

## KARL FREUDENBERG und FRANÇOIS NIEDERCORN\*)

Anwendung radioaktiver Isotope bei der Erforschung des Lignins, VIII \*\*)

### Umwandlung des Phenylalanins in Coniferin und Fichtenlignin

Aus dem Chemischen Institut der Universität und dem Forschungsinstitut für die Chemie des Holzes und der Polysaccharide, Heidelberg  
(Eingegangen am 13. Dezember 1957)

Wenn jungen Fichtenstämmen Phenylalanin- $[^{14}\text{C}]\text{HNH}_2$ ] eingegeben wird, läßt sich schon nach zwei bis drei Tagen oberhalb der Eintrittsstelle radioaktives Coniferin isolieren. Damit ist bewiesen, daß Coniferin die Durchgangsstufe für das Fichtenlignin ist und daß es an der Stelle seiner Verwendung gebildet wird. Lignin, das nach Eingabe des gleichen Phenylalanins gewachsen ist, liefert nach Behandlung mit Diazomethan und Oxydation 1% radioaktive Isohemipinsäure; wird vor der Methylierung mit starkem Alkali behandelt, so entstehen 3–4% radioaktive Isohemipinsäure. Dehydrierungspolymerisat (DHP) aus Coniferylalkohol- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]\text{H}$ ] bildet dieselbe radioaktive Säure in denselben Ausbeuten. Fichtenlignin und DHP stimmen in diesem wichtigen Punkt – wie in vielen anderen – vollkommen überein. Im Cambialgebiet des Flieders wurde neben dem dort längst angetroffenen Syringin auch Coniferin gefunden.

Vor einigen Jahren haben S. A. BROWN und A. C. NEISH<sup>1)</sup> gezeigt, daß radioaktives Phenylalanin, in die Stengel von *Weizen* eingegeben, im Lignin fixiert wird und daß dieses Lignin bei der Oxydation mit Alkali und Nitrobenzol die auch sonst aus Getreidelignin erhältlichen Aldehyde: *p*-Hydroxy-benzaldehyd, Vanillin und Syringaaldehyd in radioaktiver Form liefert. Nach Eingabe von Phenylalanin in *Ahorn* wurden die beiden letztgenannten Aldehyde erhalten. Damit war bewiesen, daß der Benzolkern des Phenylalanins in hydroxylierter und methoxylierter Form in das Lignin eingebaut wird. Wir haben vor einiger Zeit gefunden<sup>2)</sup>, daß im Aglykon radioaktives Glucovanillin, im Tauchtrieb<sup>3)</sup> durch die Nadeln in *Fichten* eingegeben, nur *scheinbar* ein radioaktives Lignin liefert. Denn obwohl der radioaktive, vom Vanillin herstammende Teil fest in das Lignin eingebaut war, lag er dennoch nicht in Gestalt eines Ligninbausteins der Gruppe  $\text{C}_6\text{C}_3$  vor, da er bei der Alkohololyse nicht Hibberts Ketone liefert. Alle Versuche, die Umwandlung eines Bausteines in Lignin durch Aboxydation zu den genannten  $\text{C}_6\text{C}_1$ -Aldehyden nachzuweisen, müssen daher mit einem gewissen Vorbehalt aufgefaßt werden; der wirkliche Beweis ist erst er-

\*) Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT sind wir für die Gewährung von Mitteln zu lebhaftem Dank verpflichtet.

\*\*) VII. Mitteil. (versehentlich mit VI. beziffert): K. FREUDENBERG und F. NIEDERCORN, Chem. Ber. **89**, 2168 [1956]; VI. Mitteil.: W. FUCHS, Chem. Ber. **88**, 1825 [1955].

<sup>1)</sup> Canad. J. Biochem. Physiol. **32**, 170 [1954]; **33**, 948 [1955]; **34**, 769 [1956]; Nature [London] **175**, 688 [1955]; S. A. BROWN, K. G. TANNER und J. E. STONE, Canad. J. Chem. **31**, 755 [1953].

<sup>2)</sup> K. FREUDENBERG, Angew. Chem. **68**, 92, 510 [1956].

<sup>3)</sup> K. FREUDENBERG, Z. REZNIK, W. FUCHS und M. REICHERT, Naturwissenschaften **42**, 29 [1955].

bracht, wenn gezeigt wird, daß der radioaktive Anteil als  $C_6C_3$ -Körper in dem Lignin vorhanden ist und Hibberts Ketone bilden kann.

Wir haben vor einiger Zeit radioaktives Phenylalanin durch den Tauchtrieb *Fichten* eingegeben und ein radioaktives Lignin erhalten, das radioaktive Hibbert-Ketone ergab<sup>4)</sup>. Phenylalanin kann also von der Fichte zum Aufbau des Lignins verwendet werden. Ob das Phenylalanin selbst oder die ihm nahestehende Phenylbrenztraubensäure oder Zimtsäure das wirkliche Durchgangsprodukt der Ligninbildung in Coniferen ist, bleibt dahingestellt.

Inzwischen haben wir den Versuch erweitert. Wird radioaktives Phenylalanin der Fichte eingegeben, so ist der größte Teil der radioaktiven Substanz nach 6–8 Tagen in das zu jener Zeit gerade in der Verholzung begriffene Gewebe fest eingelagert. Unterbricht man aber den Versuch zwei bis drei Tage nach der Eingabe, so ist noch ein großer Teil der radioaktiven Substanz in löslicher Form im Gewebe enthalten. Er kristallisiert mit dem Coniferin aus, und dieses behält auch nach wiederholter Umkristallisation die Radioaktivität in konstanter Stärke bei. Es hat sich also aus dem Phenylalanin zunächst Coniferin gebildet<sup>5)</sup>, das dann im Verlauf eines länger dauernden Versuches in Lignin verwandelt wird. Damit ist die zentrale Stellung des Coniferins bei der Bildung des Coniferenlignins bewiesen. Das Coniferin ist ein Depot, aus dem das in der Verholzung begriffene Gewebe mit Coniferylalkohol beliefert wird. Zugleich ist bewiesen, daß das Coniferin in kurzer Zeit und in nächster Nähe seiner Verwendungsstelle entsteht.

Das radioaktive Coniferin aus Phenylalanin wurde mit Emulsin gespalten. Das Aglykon war radioaktiv. Mit dem so gewonnenen Coniferylalkohol wurde in Gegenwart von Pilzlaccase<sup>6)</sup> und Luftsauerstoff ein Dehydrierungsversuch unternommen. Sämtliche Zwischenstufen der Ligninbildung traten auf, und zwar in radioaktiver Form.

1936 wurde gezeigt<sup>7)</sup>, daß man aus Fichtenlignin Isohemipinsäure (3,4-Dimethoxy-5-carboxy-benzoesäure) gewinnen kann, wenn es mit starkem Alkali erhitzt, dann methyliert und oxydiert wird. Die Ausbeute beträgt 3–4%. Man kann auch das mit Aceton/Wasser (9:1 Vol.-Tle.) extrahierte Fichtenholz ohne vorherige Isolierung des Lignins in der geschilderten Weise auf Isohemipinsäure verarbeiten. Außerdem hat H. RICHTZENHAIN<sup>8)</sup> gefunden, daß eine geringe Menge Isohemipinsäure (1–1,5%) auch dann entsteht, wenn das Ligninpräparat ohne die Vorbehandlung mit Alkali mit Diazomethan methyliert und dann oxydiert wird. Ferner hat Richtzenhain gezeigt, daß Ligninpräparate, die zunächst mit starker Säure in Berührung waren und dann auf Isohemipinsäure verarbeitet wurden, neben dieser einen kleinen Betrag (1%) von Metahemipinsäure (3,4-Dimethoxy-6-carboxy-benzoesäure) liefern. In der ersten Arbeit dieser Versuchsreihe<sup>9)</sup> wurde gezeigt, daß ein biosynthetisches Lignin (DHP),

4) K. FREUDENBERG, *Angew. Chem.* **68**, 92 [1956].

5) K. FREUDENBERG, *Ind. Engng. Chem.* **49**, 1384 [1957].

6) K. FREUDENBERG und Mitarbb., *Chem. Ber.* **91**, 581 [1958], vorstehend.

7) K. FREUDENBERG, A. JANSON, E. KNOPF und A. HAAG, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **69**, 1415 [1936].

8) *Acta chem. scand.* **4**, 206, 589 [1950].

9) K. FREUDENBERG und F. BITTNER, *Chem. Ber.* **86**, 155 [1953].

das aus Coniferylalkohol-[ $^{14}\text{C}\text{H}_2\text{OH}$ ] hergestellt war, zwar radioaktiven Formaldehyd abspaltet, aber inaktive Isohemipinsäure liefert. Die Metahemipinsäure erwies sich dagegen als radioaktiv, wenn auch nicht in der erwarteten Stärke. Daraus wurde gefolgert, daß das endständige Kohlenstoffatom des Coniferylalkohols an der Bildung der Isohemipinsäure nicht, an der Entstehung der Metahemipinsäure zum Teil beteiligt ist.

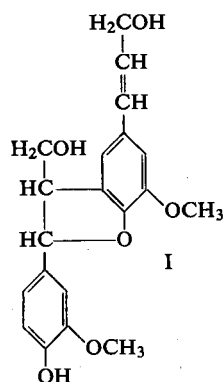
Bei der Fortsetzung dieser Versuche<sup>10)</sup> wurde ein Dehydrierungspolymerisat aus Coniferylalkohol-[ $\beta\text{-}^{14}\text{C}\text{H}$ ] verwendet. Es liefert nach der Methylierung mit Diazomethan ohne Vorbehandlung mit Alkali gegen 1 % Isohemipinsäure, die die erwartete Radioaktivität besitzt. Als mit Alkali vorbehandelt, dann methyliert und oxydiert wurde, entstand eine Isohemipinsäure in der üblichen höheren Ausbeute, die gleichfalls die volle erwartete Radioaktivität besaß. In beiden Fällen entstammt daher das Kohlenstoffatom der 5-ständigen Carboxylgruppe der Isohemipinsäure dem  $\beta$ -ständigen Kohlenstoff eines benachbarten Coniferylsystems. Aus der Höhe der Radioaktivität der Isohemipinsäure darf geschlossen werden, daß keine oder fast keine anderen Kohlenstoffatome als das  $\beta$ -Kohlenstoffatom an der Bildung der Isohemipinsäure beteiligt sind.

Es besteht kein Grund zu bezweifeln, daß der in das DHP eingebaute Dehydro-diconiferylalkohol (I) die hauptsächlichste Quelle für die nach der Alkalibehandlung gebildete Isohemipinsäure ist. Für den geringen Teil, der ohne Alkalibehandlung Isohemipinsäure liefert, muß eine Komponente im DHP vorliegen, die nicht wie der Dehydro-diconiferylalkohol zum Ring geschlossen ist. Ihr Anteil am DHP muß gering sein. Für die Metahemipinsäure, die einem durch Säure entstandenen Sekundärprodukt entstammt, ist vermutlich, teilweise wenigstens, das in das Lignin eingebaute Pinoresinol die Quelle. Pinoresinol selbst, das nacheinander mit starker Säure und Alkalien behandelt, methyliert und oxydiert wird, liefert geringe Mengen an Metahemipinsäure.

Acetonlösliches Lignin nach F. E. BRAUNS liefert im Gegensatz zu MW-Lignin nach BRÖCKMAN und zu unserem biosynthetischen Lignin auch *ohne* Säurebehandlung sehr geringe Mengen von Metahemipinsäure, die wohl freiem und eingebautem Conidendrin<sup>11)</sup> entstammt.

Die Feststellung, daß Phenylalanin von der Fichte in Coniferin verwandelt wird, ist eine starke Stütze für unsere seit langem vertretene Auffassung, daß die Bildung des Lignins in der Pflanze nach der glucosidischen Spaltung des Coniferins denselben Weg geht wie die Biosynthese des Lignins aus Coniferylalkohol *in vitro*.

Wenn das zutrifft, muß auch radioaktive Isohemipinsäure mit und ohne Alkalibehandlung aus Fichtenholz entstehen, das nach Eingabe von  $\beta$ -ständig markiertem



10) VII. Mittel.: K. FREUDENBERG und F. NIEDERCORN, Chem. Ber. 89, 2168 [1956].

11) K. FREUDENBERG und L. KNOF, Chem. Ber. 90, 2857 [1957].

Phenylalanin gewachsen ist. Dem Versuch diente Fichtenholz, das nach Eingabe von solchem Phenylalanin gewachsen und gründlich von löslichen Anteilen befreit war. Die Erwartung hat sich vollauf erfüllt: der Versuch verlief auch hinsichtlich der Ausbeute der nach beiden Verfahren gewonnenen, radioaktiven Isohemipinsäure genau wie beim biosynthetischen Lignin aus Coniferylalkohol- $[\beta\text{-}^{14}\text{CH}]$ . Die Tatsache, daß trotz der geringen Ausbeute an Isohemipinsäure diese auch nach der Verdünnung eine ziemlich hohe Radioaktivität zeigte, läßt erkennen, daß bereits nach 4 Tagen viel von dem aus Phenylalanin entstandenen Coniferin zu Lignin weiterverarbeitet worden war. Demnach bildet sich das Lignin in kurzer Zeit.

Außer mit radioaktivem Phenylalanin wurde der Versuch mit  $\beta$ -ständig markiertem Coniferin am Fichtenholz durchgeführt<sup>12)</sup>. Das Holzmehl wurde auf beiden Wegen auf radioaktive Isohemipinsäure verarbeitet. Das Ergebnis war dasselbe.

Wir haben vor kurzem<sup>5,13)</sup> eine Anzahl der Gründe angeführt, die uns aussagen lassen, daß unser biosynthetisches Lignin und das natürliche soweit übereinstimmen, wie man dies bei höchst komplizierten amorphen Produkten erwarten darf. Die Bildung der Isohemipinsäure ist ein neues, eindringliches Beispiel dafür. Wenn man bedenkt, daß sich die eine Reaktion auf dem Laboratoriumstisch abspielt, die andere in Gegenwart des Protoplasmas und der Zellwände der lebenden Fichte, so muß diese Übereinstimmung überraschen<sup>13a)</sup>.

Die chemischen Vorgänge im Cambium wären weit feiner zu erfassen, wenn es gelänge, die Cambiumzellen unverändert aus ihrer Umgebung herauszupräparieren. Was man Cambialsaft nennt, ist der Saft des Gewebes, das aus dem Cambium selbst und den lebenden Zellreihen beiderseits des Cambiums besteht. Will man die Zusammensetzung kennenlernen, so muß man zur Abtötung der Enzyme die Innenseite der Rinde und den freigelegten Stamm sofort mit Formalinlösung abwaschen. Dieser Saft wird zentrifugiert, im Vakuum eingeengt und vom auskristallisierenden Coniferin befreit. In seiner Mutterlauge befinden sich nach der Menge geordnet D-Mannit, Rohrzucker und wenige andere Zucker sowie restliches Coniferin. Chinasäure und Coniferylalkohol sind in kleinen Mengen vorhanden, ferner unbekannte hydroxylreiche oder höher polymere gelb oder gelb-orange kuppelnde Substanzen. Außerdem finden sich Hydroxy-matairesinol<sup>11)</sup> und Pinoresinol (die vielleicht aus den Harz-

12) Wir danken Herrn A. SAKAKIBARA für die Mitarbeit.

13) K. FREUDENBERG, Ruzicka-Festschrift, Croat. chem. Acta 29, 189 [1957].

13a) *Ann. b. d. Korr.*: Deshalb ist es nicht verwunderlich, daß K. KRATZL, G. BILLEK, E. KLEIN und K. BUCHTELA, Mh. Chem. 88, 721 [1957], nach Eingabe von radioaktivem Coniferin in Fichten ein radioaktives Lignin erhielten, das Hibbert-Ketone von schwächerer Radioaktivität lieferte, als das radioaktive Lignin erwarten ließ. Das Coniferin war teils in das Cambium in Substanz implantiert, teils (nach mündlicher Mitteilung) in Wasser gelöst und von den abgeschnittenen Zweigen oder Stämmchen aufgesaugt worden. Das Ergebnis sagt aus, daß unter diesen Bedingungen der Applizierung, unter den Bedingungen der Jahreszeit und Witterung, unter denen der Versuch angestellt war, das Coniferin weniger von der Hibbert-Ketone bildenden Komponente geliefert hat, als dem Durchschnitt der gesamten Wachstumsperiode entspricht. Auch im Heidelberger Laboratorium (den Versuch hat Herr Dr. M. REICHERT ausgeführt) wurden zu schwach radioaktive Hibbert-Ketone gefunden, obwohl das radioaktive Coniferin auf schonendere Weise durch die Nadeln eingeführt war (Tauchtrieb<sup>3)</sup>). Der Versuch muß über größere Zeiträume und mit verdünnten Lösungen wiederholt werden.

gefäßen stammen) nebst Spuren von Aminosäuren. Im frischen Saft sind ferner in geringen Mengen Brenzcatechinkörper zu erkennen, die weder Kaffeesäure, Chlorogensäure, Protocatechusäure noch *d*-Catechin sind, das in der Fichtenrinde neben sehr wenig Dihydroquercetin (Taxifolin) und anderen Stoffen vorkommt<sup>14,15)</sup>.

Wenn der Cambialsaft nicht mit Formalin behandelt wird und einige Zeit bei 20° stehen bleibt, so treten zu den genannten Substanzen Shikimisäure und Protocatechusäure hinzu, beide in sehr geringen Mengen. Zugleich erscheinen jetzt die Umwandlungsprodukte des Coniferylalkohols in deutlichen Mengen: das Pinoresinol vermehrt sich, hinzu kommt Dehydro-diconiferylalkohol (I), Guajacylglycerin-coniferyläther u. a. Wichtiger als das spurenweise Vorkommen dieser oder jener Substanzen ist das völlige Fehlen des Syringins und des Glucosids des *p*-Cumaralkohols in der Fichte. Vor allem nach dem letzteren ist sorgfältig, aber vergebens gesucht worden. Um das bekannte kleine Defizit an Methoxyl im Fichtenlignin zu erklären, darf man vielleicht annehmen, daß nicht methylierte Vorstufen des Coniferylalkohols neben diesem in das Lignin eingebaut werden.

Laubhölzer enthalten bekanntlich ein Lignin, das aus einem Gemisch der Coniferyl- und Sinapin-Komponente aufgebaut ist. Der beste Fundort für das Glucosid des Sinapinalkohols, das Syringin, ist die Rinde des Flieders (*Syringa*). Wir haben festgestellt, daß im Gebiet des Cambiums des Flieders neben Syringin auch Coniferin vorkommt.

Demnach sind es auch hier die Glucoside Coniferin und Syringin, aus denen die Pflanze die für den Aufbau ihres Lignins — eines Laubholzlignins — nötigen Hydroxymethylalkohole bezieht: den Coniferylalkohol und den Sinapinalkohol.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

### *Coniferin aus DL-Phenylalanin*

0.2 mC (6.7 mg) DL-Phenylalanin-[<sup>14</sup>CHNH<sub>2</sub>] von der Aktivität 0.5 mC/mMol wurden in 6 ccm Wasser gelöst und in Mengen von 1 ccm 6 Fichtenstämmchen durch den Tauchtrieb<sup>3)</sup> in den letzten oder vorletzten Jahrestrieb eingegeben. Nach 2½ Tagen war die Lösung aufgenommen. Die Fichten wurden 1 cm unterhalb des Tauchtriebes abgeschnitten, von den Nadeln befreit und mitsamt der Rinde im Starmix unter 90-proz. Methanol zerkleinert. Die Holzspäne wurden mit dem gleichen Lösungsmittel nachgewaschen, dieses wurde nach der Filtration i. Vak. eingedampft. Die Lösung des Rückstandes in wenig Wasser wurde mit Äther ausgeschüttelt und in der Wärme mit 250 mg inaktivem Coniferin versetzt. Das auskristallisierte Glucosid wurde mehrmals aus Wasser umkristallisiert. Dabei blieb die spezifische Aktivität (4.4 · 10<sup>5</sup> Imp./mMol/Min.) konstant. Das Coniferin war chromatographisch rein. Emulsin setzte Coniferylalkohol in Freiheit, der chromatographisch identifiziert wurde und radioaktiv war. Bei längerem Stehenlassen entstanden in der Lösung die üblichen dimeren Zwischenprodukte, die sich im Chromatogramm gleichfalls als radioaktiv erwiesen.

Bei einem zweiten Versuch wurden die Bäume erst 4 Tage nach der Eingabe des radioaktiven Phenylalanins aufgearbeitet. Das mit Methanol extrahierte Holzmaterial wurde mit dem vom

14) K. FREUDENBERG, *Angew. Chem.* **68**, 90 [1956].

15) W. GRASSMANN, G. DEFFNER, E. SCHUSTER und W. PAUCKNER, *Chem. Ber.* **89**, 2523 [1956]; W. GRASSMANN, H. ENDRES und W. PAUCKNER, *ebenda* **91**, 134 [1958].

ersten Versuch vereinigt, in der früher geschilderten Weise<sup>10)</sup> mit KOH behandelt, methyliert und oxydiert. Die entstandenen Säuren wurden ausgeäthert und im Chromatogramm auf Radioaktivität untersucht. Veratrumsäure und Dehydro-diveratrumsäure waren inaktiv, nur die Isohemipinsäure war aktiv. Die ätherische Lösung der rohen Säuren wurde mit 150 mg inaktiver Isohemipinsäure versetzt und mit ihr aus Wasser umkristallisiert. Nach erneuter Kristallisation wurde i. Vak. bei 220° sublimiert. Die spezifische Aktivität betrug  $8 \cdot 10^4$  Imp./mMol/Min.; Schmp. 248°.

In derselben Weise wurde in einem weiteren Versuch das ausgewaschene Holzmehl mit Diazomethan methyliert und dann auf Isohemipinsäure verarbeitet. Sie war radioaktiv. Über die Ausbeute ist oben berichtet.

Eine Lösung von radioaktivem Coniferin- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]\text{H}$  wird wesentlich langsamer aufgenommen<sup>12)</sup>. Das ausgewaschene Holzmehl wurde auf radioaktive Isohemipinsäure verarbeitet. Das Ergebnis war, wie oben berichtet, das gleiche wie mit Phenylalanin. In der folgenden Übersicht werden die ungefähren Ausbeuten an Isohemipinsäure und Metahemipinsäure mitgeteilt, die bei präparativen Versuchen mit nicht radioaktivem Material erhalten wurden.

#### Ungefähre Ausbeuten (Prozente des Lignins) an Isohemipin- und Metahemipinsäure

Ausbeute in % des Lignins	Mit Aceton extrahiertes Holz	MW- Lignin n. BJÖRKMAN	Aceton- lösliches Lignin n. BRAUNS	Dasselbe frei von Dimeren	Künstl. Zutropf- lignin	Dasselbe frei von Dimeren	Pinoresinol
Isohemipinsäure. Vorbe- handl. mit KOH	>3	>3	3	3	3	3	0
Isohemipinsäure. Vorbe- handl. nur mit Di- azomethan	>1	>1	1	1	1	1	0
Metahemipinsäure. ohne Vorbehandl. m. Säure	0	0	<1	<1	0	0	0
Metahemipinsäure. nach Behandl. mit Säure	1	1	>1	>1	1	1	reichtl. Mengen Metahemipinsäure. sehr wenig Isohemipinsäure.

Für die chromatographische Untersuchung der Säuren wurde die obere Phase des Gemisches n-Butanol/Morpholin/Wasser (4:1:5 Vol.-Tle.) und das Spezialpapier von Schleicher & Schüll 2043 a mgl verwendet. Es wurde mit einer Lösung von Bromkresolgrün in Äthanol, der eine gesättigte Lösung von  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  zugesetzt war, besprüht, und zwar 10 Tle. auf 1 Tl. Bromkresolgrünlösung. Anschließend wurde das Chromatogramm 20 Min. bei 150° getrocknet. Die Isohemipinsäure gibt einen ziegelroten Fleck; Veratrumsäure, Dehydrodiveratrumsäure und Metahemipinsäure bilden blaugraue Flecke. Trimethylgallussäure wurde nicht gefunden. Im längerwelligen Ultraviolett kann man eine Substanz vom gleichen  $R_f$ -Wert als dunkelvioletten Fleck erkennen; es handelt sich jedoch offenbar nicht um Trimethylgallussäure; denn diese gibt mit Eisen(III)-chlorid eine orangerote Färbung, während die unbekannte Substanz eine Gelbfärbung erfährt. Auch die übrigen Säuren lassen sich im längerwelligen Ultraviolett durch einen dunkelvioletten Fleck erkennen. Im kürzerwelligen Ultraviolett sind sie nicht wahrnehmbar.

#### Untersuchung des Cambialsaftes der Fichte

Wie oben erwähnt, wurde ein Teil des mit Eiswasser abgewaschenen und im abgeschabten Gewebe enthaltenen Cambialsaftes sofort mit Formalinlösung versetzt. Ein anderer Teil wurde ohne Zusatz verwendet. Beide Säfte wurden bei  $-25^\circ$  aufbewahrt. Nach dem Auftauen

wurde zentrifugiert und mit größter Beschleunigung i. Vak. in einer schnell arbeitenden Apparatur eingengt. Nach Abtrennung des rohen Coniferins wurde mit n-Butanol ausgeschüttelt und die in Gegenwart von Cellulosepulver eingedampfte wäßr. Mutterlauge an der Cellulosesäule mit Tetrachlorkohlenstoff/Dimethylformamid (11:3 Vol.-Tle.) aufgetrennt. Auch der Inhalt der Butanolphase wurde an der Säule chromatographiert. Die mit und ohne Formalin behandelten Lösungen ergeben die oben geschilderten Unterschiede.

Für die Papierchromatographie wurden folgende Lösungsmittelgemische verwendet: Xylol/Dimethylformamid (9:2 Vol.-Tle. oder 11:3 Vol.-Tle.); Tetrachlorkohlenstoff/Dimethylformamid (9:2 oder 11:3 Vol.-Tle.); ferner mit Formamid gesättigter Äther auf Formamidpapier<sup>11)</sup>. Die Gemische 9:2 eignen sich am besten für die Trennung der weniger polaren Substanzen, die Gemische 11:3 besser für die stärker polaren. Die phenolischen Substanzen werden mit diazotierter Sulfanilsäure erkannt. Chinasäure gibt mit Eisenchlorid eine Gelbfärbung, die nach  $\frac{1}{2}$  Stde. fast ganz verschwindet. Nach Tagen bis Wochen zeigt sich an dieser Stelle ein dunkelvioletter Fleck. Shikimisäure gibt mit Eisenchlorid zunächst keine Färbung. Nach Tagen erscheint ein dunkelvioletter Fleck. Protocatechusäure gibt mit Eisenchlorid sofort über Blaugrün eine dunkelviolette Färbung, Kaffeesäure und Chlorogensäure werden an der starken blauen Fluoreszenz im UV erkannt. Beide Säuren geben mit Eisenchlorid oder mit diazotierter Sulfanilsäure eine graubraune Färbung.

Um die Hauptmenge der Zucker und Eiweißstoffe zu entfernen, schüttelt man die stark konzentrierte wäßr. Lösung wiederholt mit Methanol durch, wobei diese Stoffe zurückbleiben. Das Methanol wird i. Vak. entfernt und der trockene Rückstand nach zwei Verfahren auf Glucoside untersucht.

Der erste Teil wird in trockenem Methanol aufgenommen und chromatographiert. Bei der Chromatographie der Glucoside in Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5 Vol.-Tle.) wurde gleichzeitig ein Gemisch von *p*-Cumaralkohol-glucosid, Coniferin und Syringin als Test aufgebracht. Man arbeitet nach dem Durchlaufverfahren. Die  $R_F$ -Werte der genannten Glucoside sind konzentrationsabhängig. *p*-Cumaralkohol-glucosid läuft schneller als Coniferin und dieses wiederum etwas schneller als Syringin. Die unveränderten Glucoside werden als dunkle Flecke im längerwelligen UV erkannt. Man kann die Glucoside auch auf dem Papier mit Emulsinlösung besprühen, die man langsam eintrocknen läßt. Die gebildeten Hydroxymethylalkohole werden durch diazotierte Sulfanilsäure nachgewiesen.

Der andere Teil des Rückstandes wird in Wasser aufgenommen. Am sichersten lassen sich die Glucoside nach 24stdg. Aufspaltung mit Emulsin bei 25° nachweisen. Die Hydroxymethylalkohole sind chromatographisch leichter voneinander zu trennen und auch leicht an ihrer Kupplungsfarbe zu erkennen. *p*-Cumaralkohol läuft schneller als Coniferylalkohol und dieser wiederum schneller als Sinapinalkohol. Als Lösungsmittelgemisch benutzt man dann Xylol/Dimethylformamid (9:2 Vol.-Tle.).

---