

KARL FREUDENBERG und HORST NIMZ

## Guajacylglycerin- $\beta$ -pinoresinoläther, ein Dehydrierungsprodukt des Coniferylalkohols

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität  
und dem Forschungsinstitut für die Chemie des Holzes und der Polysaccharide, Heidelberg \*)

(Eingegangen am 2. März 1962)

Unter den vielen Dehydrierungsprodukten des Coniferylalkohols, die zugleich Zwischenprodukte der Ligninbildung sind, wurde durch Gegenstromverteilung und Chromatographie eine weitere Substanz isoliert und als Guajacylglycerin- $\beta$ -pinoresinoläther (III) erkannt. Die entsprechende Verbindung des Epipinoresinols wurde gleichfalls festgestellt.

Coniferylalkohol liefert bei der Behandlung mit Laccase und Luftsauerstoff etwa 40 Dehydrierungsprodukte, die im Papierchromatogramm unterschieden werden können. Eine Übersicht über diese Substanzen ist vor 2 Jahren veröffentlicht worden<sup>1)</sup>. Davon waren zu jener Zeit 10 isoliert und aufgeklärt. Sie wurden mit den Buchstaben A bis K belegt. Die übrigen wurden in der Reihenfolge von den lipophilen Substanzen mit höchstem  $R_F$ -Wert bis zu denen mit niedrigstem mit den Ziffern 1 bis 29 gekennzeichnet. Seither hat sich die mit dem Buchstaben L belegte Substanz 7 als ( $\pm$ )-Epipinoresinol zu erkennen gegeben<sup>1,2)</sup>.

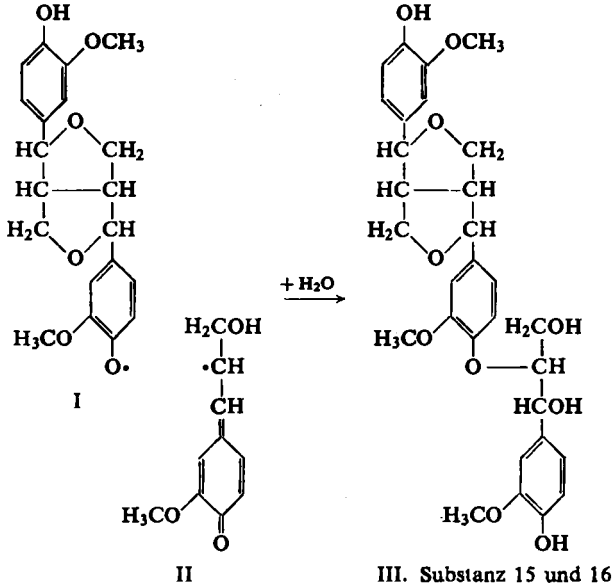
In der vorliegenden Untersuchung haben wir unser Augenmerk auf die in greifbarer Menge auftretende Substanz 16 gerichtet und sie von hartnäckig anhaftenden Begleitstoffen, insbesondere der Substanz 17, abgetrennt. Ihre Menge schätzen wir auf 1–2% der in Butanol löslichen Dehydrierungsprodukte des Coniferylalkohols. Die Zusammensetzung der chromatographisch einheitlichen Substanz entspricht 3 Moll. Coniferylalkohol minus 4 Atome Wasserstoff plus 1 Mol. Wasser. Die Substanz enthält auf 3 Einheiten mit je einem Methoxyl zwei phenolische OH-Gruppen, die an der Bildung eines 2fachen Dinitrophenyläthers erkannt werden. Außerdem sind zwei aliphatische Hydroxyle vorhanden, die acetylierbar sind. Mit Diazobenzolsulfonsäure entsteht eine kräftig gelbe Kupplungsfarbe. Daraus geht hervor, daß mindestens einem der Guajacylreste eine Carbinolgruppe benachbart ist. Damit sind die Bildungsweise und die Formel der neuen Substanz bereits festgelegt. Einseitig dehydriertes Pinoresinol (I) reagiert als Aroxyl mit dem Chinonmethidradikal  $R_3$  des dehydrierten Coniferylalkohols (II) zu einem Chinonmethid, das sich durch Wasseranlagerung zu Guajacylglycerin- $\beta$ -pinoresinoläther (III) stabilisiert. Die Substanz hat 6 Asymmetriezentren, von denen 4, die des Pinoresinols,

\*) Wir danken der DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR HOLZFORSCHUNG für die Bereitstellung von Mitteln.

1) K. FREUDENBERG und B. LEHMANN, Chem. Ber. 93, 1354 [1960].

2) K. FREUDENBERG in L. ZECHMEISTERS „Fortschritte der Chemie organ. Naturstoffe“ Bd. 20, [1962], im Druck.

als eines zu rechnen sind. Demnach kann die Substanz, die optisch inaktiv ist, aus 4 Racematen bestehen. Weder die Substanz selbst noch ihre Derivate konnten zur Kristallisation gebracht werden. Für die angeführte Konstitution sprechen folgende weitere Argumente: E. ADLER<sup>3)</sup> hat festgestellt, daß Guajacylglycerin- $\beta$ -aryläther durch 0.2*n* HCl in Dioxan/Wasser (9:1 Vol.) bei 100° in einigen Stunden gespalten werden. Unsere Substanz war nach 4 Stunden hydrolysiert. Sie ergab außer Nebenprodukten ein Gemisch von Pinoresinol mit Epipinoresinol, die chromatographisch nachgewiesen wurden. Pinoresinol wird unter diesen Bedingungen teilweise in Epipinoresinol umgelagert. Ein anderer Hinweis auf die Konstitution der Substanz



fand sich, als reines DL-Pinoresinol (frei von Epipinoresinol)<sup>4,5)</sup> zusammen mit Coniferylalkohol im Molverhältnis 1:1 dehydriert wurde. Im Chromatogramm zeigten sich die zahlreichen Dehydrierungsprodukte des Coniferylalkohols, jetzt aber mit starker Betonung der Substanz 16 neben einem Überschuß an Pinoresinol.

Der gleiche Versuch wurde mit reinem Epipinoresinol wiederholt. Nun ergab sich eine kräftige Vermehrung des an sich schwachen chromatographischen Flecks der Substanz 15. Pinoresinol und Epipinoresinol unterscheiden sich durch die Konfiguration einer der beiden Guajacylcarbinol-äthergruppen. Pinoresinol ist bisäquatorial, Epipinoresinol äquatorial-axial gebaut<sup>6)</sup>. In Substanz 15 kann die Ätherbindung (von I nach II) am äquatorialen oder axialen Guajacylrest erfolgen. Daher kann der Guajacylglycerin-epipinoresinoläther (III) in 8 Racematen auftreten.

<sup>3)</sup> E. ADLER, J. M. PEPPER und E. ERIKSOO, *Ind. Engng. Chem.* **49**, 1391 [1957].

<sup>4)</sup> Trennung von Pinoresinol und Epipinoresinol: K. WEINGES, *Chem. Ber.* **94**, 2522 [1961].

<sup>5)</sup> DL-Pinoresinol schmilzt bei 151°. Der früher angegebene Schmp. 111° (K. FREUDENBERG und D. RASENACK, *Chem. Ber.* **86**, 755 [1953]) gilt für ein Gemisch mit DL-Epipinoresinol.

<sup>6)</sup> K. FREUDENBERG und G. S. SIDHU, *Chem. Ber.* **94**, 851 [1961].

Die beiden Zwischenprodukte der Formel III (15 und 16) entstehen durch Anbau eines Coniferylrestes an ein während der Dehydrierung bereits gebildetes dimeres Zwischenprodukt, ein Vorgang, der vorausgesagt war und sich beliebig wiederholen kann. Die Kombination der Radikale I und II ergibt ein neues Chinonmethid, das die vielen schon bekannten Reaktionen dieser Verbindungsklasse einzugehen vermag. Die hier erfolgende Addition von Wasser ist nur eine dieser Möglichkeiten<sup>7)</sup>.

Auch die Substanz 3 der früheren Tabelle<sup>1)</sup> wurde untersucht. Sie erwies sich als ein Gemisch von *cis*- und *trans*-Ferulasäure-äthylester. Der Ester wird gelegentlich als Beimengung des Coniferylalkohols, der aus dieser Substanz hergestellt wird, in geringer Menge in die Ansätze eingeschleppt. Die Kupplungsfarbe des Esters wurde früher mit orangerot angegeben. Mit wenig nicht zu stark alkalischer Diazobenzolsulfonsäure-Lösung entsteht, wie jetzt gefunden wurde, die gelbe Kupplungsfarbe des Esters, die erst, wenn mehr alkalische Lösung aufgesprüht wird, in die violettrote der Ferulasäure übergeht.

In der folgenden Tabelle sind die  $R_F$ -Werte und Farbreaktionen der hier behandelten Substanzen angeführt.

$R_F$ -Werte und Farbreaktionen der diskutierten Substanzen. Die  $R_F$ -Werte I und II werden mit den früher beschriebenen<sup>1)</sup> Gemischen I und II auf vorgetränktem Papier erhalten. Die  $R_F$ -Werte III und IV erhält man auf einer Glasplatte mit „Kieselgel G nach STAHL für Dünnschichtchromatographie“ (Merck) mit den Gemischen Cyclohexan/Aceton (1:1) (III) und Cyclohexan/Essigester (3:1) (IV)

Substanz	$R_F$ -Werte				Farbe mit Diazobenzolsulfonsäure	a) UV ohne b) mit Diazobenzolsulfonsäure
	I	II	III	IV		
16	0.126	0.070	0.22		braungelb	
Dinitrophenyläther von 16			0.41			a) schwach dunkler Fleck
Acetat des Dinitrophenyläthers von 16			0.52			
<i>p</i> -Nitrobenzoat von 16			0.64			
15	0.137	0.080			braungelb	
<i>cis</i> - und <i>trans</i> -Ferulasäure-äthylester	0.65	0.80		0.27 und 0.36	gelb	a) blaue Fluoreszenz b) grünblaue Fluoreszenz
Dinitrophenyläther des <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Ferulasäureesters	0.86	0.95		0.33 und 0.40		a) dunkler Fleck
Ferulasäure-äthylester vom Schmp. 58° <sup>8)</sup>	0.65	0.80		0.27	gelb	a) blaue Fluoreszenz b) grünblaue Fluoreszenz
Dinitrophenyläther des Ferulasäure-äthylesters vom Schmp. 58°	0.86	0.95		0.40		a) dunkler Fleck

<sup>7)</sup> Nach Versuchen, die mit Herrn H. K. WERNER angestellt wurden, gehört hierzu auch eine lineare Polymerisation der Chinonmethide, bei der sich hauptsächlich Ketten mit Benzylaryl-äther-bindungen bilden.

<sup>8)</sup> K. FREUDENBERG und H. H. HÜBNER, Chem. Ber. 85, 1181 [1952].

*Zusatz b. d. Korr.:* Inzwischen sind aufgeklärt worden:

Substanz 17 (H. NIMZ): Dehydro-triconiferylalkohol (mit 2 Cumaranringen)

Substanz 23 (H. TAUSEND): Guajacylglycerin-dehydro-diconiferyl-äther

Substanz 26 (H. TAUSEND): Guajacylglycerin-guajacylglycerin-coniferyläther

Substanz 9 und 11 (H. GEIGER): *trans*- und *cis*-Ferulasäure

Substanz 10 (H. GEIGER): Vanillinsäure (Spuren)

Substanz 8 (H. GEIGER): Pinoresinolid (dem Pinoresinol entsprechendes Monolacton)

Damit ist mehr als die Hälfte der Zwischenprodukte der Ligninbildung aufgeklärt. Sie beträgt mindestens 80 % des Gesamtgewichts.

## BESCHREIBUNG DER VERSÜCHE

*Isolierung der Substanz 16:* Aus 30 g *Coniferylalkohol* wurde nach dem Zutropf-Verfahren das Gemisch der Zwischenprodukte hergestellt und, wie früher beschrieben<sup>9)</sup>, mit Dimethylformamid, Wasser und Äther durch Gegenstromverteilung im Durchlauf-Verfahren einer ersten Trennung unterworfen. Nach 1600 Überführungen wird der Inhalt der Gefäße 120 bis 180 i. Vak. von der Hauptmenge des Äthers befreit. Die hinterbleibenden 1.5 l werden mit Natriumchlorid gesättigt und 10 mal mit je 100 ccm Methylenchlorid ausgeschüttelt. Der Auszug wird unter Stickstoff bei 35° erst unter 15, dann unter 2 Torr auf 12–13 ccm eingeeengt. Wenn sich Natriumchlorid ausscheidet, wird es abfiltriert. Die Lösung wird im Papierchromatogramm mit Gemisch II geprüft<sup>10)</sup>. Sie enthält alle Substanzen, die zwischen Dehydro-diconiferylalkohol A und Guajacylglycerin-coniferyläther C liegen.

Die erhaltene Lösung in Dimethylformamid (12.5 ccm) wird in einer Gegenstromapparatur mit 100 Gefäßen von je 10 ccm erneut aufgeteilt. Die Gefäße 1 und 2 sowie 8–100 werden mit je 5 ccm der unteren und oberen Phase eines Gemisches von Dimethylformamid/Wasser/Äther (1:1:2) beschickt. In die Gefäße 3–7 werden je 2.5 ccm der Dimethylformamidlösung, 2.5 ccm Wasser und 5 ccm Äther eingefüllt. Zunächst wird nach dem Durchlauf-Verfahren gearbeitet, wobei die obere Phase entnommen wird. Nach 2500 Überführungen sind einige Vorläufer der Substanz 16 aus der Maschine ausgetreten. Nun wird auf Kreislauf gestellt; nach weiteren 4000 Überführungen werden die Gefäße 45–65, die gegen 200 mg reine Substanz 16 enthalten, entnommen. Die Gefäße 20–44 enthalten ein Gemisch der Substanzen 16 und 17. Die Gefäße 1–19 sowie 45–100 werden mit frischem Phasengemisch gefüllt. Die Verteilung wird im Kreislauf-Verfahren fortgesetzt. Nach insgesamt 11000 Überführungen enthalten die Gefäße 62–80 noch weitere 20 mg der Substanz 16. Die Gefäße 36–61 enthalten 20–30 mg unreine Substanz 17. Die Phasengemische mit reiner Substanz 16 werden unter Stickstoff bei 35° erst unter 15, dann unter 2 Torr eingedampft. Die Lösung des Rückstands in 10 ccm Aceton wird filtriert und mit 50 ccm Essigester versetzt. Während unter Stickstoff bei vermindertem Druck auf etwa 10 ccm eingeeengt wird, fällt der größte Teil der gesuchten Substanz bereits in Form amorpher Flocken aus. Die Fällung wird durch Zugabe von 40 ccm Cyclohexan vervollständigt. Zur Herstellung von Derivaten ist dieses in einer Menge von 200–220 mg anfallende farblose Produkt genügend rein. Zur Analyse wurde nochmals über eine Säule geführt. 1.5 g Kieselsäure (Mallinckrodt 100 mesh) und 0.3 g Celite 535 werden mit der Lösung von 60 mg der Substanz 16 in 10 ccm Aceton verührt. Das von Aceton befreite Pulver wird auf eine Säule von 1.5 cm Durchmesser aufgetragen, in die eine 30 cm hohe Schicht aus Kieselsäure/Celite (5:1 Gewichtsverhältnis) mit Cyclohexan/Aceton (2:1 Vol.) eingeschlämmt ist. Alle 20 Min. werden Fraktionen von je 3 ccm aufgefangen. Die Fraktionen 35–55 enthalten die reine *Substanz 16*. Sie werden

<sup>9)</sup> l. c. <sup>1)</sup>, S. 1364.

<sup>10)</sup> l. c. <sup>1)</sup>, S. 1360.

filtriert und i. Vak. verdampft. Der Rückstand wird wie oben mit Aceton, Essigester und Cyclohexan umgefällt und 48 Stdn. bei 2 Torr/50° über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> und Paraffin getrocknet.

C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>O<sub>10</sub> (554.6) Ber. C 64.97 H 6.18 OCH<sub>3</sub> 16.79  
Gef. C 64.50, 64.39 H 6.40, 6.46 OCH<sub>3</sub> 16.13, 16.51

*2,4-Dinitro-phenyläther der Substanz 16:* Die Mischung von 56 mg *Substanz 16*, 5 ccm Dimethylformamid, 75 mg *2,4-Dinitro-fluorbenzol* und 50 mg Natriumhydrogencarbonat wird bei 20° geschüttelt. Nach 20 Stdn. ist chromatographisch kein Ausgangsprodukt mehr nachzuweisen. Das Filtrat wird bei 1 Torr/35° unter Stickstoff eingedampft, der Rückstand in 10 ccm Aceton gelöst und in der oben beschriebenen Weise mit denselben Lösungsmitteln über eine Säule mit Kieselsäure/Celite geführt. Der Durchmesser der Säule beträgt 2 cm, die Höhe 60 cm. Alle 20 Min. werden Fraktionen von 4 ccm aufgefangen. Die Fraktionen 84—150 enthalten den reinen Dinitrophenyläther. Er wird nach Filtration und Eindampfen in 5 ccm Essigester gelöst, durch tropfenweise Zugabe von insgesamt 40 ccm Cyclohexan in farblosen bis blaßgelben Flocken ausgefällt und 12 Stdn. bei 2 Torr/80° über Phosphor-pentoxyd und Paraffin getrocknet. Ausb. 52 mg. Das Produkt ist chromatographisch einheitlich.

C<sub>42</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>18</sub> (886.8) Ber. C 56.88 H 4.32 N 6.32 OCH<sub>3</sub> 10.50  
Gef. C 56.75 H 4.48 N 6.00 OCH<sub>3</sub> 10.23

*Diacetat des Dinitrophenyläthers von 16:* 44 mg des *Dinitrophenyläthers* werden in 1.5 ccm Pyridin/*Acetanhydrid* (1 : 1) 24 Stdn. bei 20° aufbewahrt. Das Acetat wird mit Eiswasser ausgefällt, nach einigen Stdn. abfiltriert und 2mal aus Essigester mit Cyclohexan umgefällt. Nach der Trocknung über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> und Paraffin bei 2 Torr/50° (24 Stdn.) erhält man 31 mg (65% d. Th.) eines schwach gelben, amorphen, chromatographisch einheitlichen Pulvers.

C<sub>46</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>20</sub> (970.9) Ber. C 56.90 H 4.36 N 5.78 OCH<sub>3</sub> 9.59 COCH<sub>3</sub> 8.87  
Gef. C 56.99 H 4.59 N 5.66 OCH<sub>3</sub> 9.58 COCH<sub>3</sub> 8.98

*Tetrakis-p-nitrobenzoat von 16:* Die Lösung von 56 mg *Substanz 16* in 3 ccm Pyridin wird bei 0° mit 112 mg *p-Nitro-benzoylchlorid* versetzt. Sie bleibt 20 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Das Ausgangsprodukt ist chromatographisch nicht mehr nachweisbar. Zunächst werden 0.5 ccm Wasser zugegeben, wobei sich die Lösung nicht trübt. Nach 4 Stdn. ist etwa gebildetes *p-Nitro-benzoesäure-anhydrid* zersetzt. Jetzt wird das amorphe Nitrobenzoat mit überschüss. Wasser ausgefällt und 2mal aus Essigester mit Cyclohexan gereinigt. Nach 12stdg. Trocknen bei 50°/2 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> und Paraffin werden 59 mg eines amorphen, blaßgelben Pulvers erhalten.

C<sub>58</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>22</sub> (1151.0) Ber. C 60.52 H 4.03 N 4.87 OCH<sub>3</sub> 8.08  
Gef. C 59.96, 60.35 H 3.88, 3.99 N 4.94 OCH<sub>3</sub> 7.89

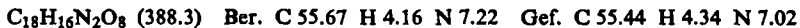
*Hydrolyse der Substanz 16:* Die Lösung von 8 mg *Substanz 16* in 4 ccm einer 0.2 n Mischung von HCl in Dioxan/Wasser (9 : 1 Vol.) wird unter Stickstoff gekocht. Dünnschichtchromatographie ergibt, daß nach 4 Stdn. die *Substanz 16* verschwunden und als Hauptmenge *Pinoresinol* nebst *Epipinoresinol* entstanden ist. Daneben zeigen sich geringe Mengen anderer Abbauprodukte.

*Substanz 16 aus Pinoresinol und Coniferylalkohol:* In einem Kolben, der mit Vibromischer und 2 Tropftrichtern mit Kapillarrohren versehen ist, werden 50 mg *DL-Pinoresinol* (frei von Epipinoresinol) in 50 ccm Aceton/Wasser (1 : 1 Vol.) gelöst. Dazu werden 0.2 ccm einer 0.02-proz. wäbr. Peroxydase-lösung (C. F. Boehringer & S.) und 2 ccm Citratpuffer nach SÖRENSEN pH 5.5 gegeben. Der eine Tropftrichter enthält 25 ccm einer 0.1-proz. Lösung von *Coniferylalkohol* in Wasser und der andere 25 ccm einer 0.02-proz. Wasserstoffperoxydlösung. Beide Trichter werden mit gleicher Tropfgeschwindigkeit innerhalb von 4 Stdn. entleert. 2 Stdn.

nach Beginn des Zutropfens werden weitere 0.2 ccm frischer Peroxydasselösung zugegeben. Nach der Beendigung werden 10 bis 20 mg Kaliumcyanid zur Zerstörung des Enzyms zugesetzt. Die Lösung wird mit Natriumchlorid gesättigt und 3 mal mit je 25 ccm n-Butanol extrahiert. Die Extrakte werden mit Natriumsulfat getrocknet und unter Stickstoff i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wird in einigen ccm Aceton aufgenommen, filtriert und chromatographiert. In den Lösungsmitteln I und II gibt sich der Hauptanteil des Gemisches, etwa  $\frac{1}{3}$ , als *Substanz 16* zu erkennen.

*Substanz 15 aus Epipinoresinol und Coniferylalkohol*: Derselbe Versuch wird mit 50 mg reinem *Epipinoresinol* wiederholt. Hier erweist sich rund  $\frac{1}{3}$  des Gemisches als *Substanz 15*.

*Ferulasäure-äthylester*: Die in sehr geringen Mengen auftretende *Substanz 3* wurde nach mühsamen Trennungsvorfahren als nicht kristallisierendes Öl erhalten, das im Chromatographiergemisch I und II einheitliche Flecke gab. Mit Dinitrofluorbenzol entstand ein kristallisierendes Gemisch vom Schmp.-Bereich 75–138°. Die Analyse stimmte auf den *Dinitrophenyläther des Ferulasäure-äthylesters*. Sterisch einheitlicher Ferulasäure-äthylester vom Schmp. 58° ergab farblose Nadeln vom Schmp. 148.5° (aus Essigester und Cyclohexan).



In den Gemischen I, II und IV der Tab. (S. 2059) erweisen sich der Ferulasäureester vom Schmp. 58° und sein Dinitrophenyläther als einheitlich. Das Gemisch des *cis*- und *trans*-Ferulasäure-äthylesters und seines Dinitrophenyläthers wird weder im Gemisch I noch in II getrennt. In Gemisch IV haben dagegen die beiden Stereoisomeren verschiedene Laufzeiten: Der Ferulasäure-äthylester (Schmp. 58°) hat den  $R_F$ -Wert 0.27 und sein Dinitrophenyläther 0.40. Im Gemisch der Isomeren befindet sich jedoch außer dem Ferulasäureester vom Schmp. 58° einer mit  $R_F$ -Wert 0.36 als Ester und 0.33 als Dinitrophenyläther. Bestrahlt man den Ester vom Schmp. 58° ( $R_F$  0.27) nach seinem Auftragen im Startpunkt etwa 5 Min. lang mit ultravioletterm Licht, so zeigt das entwickelte Chromatogramm 2 Flecke mit  $R_F$  0.27 und 0.36. In Analogie zu den Zimtsäuren ist der Ferulasäure-äthylester vom Schmp. 58° wahrscheinlich die *trans*-Form, der aus ihm durch Belichtung entstehende Ester die *cis*-Form.