, daß gereinigte Co-Zymase-Präparate tatsächlich durch eine Nucleosidase spezifisch angegriffen werden (die Mitteilung dieser Versuche erfolgt an einer anderen Stelle), streben wir an, die Teilnahme der Nucleoside und der Nucleosidasen an Bildung und Spaltung der Co-Zymase aufzuklären.

Bezüglich der Methodik, der Herstellung des Ausgangsmaterials, der kinetischen Einzelheiten, sowie historischer Daten, verweisen wir auf unsere ausführlichere Darstellung, und beschränken uns hier auf die Angabe der wesentlichen Ergebnisse bezüglich der Reinigung einer auf Adenosin wirkenden Nieren-Nucleosidase und bezüglich einiger spezifischer Hemmungen dieses Enzyms.

Beschreibung der Versuche.

A. Reinigung und Charakterisierung einer Nieren-Nucleosidase.

Als Substrat wurde Adenosin angewandt, das nach den Vorschriften von Levene und Jacobs⁴⁾ aus Hefe-Nucleinsäure dargestellt worden war. Wir charakterisierten unsere Nucleosidase, die nach Levene, Yamagawa und Weber aus Schweine-Nieren bereitet wurde, durch die Geschwindigkeit der Adenosin-Spaltung (siehe unten).

Die Methodik zur Messung der Adenosin-Spaltung gründete sich auf die Bestimmung der durch die Spaltung zunehmenden Konzentration der freien Ribose, welche nach der Mikro-methode von Shaffer-Hartmann⁵⁾ ermittelt wurde.

Unsere Reaktionsmischungen hatten die Zusammensetzung: 50 mg Adenosin + 5 ccm $\frac{1}{15}$ -mol. PO_4 -Mischung + x ccm Enzym-Lösung + (20-x) ccm Wasser. In den meisten Fällen war x = 5.

Aus den von Zeit zu Zeit der Reaktionsmischung entnommenen Proben wurden Eiweißstoffe, Purinbasen usw. durch Quecksilberacetat ausgefällt, wodurch zugleich die Enzymreaktion unterbrochen wurde. Bevor die Ribose bestimmt wird, fällt man das Quecksilber mit Schwefelwasserstoff aus, vertreibt diesen mit Luft und neutralisiert⁶⁾ die freie Essigsäure.

¹⁾ Journ. biol. Chem. **9**, 65 [1911]. ²⁾ Journ. biol. Chem. **60**, 693 [1924].

³⁾ Svensk. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, **9**, Nr. 37 [1927].

⁴⁾ B. **42**, 2703 [1909]. ⁵⁾ Journ. biol. Chem. **45**, 378 [1920/21].

⁶⁾ Dabei wurden die erhaltenen Cu-Werte als Glucose berechnet, da für Ribose noch keine Reduktions-Tabelle vorliegt. In unserer ausführlicheren Mitteilung (Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, **9**, Nr. 40 [1927]) sind die direkt erhaltenen Cu-Werte angegeben, so daß später evtl. eine Korrektur angebracht werden kann.

Zur Kinetik: Sämtliche kinetischen Versuche sind bei 30° ausgeführt. Nach den Untersuchungen von Levene und Mitarbeitern verläuft die Nucleosid-Spaltung monomolekular, und wir können dieses Ergebnis wenigstens für das erste Viertel der Reaktion bestätigen, die Spaltungs-Geschwindigkeit läßt sich also durch eine Konstante 1. Ordnung gut darstellen.

Berechnung der Aktivität bzw. des Reinheitsgrades.

Da nach Levenes zuverlässigen Angaben die Reaktions-Konstante der Nucleosid-Spaltung in Adenosin-Konzentrationen unter 0.5% unabhängig von der Adenosin-Konzentration ist, so kann die Aktivität, entsprechend dem allgemeinen Prinzip für enzymatische Aktivitäts-Bestimmungen, durch die Formel⁷⁾ festgelegt werden:

$$Ns.f = k/g \text{ Enzym-Präparat,}$$

wo Ns.f (an Stelle des allgemeinen Ausdrucks X.f) die Aktivität der Nucleosidase bezeichnet. Damit ist zunächst die hier untersuchte Nieren-Nucleosidase charakterisiert, welche nach Levene außer Adenosin auch andere Nucleoside, und zwar beim gleichen Aciditätsgrad, spaltet⁸⁾; sollte sich später eine Spezifität der Nucleosidasen ergeben, so ist diese an der Bezeichnung Ns durch einen Index zum Ausdruck zu bringen. In obiger Formel bezeichnet „g Enzym-Präparat“ die Menge Enzym (Trockengewicht der Enzym-Lösung), welche in 1 ccm der Reaktionsmischung vorhanden war.

Ausgangsmaterial.

Wir können die Angaben von Levene, welcher Schweine-Nieren als Ausgangsmaterial empfiehlt, bestätigen; sie sind nach unseren Erfahrungen den Rinder-Nieren vorzuziehen. Vom feingemahlenen Organ wurden 2 kg mit 3.5 l Wasser versetzt und nach Zusatz von Toluol 24 Stdn. bei 40° autolytisiert; hierauf wurde durch ein Sieb getrieben. Nach weiterer 1-tägiger Autolyse hatten sich große Eiweißmengen ausgeflockt, so daß durch Zentrifugieren eine ziemlich klare Enzym-Lösung erhalten wurde.

Stcn.	mg Cu	mg Ribose	k × 10 ⁴	Trockengew. in 2 ccm
2	0.423	0.242	3.6	0.0645 g
4	0.930	0.484	3.8	
6	1.360	0.688	3.8	

$$\text{Somit } Ns.f = 3.8 \times 10^4 / 0.00645 = 0.059.$$

Levene fand eine Erhöhung der Ausbeute bei Extraktion mit verd. Phosphat-Lösung (Optimum p_H = 7.0). Bei denjenigen Versuchen, bei denen statt in Wasser mit ²/₁₅-mol. Phosphat von p_H = 7 extrahiert wurde, erhielten wir keine bessere Aktivität als bei Extraktion mit Wasser; es ergab sich nämlich unter den gleichen Umständen wie oben k × 10⁴ = 3.6 × 10⁻⁴, also Ns.f = 0.055.

⁷⁾ Euler und Josephson, B. 56, 1749, und zwar S. 1753 [1923].

⁸⁾ siehe Levene und Ione Weber, Journ. biol. Chem. 60, 717 [1924].

Reinigung durch Dialyse.

Ausgangsmaterial war eine Enzym-Lösung von $Ns.f = 0.059$. Während 4 Tagen wurden 75 ccm gegen 2 l Wasser dialysiert.

Std.n.	mg Cu	mg Ribose	$k \times 10^4$	Trockengew. in 2 ccm
2	0.230	0.150	2.2	0.0240 g
4	0.555	0.304	2.2	
6	0.870	0.458	2.3	

Somit wird $Ns.f = 0.092$.

Steigerung von $Ns.f$ durch Dialyse: 1:1.5.

Isoelektrische Fällung, kombiniert mit Dialyse.

Eine wesentliche Verbesserung des Reinheitsgrades wurde durch folgendes Verfahren erreicht: Ausgangslösung von $Ns.f = 0.06$ wird mit Essigsäure versetzt bis zur Konzentration 0.05-n.; die dabei reichlich ausgeflockten Eiweißmengen werden abzentrifugiert, die klare Lösung wird mit Alkali neutralisiert, wobei weiteres Eiweiß ausfällt. Nach erneutem Zentrifugieren wird 3 Tage gegen 3 l Wasser dialysiert.

Std.n.	mg Cu	mg Ribose	$k \times 10^4$	Trockengew. in 2 ccm
2	0.203	0.137	2.0	0.0140 g
4	0.557	0.305	2.2	
6	0.838	0.440	2.2	

Somit wird $Ns.f = 0.15$.

Steigerung von $Ns.f$ durch isoelektrische Fällung und Dialyse: 1:2.5.

Adsorptionsversuche mit Kaolin und Tonerde.

Mit der von Levene vorgeschlagenen Methode, die Nucleosidase an Kaolin zu adsorbieren, haben wir keine Erfolge gehabt, und zwar weder bei Versuchen mit den Ausgangslösungen des Enzyms, noch mit Enzym-Lösungen, welche bis auf $Ns.f = 0.3$ durch Aceton-Fällung vorgereinigt waren.

Mit Tonerde, und zwar mit einem Präparat, welches dem Präparat B nach Willstätter und Kraut entspricht (0.26 g Al_2O_3 in 10 ccm Emulsion), wurde dagegen gute Adsorption erzielt. Versuche mit wechselnder Acidität ergaben die höchste Adsorptions-Ausbeute in schwach saurem Medium, bei etwa $p_H = 5-6$.

Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, daß zu 30 ccm Enzym-Lösung ($Ns.f = 0.06$) 15 ccm Tonerdehydrat-Suspension und so viel Essigsäure zugesetzt wurde, daß sich die gewünschte Acidität einstellte. Die Mischung wurde zentrifugiert und das Sorbat 2-mal mit Wasser gewaschen. Das Sorbat wurde hierauf in Wasser bis zum Volumen 45 ccm aufgeschlämmt und die Aktivität in dieser Suspension direkt bestimmt. Dabei wurden 5 ccm Suspension verwendet; Totalvolumen der Reaktionsmischung 25 ccm.

pH	Mittelwert der Reaktionskonstante $k \times 10^4$	Ausbeute in %
4.40	0.85	38
4.91	1.5	65
6.00	1.7	73
7.17	1.1	50

Während also die Adsorption beim Aciditäts-Optimum auf etwa 75 % geschätzt werden kann, bietet die Elution des Enzyms aus der Tonerde große Schwierigkeiten, und mit keinem der untersuchten Elutionsmittel — Phosphat zwischen $p_H = 6$ und 9, ferner NaOH, Ammoniak — konnte eine bessere Elution erzielt werden als 10 %.

Fällung mit Alkohol und kolloidem Eisenhydroxyd.

Auf Grund der guten Erfolge, mit denen Levene Alkohol und kolloides Eisenhydroxyd zur Reinigung von Nucleosidase-Lösungen verwendet hat, haben wir ebenfalls in einer Reihe von Versuchen mit diesen Stoffen Fällungen vorgenommen, und zwar mit variierenden Mengen von Eisenlösungen (Mercks Ferrum oxydatum dialysatum; 0.1155 g Fe_2O_3 per ccm), da Levene keine diesbezüglichen Angaben gemacht hat.

Fe-Lsg. ccm	Std.	Cu mg	Ribose mg	$k \times 10^4$
7	2	0.231	0.150	2.2
	4	0.576	0.317	2.4
	6	0.889	0.463	2.4
5	2	0.223	0.146	2.2
	4	0.553	0.302	2.3
	6	0.872	0.458	2.4
2.5	3	0.130	0.090	0.85
	6	0.298	0.183	0.90
	9	0.495	0.276	0.92
1	15	0	—	—

Zu jedem Versuch wurden 50 ccm Enzym-Lösung $Ns.f = 0.059$ angewandt, dazu 10 ccm 95-proz. Alkohol zugesetzt und folgende Mengen der Eisenhydrat-Lösung: 7, 5, 2.5 und 1 ccm. Die dadurch entstehenden Fällungen wurden abzentrifugiert und bis zu einem Volum von 50 ccm suspendiert; Prüfung der Aktivität direkt an der Suspension.

Die letzte Spalte der Tabelle zeigt, daß durch Zusatz von 1 ccm Eisen-Lösung noch kein Enzym aus der Lösung gefällt wird; auch bei Zusatz von 2 ccm fällt noch sehr wenig, dagegen wurden recht erhebliche Mengen inaktiver Stoffe gefällt. Demgemäß versetzten wir 50 ccm Enzym-Lösung mit 10 ccm Alkohol und 2 ccm kolloider Eisen-Lösung. Nach dem Zentrifugieren wurde die Restlösung mit weiteren 5 ccm Alkohol und 4 ccm kolloidem Eisen versetzt. Diese zweite Fällung, welche die gesamte Aktivität der Lösung enthielt, wurde abzentrifugiert und mit 1-proz. Na_2HPO_4 -Lösung $\frac{1}{2}$ Stde. eluiert. Nach Filtration durch einen Büchner-Trichter zeigte es sich, daß das Enzym nicht eluiert worden war; weder sek. Phosphat, noch Alkali bei $p_H = 9$ ergab bessere Resultate.

Fällungen mit Aceton.

Nachdem in einer Reihe von Versuchen gefunden worden war, daß sich Alkohol für den vorliegenden Zweck als Fällungsmittel nicht eignete, gingen wir zu Fällungsversuchen mit Aceton über.

Versuch 1: 30 ccm Enzym-Lösung (Nierensaft) $Ns.f = 0.06$, mit 30 ccm Aceton versetzt: Reichliche Fällung, die sich nach Abzentrifugieren kolloidal in Wasser löste.

$k \times 10^4 = 3.5$. Trockengewicht in 2 ccm: 0.0228 g.

Somit $Ns.f = 0.15$. Aktivitäts-Steigerung 2.5.

Versuch 2: Fraktionierte Aceton-Fällung: Wird Nierensaft mit steigenden Mengen Aceton versetzt, so tritt bei 25 % Aceton eine schwache Fällung auf; bei 40 % Aceton wird diese sehr bedeutend. Nach unseren vorhergehenden Versuchen wird die Nucleosidase bei einer Aceton-Konzentration von 50 % vollständig gefällt; wir haben nun quantitative Versuche mit 40 % Aceton angestellt.

60 ccm Enzymlösung von $Ns.f = 0.06$ wurden mit 40 ccm Aceton versetzt; die Fällungen wurden abzentrifugiert und in Wasser zu 60 ccm Volumen gelöst.

$k \times 10^4 = 0.7$. Trockengewicht in 2 ccm: 0.0140 g.

Somit ist nur ein ganz kleiner Anteil des Enzyms gefällt worden. Der Restlösung der erwähnten Fällung wurden nun weitere 20 ccm Aceton zugesetzt. Gesamt-Konzentration des Acetons bei dieser Fällung somit 50 %. Die jetzt erhaltene Fällung löste sich leicht in Wasser.

$k \times 10^4 = 2.9$. Trockengewicht in 2 ccm: 0.0086 g.

$Ns.f = 0.34$. Steigerung der Aktivität 5.5.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Aceton-Fällung:

Ausgangspräparat	E_1
„ „, gefällt mit 40 % Aceton	E_2
Restlösung, gefällt mit 50 % Aceton	E_3
Das Ausgangspräparat, direkt gefällt mit 50 % Aceton	E_4

Präparat	Aktivität	Trockengew. pro ccm	$Ns.f$	Steigerung von $Ns.f$
E_1	3.5	0.7292	0.06	—
E_2	0.7	0.0070	—	—
E_3	2.9	0.0043	0.34	5.6
E_4	3.5	0.0114	0.15	2.5

Die Tabelle zeigt, daß bei 40 % Aceton 24 % des Trockengewichts der Ausgangslösung gefällt werden. Die Fällung enthält 20 % der Aktivität. Bei weiterem Zusatz von Aceton auf 50 % werden 15 % des Trockengewichts der Ausgangslösung gefällt. Diese Fällung enthält 83 % der Aktivität. Setzt man von Anfang an bis 50 % Aceton hinzu, so werden 39 % des Trockengewichts der Ausgangslösung gefällt, und diese Fällung enthält die gesamte Aktivität.

Versuche, eine Enzym-Lösung von $Ns.f = 0.34$ noch weiter zu fraktionieren, sind mißlungen. Bei Zusatz von Aceton zu dieser wurde keine zentrifugierbare Fällung erhalten. Dieselbe verteilt sich kolloidal in der Lösung.

Adsorption aceton-gereinigter Präparate an Kaolin und Aluminiumhydrat.

Es wurde versucht, bei der mit Aceton gereinigten Enzym-Lösung die Adsorptions-Methoden zu verwenden.

50 ccm Enzym-Lösung von $Ns.f = 0.3$ wurden mit 10 ccm Kaolin-Suspension (25-proz.) versetzt. Die Adsorptionsversuche wurden ausgeführt, teils bei $p_H = 5$, bei $p_H = 7$ und bei $p_1 = 8.5$. Sowohl das Sorbat als auch die Restlösung wurden auf ihre Aktivität geprüft. Das Resultat war daselbe wie vorher: Bei keiner der untersuchten Aciditäten wurde das Enzym adsorbiert; die ganze Aktivität war in der Restlösung zurückgeblieben.

Isoelektrische Ausfällung von aceton-gereinigten Präparaten.

Ausgangsmaterial: Fraktionierter, aceton-gefällter Nierensaft von $Ns.f = 0.3$. Die zweite Fraktion war in halb soviel Wasser gelöst wie vorher. Die Aktivität des Präparats war $k = 6.0 \times 10^{-4}$. Zu 50 ccm dieser Enzym-Lösung wurde 1 ccm *n*. Essigsäure gesetzt. Es wurde eine Fällung erhalten,

die abzentrifugiert wurde. Es zeigte sich, daß diese Fällung vollständig inaktiv war. Die Restlösung wurde mit Natronlauge neutralisiert, wobei weitere Fällung erhalten wurde. Auch diese war inaktiv.

Die Restlösung der beiden Fällungen wurde mit dem doppelten Volumen Aceton versetzt. Die erhaltene Fällung wurde bis 50 ccm Volumen gelöst.

Stdn.	mg Cu	mg Ribose	$k \times 10^4$	Trockengew. in 2 ccm
2	0.631	0.343	5.2	0.00989 g
4	1.33	0.675	5.5	
6	1.87	0.930	5.5	

Ns.f = 0.56.

Steigerung der Aktivität: 9.4.

Durch das zuletzt beschriebene Verfahren, nämlich Kombination der Aceton-Fällung und isoelektrischer Fällung, wurde also der Reinheitsgrad der Nieren-Nucleosidase auf rund das 10-fache erhöht. Bei der Fortsetzung unserer Arbeit gingen wir dementsprechend von diesem Verfahren aus.

B. Hemmung der enzymatischen Nucleosid-Spaltung durch Nucleinsäure, Harnsäure und Arabinose.

Mit den nunmehr erreichten Reinheitsgraden der Nieren-Nucleosidase, deren Erhöhung allerdings noch sehr erwünscht ist, können immerhin schon Versuche über Affinität dieses Enzyms zu seinem Substrat und über seine Spezifität unternommen werden. Für Affinitäts-Messungen kommen zunächst Versuche in Betracht, wie sie zuerst von Michaelis und Menten⁹⁾ an Saccharase angestellt worden sind, und wie sie dann sowohl von der Münchener Schule als im hiesigen Laboratorium ausgeführt und zum Teil modifiziert worden sind. Wir haben uns, wie bei anderen Enzymen, zur Orientierung über Spezifitäts-Fragen, zunächst den Hemmungs-Erscheinungen zugewandt, und führen im Folgenden einige Ergebnisse an.

1. Hemmung durch Nucleinsäure.

Die Versuchsreihe wurde mit einem aceton-gefällten Präparat von Ns.f = 0.26 ausgeführt. Die Nucleinsäure-Lösung enthielt 1 g Na-Salz von Acid. nucleicum Boehringer in 100 ccm Lösung.

Sämtliche Versuche wurden bei pH = 7.5 ausgeführt. In den im Folgenden angegebenen Mischungen ist:

die Adenosin-Konzentration 0.2-proz. = 0.0068-mol.

„ Nucleinsäure- „ 0.6-proz. = ca. 0.006-mol.

5 ccm Phosphat-Mischung + 5 ccm Enzym-Lösung	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ccm	Differenz	mg Cu	mg Ribose
50 mg Adenosin + 15 ccm Wasser ..	15.87	2.98	0.871	0.457
15 ccm Wasser	18.85			
50 mg Adenosin + 15 ccm Nuclein- säure-Lösung	17.00	1.50	0.438	0.250
+ 15 ccm Nucleinsäure-Lösung	18.50			

⁹⁾ Michaelis und Menten, Biochem. Ztschr. **49**, 333 [1913]. — Vergl. Euler, Chemie der Enzyme, 3. Aufl., I. Tl. [1925]; s. a. Euler und Josephson, Ztschr. physiol. Chem. **161**, 270 [1926]; B. **60**, 1341 [1927].

Aus obigen Zahlen ergibt sich eine Hemmung der Nucleosidase-Wirkung durch Nucleinsäure im Betrag von 46%.

2. Hemmung durch Harnsäure.

Die gleiche Enzym-Lösung wie im vorhergehenden Versuch. Harnsäure-Lösung: 0.25 g Lithiumcarbonat + 0.5 g Harnsäure wurden mit Wasser zum Volumen 100 ccm gelöst; die Lösung wurde bis zur Acidität $pH = 7.5$ neutralisiert. Parallelversuch mit der gleichen Menge Lithiumcarbonat bei gleicher Acidität. Versuchsdauer stets 180 Min.

5 ccm Phosphat-Mischung + 5 ccm Enzym-Lösung	$Na_2S_2O_3$ ccm	Differenz	mg Cu	mg Ribose
50 mg Adenosin + 15 ccm Li_2CO_3 -Lsg.	15.85	2.94	0.858	0.450
15 ccm Li_2CO_3 -Lösung	18.79			
50 mg Adenosin + 15 ccm Harnsäure- Lösung	16.62	2.23	0.650	0.350
15 ccm Harnsäure-Lösung	18.85			

Die Hemmung durch Harnsäure betrug 22%.

3. Einfluß von Arabinose.

Arabinose-Lösung: 0.2 g in 100 ccm, Reaktionsmischungen:

- 5 ccm Phosphat-Mischg. + 5 ccm Enzym-Lösg. + 50 mg Adenosin + 15 ccm Wasser
- 5 ccm „ + 5 ccm „ + 15 ccm Wasser
- 5 ccm „ + 5 ccm „ + 50 mg Adenosin + 10 ccm Arabinose-Lösg. + 5 ccm Wasser
- 5 ccm „ + 5 ccm „ + 10 ccm Arabinose-Lösg. + 5 ccm Wasser

Somit in den Reaktionsmischungen: Adenosin-Konzentrat. 0.0068-mol., Arabinose-Konzentrat. 0.0054-mol.

Reakt.- Mischg.	Vers.- Dauer Stdn.	$Na_2S_2O_3$ ccm	Differenz	mg Cu	mg Ribose	Reakt.- Konstant. $k \times 10^4$
1	2	18.45	0.55	0.17	0.11	3.4
2		19.00				
3		12.25	0.60	0.19	0.13	3.8
4		12.85				
1	4	17.64	1.36	0.429	0.244	3.9
2		19.00				
3		11.54	1.26	0.398	0.230	3.6
4		12.80				
1	6	16.86	2.09	0.658	0.353	3.9
2		18.95				
3		10.70	2.13	0.672	0.361	4.0
4		12.83				

Die Werte der Reaktionskonstanten in der letzten Spalte zeigen, daß durch die zugesetzte Arabinose eine Hemmung der Adenosin-Spaltung nicht eingetreten ist. Arabinose verdrängt also das Adenosin nicht aus seiner Bindung an das untersuchte Enzym. Auch hieraus geht also hervor, daß an der Affinität der Nieren-Nucleosidase zum Adenosin die Konfiguration des Pentose-Restes einen wesentlichen Einfluß ausübt.

Die Versuchsreihen 1 und 2 mit Hefen-Nucleinsäure Boehringer und mit Harnsäure ergaben eine deutliche Hemmung, und zwar ist, besonders in Rücksicht auf die kleinen Konzentrationen der zugesetzten Stoffe, an der Spezifität dieser Hemmung kaum zu zweifeln. Auch diese Hemmungsversuche deuten also darauf hin, daß für die spezifische Bindung des Adenosins an die untersuchte Nucleosidase die NH_2 -Gruppe des Adenosins bzw. die freie CH_2OH -Gruppe der Ribose nicht unbedingt erforderlich sind.

282. F. W. Semmler und H. von Schiller:

Beiträge zur Kenntnis des ätherischen Öles aus den Kienstubben und Wurzeln von *Pinus silvestris* (Kiefernswurzelöl) und sein Vergleich mit Stamm- und Nadelölen dieser *Pinus*-Art.

(Eingegangen am 8. Juni 1927.)

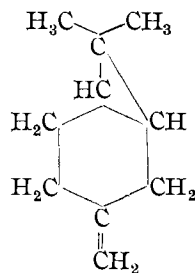
In letzterer Zeit war öfters die Vermutung aufgetaucht, daß das von Atterberg¹⁾ im deutschen und schwedischen Kiefernadelöl, Kienöl und im finnländischen Terpentinöl entdeckte und von Wallach näher untersuchte Silvestren gar nicht in der Natur und in den ursprünglichen Rohölen vorkommt, sondern erst bei der Isolierung desselben über das Dihydrochlorid oder durch Invertierung während der Herstellung gebildet wird.

So teilen Simonsen und Rao²⁾ in einer kurzen Abhandlung mit, daß das von ihnen untersuchte schwedische Fichtennadelöl von *Pinus silvestris* kein Silvestren, wie früher angenommen, enthält, sondern daß ursprünglich in dem Öl *d*- Δ^3 -Caren vorhanden sei, aus welchem durch die zur Isolierung des Silvestrens eingeleitete Salzsäure letzteres erst entstehe. Auch Schimmel & Co. hatten schon die Beobachtung gemacht, daß im Kiefernadelöl Caren enthalten ist.

Wenn man bedenkt, daß in sämtlichen ätherischen Ölen außer Silvestren kein Terpen vom *m*-Cymol-Typus enthalten ist, und wenn man ferner die bei der Gewinnung der Kienöle nötigen hohen Temperaturen und die dadurch mögliche Invertierung berücksichtigt, so scheint der Gedanke, daß Silvestren gar nicht in der Natur vorkommt, sondern, sei es bei der Herstellung der Öle, sei es durch die Isolierungsmethode, erst gebildet wird, sehr einleuchtend.

Als ursprüngliches Terpen kommt nur *d*- Δ^3 -Caren (I)³⁾, *d*- Δ^4 -Caren (II) oder das *ps*-Caren von nebenstehender Formel in Betracht. Alle drei liefern mit Salzsäure leicht ein Gemisch von Silvestren- und Dipenten-Dihydrochlorid⁴⁾. Also muß in den ursprünglichen Rohölen eines der drei Carene oder vielleicht ein Gemisch von allen dreien enthalten sein.

Caren ist ein bisher noch wenig erforschtes Terpen. Simonsen und Rao haben die *d*- Δ^3 -Verbindung als Bestandteil des indischen Terpentins von *Pinus longifolia*⁵⁾ und die *d*- Δ^4 -Verbindung im ätherischen Öl von *Andropogon Iwarankusa*⁶⁾ nachgewiesen und l. c. auch versucht, die Konstitution der beiden isomeren Terpene aufzuklären.



¹⁾ B. 10, 1202 [1877].

²⁾ Journ. chem. Soc. London 127, 2494 [1925].

³⁾ vergl. die Formeltabelle auf S. 1594/95.

⁴⁾ Journ. chem. Soc. London 121, 2294.

⁵⁾ Journ. chem. Soc. London 123, 549—560.

⁶⁾ Journ. chem. Soc. London 121, 2294.