

Vergleich der durch Oxydation mit alkalischer Jodlösung erhaltenen Werte mit den Ergebnissen des Permanganat-Verfahrens

Normalität der Jodlösung: 0.06820 n, der Natriumarsenitlösung: 0.1 n

Ver- such Nr.	Vorgelegte VO ²⁺ -Lösg. in ccm	Eingesetzte Jodlösung in ccm	As ₂ O ₃ = J ₂ umgesetzte ccm 0.1 n Lösg.	Gef. V in g		Differenz
				mit KMnO ₄	mit As ₂ O ₃	
1.	10.0	25.0	7.6	0.03882	0.03873	-0.0009
2.	20.0	50.0	15.2	0.07755	0.07743	-0.0012
3.	30.0	50.0	22.8	0.1164	0.1161	-0.0003
4.	40.0	75.0	30.55	0.1552	0.1556	+0.0004
5.	60.0	125.0	45.7	0.2325	0.2328	+0.0003
6.	10.0	25.0	5.15	0.02612	0.02623	+0.0001
7.	20.0	50.0	10.3	0.05224	0.05247	+0.0002
8.	10.0	25.0	2.35	0.01205	0.01198	-0.0007
9.	20.0	50.0	4.8	0.02410	0.02412	+0.00002
10.	10.0	20.0	3.9	0.01993	0.01986	-0.0007
11.	10.0	30.0	3.9	0.01993	0.01986	-0.0007

94. Karl Freudenberg und Herbert Schlüter: Weitere Zwischenprodukte der Ligninbildung

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

(Eingegangen am 27. Januar 1955)

Bei der enzymatischen Dehydrierung des Coniferylalkohols bilden sich zunächst sekundäre Bausteine des Lignins. Außer dem früher beschriebenen Dehydro-diconiferylalkohol (I) und dem DL-Pinoresinol (II) wurde jetzt der Guajacylglycerin- β -coniferyläther (α -[4-Oxy-3-methoxy-phenyl]-glycerin- β -[2-methoxy-4-(γ -oxy-propenyl)-phenyl]-äther) (III)* und der Coniferylaldehyd (IV) gefunden. Aus dem Gemisch dieser Substanzen mit weiterem Coniferylalkohol bildet sich bei fortgesetzter Dehydrierung Lignin. Andere dimere Zwischenprodukte scheinen nicht aufzutreten. Die Reaktionen des Lignins, insbesondere die Bisulfitreaktion, lassen sich mit Hilfe dieser sekundären Bausteine erklären.

Die Redoxase des Speisechampignons verwandelt den Coniferylalkohol in sehr verdünnter wäßriger Lösung über verschiedene Zwischenprodukte hinweg in ein wasserstoffärmeres unlösliches Lignin, das dem der Coniferen sehr ähnlich ist. Zuerst wurde der kristallisierte Dehydro-diconiferylalkohol (I) aufgefunden und in seiner Konstitution aufgeklärt¹). Ihm folgte das ebenfalls kristallisierte DL-Pinoresinol (II)²), dessen Konstitution durch Abbau und

*) Wie aus dem oben in Klammern beigefügten systematischen Namen ersichtlich ist, gebrauchen wir der Einfachheit halber in dieser und in der nachstehenden Arbeit den Namen „Guajacyl“ immer für den 4-Oxy-3-methoxy-phenyl-Rest, den Namen „Coniferyl“ für den 2-Methoxy-4-[γ -oxy-propenyl]-phenyl-Rest.

¹) K. Freudenberg u. H. H. Hübner, Chem. Ber. 85, 1181 [1952].

²) K. Freudenberg u. D. Rasenack, Chem. Ber. 86, 755 [1953]. Der Schmelzpunkt des DL-Pinoresinols ist höher als damals angegeben, nämlich 158°.

Synthese ermittelt wurde³). Beide geben mit sehr verdünnter, in Natriumcarbonat gelöster Diazobenzolsulfonsäure auf Filtrierpapier eine hellrote Farb-reaktion. Ein drittes bis dahin unbekanntes Zwischenprodukt der Ligninbildung wurde im Papierchromatogramm durch eine andere Laufzeit und eine gelbe Farb-reaktion erkannt. Ein vierter in sehr geringer Menge vorhandener Bestandteil des Gemisches zeichnet sich durch lebhaftes Fluoreszenz im ultravioletten Licht aus. Diese Bausteine III und IV können durch wiederholte Gegenstromverteilung isoliert werden. Die Substanz IV kristallisiert und ist Coniferylaldehyd. Es ist noch nicht erwiesen, ob der Coniferylaldehyd durch die Wirkung des Ferments entsteht oder ob er durch den die Flüssigkeit durchströmenden Sauerstoff gebildet wird, wobei möglicherweise Spuren von Schwermetall mitwirken.

Die Substanz III konnte nicht kristallisiert erhalten werden. Sie ist eine farblose blättrige Masse, die sich im Papierchromatogramm und in der Verteilung als einheitlich erweist. Wie alle sekundären Bausteine des Lignins ist sie optisch inaktiv. Die Titration der Oxygruppen⁴) ergibt 4 Hydroxyle. Eines davon ist phenolisch⁵) und reagiert mit Dinitrofluorbenzol. Der R_F -Wert entspricht dem gleichfalls mit 4 Oxygruppen versehenen, mit III isomeren Olivil⁶) (V). Die Elementaranalyse ergibt 2 Coniferylalkohol minus 2 Wasserstoff plus 1 Wasser. Eine Doppelbindung ist vorhanden. Mit Diazobenzolsulfonsäure entsteht, wie erwähnt, eine gelbe Färbung²).

Die gleiche Farbe haben wir bei allen von uns geprüften Guajacylcarbinolen gefunden. Sind Guajacylcarbinole veräthert wie in Dehydro-diconiferylalkohol (I), Pinoresinol (II) oder Olivil (V), so tritt eine rote Färbung auf⁷). Coniferylalkohol färbt sich karminviolett. Wenn dem Guajacylkern eine Methylverzweigung benachbart ist (z. B. 2-Guajacylpropyl), so ist die Färbung rot.

³) K. Freudenberg u. H. Dietrich, Chem. Ber. **86**, 1157 [1953].

⁴) Das ursprüngliche Verfahren von A. Verley u. Fr. Bölsing (Ber. dtsh. chem. Ges. **34**, 3354 [1901]) muß abgeändert werden. Wir können die Beobachtung von R. Delaby u. S. Sabetay (Bull. Soc. chim. France [5] **2**, 1716 [1935]) bestätigen, daß ein Überschuß an Pyridin die Reaktion hemmt. Am besten ist ein Gemisch von äquimolekularen Mengen Acetanhydrid und Pyridin (bearb. von M. Gatterdam u. H. Boesenberg). Die zu prüfende Substanz wird mit der 5- bis 6fachen Gewichtsmenge des Acetylierungsgemisches übergossen, eingeschmolzen und 24 Stdn. bei 50° aufbewahrt. Bei Gegenwart von tertiärem Hydroxyl muß die Reaktionsdauer verdoppelt oder verdreifacht werden. Die Mischung wird mit dem mehrfachen Volumen Aceton und soviel Wasser versetzt, wie das Gewicht an Acetylierungsmittel beträgt. Bei Einwaagen von 0.2 g Substanz mit etwa 10% Hydroxylgehalt wird mit $n/5$ NaOH potentiometrisch oder gegen Phenolphthalein titriert. Falls die Substanz ausfällt oder verklumpt, wird mehr Aceton zugegeben. Bei leicht versifbaren Acetylverbindungen empfiehlt es sich, bei 0° und möglichst rasch zu titrieren. In dem Parallelversuch ohne Substanz wird ebenso verfahren. Bei präparativen Acetylierungen ist dasselbe Mischungsverhältnis von Acetanhydrid und Pyridin anzuwenden. Auch die oben angegebene Temperatur und Reaktionsdauer muß eingehalten werden. Die Hydroxylgruppenbestimmung wurde von Hrn. H. Simon als Mikroverfahren (Glas-elektrode, $n/10$ NaOH) ausgearbeitet, worüber dieser an anderer Stelle berichten wird.

⁵) Potentiometrische Mikrotitration der phenolischen Oxygruppen — ausgeführt von W. Koenig — nach H. Brockmann u. E. Meyer, Chem. Ber. **86**, 1514 [1953].

⁶) B. L. Vanzetti, Atti Reale Accad. naz. Lincei, Rend. [6] **19**, 421 [1934]; B. L. Vanzetti u. P. Dreyfuss, Gazz. chim. ital. **64**, 381 [1934].

⁷) K. Freudenberg, in Zehmeisters Fortschr. d. Chemie org. Naturstoffe XI, 43 [1954].

Die Guajacylcarbinolgruppe wird auch bewiesen durch die Reaktion von E. Ziegler und K. Gartler⁸⁾, die von J. Gierer und Mitarbb.⁹⁾ auf das Lignin angewendet wurde. Mit Chinonmonochlorimid geben solche Gruppierungen, nicht aber die zugehörigen Benzyläther, einen blauen Indophenolfarbstoff. Die Substanz III zeigt diese Reaktion stark. Demnach ist schon durch die Farbproben sehr wahrscheinlich gemacht, daß ein Guajacylcarbinol vorliegt.

Die Substanz III spaltet beim Kochen mit 28-proz. Schwefelsäure geringe Mengen Formaldehyd ab, wie es beim Phenylglycerin¹⁰⁾ und Guajacylglycerin¹¹⁾ schon bekannt ist. Der Formaldehyd entstammt dem primären Carbinol. Auch der Dehydro-diconiferylalkohol (I) liefert Formaldehyd. Es konnte aber früher angedeutet werden¹²⁾, daß die Komponente I nicht der einzige Lieferant des Formaldehyds aus dem Lignin sein kann. Diese Vermutung hat sich somit bewahrheitet.

Nach diesen Feststellungen besteht kein Zweifel, daß III ein 1-Guajacylglycerin ist, das am mittelständigen oder endständigen Hydroxyl mit der Phenolgruppe des Coniferylalkohols veräthert ist. Ultraviolett- und Infrarot-Spektren passen zu diesem Konstitutionsbild. Das IR-Spektrum weist auf *trans*-Konfiguration hin. Zugunsten der mittelständigen (β)-Bindung entschied die Synthese¹³⁾.

Beim Kochen mit Äthanol-Salzsäure liefert die biochemisch und synthetisch gewonnene Substanz III ebenso wie das natürliche und künstliche Lignin die Hibbertschen monomeren Äthanalyseprodukte¹⁴⁾, wozu Coniferylalkohol, Dehydro-diconiferylalkohol (I) und Pinoresinol (II) nicht imstande sind¹⁵⁾, wie der Versuch bestätigt hat.

Die Substanz III nimmt genau zwei Atome Wasserstoff auf. Das hydrierte Produkt erweist sich in der Gegenstromverteilung und der Papierchromatographie als einheitlich. Infrarot- und Ultraviolett-Spektrum entsprechen der Erwartung. Die Bestimmungen des Gesamthydroxyls und der Phenolgruppe⁵⁾ ergaben denselben Wert wie beim nicht hydrierten Produkt III, von dem sich die hydrierte Substanz durch große Stabilität unterscheidet. Obwohl auch diese Substanz nicht kristallin gewonnen werden konnte, lieferte sie brauchbare Analysenwerte. Wie die unhydrierte Substanz ist die hydrierte optisch inaktiv.

⁸⁾ Mh. Chem. 80, 759 [1949].

⁹⁾ J. Gierer, Acta chem. scand. 8, 1319 [1954]; J. Gierer, B. O. Lindgren u. H. Mikawa, Svensk Papperstidn. 57, 633 [1954].

¹⁰⁾ K. Freudenberg u. E. Plankenhorn, Chem. Ber. 80, 149 [1947].

¹¹⁾ E. Adler u. K. J. Björkqvist, Acta chem. scand. 7, 561 [1953]; E. Adler u. S. Yllner, Acta chem. scand. 7, 570 [1953]; Svensk Papperstidn. 57, 78 [1954]; K. Freudenberg u. G. Achtzehn, Chem. Ber. 88, 10 [1955].

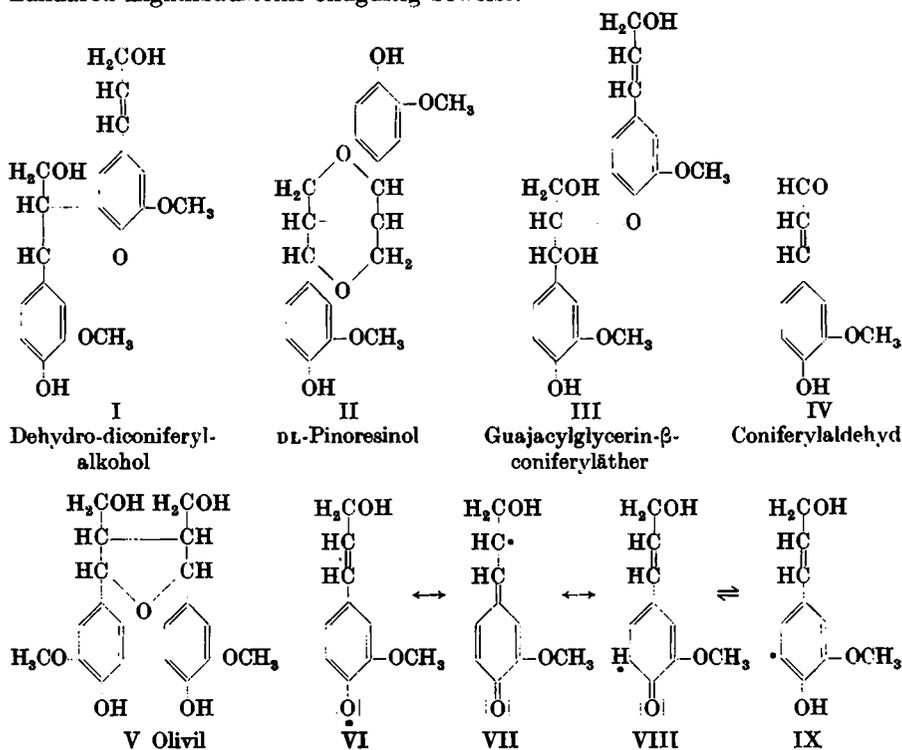
¹²⁾ K. Freudenberg u. F. Bittner, Chem. Ber. 86, 155 [1953].

¹³⁾ a) K. Freudenberg u. W. Eisenhut, Chem. Ber. 88, 626 [1955], nachstehend; b) vergl. K. Freudenberg u. W. Fuchs, Chem. Ber. 87, 1834 [1954]; c) K. Freudenberg, H. Schlüter u. W. Eisenhut, Naturwissenschaften 41, 576 [1954].

¹⁴⁾ A. B. Cramer, M. J. Hunter u. H. Hibbert, J. Amer. chem. Soc. 61, 509 [1939]; L. Brickman, W. L. Hawkins u. H. Hibbert, ebenda 62, 2149 [1940]; L. Brickman, J. J. Pyle, J. L. McCarthy u. H. Hibbert, ebenda 61, 868 [1939].

¹⁵⁾ Wir verdanken die chromatographische Feststellung dieser Spaltstücke Hrn. K. Kratzl in Wien; vergl. K. Kratzl u. W. Schweers, Mh. Chem. 85, 1046, 1166 [1954].

Mit Dinitrofluorbenzol bildet das hydrierte Produkt im Gegensatz zu III einen kristallisierenden Hauptanteil, der sich als der Mono-dinitrophenyläther erweist. Ein nicht kristallisierendes Nebenprodukt ist stickstoffreicher und dürfte ein Gemisch von Bis-dinitrophenyläthern sein, in dem außer der phenolischen Oxygruppe auch die eine oder andere aliphatische umgesetzt worden ist⁷⁾. Der schön kristallisierende Hauptanteil ist identisch mit einem synthetischen Präparat^{13a)} (Mischprobe), das die Konstitution III unseres neuen sekundären Ligninbausteins endgültig beweist.



Die Substanz III erleidet mit der Zeit Veränderungen. Unmittelbar nach der Gegenstromverteilung isoliert, zeigt sie keine Reaktion mit Phloroglucin-Salzsäure. Im Vak.-Exsiccator bei 20° oder unter gewöhnlichem Druck bei 3° mehrere Tage aufbewahrt, verändert sie sich und gibt jetzt die Phloroglucinreaktion. Ein großer Teil wird in Wasser unlöslich. Auch unter Stickstoff bildet sich die unlösliche Substanz. Ihre Kupplungsfarbe mit Diazobenzolsulfonsäure ist nach wie vor gelb. Auch der potentiometrisch ermittelte Phenolgruppengehalt bleibt unverändert. Offenbar tritt eine Polymerisation an der Doppelbindung ein und, wenn Sauerstoff zugegen ist, eine teilweise Oxydation primärer Carbinole zum Aldehyd.

Wie die Substanzen I und II liefert auch der sekundäre Baustein III, für sich allein der Wirkung der Pilzdehydrase ausgesetzt, ein Dehydrierungspolymerisat (DHP), das ein rahmfarbenes unlösliches Pulver ist und eine gelbe

Kupplungsfarbe mit Diazobenzolsulfonsäure liefert. Die Kupplungsfarbe der DHP aus Substanz I und II ist rot, die des DHP aus Coniferylalkohol rotgelb, des löslichen Lignins (Brauns-Lignin) gelb. Obwohl sich die Absorption im Ultraviolett des DHP aus Substanz III stark von der des löslichen Lignins unterscheidet, halten wir es doch für gesichert, daß der sekundäre Baustein III eine wesentliche Rolle bei der Bildung des Lignins spielt. Der Unterschied in der Absorption beruht zum Teil auf der Gegenwart von mehr ungesättigten Gruppen als im löslichen Lignin, ferner auf der Gegenwart einer Komponente des löslichen Lignins, die unten besprochen wird. Das DHP aus Substanz III spaltet wie das lösliche Lignin mit Chinonmonochlorimid den erwähnten Indophenolfarbstoff ab, während die Substanzen I, II und IV diese Reaktion nicht geben. Die Intensität der Reaktion ist jedoch beim DHP aus Substanz III nur noch ein Fünftel der von Substanz III. Das bedeutet, daß nur noch in jeder zehnten Phenylpropaneinheit des DHP aus Substanz III eine Guajacylcarbinol-Komponente vorhanden ist. Im löslichen Lignin findet sich nach J. Gierer und Mitarbb. auf jede 7. bis 8. C₆-Einheit eine Guajacylcarbinolgruppe. Mit 20-proz. Salzsäure bildet die Substanz III sofort, mit $n/_{10}$ HCl in der Wärme nach 5 Min. ein unlösliches Polymerisat oder Kondensat.

Mit der Auffindung der Komponente III läßt sich der Befund von N. N. Schorygina, T. Ja. Kefeli und A. F. Ssemetschkina¹⁶⁾ erklären, daß aus Lignin durch Natrium in flüssigem Ammoniak ein monomeres Spaltprodukt (vermutlich 1-Guajacyl-propanol-(2)) in einer Ausbeute von etwa 10% gewonnen wird.

Der Coniferylaldehyd (IV) wird bei der Gegenstromverteilung in geringen Mengen als Rohprodukt gewonnen, das zweckmäßig aus alkoholischer Lösung mit Kaliumacetat gefällt¹⁷⁾ und aus Wasser umkristallisiert wird. Er wurde als Dinitrophenylhydrazon identifiziert (Mischprobe). Die Kupplungsfarbe des Coniferylaldehyds mit Diazobenzolsulfonsäure ist zitronengelb.

Über die Menge der aus Coniferylalkohol gebildeten sekundären Bausteine des Lignins (I–IV) besteht noch keine Klarheit. Wenn 30 g Coniferylalkohol in 10 l Pufferlösung von p_H 5 bei 20° mit Fermentlösung versetzt und belüftet werden, bis der Coniferylalkohol auf wenige Prozente verschwunden ist, sind bis zu 45% des eingesetzten Coniferylalkohols als unlösliches DHP ausgefallen. In der Lösung befinden sich etwa 26% Substanz I, 13% Substanz II, 9% III, 0,2% IV und 3% Coniferylalkohol. Einige Prozente gehen bei der Aufarbeitung verloren. Die geringe Menge an Substanz III in der Lösung ist ohne Zweifel darauf zurückzuführen, daß sie rascher als die anderen Komponenten in unlösliches Material verwandelt wird, sei es durch weitere Dehydrierung oder durch Polymerisation, die durch den Sauerstoff oder die in der Lösung anwesenden Radikale eingeleitet werden kann. Die Substanz I reichert sich in diesem Stadium in der Lösung an, weil sie langsamer weiterreagiert. Ähnliches ist von Substanz II zu sagen. Wir vermuten, daß der Niederschlag

¹⁶⁾ J. allg. Chem. (russ.) 19 (81), 1558 [1949]; C. 1950 I, 728; C. R. [Doklady] Acad. Sci. URSS 64, 689 [1949]; C. 1950 I, 1366.

¹⁷⁾ Vergl. A. G. Perkin, J. chem. Soc. [London] 75, 433 [1899].

(45 %) zu einem großen Teil aus kondensierter Substanz III besteht. Unge-
wiß ist auch, in welchem Umfang der Coniferylaldehyd (IV) oder Oxydations-
produkte der Substanzen I und III zu den Zimtaldehydgruppen des Lignins
beitragen.

Das lösliche Lignin (Brauns-Lignin) hat neuerdings Unterschiede von dem
Hauptanteil des Fichtenlignins und dem DHP aus Coniferylalkohol erkennen
lassen. Wir haben gezeigt¹⁸⁾, daß sich die Acetate des löslichen Lignins, des
Dioxanlignins¹⁹⁾ und des DHP aus Coniferylalkohol gegenüber Acetanhydrid,
das eine Spur von Perchlorsäure enthält, verschieden verhalten. Lösliches Li-
gnin verbraucht keine zusätzliche Essigsäure, Dioxanlignin auf jede fünfte Ein-
heit eine und DHP auf 2 bis 3 Einheiten eine. Der Verbrauch an Essigsäure
rührt von der Aufspaltung von Cumaranringen wie in Substanz I und Phenyl-
hydrofuranringen wie in Substanz II her, die offenbar in DHP reichlich, in
Dioxanlignin weniger reichlich und im löslichen Lignin nicht oder nur in ge-
ringem Umfang vorhanden sind. Inzwischen hat J. Gierer⁹⁾ gleichfalls einen
Unterschied zwischen löslichem Lignin und Lignin im Holze durch die Reak-
tion mit Chinonchlorimid festgestellt. Lösliches Lignin enthält danach auf
7–8 Einheiten ein freies Guajacylcarbinol, Lignin im Holze nur auf 35–40
Einheiten. Dazu kommt, wie neuerdings gefunden wurde²⁰⁾, daß im löslichen
Lignin wechselnde, aber zum Teil erhebliche Mengen einer kristallisierbaren
Komponente enthalten sind, die in Nachbarschaft zu einem Guajacylkern
eine Oxygruppe trägt und ein Oxy-matairesinol sein dürfte. Es ist nicht sicher,
daß sie ein Baustein des Lignins ist.

Die Substanzen I bis IV enthalten alle Gruppierungen, die zur Erklärung
der Bisulfitreaktion und der übrigen mannigfaltigen Reaktionen des Lignins
erforderlich sind. I bis III können aus den mesomeren bzw. tautomeren
Radikalen VI bis IX erklärt werden: I aus der Addition von VII und IX, II
aus der Addition von 2 Einheiten VII, III aus der Addition von VI und VII
und Stabilisierung des entstandenen Chinonmethids durch Wasser. Es ist sehr
gut möglich, daß statt Wasser auch gelegentlich das Hydroxyl eines benach-
barten Kohlenhydrats eintritt und hierdurch eine leicht hydrolysierbare Koh-
lenhydratbindung des Lignins entsteht. Das Bauprinzip III hat für die weiteren
Vorstellungen von der Entstehung des Lignins den besonderen Vorteil, daß
nach diesem Prinzip der dehydrierte Coniferylalkohol der Grenzform VII mit
jedem Phenolhydroxyl, das sein Wasserstoffatom verloren hat, reagieren kann.
Ohne Zweifel arbeitet die Natur bei der Bildung des Lignins unter anderen
Bedingungen, als wir sie in dem oben beschriebenen Ansatz nachahmen. Die
Redoxasen des Holzes haben nicht einen einmalig gegebenen Vorrat von Coni-
ferylalkohol umzusetzen, sondern dieser wird vom Coniferin her über die im

¹⁸⁾ K. Freudenberg, M. Reichert u. L. Knof, *Naturwissenschaften* 41, 231 [1954];
K. Freudenberg u. H. Leuck, unveröffentlicht.

¹⁹⁾ Auch Dioxan-Salzsäure-Lignin genannt; vergl. K. Freudenberg, l. c.⁷⁾ und K.
Freudenberg, Lignin, in: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse III*, Springer-Verlag,
im Druck.

²⁰⁾ K. Freudenberg u. L. Knof, unveröffentlicht. Matairesinol: R. D. Haworth,
J. chem. Soc. [London] 1942, 448.

Gewebe befindliche Glucosidase dauernd nachgeliefert. Es steht also immer wieder frischer Coniferylalkohol zur Verfügung. Bei der Befolgung dieses Prinzips *in vitro* haben wir tatsächlich Dehydrierungspolymerisate erhalten, die sich von den bisherigen in einigen Punkten unterscheiden²¹⁾. Die Azofarbe ist mehr gelb als rotgelb. Die sekundären Bausteine sind dieselben, aber unter ihnen überwiegt die Substanz III (60% und mehr).

Das Aufbauprinzip nach Schema III gibt, wenn es sich fortsetzt, die Möglichkeit zur Bildung phenolarmer Ligninfraktionen, und wir glauben, daß sich unter diesem Gesichtspunkt Abweichungen im Phenolgruppengehalt erklären lassen, die von verschiedenen Beobachtern festgestellt worden sind. Der Mehrgehalt an Wasser, der sich in der C₆-Einheit des Lignins im Vergleich zum Coniferylalkohol vorfindet, kann auf Komponente III oder ähnlichen Kombinationen beruhen. Der dehydrierte Sinapinalkohol ist nicht zu Kombinationen fähig, die dem Radikal IX entsprechen. Sein Übergang in Syringaresinol ist aus der Addition von Radikalen des Typus VII zu erklären. Die Umsetzung des dehydrierten Sinapinalkohols nach dem Schema VI + VII + Wasser, also entsprechend der Substanz III, dürfte eine der Reaktionen beim Einbau des Sinapinalkohols sein. Daß Laubholzlignin, eine Kombination von Coniferylalkohol und Sinapinalkohol, bei der Oxydation stets einen Mindergehalt an Vanillin gegenüber Syringaaldehyd ergibt, hängt mit der Gegenwart der Komponente I zusammen, die nur beim Coniferylalkohol möglich ist. Wenn Laubholzlignine sehr viel mehr Sinapinkomponente als Coniferinkomponente enthielten, müßte dies an einem höheren Methoxylgehalt als 22% zu erkennen sein.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir zu Dank verpflichtet für die Bereitstellung von Mitteln.

Herrn W. Otting danken wir für die Aufnahmen der Infrarot-Spektren, Herrn W. Eisenhut für die der UV-Spektren. Besonderen Dank schulden wir Fräulein S. Schwab für die Herstellung von Präparaten.

Beschreibung der Versuche

Isolierung der sekundären Bausteine

Die Lösung von 32 g Coniferylalkohol in möglichst wenig Aceton wird zu einer Mischung von 8 l Wasser und 4 l Citronensäure-Phosphat-Puffer (p_H 5, nach McIlaine²²⁾) gegeben. Das Aceton wird i. Vak. abdestilliert und eine wäßr. Lösung von 1000 Einheiten²³⁾ Champignonredoxase zugegeben. Durch die sich bald trübende Lösung wird bei 20° ein schwacher Sauerstoffstrom geleitet. Die Abnahme des Coniferylalkohols wird dadurch verfolgt, daß einige Tropfen der Lösung auf Filtrierpapier mit sehr verdünnter, frisch hergestellter, mit Natriumcarbonat neutralisierter Diazobenzolsulfonsäure-Lösung besprüht werden. Nach 5–6 Stdn. ist die violette Färbung des Coniferylalkohols kaum mehr wahrnehmbar. Das Dehydrierungspolymerisat wird abzentrifugiert (Ausb. bis zu 45%), die Lösung mit Natriumchlorid gesättigt und wiederholt mit Methylchlorid

²¹⁾ K. Freudenberg u. M. Reichert, unveröffentlicht.

²²⁾ Vergl. D'Ans-Lax, Taschenbuch f. Chemiker u. Physiker, Springer-Verlag, Berlin 1943, S. 1592.

²³⁾ K. Freudenberg, M. Reichert u. G. Reuther, unveröffentlicht. Eine Einheit ist die Menge Fermentpräparat, die in 40 Min. 120 mm³ Sauerstoff bei 25° auf 3 mg Dihydroferulasäure bei p_H 5.5 in 4 mm³ Pufferlösung überträgt.

(im ganzen 4–5 l) ausgeschüttelt, bis die wäbr. Phase nicht mehr mit Diazobenzolsulfonsäure reagiert. Die Methylenchlorid-Lösung wird unter schwach vermindertem Druck auf 2 l eingeeengt, mit Natriumsulfat getrocknet und weiter auf 600 ccm konzentriert. Sie wird mit etwa 250 ccm Petroläther (Sdp. 40°, über Natrium getrocknet) bis zur beginnenden Trübung versetzt und 12 Stdn. im Eisschrank aufbewahrt. Hierbei fällt der größte Teil der Komponente I zusammen mit einer geringen Menge III und Coniferylalkohol aus. Der Niederschlag wird in 250 ccm wäbr. Methanol (7 Vol.-Tle. Methanol, 3 Vol.-Tle. H₂O) gelöst. Beim Eindampfen unter vermindertem Druck unter Stickstoff kristallisiert der Dehydro-diconiferylalkohol (I) in weißen Nadeln aus. Die vom Methanol befreite Mutterlauge wird mit Kochsalz gesättigt und mit Methylenchlorid erschöpft, das getrocknet und mitsamt der Mutterlauge von der Petrolätherfällung i. Vak. verdampft wird.

Zur Herstellung des Phasensystems wird zur Mischung von 7 Vol.-Tln. Methanol und 3 Vol.-Tln. Wasser das gleiche Volumen Methylenchlorid gegeben. Der zu trennende Rückstand (etwa 10 g) wird in 150 ccm des Phasengemisches gelöst und in die ersten drei Röhren der Verteilungsapparatur²⁴⁾ gefüllt (200 Röhren für je 50 ccm Phasengemisch). Nach 270 Überführungen haben sich die Fraktionen in folgender Reihenfolge verteilt: II, IV, I, III. Die Trennung, die noch nicht vollständig ist, wird mit Hilfe der Diazoreaktion beobachtet. Die Fraktion III mit wenig I wird von IV, das einen Rest von II enthält, getrennt und jede nach erneuter Fällung der Apparatur durch weitere Überführungen gereinigt. Für III genügen 100 weitere Überführungen, IV benötigt 300. Die einzelnen Fraktionen werden unter Luftabschluß i. Vak. eingedampft.

Dehydro-diconiferylalkohol (I) kristallisiert nach dem Abdampfen des Methylenchlorids und Methanols aus und wird abgesaugt. Ein Rest von Coniferylalkohol und, falls vorhanden, eine geringe Menge einer rot kuppelnden Substanz ($R_F = 0.7$) bleiben in der wäbr. Mutterlauge. Nach Umkristallisieren aus Methylenchlorid-Petroläther wird der Dehydro-diconiferylalkohol in reinem Zustand erhalten; Schmp. 156–157°. Mit dem früher gewonnenen Präparat beträgt die Gesamtausbeute an I 8.2 g (26% d. Th., bez. auf Coniferylalkohol).

DL-Pinoresinol (II) kristallisiert nach dem Abdampfen des Methylenchlorids und Methanols gleichfalls vollständig aus. Rhombische Kristalle aus Ligroin; Schmp. 158°; Ausb. 4.3 g (13% d. Th., bez. auf Coniferylalkohol).

C₂₀H₂₂O₆ (358.4) Ber. C 67.02 H 6.19 OCH₃ 17.32 Gef. C 67.19 H 6.32 OCH₃ 17.53

Das Diacetat und der Bis-dinitrophenyläther stimmen mit den früheren Präparaten überein (Mischproben). Bei der Verseifung des Diacetats und der Spaltung des Bis-dinitrophenyläthers mit Hexamethyldiamin wurde in beiden Fällen das DL-Pinoresinol vom Schmp. 158° zurückgewonnen. Der früher angegebene Schmp. 111° konnte nicht reproduziert werden.

Guaajacyl-glycerin-β-coniferyläther (III) bleibt nach dem Abdampfen des Methylenchlorids und Methanols in Wasser gelöst. Nach Sättigung mit Kochsalz wird mit Methylenchlorid ausgeschüttelt, dieses mit Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. unter Luftabschluß eingedampft. Das amorphe rein weiße Präparat wiegt 2.8 g (9% d. Th., bez. auf Coniferylalkohol).

Der R_F -Wert in Wasser (mit Benzol gesättigt, aufsteigend) auf Whatman No. 1 beträgt 0.63^{13b)}. Am Olivil (Präparat von B. L. Vanzetti) haben wir denselben R_F -Wert gefunden.

C₂₀H₂₄O₇ (376.4)

Ber. C 63.82 H 6.43 OCH₃ 16.47 OH 18.08 phenol. OH 4.52 H₂-Aufnahme/Mol. 1.00

Gef. C 63.93 H 6.65 OCH₃ 16.25 OH 18.13 phenol. OH 5.28 H₂-Aufnahme/Mol. 1.04

Bei der Destillation mit 28-proz. Schwefelsäure spaltet die Substanz 1.35% Formaldehyd ab.

Ältere Präparate der Substanz III werden zur Abtrennung von Polymerisaten in der 2000fachen Menge 70-proz. Methanols gelöst, das Methanol wird i. Vak. bei gewöhnlicher

²⁴⁾ 200stufige Verteilungsapparatur der Firma H. Kühn, Glastechn. Werkstätten, Göttingen.

Temperatur abgedampft. Im zurückbleibenden Wasser fällt das Polymerisat aus, während die Substanz III in der Lösung bleibt, die mit Kochsalz gesättigt und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt wird, das beim Verdampfen i. Vak. die Substanz rein hinterläßt.

Guajacyl-glycerin- β -dihydroconiferyläther: Die Substanz III wird in Methanol mit Pd-BaSO₄ (5-proz.) hydriert. Die Lösung wird i. Vak. cingedampft und der Rückstand im oben gegebenen Phasengemisch durch 250 Überführungen gereinigt. Die wäbr. Lösung der Substanz wird mit Natriumchlorid gesättigt und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Beim Verdampfen des Methylenchlorids i. Vak. hinterbleibt die Substanz.

C₂₀H₂₆O₇ (378.4) Ber. C 63.48 H 6.93 OCH₃ 16.39 OH 17.96 phenol. OH 4.49
Gef. C 64.01 H 6.96 OCH₃ 16.25 OH 18.54 phenol. OH 5.03

Dinitrophenyläther: 2.3 g der hydrierten Substanz und 1.8 g Dinitrofluorbenzol werden in 100 ccm Aceton gelöst. Unter Rühren wird eine Lösung von 900 mg Natriumhydrogencarbonat in 50 ccm Wasser zugesetzt. Nach 4 bis 5 Stdn. ist die Reaktion mit Diazobenzolsulfonsäure verschwunden. Nach Zugabe von 200 ccm Wasser wird das Aceton i. Vak. entfernt. Dabei scheidet sich ein Öl ab, das in Methylenchlorid aufgenommen wird. Etwa vorhandenes Dinitrophenol bleibt in der wäbr. Lösung zurück. Das Methylenchlorid wird nach der Trocknung mit Natriumsulfat i. Vak. abgedampft. Der Rückstand wird in 50 ccm des oben beschriebenen Phasensystems aufgenommen, filtriert und in das erste Verteilungsgefäß gefüllt. Nach 718 Überführungen werden die den Dinitrophenyläther enthaltenden Röhren entleert. Beim Eindampfen i. Vak. kristallisiert die Substanz in farblosen Nadeln aus. Ausb. 2.5 g (76% d.Th.). Sie wird aus Äthanol/Wasser umkristallisiert; Schmp. 150° (Mischprobe mit dem synthet. Produkt^{25a}).

C₂₆H₂₈O₁₁N₂ (544.5) Ber. C 57.35 H 5.18 N 5.15 OCH₃ 11.40
Gef. C 57.41 H 5.31 N 5.34 OCH₃ 11.38

Der Dinitrophenyläther kann auch ohne Gegenstromverteilung gewonnen werden, wenn das Rohprodukt mit heißem, 5% Methanol enthaltendem Wasser ausgezogen wird. Nach Verdampfen des Methanols i. Vak. scheidet sich beim Abkühlen ein Öl aus, das nach 12 Stdn. kristallisiert; weiße Nadeln vom Schmp. 149–150°.

Coniferylaldehyd-2.4-dinitro-phenylhydrazon: Die Lösung von 30 mg der Substanz IV in 6 ccm Äthanol wird filtriert und mit der Lösung von 50 mg 2.4-Dinitro-phenylhydrazin in 6 ccm heißem Äthanol versetzt, dem einige Tropfen verd. Salzsäure zugegeben sind. Bei 50° kristallisiert das Hydrazon in roten Nadeln aus. Ausb. 50 mg (83% d.Th.). Das rohe Produkt wird in möglichst wenig warmem Tetrahydrofuran gelöst und nach Zugabe von 3 ccm Äthanol zur Kristallisation in den Eisschrank gebracht. Rote Nadeln vom Schmp. 246–248° (Zers.); Mischprobe mit synthet. Material²⁵).

C₁₈H₁₄O₆N₄ (358.3) Ber. C 53.64 H 3.94 N 15.64 Gef. C 53.61 H 4.19 N 15.25

Dehydrierungspolymerisat von III: 600 mg der Substanz III werden in 200 ccm Wasser, 100 ccm Citronensäure-Phosphat-Puffer p_H 5 (nach Mc Ilvaine) gelöst, mit der Lösung von 10 Einheiten Champignonredoxase versetzt und bei 20° 3 bis 4 Tage lang mit Sauerstoff belüftet. Das ausgeflockte Produkt löst sich mit brauner Farbe in wenig Aceton und wird daraus mit der 10fachen Menge Wasser gefällt. Nach 12 Stdn. wird zentrifugiert. Ausb. 480 mg eines rahmfarbenen Pulvers; OCH₃ gef. 15.53.

²⁵) K. Freudenberg u. R. Dillenburg, Chem. Ber. 84, 67 [1951].