

3-[4-Oxy-3-methoxy-phenyl]-propan-diol-(1.3) (3-Guajacyl-propan-diol-(1.3)) (VI) ist voraussichtlich durch Reduktion und Abspaltung der schützenden Gruppen aus der vorstehend beschriebenen Verbindung IV zugänglich. Diese Reaktion wurde aber nicht ausgeführt, da VI sich aus dem von K. A. West und H. Hibbert²³⁾ beschriebenen 1-Acetoxy-3-[4-oxy-3-methoxy-phenyl]-propan-on-(3) durch Reduktion mit LiAlH_4 herstellen ließ.

Das Ausgangsmaterial wird abweichend von den Angaben Hibberts aus viel Cyclohexan umkristallisiert.

36 mMol des Ketons werden mit 55 mMol LiAlH_4 (ber. 45 mMol) in absol. Äther und unter Feuchtigkeits- und Sauerstoffausschluß 5 Stdn. bei Zimmertemp. reduziert. Dann wird mit Wasser zersetzt. Die Ätherphase wird verworfen, die verbleibende wäßr. Lösung mit festem Kohlendioxyd angesäuert und mit *n*-Butanol ausgeschüttelt. Den Verlauf der Extraktion kann man gut verfolgen, da der gesuchte Alkohol die gleiche rotviolette Farb-reaktion mit konz. Schwefelsäure gibt wie Coniferylalkohol. Bricht man die Extraktion rechtzeitig ab, so verbleibt der größte Teil der bei der Reduktion entstandenen Nebenprodukte im Wasser. Nach dem Abdestillieren des Butanols i. Vak. hinterbleibt der Alkohol als fast farblose zähe Masse. Er löst sich leicht in Wasser, Aceton, Methanol, Dioxan, Pyridin, Butanol und sublimiert bei Drucken unter 10^{-2} Torr erst bei Badtemperaturen über 150° unter teilweiser Zersetzung.

Die R_F -Werte in Wasser (mit Benzol gesättigt) auf Whatman No. 1 betragen bei aufsteigender Chromatographie für

Verbindung VI	0.79
1.4-Bis-[3-methoxy-4-oxy-phenyl]-2.3-bis-oxymethyl-butandiol-(1.4) ²⁴⁾	0.73

Anm. b. d. Korr.: Inzwischen ist der dritte dimere Baustein des Lignins (Guajacyl-glycerin- β -coniferyläther) isoliert und synthetisiert worden. Der R_F -Wert ist unter den obigen Bedingungen 0.63.

285. Karl Freudenberg und Martin Reichert: Anwendung radioaktiver Isotope bei der Erforschung des Lignins, V¹⁾

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

(Eingegangen am 4. Oktober 1954)

Die Synthese des Vanillins-[carbonyl- ^{14}C] und seines D- und L-Glucosides sowie des Syringaaldehyds-[carbonyl- ^{14}C] wird mitgeteilt. Wird ein Gemisch von Coniferylalkohol und radioaktivem Vanillin der Wirkung von Pilzredoxase ausgesetzt, so entsteht ein inaktives Dehydrierungspolymerisat, während das Vanillin unverändert bleibt. Im Anschluß an die IV. Mitteil. werden Einzelheiten über die von uns angewendete Meßtechnik mitgeteilt.

In der III. Abhandlung²⁾ dieser Reihe sind Versuche mit radioaktiv markiertem D- und L-Glucovanillin beschrieben worden. Es hat sich gezeigt, daß im Gegensatz zum L-Glucosid das D-Glucosid von der Fichte in das in der Verholzung begriffene Gewebe eingebaut wird. Hier sollen die Bereitung

²³⁾ J. Amer. chem. Soc. **65**, 1171 [1943].

²⁴⁾ K. Freudenberg u. H. Dietrich, Chem. Ber. **86**, 1157 [1953].

¹⁾ IV. Mitteil.: K. Freudenberg u. W. Fuchs, Chem. Ber. **87**, 1824 [1954], vorstehend.

²⁾ a) K. Freudenberg, H. Reznik, W. Fuchs u. M. Reichert, Naturwissenschaften **41**, Nov. [1954]; b) dieselben, Angew. Chem. **66**, 109 [1954]; c) K. Freudenberg, M. Reichert u. L. Knof, Naturwissenschaften **41**, 231 [1954].

dieser Präparate sowie des radioaktiven Syringaaldehyds beschrieben und einige technische Ergänzungen zu der erwähnten Abhandlung mitgeteilt werden.

Vanillin-[carbonyl- ^{14}C] kann nach K. Kratzl und G. Billek³⁾ über Brom-guajacol-benzyläther gewonnen werden.

Während diese Autoren die Lithiumverbindung benutzten, verwendeten wir bei unseren gleichzeitig⁴⁾ ausgeführten Versuchen die in Tetrahydrofuran hergestellte Grignard-Verbindung, um über diese das radioaktive Kohlendioxyd einzuführen. Die gebildete Benzyläther-vanillinsäure wurde nach Hydrierung und Acetylierung in das Acetyl-vanillinsäurechlorid verwandelt, das nach Rosenmund reduziert wurde und schließlich, bezogen auf $^{14}\text{CO}_2$, in einer Ausbeute von 25% ein Vanillin[carbonyl- ^{14}C] ergab, das 1.27 mC ^{14}C pro mMol enthält.

Die Umsetzung des Vanillins mit D- oder L-Acetobromglucose gelingt zwar nicht mit sehr guter Ausbeute, aber das nicht umgesetzte Vanillin läßt sich größtenteils zurückgewinnen.

Auch für Syringaaldehyd-[carbonyl- ^{14}C]⁵⁾ mußte ein Weg gesucht werden, der es erlaubt, den radioaktiven Kohlenstoff so spät wie möglich einzubauen. Benzyläther-syringasäureamid (3.5-Dimethoxy-4-benzyloxy-benzamid)⁶⁾ wurde zum Amin abgebaut, das diazotiert und in das entsprechende Jodid verwandelt wurde. Durch den Weg über das Amid und Jodid unterscheiden sich unsere Versuche⁵⁾ von gleichzeitig ausgeführten von K. Kratzl und G. Billek⁷⁾, die von Brom-pyrogallol-dimethyläther ausgehen. Das Jodid wurde in die Lithiumverbindung übergeführt. Durch $^{14}\text{CO}_2$ entstand daraus Benzyläther-syringasäure-[carboxyl- ^{14}C]. Sie wurde in Acetyl-syringasäurechlorid übergeführt, das nach der Reduktion und Verseifung in einer Ausbeute von 22% Syringaaldehyd-[carbonyl- ^{14}C] ergab, der 1.11 mC ^{14}C pro mMol enthält.

Vor einiger Zeit^{2b)} wurde eine Mischung von Coniferylalkohol und radioaktivem Vanillin der Dehydrierung durch Pilzredoxase ausgesetzt. Das entstandene künstliche Lignin erwies sich als radioaktiv. Daraus wurde geschlossen, daß ein Copolymerisat von Dehydrierungsprodukten des Coniferylalkohols und des Vanillins entstanden wäre. Die Wiederholung dieses Versuchs^{2a, 2c)} hat jedoch ergeben, daß Vanillin lediglich in sehr hartnäckiger Weise durch Adsorption oder in Form einer festen Lösung in dem ausfallenden Dehydrierungspolymerisat des Coniferylalkohols enthalten ist. Diese Feststellung ist wichtig, weil, wie in der III. Mitteilung ausgeführt wurde, die Fichte im Gegensatz hierzu imstande ist, das Glucovanillin zum Aufbau des Holzes mitzuverwenden. Offenbar nimmt die Pflanze mit dem Glucovanillin zunächst eine Veränderung vor, die den Einbau möglich macht.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der Arbeit.

³⁾ *Holzforschung* 7, 68 [1953].

⁴⁾ M. Reichert in K. Freudenberg u. H. Dietrich, *Chem. Ber.* 86, 1162 [1953].

⁵⁾ Vorläufige Mitteil.: K. Freudenberg u. M. Reichert, *Naturwissenschaften* 41, 229 [1954].

⁶⁾ W. Bradley u. R. Robinson, *J. chem. Soc. [London]* 1928, 1555.

⁷⁾ *Mh. Chem.* 85, 845 [1954].

Beschreibung der Versuche

Benzyläther-vanillinsäure⁸⁾: Brom-guajacol-benzyläther (5-Brom-1-methoxy-2-benzyloxy-benzol)^{9,10)} ließ sich in Äther nicht in befriedigender Weise in die Grignard-Verbindung überführen. Dagegen gelang dies in Tetrahydrofuran.

0.3 g Magnesiumspäne und ein Körnchen Jod wurden in den Reaktionskolben¹¹⁾ eingebracht und mit der Lösung von 2.55 g 5-Brom-guajacol-2-benzyläther in 35 ccm absol. Tetrahydrofuran versetzt. Nun wurde unter sorgfältig getrocknetem Stickstoff langsam zum Sieden erhitzt, dann erst mit dem Rühren begonnen und die Reaktionslösung im Sieden erhalten. Durch dieses Verfahren wurde erreicht, daß sich am Boden des Kolbens eine relativ konzentrierte Jodlösung bildete, die das Magnesium viel besser aktivierte als eine durch Umrühren entstandene verdünntere Jodlösung. Die zunächst gelb gefärbte Lösung wurde nach 15–20 Min. farblos, um sich dann unter gleichzeitigem Verbrauch des Magnesiums allmählich wieder gelb zu färben. Nach 2 Stdn. war die Bildung der Grignard-Verbindung beendet. Der Gehalt wurde durch Hydrolyse und Titration bestimmt¹²⁾. Das als Lösungsmittel verwendete Tetrahydrofuran war durch Aufbewahren über Kaliumhydroxyd, mehrfaches Trocknen mit Natriumdraht und zuletzt durch Abdestillieren über wenig Lithiumaluminiumhydrid gereinigt worden. Es wird über Natriumdraht aufbewahrt, muß dennoch vor jedem Versuch erneut über LiAlH₄ destilliert werden.

Wegen der Überführung der Grignard-Verbindung in radioaktive Benzyläther-vanillinsäure kann auf die Literatur verwiesen werden¹³⁾. Die Weiterverarbeitung zu Vanillin ist oben geschildert. Das radioaktive Vanillin wurde entsprechend der Vorschrift von E. Fischer und K. Raske¹⁴⁾ mit D- und L¹⁵⁾-Acetobromglucose umgesetzt.

D- und L-Tetraacetyl-glucovanillin-[carbonyl-¹⁴C]: 23.8 mg Vanillin-[carbonyl-¹⁴C] wurden mit 43 mg Kaliumcarbonat in 1 ccm Wasser gelöst und mit 70 mg D-Acetobromglucose in 1.2 ccm Aceton versetzt. Der Ansatz blieb unter Stickstoff in einem verschlossenen Zentrifugenglas 15 Stdn. stehen. Nach dem Abdestillieren des Acetons, Zentrifugieren und Waschen mit Wasser wurden 26.2 mg radioaktives D-Tetraacetyl-glucovanillin isoliert. Die alkalische Mutterlange wurde mit 14 mg inaktivem Vanillin versetzt und durch Extraktion mit Chloroform von Substanzen befreit, die aus der überschüss. Acetobromglucose entstanden waren. Nach Ansäuern wurden dann durch erneute Extraktion mit Chloroform 25.9 mg schwächer radioaktives Vanillin zurückgewonnen, das erneut auf die beschriebene Art glucosidiert wurde.

Nach der 2. Glucosidierung und Verdünnung fielen 23.4 mg Vanillin-[¹⁴C] an, die mit aus L-Glucose¹⁵⁾ hergestellter L-Acetobromglucose¹⁶⁾ glucosidiert wurden. Das erhaltene L-Tetraacetyl-glucovanillin-[¹⁴C] hatte nur noch $\frac{1}{6}$ bis $\frac{1}{4}$ der molaren Aktivität des unverdünnten radioaktiven Vanillins.

D-Glucovanillin-[carbonyl-¹⁴C]: 26.2 mg D-Tetraacetyl-glucovanillin-[¹⁴C] wurden in 4 ccm Methanol gelöst und mit der Lösung von 4.9 mg Natrium in 0.2 ccm Methanol verseift. Nach dem Verjagen des Methanols durch Kohlendioxyd wurde der

⁸⁾ Vergl. A. Lovecy, R. Robinson u. S. Sugasawa, J. chem. Soc. [London] 1930, 820.

⁹⁾ K. Freudenberg, H. Fikentscher u. M. Harder, Liebigs Ann. Chem. 441, 178 [1925].

¹⁰⁾ B. Riegel u. H. Wittehoff, J. Amer. chem. Soc. 68, 1915 [1946].

¹¹⁾ nach H. Gilman u. C. H. Meyers, J. Amer. chem. Soc. 45, 159 [1923].

¹²⁾ H. Gilman, P. D. Wilkinson, W. P. Fishel u. C. H. Meyers, J. Amer. chem. Soc. 45, 156 [1923].

¹³⁾ z. B. M. Calvin, Isotopic Carbon (New York 1949), S. 178; K. Kratzl, l. c. 7).

¹⁴⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. 42, 1475 [1909].

¹⁵⁾ L-Glucose wurde nach J. C. Sowden u. H. O. L. Fischer (J. Amer. chem. Soc. 69, 1963 [1947]) von Hrn. O. P. Swoboda hergestellt, wofür wir ihm danken.

¹⁶⁾ M. Barczai-Martos u. F. Korösy, Nature [London] 165, 369 [1950].

Rückstand mehrmals mit einigen ccm absol. Dioxan gekocht, die ungelösten Salze abzentrifugiert und die überstehende Dioxanlösung in ein anderes Zentrifugenglas pipettiert. Die vereinigte Dioxanlösung wurde durch einen Kohlendioxydstrom bei möglichst niedriger Temperatur eingedampft und der Rückstand zur Beseitigung mitgerissener anorganischer Bestandteile abermals mehrfach mit heißem Dioxan extrahiert. Die vereinigten Dioxanlösungen wurden in einem Zentrifugenglas durch einen Strom von Kohlendioxyd weitgehend eingeengt und dann vorsichtig mit niedrig siedendem Petroläther überschichtet. Nach 12stdg. Stehenlassen hatte sich das Glucovanillin in watteartigen weißen Kristallen ausgeschieden. Die Mutterlauge wurde abpipettiert, wobei die Kristallmasse als Filter benützt wurde, die Kristalle wurden durch mehrfaches Waschen mit Petroläther und Abzentrifugieren vollständig von Dioxan befreit und über Silicagel im Exsiccator getrocknet. Ausb. 15.8 mg krist. D-Glucovanillin-[carbonyl-¹⁴C] (92% d.Th.).

L-Glucovanillin-[carbonyl-¹⁴C]: Aus 28.2 mg L-Tetraacetyl-glucovanillin-[¹⁴C] fielen 12.8 mg L-Glucovanillin-[carbonyl-¹⁴C] an (68% d.Th.).

Die radioaktiven Verbindungen wurden papierchromatographisch auf Einheitlichkeit geprüft (siehe unten). Nicht aktive Aldehyde wurden durch Besprühen mit salzsaurem 2.4-Dinitro-phenylhydrazin sichtbar gemacht. Sämtliche bei den radioaktiven Synthesen angefallenen Mutterlaugen, Rückstände und Katalysatoren wurden mit nicht-radioaktivem Material der betreffenden Reaktionsstufe behandelt und so schwächer radioaktive Präparate gewonnen.

Benzyläther-syringensäure^{6,17,18)} wird zweckmäßig mit Thionylchlorid statt mit Phosphorpentachlorid in das Chlorid übergeführt. 30 g Säure wurden mit 60 ccm gereinigtem Thionylchlorid 1½ Stdn. auf 50° erwärmt. Die zitronen- bis höchstens goldgelbe Lösung wurde nach dem Erkalten innerhalb von 1 Stde. in eine heftig gerührte Mischung von konz. wässriger Ammoniaklösung und Eis unter der Flüssigkeitsoberfläche eingetropfelt; das ausgefallene Säureamid wurde abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Ausb. 29 g vom Schmp. 149°. Nach dem Umkristallisieren aus Benzol Schmp. 152°.

5-Amino-pyrogallol-1.3-dimethyläther-2-benzyläther: 5 g Benzyläther-syringensäureamid wurden mit etwa 100 ccm Wasser im Starmix verrührt, die erhaltene Suspension wurde mit 1.5 l Wasser verdünnt und unter Rühren in einem Becherglas auf 70 bis 75° erwärmt. Dann wurden 45 ccm einer bei 0° hergestellten Lösung von 200 g Natriumhydroxyd und 100 g Chlor in 1.2 l Wasser sowie 20 g Natriumhydroxyd, gelöst in 50 ccm Wasser, zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde weiter bei 70–75° gehalten. Im Verlauf von 20 Min. ging das Säureamid zum größten Teil in Lösung und das Reaktionsgemisch farbte sich rot. Die Lösung wurde heiß filtriert und nach dem Erkalten 3mal mit Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten äther. Lösungen wurden 3mal mit verd. Salzsäure extrahiert und in die saure Lösung mitgegangener Äther bei Zimmertemperatur i. Vak. abdestilliert. Dabei kristallisierte meist das salzsaure Salz des entstandenen Amins aus. Durch Zusatz von verd. Natronlauge wurde das freie Amin gefällt und nach einigen Stunden abgesaugt. Die Ausbeute betrug meistens 1.4–1.5 g, war aber nicht immer reproduzierbar. So konnten in einigen Fällen bis 1.8 g, manchmal auch weniger als 1 g erhalten werden.

Das Amin kann durch Lösen in wenig Methanol und tropfenweisen Zusatz von Wasser bis zur beginnenden Trübung umkristallisiert werden.

Zur Auffindung der brauchbarsten Reaktionsbedingungen war die Beobachtung nützlich, daß die salzsaure Lösung des Amins Holz bzw. holzhaltiges Papier intensiv gelb färbt. Schmp. 69°.

C₁₅H₁₇O₅N (259.3) Ber. C 69.48 H 6.61 N 5.40 Gef. C 69.65 H 6.65 N 5.36

5-Jod-pyrogallol-1.3-dimethyläther-2-benzyläther: 4 g 5-Amino-pyrogallol-1.3-dimethyläther-2-benzyläther wurden in 80 ccm Äther gelöst und mit 50 ccm 1 n HCl und 400 ccm Wasser unterschichtet. Dann wurde der Äther i. Vak. bei

¹⁷⁾ G. Hahn u. H. Wassmuth, Ber. dtsh. chem. Ges. **67**, 701 [1934].

¹⁸⁾ C. Graebe u. E. Martz, Ber. dtsh. chem. Ges. **36**, 217 [1903].

Zimmertemperatur abdestilliert. In die erhaltene salzsaure Lösung wurde Eis eingeworfen und unter Rühren die Lösung von 1.3 g Natriumnitrit in 50 ccm Wasser tropfenweise zugegeben. Die Diazoniumsalzlösung wurde rasch unter kräftigem Rühren einer mit etwa 150 ccm Chloroform unterschichteten Lösung von 8 g Kaliumjodid in 150 ccm Wasser zugefügt¹⁹⁾ und noch 30 Min. gerührt. Nach dieser Zeit war die wäbr. Schicht klar und die Chloroformschicht dunkelbraun geworden. Unter weiterem Rühren wurde die Reaktionsmischung alkalisch gemacht und die jetzt hellrot gefärbte Chloroformschicht abgetrennt, mit Calciumchlorid getrocknet und das Chloroform im Wasserstrahlvak. abdestilliert. Der Rückstand wurde aus einem kleinen Kölbchen bei etwa 1 Torr rektifiziert. Die Jodverbindung ging als hellrötliches Öl über, das bald kristallisierte und sich aus wäbr. Methanol umkristallisieren ließ. Ausb. nach dem Umkristallisieren 3.3 g (56% d.Th.). Schmp. 58.5°.

Zur Analyse wurde die Substanz zweimal destilliert, dreimal aus wäbr. Äthanol umkristallisiert, zweimal bei 110–115° Badtemperatur sublimiert, nochmals umkristallisiert und sublimiert. Schmp. der reinen Verbindung 59°. Bei 150° beginnt sie sich zu zersetzen.

$C_{15}H_{15}O_3J$ (370.2) Ber. C 48.67 H 4.08 J 34.28 Gef. C 48.70 H 4.33 J 34.40

Methoxymethyläther-vanillinsäure: 21 g gepulvertes Methoxymethyläther-vanillin²⁰⁾ wurden in der Lösung von 6 g Natriumhydrogencarbonat in 300 ccm Wasser suspendiert. Bei 20° wurde die Lösung von 12 g Kaliumpermanganat in 250 ccm Wasser bei Zimmertemperatur unter Rühren tropfenweise zugegeben, nach beendeter Oxydation von den entstandenen Manganoxyden abfiltriert und das Filtrat bei 0° mit verd. Schwefelsäure bis p_H 4 angesäuert. Die weiße Fällung von Methoxymethyläther-vanillinsäure wurde abgesaugt, getrocknet und aus Benzol umkristallisiert. Lange Nadeln vom Schmp. 157.5°. Hartnäckig anhaftende Benzolspuren ließen sich nur durch zweimalige Sublimation i. Vak. bei einer Badtemperatur von 110–120° entfernen. Ausb. nach dem Umkristallisieren 16 g. $C_{10}H_{12}O_5$ (212.2) Ber. C 56.60 H 5.70 OCH_3 29.25 Gef. C 56.71 H 5.84 OCH_3 29.33

Die Verbindung ist in der Kälte gegen verd. Säuren ziemlich beständig, beim Erwärmen mit verd. Säure spaltet sie Formaldehyd ab.

Durch Hydrierung von Vanillin-benzyläther mittels 10-proz. Palladium-Bariumsulfat-Katalysators in Essigester bei Zimmertemperatur entstand unter Aufnahme von 3 Moll. Wasserstoff in 40 Min. in quantitativer Ausb. Kreosol (4-Oxy-3-methoxy-1-methyl-benzol), das als Pikrat vom Schmp. 110.5° identifiziert wurde^{21, 22)}.

4-Oxy-3.5-dimethoxy-azobenzol-sulfonsäure-(4'): Die Lösung von 22 g Sulfanilsäure in 125 ccm 1*n*NaOH wurde mit 9.3 g Natriumnitrit versetzt und die Mischung mit Eis und Wasser auf 500 ccm verdünnt. Dann ließ man unter lebhaftem Rühren 75 ccm halbkonz. Salzsäure langsam zutropfen. Der so hergestellte Brei von diazotierter Sulfanilsäure wurde in die mit Eis versetzte Lösung von 20 g Pyrogallol-1.3-dimethyläther¹⁷⁾ in 500 ccm 1*n*NaOH eingerührt. Dabei fiel das Natriumsalz des gebildeten Azofarbstoffs zum Teil aus. Die freie Sulfonsäure wurde nach 1 Stde. durch Fällung mit Salzsäure erhalten, nach 12 Stdn. abgesaugt, mit halbkonz. Salzsäure und Aceton gewaschen und im Exsiccator getrocknet. Ausb. 30 g.

Die Verbindung kristallisiert als Monohydrat in schwarzgrünen Nadeln und kann aus verd. Salzsäure umkristallisiert werden. Die saure wäbr. Lösung scheidet dunkelrot aus. Schmp. oberhalb von 300°. Das Kristallwasser wird bei 60° über Diphosphorpentoxyd noch nicht abgegeben, erst bei 100° entsteht die sehr hygroskopische wasserfreie Verbindung.

$C_{14}H_{14}O_6N_2S \cdot H_2O$ (356.34) Ber. C 47.19 H 4.53 N 7.86 S 9.00 H_2O 5.06
Gef. C 47.34 H 4.72 N 7.76 S 8.89 H_2O 5.24

5-Amino-pyrogallol-1.3-dimethyläther: In die Lösung von 41 g 4-Oxy-3.5-dimethoxy-azobenzol-sulfonsäure-(4') in 450 ccm 10-proz. wäbr. Ammoniak wurde

¹⁹⁾ Vergl. J. R. Chalmers, G. T. Dickson, J. Elks u. B. A. Hems, J. chem. Soc. [London] 1949, 3429.

²⁰⁾ H. Pauly u. K. Wäscher, Ber. dtsh. chem. Ges. 56, 609 [1923].

²¹⁾ R. v. Goedike, Ber. dtsh. chem. Ges. 26, 3043 [1893].

²²⁾ W. Schepss, Ber. dtsh. chem. Ges. 46, 2572 [1913].

in raschem Strom Schwefelwasserstoff eingeleitet. Die Lösung erhitze sich, und ihre Farbe schlug, nachdem vorübergehend rote Kristalle ausgefallen waren, ziemlich plötzlich von Rot nach Gelb um. Gleichzeitig begann der Amino-pyrogallol-dimethyläther in hellgelben Kristallen auszufallen. Er wurde nach dem Abkühlen der Reaktionsmischung rasch abgesaugt, mit Ammoniakwasser und dann mit sehr verd. Natriumsulfatlösung gewaschen und im Vakuumexsiccator getrocknet. Der hellgraue Kristallkuchen färbte sich, von außen nach innen fortschreitend, bald dunkelbraun. Ausb. 10 g (51% d.Th.). Die Verbindung ließ sich zwar aus Wasser oder Methanol umkristallisieren, konnte aber nie farblos erhalten werden. Besonders die heißen Lösungen färbten sich rasch dunkelbraun. Zur Analyse wurde das Amin daher in sein oxalsaures Salz übergeführt: 2 g des rohen Amins wurden in 50 ccm heißem Wasser gelöst und mit der Lösung von 1.5 g krist. Oxalsäure in 50 ccm Wasser versetzt. Das Oxalat kristallisierte beim Abkühlen aus der dunkelbraunen Lösung aus und wurde aus Wasser umkristallisiert. Es war ebenfalls noch oxydationsempfindlich, allerdings wesentlich weniger als die freie Base. Zur Umkristallisation wurden daher kleine Ansätze sehr rasch erhitzt und ebenso rasch abgekühlt. Trotzdem färbte sich die Lösung in der Wärme stets grün. Der oxalsaure Amino-pyrogallol-dimethyläther fiel in hellgrauer Form an und konnte durch Auskochen mit Methanol, in dem er unlöslich ist, fast weiß erhalten werden. Ab 165° Verfärbung, ab 215° lebhafte Zersetzung unter Gasentwicklung und Dunkelviolettärfärbung.

$C_8H_{11}O_2N \cdot C_2H_2O_4$ (259.2) Ber. C 46.33 H 5.06 N 5.40 Gef. C 46.62 H 5.19 N 5.36

Der Versuch, aus dem 5-Amino-pyrogallol-1.3-dimethyläther, analog der Darstellung von 4-Jod-guajacol, durch Reaktion nach Sandmeyer²³) den 5-Jod-pyrogallol-1.3-dimethyläther zu gewinnen, schlug fehl.

Messung der Radioaktivität: Zum Nachweis des radioaktiven Kohlenstoffs reichte in den meisten Fällen die Empfindlichkeit eines Endfenster-Geiger-Müller-Zählrohres nicht aus. Die Messungen wurden daher mit einem fensterlosen Methandurchflußzählrohr („flow-counter“) vorgenommen, in das die zu messenden Proben eingeschleust wurden. Dieses Gerät arbeitet bei Atmosphärendruck mit einer Zählrohrspannung von etwa 4000 Volt im Proportionalbereich.

Herstellung von Bariumcarbonat-Meßproben: Zur Wahrung einheitlicher Bedingungen wurden alle Präparate und Pflanzenteile, deren Gehalt an ^{14}C zu bestimmen war, verbrannt und das erzeugte Kohlendioxyd als Bariumcarbonat in das Zählrohr gebracht.

Für die Korrektur der Selbstabsorption der β -Strahlung des radioaktiven Kohlenstoffs in Bariumcarbonat wurden die in „Isotopic Carbon“²⁴) angegebenen Werte verwendet und damit alle Meßwerte auf unendlich dicke Schichten umgerechnet.

Die Verbrennung der organischen Substanz wurde auf nassem Wege durch eine Mischung von Oleum, Phosphorsäure, Kaliumdichromat und Kaliumjodat vorgenommen²⁵). Mit der von J. H. Peters und H. R. Gutmann²⁶) beschriebenen Apparatur zur Oxydation von 0.5–3 mg Kohlenstoff, in der das entwickelte Kohlendioxyd i. Vak. durch Bariumhydroxydlösung absorbiert wird, erhielten wir zu kleine Ausbeuten an Bariumcarbonat. Die Anordnung wurde daher so abgeändert, daß die Oxydation im Stickstoffstrom erfolgte und das Kohlendioxyd durch den Gasstrom in eine mit der Absorptionslösung gefüllte Spiralfalle gespült wurde. Nach beendeter Oxydation konnte der Inhalt des Absorptionsgefäßes durch Hochstoßen eines eingeschlifenen Bodenventils abgelassen werden. Erfolgte die Absorption des Kohlendioxyds in eingestelltem $0.25n Ba(OH)_2$, das außerdem noch Bariumchlorid enthielt, so konnte der nicht verbrauchte Laugeüberschuß gegen Phenolphthalein zurücktitriert werden²⁶). Hierdurch entfiel die Notwendigkeit, das Bariumcarbonat zwecks Ausbeutebestimmung quantitativ zur Wägung zu bringen.

²³) E. Mameli u. G. Pinna, Arch. d. Farmacol. specim. 6, 193 [1907]; C. 1907 II, 2045.

²⁴) M. Calvin, Isotopic Carbon (J. Wiley & Sons, New York 1949), S. 317.

²⁵) D. D. van Slyke, J. Plazin u. J. R. Weisiger, J. biol. Chemistry 191, 299 [1951].

²⁶) Analytic. Chem. 25, 987 [1953].

Bei Einwaagen von 4–5 mg Acetyl-syringasäure mit 55% Kohlenstoff als Testsubstanz wurde so durch Titration 99–104% der theoret. Kohlendioxidmenge gefunden und die Brauchbarkeit des Verfahrens bestätigt. Es war aber unmöglich, aus dem durch direkte Absorption von Kohlendioxid in Bariumhydroxydlösung erhaltenen Bariumcarbonat hergestellte Bariumcarbonatschichten ohne Bildung von Rissen zu trocknen. Deshalb wurde die Absorption in carbonatfreier 0.25*n* NaOH vorgenommen. Die Absorptionslösung wurde in ein Becherglas abgelassen und die Falle mit kohlendioxidfreiem Wasser gespült, dem Phenolphthalein zugesetzt war, um die Beendigung des Auswaschens erkennen zu können. Absorptionslösung und Waschwasser wurden unter Stickstoff zum Sieden erhitzt und tropfenweise mit soviel Ammoniumchloridlösung versetzt, daß die Indikatorfarbe nur noch schwach sichtbar war (0.8 bis 1 ccm einer Lösung von 160 g Ammoniumchlorid in 1000 ccm Wasser). Die heiße Lösung wurde sofort mit 5–6 ccm einer Lösung von 20 g BaCl₂·2H₂O in 1000 ccm Wasser versetzt. Nach etwa 1/2 Stde. hatte sich der Bariumcarbonatniederschlag auf dem Boden des Becherglases abgesetzt. Er wurde auf ein gewogenes Filterpapierscheibchen (Schleicher & Schüll Nr. 1506) abgesaugt und gewaschen²⁷⁾. Nach 20 ccm Waschwasser war das Filtrat chloridfrei.

Papier und Niederschlag wurden mit einem Ring auf einen runden Messingblock gespannt²⁷⁾, der in die Bohrung des Zählrohres paßte und 30 Min. unter einer Infrarot-Lampe und dann bei 120° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Bariumcarbonat bedeckte eine Fläche von 3.33 qcm. Völlig gleichmäßige Schichten konnten zwischen etwa 2 und 40 mg/qcm hergestellt werden. Das genannte Verfahren befriedigte zwar hinsichtlich der Erzeugung gleichmäßiger Bariumcarbonatschichten, dafür war aber eine Kontrolle über den quantitativen Verlauf der Verbrennung nicht möglich, da das Bariumcarbonat nicht restlos auf das Filter gebracht werden konnte. Im allgemeinen erhielt man 70–90% der erwarteten Menge als Schicht.

Die Herstellung mechanisch ziemlich widerstandsfähiger Dauerpräparate, wie sie zu Vergleichszwecken benötigt wurden, gelang dadurch, daß nach dem letzten Waschwasser 1 ccm einer wäbr. Leimlösung durch das Bariumcarbonat gesaugt wurde (0.5 mg „Glutofix“ der Firma Kalle & Co. in 1 ccm Wasser). Nach dem Trocknen wurde die Schicht vorsichtig auf ein mit Benzol oberflächlich aufgeweichtes Polystyrolplättchen abgeklatst. Halbe Präparate, wie sie zur Ermittlung der Koinzidenzkorrektur benötigt werden, ließen sich ebenso herstellen, wenn die noch feuchte Bariumcarbonatschicht in der Mitte mit einer Rasierklinge geteilt wurde.

Auswertung von radioaktiven Papierchromatogrammen: Die ¹⁴C-Strahlung wird durch Filterpapier so stark geschwächt, daß mit einem Endfenster-Zählrohr nur ziemlich hochaktive Chromatogrammeflecke entdeckt werden können.

Papierchromatogramme wurden daher in etwa 20 mm breite Streifen zerschnitten und diese in numerierten 1 cm langen Stückchen im fensterlosen Durchflußzählrohr Stück für Stück vermessen.

Je nach der Stärke der vorhandenen Radioaktivität wurde jedes Stückchen 2 oder 3 Min. lang gezählt. Die von der Untergrundstrahlung herrührenden Impulszahlen wurden nicht abgezogen, sondern die Zählergebnisse graphisch ausgewertet. Auf diese Weise gelang es, radioaktive Flecke mit einer Strahlungsintensität von der Größenordnung der doppelten Untergrundstrahlung noch sicher nachzuweisen.

²⁷⁾ l. c. ²⁴⁾, S. 116.