

27. Karl Freudenberg und Friedrich Bittner: Versuche mit Coniferylalkohol, der radioaktiven Kohlenstoff enthält

[Aus dem Chemischen Institut der Universität und dem Forschungsinstitut für die Chemie des Holzes und der Polysaccharide Heidelberg]

(Eingegangen am 6. August 1952)

Coniferylalkohol, der am primären Carbinol radioaktiven Kohlenstoff enthält, wurde in das Dehydrierungs-polymerisat (DHP) und in Coniferin verwandelt. Der aus dem DHP abgespaltene Formaldehyd ist radioaktiv und entstammt daher primärem Carbinol, wie solches im Oxymethylcumarin-System des in das DHP eingebauten Dehydro-diconiferylalkohols (I) vorkommt. Durch den üblichen Abbau mit Alkali aus DHP gewonnene Isohemipinsäure (II) ist inaktiv. Sie dürfte zur Hauptsache demselben Cumarin-System entstammen; die Metahemipinsäure (III), die nach Säurebehandlung des DHP als Sekundärprodukt entsteht, besteht zu einem Drittel aus aktiver Säure.

Es bereitet keine Schwierigkeiten, von Cyanid mit radioaktivem Kohlenstoff ausgehend Cyanessigsäure und aus dieser Cyanferulasäure zu gewinnen. Daraus werden Ferulasäurenitril, Ferulasäure und Acetylferulasäureester erhalten. Die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid ergibt einen Coniferylalkohol, der am primären Carbinol radioaktiven Kohlenstoff enthält und mit Acetobromglucose in radioaktives Coniferin umgesetzt werden kann. Der radioaktive Coniferylalkohol wurde mit Pilzredoxase in ein Dehydrierungs-polymerisat (DHP) verwandelt. Vor kurzem ließ sich feststellen¹⁾, daß die Wirkung der Holzredoxasen auf Coniferylalkohol die gleiche ist und daß keine Bedenken mehr bestehen, das mit Redoxasen gebildete Dehydrierungs-polymerisat dem frisch gebildeten Lignin des Holzes gleichzusetzen. Die für das Lignin charakteristischen, in geringer Menge entstehenden Abbauprodukte Formaldehyd, Isohemipinsäure und Metahemipinsäure werden auch von DHP, und zwar in derselben Menge gebildet. Es war von Interesse, diese Reaktion am radioaktiven DHP durchzuführen.

Formaldehyd²⁾ wird in einer Ausbeute von rund 2% aus Lignin oder DHP durch Destillation mit Schwefelsäure gewonnen. Es wird als Formaldimedon abgefangen. Aus aktivem DHP bereiteter Formaldehyd enthält dieselbe Radioaktivität wie die primäre Carbinolgruppe des ursprünglich angewendeten Coniferylalkohols. Der Formaldehyd entstammt also primärem Carbinol des DHP. Inzwischen wurde gezeigt³⁾, daß in das DHP und das Lignin zu einem erheblichen Teil die Komponente des Dehydro-diconiferylalkohols (I) eingebaut ist, und daß dieser gleichfalls Formaldehyd liefert. Die Aussage, daß der Formaldehyd dem primären Carbinol des ursprünglichen Coniferylalkohols entstammt, läßt sich also dahin spezifizieren, daß ein Teil des Formaldehyds von der Dehydro-diconiferylalkohol-Komponente des DHP bzw. des Lignins abgegeben wird.

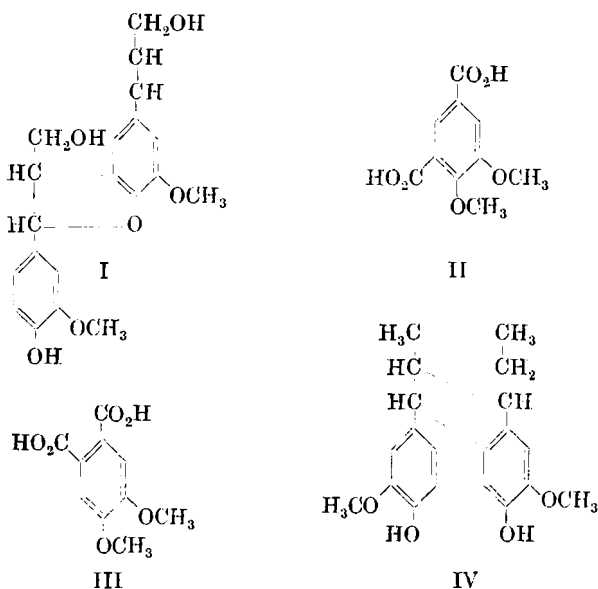
¹⁾ K. Freudenberg, H. Reznik, H. Boesenberg u. D. Rasenack, Chem. Ber. **85**, 641 [1952].

²⁾ K. Freudenberg u. G. Wilke, Chem. Ber. **85**, 78 [1952]; hier auch ältere Literatur.

³⁾ K. Freudenberg u. H. H. Hübner, Chem. Ber. **85**, 1181 [1952].

Isohemipinsäure (II) wird gefunden, wenn man Lignin oder DHP methyliert, mit starkem Kaliumhydroxyd verkoocht, wieder methyliert und mit Permanganat oxydiert. Die Ausbeute beträgt nur einige Prozente. Der Versuch am aktiven DHP ergibt, daß mehr als 85 % der Isohemipinsäure inaktiv sind. An ihrer Bildung ist also das ursprüngliche primäre Carbinol des Coniferylalkohols nicht oder nur unwesentlich beteiligt. Damit ist der Verdacht beseitigt, daß die Isohemipinsäure das Produkt einer sekundären Reaktion sein könnte, an der die formaldehydliefernde Gruppe des Lignins beteiligt wäre. Der Befund stützt die Auffassung, daß die Isohemipinsäure nicht einer Chroman-, sondern der Cumaran-Anordnung des Lignins entstammt. Nachdem der Dehydro-diconiferylalkohol als Komponente des DHP und des Lignins erkannt ist, darf die Isohemipinsäure aus dieser Gruppierung heraus erklärt werden. Ein Chromanring kann, wenn überhaupt, nur in untergeordnetem Maße vorhanden sein.

Wenn Lignin oder DHP, wie soeben bei der Isolierung der Isohemipinsäure geschildert, nicht mit Säuren vorbehandelt ist, entsteht neben Isohemipinsäure keines ihrer Isomeren. Wenn dagegen Lignin, oder, wie wir jetzt mitteilen können, DHP mit Säure kondensiert, methyliert und oxydiert wird, entsteht nicht oder nur in minimaler Menge Isohemipinsäure. Dies ist so zu verstehen, daß die Cumaran-Systeme bei diesen Reaktionen nicht aufgebrochen



werden. Dagegen entsteht aus säurebehandeltem Lignin und DHP nach der Methylierung und Oxydation in geringer Menge Metahemipinsäure (III)⁴. Diese Säure muß einem Sekundärprodukt entstammen, das durch die Säure gebildet wird, andernfalls müßte sie aus dem nicht mit Säure behandeltem Lignin in der gleichen Menge entstehen. Die aus dem radioaktiven DHP gewon-

⁴) H. Richtzenhain, Acta chem. scand. 4, 206, 589 [1950].

nene Metahempinsäure ist radioaktiv. Demnach ist das primäre Carbinol des ursprünglichen Coniferylalkohols an ihrer Bildung beteiligt. Entweder ist ein Teil des entstehenden Formaldehyds in die Guajacyl-Systeme des DHP inkondensiert worden oder die Seitenkette des Phenylpropan-Systems hat sich in einen Guajacyl-Kern kondensiert. Die aus dem radioaktiven DHP gewonnene Metahempinsäure besitzt jedoch nur ein Drittel der Radioaktivität, die nach einem solchen Reaktionsschema zu erwarten wäre. Deshalb muß noch eine zweite Sekundär-Reaktion Anlaß zur Bildung der Metahempinsäure geben. Wenn man sich daran erinnert, daß das Isoeugenol durch Säuren zum Di-iseugenol (IV) kondensiert wird, so braucht man nur diese Reaktion auf das Coniferylalkohol-System des Lignins zu übertragen, um daraus das Auftreten des inaktiven Teiles der Metahempinsäure zu erklären.

Radioaktives Coniferin wurde einem 4 Jahre alten Fichtenbäumchen in der Mitte des zweiten Jahrestriebes unter die Rinde gelegt. Dies geschah so, daß Mitte Mai ein senkrechter Schnitt gemacht, die Rinde ein wenig abgehoben, einige mg aktives Coniferin eingelegt und die Stelle mit Baumwachs verklebt und verbunden wurde. Sie heilte sehr rasch zu. Zwei Monate später zeigte sich, daß sich die radioaktive Substanz einige cm aufwärts und abwärts des Depots verteilt hatte und daß das Glucosid nicht mehr vorhanden war. Aktives Material war in der Rinde ($\frac{1}{3}$) wie im Holz ($\frac{2}{3}$) enthalten. Im Holz war nur eine wenige Zellen breite Zone mit Aktivität beladen. Dieser Aktivitätsring war auf der Seite des Einschnitts stärker als auf der abgewandten Seite. Aus der Schmalheit des Rings ergibt sich, daß das aktive Material innerhalb von 14 Tagen in die Wände der in Verholzung begriffenen Zellen eingelagert wurde. Es waren nieder- und höhermolekulare Umwandlungsprodukte des radioaktiven Coniferylalkohols entstanden. Über 90% der aktiven Substanz hatte die gleichen Löslichkeitseigenschaften wie Lignin und blieben bei der Aufarbeitung des Holzes in der Ligninfraktion.

Zur Bestreitung der Kosten der Arbeit haben Mittel des Marshallplanes beigetragen.

Beschreibung der Versuche

Cyan-ferulasäure⁵⁾: 22 mg radioaktives Kaliumcyanid, $K^{14}CN$, die 1 mC enthielten und mit 36 mg Kaliumhydroxyd vermischt waren, wurden in 0.3 ccm Wasser gelöst und mittels fester Kohlenensäure eingefroren. Nach Zugabe von 58 mg Chloroessigsäure wurde 3 Stdn. bei 25° im geschlossenen Gefäß aufbewahrt. Danach wurde wieder eingefroren, 27 mg inakt. Kaliumcyanid zugegeben und 1 Stde. auf 80° erwärmt. Hierzu wurde die Lösung von 150 mg Vanillin in 1.5 ccm 10-proz. Natronlauge gegeben. Das Gemisch blieb 3 Stdn. bei Zimmertemperatur, dann $\frac{1}{2}$ Stde. bei 60° stehen. Nach dem Erkalten wurde mit 0.5 ccm 12% HCl angesäuert und die in gelben Kristallen sich abscheidende Cyan-ferulasäure abgesaugt. Das Filtrat wurde wieder alkalisch gemacht, mit 32 mg inakt. Cyan-ferulasäure versetzt und diese durch Ansäuern wieder ausgefällt. Die vereinigten Fraktionen von Cyan-ferulasäure wurden in Methanol aufgenommen, im Zentrifugengläschen eingetrocknet und mehrmals mit heißem Benzol ausgezogen, um Beimengungen, hauptsächlich Vanillin, herauszulösen. Die chemische Ausbeute betrug 65–70%, die Ausbeute an Aktivität etwas mehr.

⁵⁾ In Anlehnung an W. Baker u. A. Lapworth, J. chem. Soc. [London] 127, 560 [1925].

Ferulasäure-nitril⁶⁾: Die Cyan-ferulasäure wurde in 3 ccm Cyclohexanol und 1 ccm Dimethylanilin 2 Stdn. auf 170° gehalten. Zur Erleichterung des Siedens wurde Kupferpulver verwendet. Die Lösung wurde bei 10⁻³ Torr erst kalt, dann bei 50° eingedampft, der Rückstand in 20 ccm Chloroform aufgenommen und die Lösung über Aluminiumoxyd (Höhe 2 cm, Durchmesser 4 mm) filtriert.

Ferulasäure: Der Rückstand von der Chloroform-Lösung wurde unter Stickstoff mit 4 ccm 20-proz. Kalilauge 4½ Stdn. gekocht, die erkaltete Lösung mit einem geringen Überschuß konz. Salzsäure angesäuert und die Ferulasäure mit insgesamt 50 ccm Essigester ausgeschüttelt. Sie wurde über das Acetyl-ferulasäurechlorid in den Acetyl-ferulasäureäthylester verwandelt; Ausb. 33% in bezug auf das Kaliumcyanid.

Coniferylalkohol und Coniferin⁷⁾: Nach der Reduktion des Esters mit 32 mg Lithiumaluminiumhydrid (8 Stdn. bei -15°) wurde das Lithiumaluminium-Salz in der Kälte mit wenig verd. Dithionit-Lösung zersetzt. Am Rührer hängende Reste wurden mit wenig Methanol ins Reaktionskölbchen gespült. Die Lösungsmittel wurden i. Hochvak. völlig entfernt. Der Rückstand wurde mit 70 mg Kaliumhydrogencarbonat in 2 ccm Wasser gelöst und mit der Lösung von 146 mg Acetobromglucose in 2 ccm Aceton versetzt. Nach 36stdg. Schütteln bei Zimmertemperatur wurde i. Hochvak. eingedampft, der Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen und die Lösung mit 0.1 n NaOH gewaschen, bis sich die Lauge nicht mehr gelb färbte. Der in Methylenchlorid unlösliche Rückstand und die alkal. Auszüge enthielten den nicht glucosidierten Coniferylalkohol. Durch isotopische Verdünnung mit mehreren Anteilen inaktiven Coniferylalkohols, insgesamt 9.8 g, konnte er in reiner Form isoliert werden. Die Methylenchlorid-Lösung enthielt das acetylierte Glucosid. Sie wurde eingedampft und der Rückstand nach Zemplén verseift. Nach Sättigung mit Kohlendioxyd wurde in heißem Dioxan gelöst, von den ungelösten Carbonaten abzentrifugiert, auf 0.5 ccm eingengt und mit 4 ccm Benzol versetzt. Nach 24stdg. Stehenlassen in der Kälte wurde das Glucosid abzentrifugiert und aus 0.1 ccm Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute an fast reinem Coniferin hoher spezifischer Aktivität betrug 19 mg. Aus der Mutterlauge wurde durch Zusatz von 2 × 7 mg inakt. Coniferins eine zweite und dritte Fraktion gewonnen. Die gemessene spezifische Aktivität der vereinigten Fraktionen betrug etwa 80000 Impulse pro mg und Min. in unserer Meßanordnung.

Radioaktives Dehydrierungs-polymerisat (DHP): Der aktive Coniferylalkohol wurde bei pH 6.5 durch Champignon-Dehydrogenase in ligninartiges Material (DHP) verwandelt⁸⁾. Nach Abfiltrieren des DHP wurden in derselben Lösung zwecks besserer Ausnützung der Aktivität nochmals 9 g Coniferylalkohol dehydriert. Die Polymerisate wurden gemeinsam aus Aceton ungefällt. Die Ausbeute betrug 16.5 g aus 18.8 g Coniferylalkohol. Die Selbstabsorptionskurve des DHP ist annähernd die gleiche wie die für Wachs in „Isotopic Carbon“⁹⁾ angegeben.

Formaldehyd¹⁰⁾: 200 mg eines DHP von schwächerer spezifischer Aktivität wurden mit 28-proz. Schwefelsäure destilliert und der abgespaltene Formaldehyd als Formalimedon gefällt. Die Aktivität ist in der Tafel angegeben.

Isohemipinsäure¹¹⁾: Zur Herstellung dienten 4 g methyliertes, mit Kalilauge aufgeschlossenes und wieder methyliertes aktives Dehydrierungs-polymerisat. Metahe-

⁶⁾ In Anlehnung an K. Freudenberg u. R. Dillenburg, Chem. Ber. 84, 67 [1951].

⁷⁾ C. F. H. Allen u. R. J. Byers jr., J. Amer. chem. Soc. 71, 2683 [1939], in der Ausföhrung von K. Freudenberg u. H. H. Hübner, Chem. Ber. 85, 1181 [1952].

⁸⁾ K. Freudenberg u. W. Heimberger, Chem. Ber. 83, 519 [1950]; K. Freudenberg u. H. H. Hübner, Chem. Ber. 85, 1181 [1952].

⁹⁾ M. Calvin u. a., I. Wiley & Sons, Inc., New York u. Chapman & Hall, Ltd. London [1949].

¹⁰⁾ K. Freudenberg, F. Klink, E. Flickinger u. A. Sobek, Ber. dtsch. chem. Ges. 72, 217 [1939].

¹¹⁾ K. Freudenberg, K. Engler, E. Flickinger, A. Sobek u. F. Klink, Ber. dtsch. chem. Ges. 71, 1810 [1938].

pinsäure wurde nicht angetroffen, dagegen Veratrumsäure. Über die Radioaktivität der Isohemipinsäure gibt die Tafel Auskunft.

Metahemipinsäure¹²⁾: 6.5 g DHP wurden mit einem Gemisch aus 50 ccm Methanol und 5 ccm konz. Salzsäure 8 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Der Verdampfungsrückstand wurde mit wenig Aceton angeteigt, durch Zusatz von Wasser fein verteilt und mit Dimethylsulfat und Natronlauge, dann mit Diazomethan und nochmals mit Dimethylsulfat methyliert. Hierzu wurde unter Turbinieren eine gesätt. Lösung von Permanganat zutropft. Mit Hilfe von primärem Phosphat (2 Tle. auf 3 Tle. Permanganat) wurde neutral gehalten. Das gebildete Kohlendioxyd wurde aufgefangen. Im ganzen wurden 50 g Permanganat verbraucht. Das Filtrat von Mangandioxyd wurde eingengt und angesäuert. Von den ausgefallenen Säuren wurde abfiltriert, die Mutterlauge mit Äther extrahiert, die unlöslichen und die im Ätherextrakt befindlichen Säuren mit Diazomethan verestert und das Gemisch der ätherlöslichen Ester i. Hochvak. destilliert. Die Fraktion von 50–150° wurde mit methanol. Kalilauge verseift und nach Entfernung des Methanols mit Bariumchlorid gefällt. Aus dem Bariumsalz wurde eine in Benzol nicht lösliche Säure gewonnen, deren Methylester zweimal i. Hochvak. sublimiert und aus Äther+Petroläther umkristallisiert wurde. Er schmolz bei 87–88° (Misch-Schmp. mit dem Dimethylester der Metahemipinsäure). Die Aktivität wird in der Tafel mitgeteilt. Aus dem Filtrat der Bariumsalze wurde inaktive Veratrumsäure isoliert. Isohemipinsäure und Dehydro-diveratrumsäure traten hierbei nicht auf.

Messung: Die zu messenden Substanzen wurden auf Glasplättchen aufgebracht, in die eine Vertiefung von 0.5 mm/0.79 qcm eingeschliften war. Die Aktivität wurde mit einem Geiger-Müller-Zählgerät gemessen. Es handelt sich also um Relativmessungen, die wegen der Schwierigkeit, reproduzierbare Schichtdicken zu gewinnen, nur annähernde quantitative Aussagen gestatten. Für die Selbstabsorptions-Korrektur wurde die in „Isotopic Carbon“¹³⁾ auf S. 317 angegebene Tafel für Wachs als gültig angenommen.

Tafel. Aktivitätsmessungen

Präparat	Flächenbelag mg/qcm	Selbstabsorpt., korr. Faktor	gemessen Imp./Min.	Aktivität		
				Imp./mg u. Min. unkorr.	Imp./mg u. Min. korr.	Imp./mMol Min.
DHP (25 mg)	∞ dick (0.79 qcm)	—	1590	—	740	133000
DHP (5.7 mg)	7.25	1/0.33	1403	251	764	137000
Metahemipinsäure- dimethylester (7.8 mg)	9.9	1/0.26	342	44	169	43000
Metahemipinsäure- dimethylester (0.87 mg)	1.1	1/0.81	133	153	190	48000
Isohemipinsäure- dimethylester (0.7 mg)	0.9	1/0.84	15	21	26	6500
DHP (12.4 mg)	7.1	1/0.33	818	66	200	36000
Formaldimedon (12.7 mg)	7.3	1/0.33	540	42.5	129	38000

¹²⁾ H. Richtzenhain, Acta chem. scand. 4, 206, 589 [1950].