

### 307. Karl Freudenberg und François Niedercorn: Anwendung radioaktiver Isotope bei der Erforschung des Lignins, VI\*<sup>1</sup>. Herkunft der Isohemipinsäure

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

(Eingegangen am 14. Juni 1956)

Dehydrierungspolymerisat (DHP) aus Coniferylalkohol, der am mittelständigen Kohlenstoff der Seitenkette radioaktiv markiert ist, ergibt nach der Behandlung mit Alkali, Methylierung und Oxydation Isohemipinsäure (VIII) von der erwarteten Radioaktivität. Eben solche Isohemipinsäure, allerdings in geringerer Menge, wird erhalten, wenn unmittelbar mit Diazomethan methyliert wird. DHP, das mit Salzsäure behandelt war, ergibt inaktive Metahemipinsäure (IX). Die Isohemipinsäure entstammt zum einen Teil der als Dehydro-diconiferylalkohol (I) erkannten Ligninkomponente, zum anderen Teil einer sehr ähnlichen Anordnung mit freiem, nicht ringgebundenem Phenolhydroxyl. Von einer Diphenylverbindung nach Art des Dehydro-dieugenols (XII) kann die Isohemipinsäure nicht herkommen.

Künstliches Lignin (DHP) läßt sich auf zwei Wegen herstellen. Nach dem älteren bisher geübten Verfahren, das wir Zulaufverfahren nennen wollen, läßt man die verdünnte wäßrige Lösung des Coniferylalkohols rasch zu der Enzymlösung zulaufen. Das Enzym befindet sich also von vornherein dem gesamten Vorrat an Coniferylalkohol gegenüber und verwandelt ihn langsam in die früher geschilderten, hauptsächlich dimeren Umwandlungsprodukte, die sekundären Bausteine, die durch weitere nach Dehydrierung erfolgende Kondensation in DHP übergehen. Nach dem neuen Verfahren, das wir Zutropfverfahren nennen, wird die verdünnte wäßrige Lösung des Coniferylalkohols in dem Maße zu der vorgegebenen Fermentlösung zugetropft, wie der Coniferylalkohol verbraucht wird. Wir glauben, daß dieses Verfahren dem natürlichen Vorgang näher kommt. Der Coniferylalkohol befindet sich jeweils in äußerster Verdünnung dem gesamten Fermentvorrat gegenüber. Die hierbei gebildeten sekundären Bausteine sind die gleichen, aber sie entstehen in einem anderen Mengenverhältnis. In beiden Fällen bilden die bisher erfaßten sekundären Bausteine: Dehydro-diconiferylalkohol (I), DL-Pinoresinol (II) und Guajacylglycerin-coniferyläther (III)<sup>1</sup> schätzungsweise 80% der Umwandlungsprodukte. Beim Zutropfverfahren überwiegt der Guajacylglycerin-coniferyläther bei weitem. Neuerdings wurde der Rest von schätzungsweise 20% der Umwandlungsprodukte genauer untersucht<sup>2</sup>). Er enthält außer dem schon früher in kleinster Menge festgestellten Coniferylaldehyd (IV) eine größere Zahl weiterer Produkte, die zumeist dimer sein dürften. Über sie soll später berichtet werden. Die Angaben über die Mengenverhältnisse beziehen sich auf die niedrigmolekularen Anteile. Daneben entsteht nach beiden Verfahren

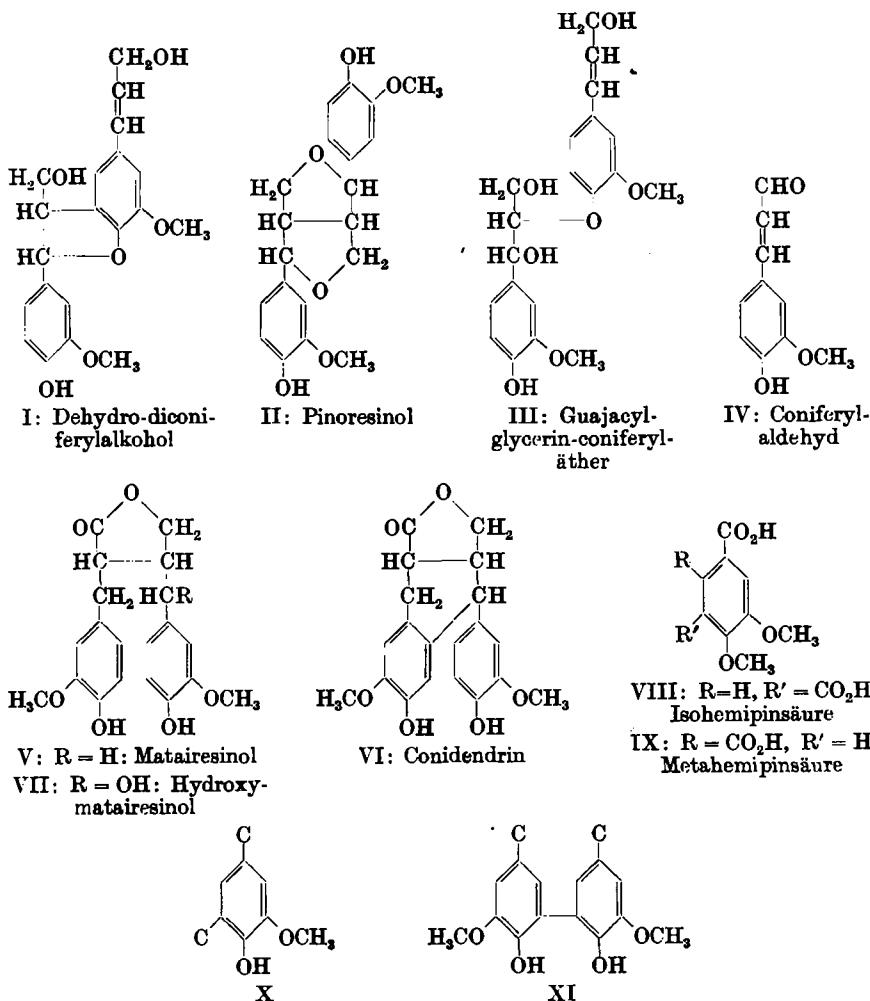
\*<sup>1</sup>) V. Mitteil.: K. Freudenberg u. M. Reichert, Chem. Ber. 87, 1834 [1954].

<sup>1</sup>) Zusammenstellung: K. Freudenberg, Angew. Chem. 68, 84 [1956].

<sup>2</sup>) Nach unveröffentlichten Versuchen von B. Lehmann u. Erich Fischer.

ein höhermolekularer Anteil, der dem natürlichen Lignin näher kommt und beim Zutropfverfahren in größerer Menge anfällt als beim Zulaufverfahren.

Wie schon früher erwähnt, sind wir denselben dimeren Bestandteilen, und zwar den Substanzen I–IV, sowie einem Teil der weiteren im Cambialsaft begegnet, wenn er mit den in der Verholzung begriffenen äußersten Schichten des Fichtenholzes in Berührung war. Im löslichen Lignin (Brauns-Lignin) sind vorwiegend andere Bestandteile vorhanden, darunter wenig Matairesinol (V), Conidendrin (VI) und vor allem eine weitere Komponente, die wir ebensowenig wie V und VI in den Dehydrierungspolymerisaten angetroffen haben und einstweilen als Hydroxymatairesinol (VII) bezeichnen<sup>1,3)</sup>. Dieses besteht aus mindestens zwei Komponenten, von denen eine optisch aktive durch Säure in Conidendrin (VI) verwandelt werden kann und als dessen Vorstufe anzusehen ist.



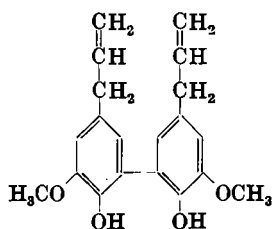
<sup>3)</sup> Unveröffentlichte Versuche von L. Knof.

Für die vorliegende Untersuchung ist wichtig, daß außer den gekennzeichneten Komponenten I bis IV in geringerer Menge noch weitere Umwandlungsprodukte des Coniferylalkohols vorkommen und für die Ligninbildung in Betracht gezogen werden müssen. Weitere Bindungstypen entstehen durch die fortgesetzte Dehydrierungskondensation der zahlreichen festgestellten sekundären Bausteine untereinander. Somit ist für die Gegenwart bisher unbekannter Verknüpfungstypen im Lignin reichlicher Raum gegeben.

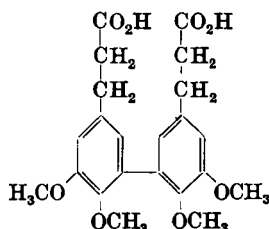
Für das Vorkommen solcher nach den sekundären Bausteinen I bis IV nicht erklärbarer Kombinationen liegen drei verschiedene Anzeichen vor:

1. H. Richtzenhain<sup>4)</sup> hat gefunden, daß Isohemipinsäure (VIII) auch dann entsteht, wenn Fichtenlignin ohne Vorbehandlung mit Alkali mit Diazomethan methyliert und oxydiert wird. Die Menge ist gering (1–1.5%); wir hatten seinerzeit Isohemipinsäure in etwas größerer Menge (3–4%) gefunden, als wir Holz, Lignin oder synthetisches Lignin mit starkem Alkali behandelten, methylierten und oxydierten. Die Isohemipinsäure entstammt daher zwei Quellen. Die eine ist der sekundäre Baustein I, dessen Ring mit Alkali aufgesprengt wird, wonach durch Methylierung und Oxydation Isohemipinsäure entsteht. Die zweite Quelle muß jedoch eine Gruppierung X sein, in der die Methylierung mit Diazomethan genügt, um durch nachfolgende Oxydation Isohemipinsäure entstehen zu lassen.

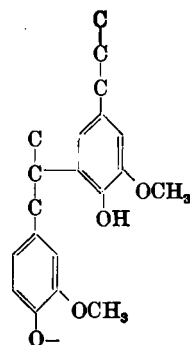
2. Eine weitere Kombination, die in den Verbindungen I bis IV nicht vorhanden ist, hat J. C. Pew<sup>5)</sup> nachgewiesen. Sie besteht in einem Diphenylderivat der Anordnung XI. Pew hat gefunden, daß bei dem Abbau des Lignins mit Nitrobenzol und Alkali Dehydrodivanillin in geringen Mengen entsteht. Er schließt aus Modellversuchen, daß die Diphenylbindung im Lignin präformiert ist. Schon H. Cousin und H. Hérissé<sup>6)</sup> haben 1908 festgestellt, daß Eugenol bei der enzymatischen Dehydrierung in reichlichen Mengen Dehydro-dieugenol (XII) bildet neben amorphen Produkten. Nach H.



XII: Dehydro-dieugenol



XIII: Dimethyldehydro-bis-dihydroferulasäure



XIV

Richtzenhain<sup>7)</sup> gibt Dimethyldehydro-bis-dihydroferulasäure (XIII) mit Permanganat 6.3% Isohemipinsäure und 48% Dehydro-dieugenol.

<sup>4)</sup> Acta chem. scand. 4, 206, 589 [1950].

<sup>5)</sup> J. Amer. chem. Soc. 77, 2831 [1955].

<sup>6)</sup> Bull. Soc. chim. France [4] 8, 1070 [1908].

<sup>7)</sup> Chem. Ber. 82, 447 [1949].

Bei der Dehydrierung mit Fermenten wurde bei *p*-Kresol, Äthylguajacol, Propylguajacol und Dihydroconiferylalkohol Diphenylbindung beobachtet. Das Dehydrierungsprodukt von Guajacylaceton, Ferulasäure und Dihydroferulasäure enthält geringe Mengen Diphenylkörper, die nach der Methylierung Isohemipinsäure bilden. Wir haben früher die Möglichkeit erörtert, daß Isohemipinsäure aus solchen Diphenylverbindungen entstehen könnte. Für die Entstehung der Isohemipinsäure nach der Behandlung mit Diazomethan kommen demnach die unter 1. und 2. geschilderten Wege in Betracht.

3. Weitere Anzeichen für das Vorkommen noch unbekannter Gruppierungen können erblickt werden in den Versuchen von G. Aulin-Erdtman<sup>8)</sup>. Während titrimetrische und chemische Verfahren übereinstimmend ergeben haben, daß im Lignin und in künstlichen Dehydrierungspolymerisaten (DHP) auf die ursprüngliche C<sub>6</sub>-Einheit des Phenylpropankörpers 0.3–0.4 Phenolhydroxyl kommt<sup>9)</sup>, findet Aulin-Erdtman nach ihrem optischen Verfahren nur 0.2–0.3 Phenolhydroxyl. Die schwedische Autorin stützt sich auf die ältere Feststellung, daß die Maxima der Ultraviolettpektren von Phenolen in der Intensität verändert und gegen das Gebiet der längeren Wellen verschoben werden, wenn sie im alkalischen Gebiet gemessen werden. Aus der Größe der Veränderung kann an Hand geeigneter Modelle auf die Menge der vorhandenen Phenolgruppen geschlossen werden. Wenn sterisch oder elektrostatisch behinderte Phenolgruppen vorkommen, vermindert sich der Effekt<sup>10)</sup>. Das ist der Fall bei den Hydrierungsprodukten des Dehydro-dieugenols XII und vielleicht noch weiteren Kombinationen. Der Unterschied zwischen optischer und titrimetrischer Phenolgruppenbestimmung kann aus den sekundären Ligninbausteinen I–IV nicht erklärt werden und zwingt zur Annahme weiterer Gruppierungen.

In dieser Arbeit wird die Frage beantwortet, welchem Kohlenstoffatom die Carboxylgruppe 5 der Isohemipinsäure (VIII) entstammt. Bereits früher haben K. Freudenberg und F. Bittner<sup>11)</sup> Coniferylalkohol (<sup>14</sup>CH<sub>2</sub>OH) in Dehydrierungspolymerisat verwandelt und daraus durch Behandlung mit starkem Alkali, Methylierung und Oxydation Isohemipinsäure hergestellt. Sie enthielt fast keinen radioaktiven Kohlenstoff. Wir haben jetzt Coniferylalkohol verwendet, der in der Mittelstellung der Seitenkette markiert ist (Coniferylalkohol-[β<sup>14</sup>CH]). Die Methylierung des DHP erfolgte ohne und mit Behandlung mit Alkali. Im ersten Falle wurden 0.9 % Isohemipinsäure gewonnen, die die volle erwartete Radioaktivität besaß. Im anderen Falle wurden 2–3 % ebensolcher Isohemipinsäure gewonnen. Der Anteil an Isohemipinsäure, der nach Alkalibehandlung entsteht, entstammt der DHP-Komponente Dehydro-diconiferylalkohol (I), während für die ohne Alkali entstehende Isohemi-

<sup>8)</sup> Svensk Papperstidn. 55, 745 [1952]; 56, 91, 287 [1953]; 57, 745 [1954].

<sup>9)</sup> S. Hernestam u. E. Adler, Svensk kem. Tidskr. 67, 37 [1955]; K. Freudenberg u. K. Dall, Naturwissenschaften 42, 606 [1955]; T. Enkvist, B. Alm u. B. Holm, Papperi ja Puu 38, 1 [1956].

<sup>10)</sup> N. D. Coggeshall u. A. S. Glessner, J. Amer. chem. Soc. 71, 3150 [1949]; J. J. Lindberg u. T. Enkvist, Suomen Kemistilehti B 28, 23 [1955].

<sup>11)</sup> Chem. Ber. 86, 155 [1953].

pinsäure eine Komponente XIV anzunehmen ist, die der Verbindung I, jedoch mit geöffnetem Heterocyclus, entspricht und aus theoretischen Gründen erwartet werden darf.

Bekanntlich läßt sich aus dem DHP wie aus dem Lignin Formaldehyd abspalten, wenn es mit starker Mineralsäure gekocht wird. Dieser Formaldehyd ist radioaktiv, wenn am Carbinol markierter Coniferylalkohol verwendet wird<sup>11)</sup>. In unserem Falle war er wie zu erwarten inaktiv.

Wenn DHP oder Lignin mit Salzsäure vorbehandelt werden, treten zusätzliche Kondensationen ein. Bei der Aufarbeitung auf Isohemipinsäure entsteht jetzt neben dieser in geringen Mengen Metahemipinsäure (IX)<sup>4, 12)</sup>. Sie ist teilweise radioaktiv<sup>11)</sup>, wenn am Carbinol markierter Coniferylalkohol verwendet war. In unserem Falle war sie inaktiv. An der Bildung der Metahemipinsäure ist also das mittelständige Kohlenstoffatom nicht beteiligt, das primäre zum Teil. Die Salzsäure bewirkt demnach sowohl eine Kondensation primärer Carbinolgruppen in die 6-Stellung von Guajacylkernen, zum anderen Teil muß das dem Guajacylkern benachbarte Kohlenstoffatom Kondensation mit der 6-Stellung eines anderen Kernes erleiden, wie dies die Lignane tun. Vielleicht sind an der Bildung der Metahemipinsäure Gruppierungen beteiligt, die dem Pinoresinol nahestehen.

Für die Unterstützung der Arbeit sind wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft zu lebhaftem Danke verpflichtet.

#### Beschreibung der Versuche

Mittelständig markierter Coniferylalkohol<sup>13)</sup>: Die Mischung von 450 mg Acetylvainillin, 185 mg markierter Malonsäure ( $2 \cdot 10^7$  Imp/mMol·min), 2 ccm Pyridin und 2 Tropfen Anilin wird 8 Stdn. auf 60° erwärmt und anschließend in ein Gemisch aus 2 ccm konz. Salzsäure und 8 ccm Wasser gegossen. Ausb. 388 mg Acetylferulasäure (90%). Sie wird mit 2 ccm über Leinöl destilliertem Thionylchlorid, einem Tropfen Pyridin und 5 ccm Benzol 2 Stdn. auf 75° erwärmt. Im Vak. wird ein trockener Rückstand erhalten, der mit Petroläther gewaschen und aus Benzol umkristallisiert wird. Erhalten werden 370 mg Acetylferulasäurechlorid (89%), Schmp. 147–149°. Das Chlorid muß alsbald verarbeitet werden. Es wird in 5 ccm Benzol und 30 ccm Tetrahydrofuran gelöst. Im Lauf von 20 Min. wird hierzu bei 20° die Lösung von 120 mg LiAlH<sub>4</sub> in 30 ccm Tetrahydrofuran gegeben. Nach 24 Stdn. wird das abfiltrierte Anlagerungsprodukt in eine Lösung von 22 mg Ammoniumcarbonat in 10 ccm Wasser in Gegenwart einer Spur Natriumdithionit eingetragen. Danach wird mit Äther extrahiert, getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird aus Methylenechlorid-Petroläther umkristallisiert und ergibt 216 mg Coniferylalkohol (81%), Schmp. 72°.

Dehydrierungspolymerisat (DHP): Zur Lösung von 150 mg des aktiven Coniferylalkohols in 5 l Wasser werden 7 g inaktiver Coniferylalkohol gegeben. Die Lösung wird, wenn nötig, von einer kleinen Menge ungelöster Substanz filtriert, mit 1 l Phosphatpuffer  $p_H$  7 nach Sörensen und 5000 Einheiten Champignon-Dehydrase (350 mg Trockenferment<sup>14)</sup>) versetzt. Während 5 Tagen wird bei 15° ein Sauerstoffstrom mit Hilfe von Glasfritten durchgeleitet. Das gebildete DHP wird abzentrifugiert, mit wenig Wasser gewaschen, getrocknet, in wenig Aceton gelöst und mit Benzol gefällt. Ausb. 5.6 g (80%). Die spezifische Aktivität beträgt 402000 Imp/mMol·min (auf ein Äquivalent von 188 berechnet).

<sup>12)</sup> H. Richtzenhain, Svensk Papperstidn. **53**, 644 [1950].

<sup>13)</sup> K. Kratzl u. G. Billek, Mh. Chem. **84**, 413 [1953].

<sup>14)</sup> K. Freudenberg, M. Reichert u. G. Reuther, Angew. Chem. **68**, August 1956.

Isohemipinsäure<sup>15</sup>): 2 g DHP wurden mit Kalilauge aufgeschlossen, methyliert und mit Permanganat bei  $p_H$  7 (durch Tüpfeln kontrolliert) oxydiert. Ausbeute 53 mg chromatographisch reiner Isohemipinsäure; Schmp. 245°, spezif. Aktivität 385000 Imp/mMol·min. Die ebenfalls rein isolierte Veratrumsäure besaß keine Aktivität.

1.5 g radioaktives DHP wurde in Aceton mit 25 ccm äther. Diazomethanlösung versetzt. Nach 24 Stdn. wurde eingedampft, das Methylprodukt in wenig Aceton aufgeschlämmt und wiederum mit äther. Diazomethanlösung behandelt. Diese Operation wurde noch zweimal wiederholt. Jetzt wurde in wenig Aceton aufgeschlämmt, mit Wasser versetzt und die Suspension bei  $p_H$  7 mit fein gepulvertem Kaliumpermanganat oxydiert. Ausb. 13.5 mg aktive Isohemipinsäure (0.9%). Sie war chromatographisch rein. Die spezif. Radioaktivität war 382000 Imp/mMol·min, also 95% derjenigen des aktiven DHP.

Metahemipinsäure: 2.5 g DHP der spezif. Aktivität 402000 wurden mit einem Gemisch von 25 ccm Methanol und 3 ccm konz. Salzsäure 10 Stdn. gekocht. Nach dem Abdampfen wurde der Rückstand in Aceton aufgeschlämmt und durch Zusatz von Wasser in eine Suspension verwandelt. Jetzt wurde mit Dimethylsulfat und Natronlauge methyliert. Die Oxydation ergab 21 mg Metahemipinsäure, die zur Abtrennung der Isohemipinsäure fünfmal aus Wasser umkristallisiert werden mußte. Sie war chromatographisch rein (Schmp. 174°) und zeigte nur noch Spuren von Radioaktivität, die zweifellos auf letzte Reste von Isohemipinsäure zurückzuführen waren.

Formaldehyd<sup>16</sup>): 500 mg radioaktives DHP wurden mit 28-proz. Schwefelsäure destilliert. Der Formaldehyd wurde mit Dimedon gefällt. Das Formaldimedon zeigte nur Spuren von Aktivität.

Chromatographie: Die zu trennenden Säuren: Veratrumsäure, Dehydro-diveratrumsäure, Isohemipinsäure und Metahemipinsäure werden absteigend in Butanol/Wasser/Morpholin (100:15:10 Vol.) chromatographiert. Als Entwickler dient eine kalt gesättigte alkohol. Lösung von Bromkresolgrün, der 10 Vol. einer gesätt. wäßrigen Lösung von Kaliumhexacyanoferrat(II) zugesetzt werden. Nach 2–3 Tagen Laufzeit werden die Chromatogramme besprüht und etwa 20 Min. bei 150° getrocknet. Isohemipinsäure gibt einen ziegelroten, Metahemipinsäure einen blauen Fleck: Veratrumsäure und Dehydro-diveratrumsäure erscheinen blaugrün. Die  $R_F$ -Werte auf Papier von Schleicher & Schüll 2043a Mgl sind: Veratrumsäure 0.65; Metahemipinsäure 0.35; Isohemipinsäure 0.25; Dehydro-diveratrumsäure 0.10. Im Chromatogramm erscheint außerdem der violette Fleck einer unbekanntenen Substanz von  $R_F$  0.45.

<sup>15</sup>) K. Freudenberg, K. Engler, E. Flickinger, A. Sobek u. F. Klink, Ber. dtsh. chem. Ges. 71, 1810 [1938].

<sup>16</sup>) K. Freudenberg u. G. Wilke, Chem. Ber. 85, 81 [1952].