

## KARL FREUDENBERG UND HANS GEIGER

## Pinoresinolid und andere Zwischenprodukte der Ligninbildung

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

(Eingegangen am 7. November 1962)

Unter den Dehydrierungsprodukten des Coniferylalkohols, die zugleich Bauelemente des Lignins sind, hat sich Ferulasäure gefunden. Ihr Dehydrierungsprodukt verbindet sich mit dehydriertem Coniferylalkohol zu dem Halblacton Pinoresinolid (I), das dem Pinoresinol entspricht und ein Lignan ist. Ein zweites Lignan ist die isomere Verbindung III (Substanz 13), die dem Hydroxy-matairesinol und damit dem Conidendrin sehr nahesteht. Mit diesen Lignanen findet die im Infrarot wahrnehmbare Lactonbande des Coniferenlignins und künstlichen Lignins ihre Erklärung.

Bei den hydrolysierbaren polymolekularen Naturstoffen wie Polysacchariden und Proteinen stützt sich die Konstitutionsaufklärung auf den *Abbau* zu oligomeren Bruchstücken. Beim Lignin<sup>1,2)</sup>, das sich nicht zu oligomeren Bruchstücken abbauen läßt, muß der umgekehrte Weg, der des (enzymatischen) *Aufbaus* der oligomeren Bauelemente, begangen werden. Der Ausgangspunkt sind der Coniferylalkohol nebst wenig *p*-Cumaralkohol und Sinapinalkohol, deren Glucoside nebeneinander im Cambialsaft der Fichte vorkommen<sup>3)</sup>. Der Abschluß des Aufbaus ist das Dehydrierungspolymerisat, dessen weitgehende Übereinstimmung mit dem Lignin eingehend begründet ist<sup>4)</sup>.

Bei der Dehydrierung des Coniferylalkohols, auf den wir uns hier beschränken müssen, lassen sich gegen 40 im Chromatogramm erkennbare oligomere Produkte unterscheiden. Wir behalten die vor zwei Jahren eingeführte Bezifferung bei<sup>5)</sup>. Von diesen Zwischenprodukten der Ligninbildung sind neuerdings die Substanzen 15<sup>6)</sup>, 16<sup>6)</sup> und 17<sup>7)</sup> isoliert und aufgeklärt worden. Auch die Konstitution der Trimeren 23<sup>8)</sup> und 26<sup>9)</sup> ist gesichert. Die Substanzen 1<sup>7)</sup> und 3<sup>6)</sup> sind Nebenprodukte. Über die Substanzen 8, 9, 10 und 13 soll hier berichtet werden.

Die Bezeichnung richtet sich nach den  $R_F$ -Werten<sup>5)</sup>, deren zweite Dezimale unsicher ist. Maßgebend ist die Reihenfolge.

\*) Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danken wir für die Gewährung von Mitteln.

1) K. FREUDENBERG, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe [Wien] (Zechmeister) **20**, 41 [1962].

2) K. FREUDENBERG, Pure appl. Chem. **5**, 9 [1962].

3) K. FREUDENBERG und J. M. HARKIN, unveröffentlicht.

4) K. FREUDENBERG, C. L. CHEN und G. CARDINALE, Chem. Ber. **95**, 2814 [1962].

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

6) K. FREUDENBERG und H. NIMZ, Chem. Ber. **95**, 2057 [1962].

7) H. NIMZ, Chem. Ber. **96**, 478 [1963].

8) K. FREUDENBERG und H. TAUSEND, unveröffentlicht; vorläufig mitgeteilt l. c.<sup>6)</sup>.

9) K. FREUDENBERG, V. JOVANOVIĆ und F. TOPFMEIER, Chem. Ber. **94**, 3227 [1961].

Zur Isolierung der Substanzen dient ein nach dem „Zutropfverfahren“ mit Peroxydase<sup>1,9)</sup> hergestelltes Oligomergemisch, das im Gegenstrom einer ersten Aufteilung unterworfen und danach auf einer Säule fraktioniert wird.

Zu den bisherigen Substanzen ist im Lösungsgemisch II<sup>5)</sup> unmittelbar unter der Substanz 13 hinzugekommen die mit Diazobenzolsulfonsäure sich violett färbende und im Ultraviolett blau fluoreszierende *cis*-Ferulasäure. Sie tritt im Gemisch I zusammen mit der *trans*-Ferulasäure als Substanz 9 auf. Aus dem Gemisch der Ferulasäuren wurde durch Kristallisation die reine *trans*-Form isoliert.

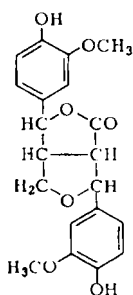
Die Menge an *cis*- und *trans*-Ferulasäure schätzen wir auf 0.4 bis 0.8%. Sie ist ein echtes Dehydrierungsprodukt des Coniferylalkohols und des aus diesem entstehenden Coniferylaldehyds. Da der Coniferylalkohol aus Ferulasäure-äthylester hergestellt wird, bestand der Verdacht, daß die Ferulasäure aus mitgeschlepptem Ferulasäure-äthylester (Substanz 3) stammen könnte. Es hat sich jedoch gezeigt, daß auch Coniferylalkohol, der zuverlässig frei von Ferulasäure und Ferulasäureester ist, bei der Dehydrierung Ferulasäure bildet. Ob die beiden isomeren Ferulasäuren gleichzeitig entstehen oder die *cis*-Ferulasäure erst während der Aufbereitung am Tageslicht aus der *trans*-Säure gebildet wird, ist nicht untersucht worden. Mit einer schwach alkalischen Lösung von Diazobenzolsulfonsäure färben sich die beiden Ferulasäuren auf dem Papier violett.

In einer Menge von weniger als 1% der Dehydrierungsprodukte tritt Vanillinsäure auf. Sie wird mit Diazobenzolsulfonsäure dunkelgelb gefärbt und ist identisch mit der Substanz 10 unserer Bezifferung.

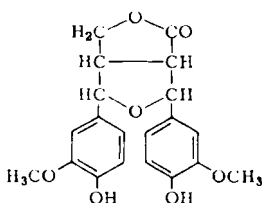
Ferner muß als Fremdkörper der Dihydro-coniferylalkohol eingetragen werden, der häufig als Nebenprodukt bei der Herstellung des Coniferylalkohols auftritt und schwer zu entfernen ist. Er wird von der Diazobenzolsulfonsäure rosa angefärbt, sein  $R_f$ -Wert liegt im Gemisch II zwischen Coniferylalkohol und E, dem Aldehyd des Dehydro-diconiferylalkohols. In Gemisch I findet er sich zwischen dem Coniferylalkohol und dem Pinoresinol B. Er tritt immer nur in geringer Menge auf. Aus uns unbekanntem Gründen ist er bei manchen Darstellungen im Coniferylalkohol nicht vorhanden. Die Dihydroverbindung vom Coniferylalkohol durch Kristallisation zu trennen, ist verlustreich. Wirksam ist die Gegenstromverteilung.

Die isolierte Substanz 8 kristallisiert. Im Chromatographiegemisch II findet sie sich zwischen dem Aldehyd E des Dehydro-diconiferylalkohols und dem Pinoresinol B, im Gemisch I tritt sie zusammen mit E zwischen *cis-trans*-Ferulasäure (9) und Coniferylalkohol auf. Sie hat den Gebrauchsnamen Pinoresinol erhalten, weil sie ein dem Pinoresinol entsprechendes Monolacton ist (I). Die systematische Bezeichnung ist 4-Oxo-2.6-bis-[4-hydroxy-3-methoxy-phenyl]-3.7-dioxa-bicyclo-[3.3.0]-octan. Wenn man Coniferylalkohol und Ferulasäure im molaren Verhältnis 1:1 zusammen dehydriert, so werden 5–6% an Pinoresinolid erhalten. Es bildet ein Diacetat und einen Dimethyläther, die wie die Substanz selbst kristallisieren, während der Bis-dinitrophenyläther zwar analysenrein, aber nicht kristallisiert erhalten wurde. Daraus folgt, daß zwei Hydroxyle vorliegen, die beide phenolisch sind. Die IR-Spektren des Pinoresinolids und seines Dimethyläthers zeigen eine starke Bande bei 1770/cm, die einem  $\gamma$ -Lacton entspricht. Mit diazotierter Sulfanilsäure färbt sich das Pinoresinolid auf dem

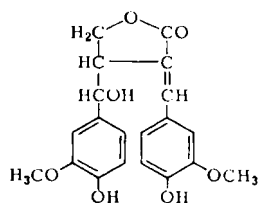
Papier rot. Wird dagegen die auf das Papier aufgebraachte Substanz vorher mit verdünnter Natronlauge behandelt und dann mit Diazobenzolsulfonsäure besprüht, so entsteht eine orangegelbe Kupplungsfarbe. Außer der Formel I des Pinoresinolids könnte auch II in Betracht kommen. Bei I ist mit Diazobenzolsulfonsäure nach unseren Erfahrungen eine rote Färbung zu erwarten, solange der Lactonring geschlossen ist. Wenn er dagegen geöffnet ist und ein Guajacylcarbinol entsteht, ist mit gelber oder orangeroter Farbe zu rechnen, wie es beobachtet wird. Die ohnehin unwahrscheinliche Formel II müßte mit und ohne alkalische Behandlung Rotfärbung geben, da kein Guajacylcarbinol entsteht. Das Pinoresinolid erklärt die im Infrarotspektrum des Lignins und des Dehydrierungspolymerisates in geringer Menge auftretende Lactonbande.



I. Pinoresinolid



II



III. Substanz 13

Auch die Substanz 13, die bei der Dehydrierung des Coniferylalkohols nur in geringer Menge auftritt, bildet sich bei der gemeinsamen Dehydrierung des Coniferylalkohols und der Ferulasäure in deutlich verstärktem Maße. Sie enthält also auch eingebaute Ferulasäure. Sie ist bisher nicht kristallin erhalten worden. Im UV-Licht fluoresziert sie blau, nach der Besprühung mit Alkali grün. Mit Ammoniak, Natriumcarbonat oder Alkali tritt im sichtbaren Licht wie bei Coniferylaldehyd, Ferulasäure-ester und Vanillin eine zitronengelbe Farbe auf, die auf die Bildung eines mesomeren Anions vom Charakter der Chinonmethide hinweist. Mit Diazobenzolsulfonsäure entsteht eine trübe Rosafärbung; wird vorher mit Alkali behandelt, so ist die Farbe bräunlich-orange. Im IR-Spektrum findet sich eine Bande bei 1730/cm, die zusammen mit den Farbreaktionen auf ein  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes  $\gamma$ -Lacton schließen läßt. Die Stellung in den Chromatogrammen deutet auf ein Dimeres mit 3 Hydroxylen hin. Die Analyse der Substanz 13 sowie ihres Dinitrophenyläthers weist auf ein ungesättigtes Hydroxy-matairesinol (III) hin. Auch eine Lactonbindung, an der das sek. Carbinol beteiligt ist, kommt in Betracht. In diesem Falle wäre das primäre Carbinol frei. Obwohl die Beweise ergänzt werden müssen, kann mit Sicherheit gesagt werden, daß die Substanz 13 zu den Lignanen vom Lactontypus gehört und einen Hinweis auf die Entstehung dieser Lignane gibt. Insbesondere ist die Verwandtschaft zum Hydroxy-matairesinol<sup>10)</sup> und Conidendrin zu betonen. Damit ist der Weg zu den *o*-Phthal-säuren und zur Benzolpentacarbonsäure gewiesen, die beim oxydativen Abbau des natürlichen und künstlichen Lignins entstehen.

<sup>10)</sup> K. FREUDENBERG und L. KNOF, Chem. Ber. 90, 2857 [1957].

Die Menge des Pinoresinols im Gemisch der Oligomeren läßt sich auf 1–2% schätzen. Die Menge der Substanz 13 ist kleiner. Jede dieser Substanzen, auch die Ferulasäure, entsteht mit einer ihr eigenen Geschwindigkeit, durchläuft ein Maximum und geht in den höhermolekularen Dehydrierungsprodukten auf. Die angetroffene Ausbeute ist daher nur ein Teil der in das Lignin eingefügten Bauelemente der jeweiligen Substanz.

Die  $R_F$ -Werte in Wasser auf Papier Schleicher & Schüll 2043 b sind bei den hier untersuchten Substanzen folgende:

Coniferylalkohol	0.29	Dehydro-diconiferylalkohol A <sub>2</sub>	0.57
Pinoresinolid	0.33	Dihydro-coniferylalkohol	0.73
Substanz 13	0.41	<i>trans</i> -Ferulasäure	0.85
Pinoresinol	0.47	Vanillinsäure	0.89
Dehydro-diconiferylalkohol A <sub>1</sub>	0.53	<i>cis</i> -Ferulasäure	0.9
Coniferylalkohol	0.55		

Die Werte sind in der zweiten Dezimale unsicher. Sie können je nach Temperatur und durchwanderter Strecke erheblich variieren, aber die Reihenfolge bleibt immer gewahrt. Dasselbe gilt für die früher angegebenen  $R_F$ -Werte.

Daß sich der bisher einheitlich auftretende Dehydro-diconiferylalkohol (Substanz A) in zwei Fraktionen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> aufteilt, beruht vielleicht auf der Trennung in Antipoden. An DL-Catechinen haben E. A. H. ROBERTS und D. J. WOOD<sup>11)</sup> sowie W. MAYER und F. MERGER<sup>12)</sup> auf Cellulose mit Wasser als Elutionsmittel die Trennung in die Antipoden beobachtet.

#### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Das Oligomerengemisch wird nach dem Zutropfverfahren mit Peroxydase hergestellt<sup>11)</sup>. Zur Extraktion verwenden wir neuerdings Äthylacetat statt Butanol, nachdem sich gezeigt hat<sup>7)</sup>, daß Fraktionen, die längere Zeit mit Resten von Butanol aufbewahrt werden, an der ungesättigten Carbinolgruppe mit Butyl veräthert werden können. Die eingengten Äthylacetatextrakte werden, wie früher beschrieben<sup>5)</sup>, im Gegenstrom mit Dimethylformamid/Wasser/Äther (1:4:5 Vol.) aufgeteilt. Die Fraktionen, die schneller als Dehydro-diconiferylalkohol (A) wandern und noch das Pinoresinol (B) enthalten, werden vereinigt und von der Hauptmenge des Lösungsmittels befreit. 5 g des Sirups werden in 10 ccm Aceton gelöst und mit so viel Perlonpulver versetzt, daß ein steifer Brei entsteht. Dieser wird unter Umrühren mit 20 ccm Wasser verdünnt und sogleich auf eine 1 m lange und 4 cm breite Säule gegeben, in die Perlonpulver mit Aceton/Wasser (3:7 Vol.) eingeschlämmt ist. Mit demselben Lösungsmittel wird eluiert und in Fraktionen von 15–20 ccm unterteilt, die papierchromatographisch untersucht werden. Die Reihenfolge der austretenden Substanzen ist: Dihydro-coniferylalkohol, Coniferylalkohol, Pinoresinol mit Coniferylaldehyd und Dehydro-diconiferylalkohol, Substanz 8 (Pinoresinolid), Substanz 13, Substanz 10 (Vanillinsäure) sowie Substanz 9 (Gemisch von *cis*- und *trans*-Ferulasäure).

Die *cis*-Ferulasäure läuft im Chromatographier-Gemisch II ein wenig schneller als Substanz 13 und deckt sich im Gemisch I mit *trans*-Ferulasäure. Aus dem Gemisch der Ferulasäure wurde durch verlustreiches Umkristallisieren aus Wasser bei abgeschirmtem Tageslicht *trans*-Ferulasäure vom Schmp. 170–171° gewonnen. Außerdem wurden beide Formen durch Chromatographie mit authent. Präparaten verglichen (s. d. Tab. oben).

<sup>11)</sup> Biochem. J. **53**, 332 [1953].

<sup>12)</sup> Liebigs Ann. Chem. **644**, 70 [1961].

Der Coniferylalkohol enthält von der Herstellung her häufig geringe Mengen Ferulasäure-äthylester und Dihydro-coniferylalkohol. Durch wiederholte Kristallisation aus Methylchlorid ist der Ferulasäureester leicht zu entfernen, während der Dihydro-coniferylalkohol hartnäckiger anhaftet. Man kann den Coniferylalkohol auch nach Zusatz von 5–10% Dioxan in einer Schale schmelzen und nach dem Erstarren zwischen dicken Lagen Filtrierpapier bei 250 at auspressen.

Der Trockenrückstand der Fraktion, in der sich die Vanillinsäure befindet, wird mit sehr wenig Aceton aufgenommen und auf einen Viertelbogen dicken Chromatographiepapiers (Macherey, Nagel & Co, Düren Nr. 2214) aufgetragen. Als Leitsubstanz der Chromatographie muß ein wenig Ferulasäure anwesend sein. Die Beschickung soll 10–15 mg Substanz betragen. Das Chromatogramm wird mit Isopropylalkohol und 25-proz. Ammoniak (7:3 Vol) aufsteigend entwickelt. Um die Lage der Vanillinsäure festzustellen, werden auf beiden Seiten des Chromatogramms schmale Streifen abgeschnitten und mit diazotierter Sulfanilsäure besprüht. Ferner läßt sich mit Hilfe der Ferulasäure unter der Ultraviolettlampe feststellen, ob das Chromatogramm gerade gelaufen ist. Der die Vanillinsäure enthaltende Streifen wird ausgeschnitten, mit Methanol eluiert, der Eindampfrückstand mit Wasser aufgenommen, angesäuert und mit Äther extrahiert, der Äther verdampft und der Rückstand bei 150° aus einem Hohlsliffobjektträger an einen gewöhnlichen Objektträger sublimiert. Schmp. und Misch-Schmp. 210–211°. Die Ausb. beträgt höchstens 0.1% der Oligomeren, wahrscheinlich wesentlich weniger. Die  $R_F$ -Werte sind in der Tab. S. 1268 angegeben.

Das *Pinoresinolid* scheidet sich beim langsamen Abdunsten des Acetons im Verlauf einiger Tage in perlmutterglänzenden Plättchen vom Schmp. 127–128° ab. Zur Darstellung größerer Mengen an *Pinoresinolid* wird eine Lösung von 1.94 g *Ferulasäure*, 0.42 g  $\text{NaHCO}_3$  in 1 l Wasser und 200 ccm Citratpuffer vom pH 5.5 mit 5 mg Peroxydase versetzt. Unter Rühren läßt man im Verlauf von 5 Tagen gleichzeitig 1 l 0.02 n  $\text{H}_2\text{O}_2$  sowie eine Lösung von 1.8 g *Coniferylalkohol* in 10 ccm Dioxan und 990 ccm Wasser zutropfen, wobei jeden Tag 1 mg Peroxydase zugefügt wird. Nach der Beendigung wird mit Natriumchlorid gesättigt und mit Äthylacetat extrahiert. Der Rückstand der mit Natriumsulfat getrockneten Extrakte (3.7 g) wird, wie oben beschrieben, an der Perlonsäure fraktioniert. Ausb. 200–220 mg (5–6%). Aus Äthylacetat werden derbe, zu Rosetten verwachsene Plättchen vom Schmp. 127–128° erhalten. Die Substanz hält hartnäckig eingeschlossenes Wasser fest.

Zur Analyse wurde 12 Stdn. bei 120°/1 Torr über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet.

$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7$  (372.4) Ber.  $\text{OCH}_3$  16.67 Gef.  $\text{OCH}_3$  16.24, 16.51

*Diacetat*: Die Lösung von 50 mg *Pinoresinolid* in 0.5 ccm *Acetanhydrid* und 0.4 ccm Pyridin wird 15 Stdn. auf 40° erwärmt, mit Eiswasser auf 10 ccm verdünnt und einige Stdn. bei 0° aufbewahrt. Die Kristalle werden mit Wasser gewaschen und aus wenig Benzol/Tetrachlorkohlenstoff (1:10 Vol.) als farbloses, kristallines Pulver gewonnen. Schmp. 125°.

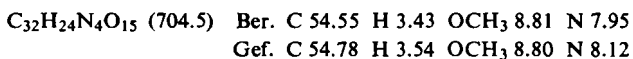
$\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{O}_9$  (456.4) Ber. C 63.15 H 5.30  $\text{OCH}_3$  13.60  $\text{COCH}_3$  18.86  
Gef. C 62.89 H 5.19  $\text{OCH}_3$  13.44  $\text{COCH}_3$  18.78

*Dimethyläther*: Die Suspension von 200 mg *Pinoresinolid* in 10 ccm Methanol wird mit 40 ccm Äther versetzt, der 0.840 g *Diazomethan* enthält. Nach 4 bis 6 Stdn. tritt bei Raumtemperatur Lösung ein. Nach 24 Stdn. wird eingedampft und der Rückstand aus 50-proz. wäBr. Aceton umkristallisiert. Plättchen mit Schmp. 126–127°.

$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_7$  (400.4) Ber. C 65.99 H 6.04  $\text{OCH}_3$  31.00 Gef. C 65.99 H 5.86  $\text{OCH}_3$  30.65

*Bis-[2.4-dinitro-phenyläther]*: Die Lösung von 30 mg *Pinoresinolid* und 30 mg 2.4-Dinitrofluorbenzol in 0.8 ccm Dimethylformamid wird mit 0.2 ccm einer 9-proz. Natriumhydrogen-

carbonatlösung in Wasser versetzt und 5 Stdn. gerührt. Danach werden erneut 0.5 ccm Hydrogencarbonatlösung zugefügt und nach weiteren 3 Stdn. 5 ccm Wasser zugegeben. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus wenig Aceton mit viel Methanol ausgefällt. Blaßgelbes amorphes Pulver, Schmp. 109–111°.



Die *Substanz 13* wird aus ihren Lösungen als hell gelbbrauner Sirup erhalten. Die Lösung in kochendem Methylenchlorid wird filtriert und bis zur Trübung eingeengt. Bei längerem Stehenlassen scheiden sich 70–80 mg eines farblosen Pulvers ab, das 12 Stdn. bei 1 Torr und 70° getrocknet wird.



Der *Bis-dinitrophenyläther* wird wie der des Pinoresinols aus 50 mg der *Substanz 13* hergestellt. Die Lösung des Rohprodukts in 1 ccm Aceton wird mit 10 ccm Benzol versetzt und auf eine 1 cm hohe Schicht von neutralem  $\text{Al}_2\text{O}_3$  gegeben. Darauf wird mit je 10 ccm einer Mischung von Benzol mit Aceton eluiert, und zwar der Reihe nach mit folgenden Volumverhältnissen: 9:1; 8:2; 6:4; 2:8; dann folgen 2 Elutionen mit reinem Aceton. Das Hauptprodukt findet sich in den 3 letzten Fraktionen. Sie werden verdampft, der Rückstand wird in einem Tropfen Aceton gelöst, mit 1 ccm Benzol versetzt und mit 4 ccm Cyclohexan gefällt. Zur Analyse wird 12 Stdn. bei 50°/1 Torr getrocknet.

