

KARL FREUDENBERG und BERNHARDT LEHMANN *)

Radioaktive Isotope und Lignin, X¹⁾Untersuchung eines mit ¹⁴C markierten Ligninpräparates

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

(Eingegangen am 11. Januar 1963)

Fichtenholz, das nach Eingabe von mittelständig markiertem Phenylalanin gewachsen war, wurde auf methoxylierte Benzolcarbonsäuren verarbeitet. Die Radioaktivität pro Mol beträgt bei der Isohemipinsäure (II) 29% der Radioaktivität der Lignineinheit, bei der Metahemipinsäure (III) 15% und bei der Hemipinsäure (IV) 10%. Außerdem erwiesen sich als radioaktiv die Methoxytrimesinsäure (V), 4-Methoxy-isophthalsäure (VI), 4-Methoxy-*o*-phthalsäure (VII), Trimethoxy-*o*-phthalsäure (VIII) und 2.3.4-Trimethoxy-benzoessäure (IX). Die Herkunft des radioaktiven und inaktiven Teils der *o*-Phthalsäuren wird erörtert.

Unter den Säuren der Gruppe C₆C₃ wird Phenylalanin besonders leicht in Lignin verwandelt. Früher wurde gezeigt²⁾, daß Fichtenholz nach der Methylierung, Behandlung mit Alkali, erneuter Methylierung und Oxydation radioaktive Isohemipinsäure ergab, wenn den Bäumchen Phenylalanin-[β-¹⁴C] eingegeben war. Damals wurde ausgesagt, daß die Isohemipinsäure kräftig radioaktiv sei. Wir haben diesen Versuch mit verbesserter Technik wiederholt und erweitert.

Das methylierte Holz wurde in der gewohnten Weise auf das Gemisch der Abbausäuren verarbeitet³⁾. In reinem Zustand wurde Dehydrodiveratrumsäure (I) isoliert und über den Methylester gereinigt. Sie ist nicht radioaktiv. Dagegen sind es die Isohemipinsäure (II), Metahemipinsäure (III) und Hemipinsäure (IV). Das Lignin, aus dem diese Säuren stammen, wurde aus dem Holze nach KLASON isoliert. Es betrug 29% des Holzes. In der Zusammensetzung (C₆H_{6,82}O₂(H₂O)_{0,38}(OCH₃)_{0,62}) unterschied sich dieses Präparat von gewöhnlichem Fichtenlignin durch einen um 0,3 zu geringen Methoxylgehalt (0,62 statt 0,92). Vielleicht enthielt es Bestandteile der Rinde; Holz und Rinde sind bei den verwendeten sehr dünnen Zweigen nur schwer zu trennen oder das Lignin junger Bäumchen ist von dem des älteren Holzes verschieden. Als Gewicht der Einheit wurde 174 eingesetzt. Die Radioaktivität beträgt: Lignin 1,01 μC/mMol; Isohemipinsäure-dimethylester 0,292 μC/mMol; Metahemipinsäure-dimethylester 0,148 μC/mMol; Hemipinsäure-dimethylester 0,099 μC/mMol. Außerdem sind folgende Säuren radioaktiv: Methoxytrimesinsäure (V),

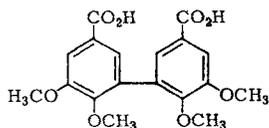
*) Dem WIRTSCHAFTSMINISTERIUM BADEN-WÜRTTEMBERG danken wir für die Bereitstellung von Mitteln. Herrn Dr. E. JOST sind wir zu Dank verpflichtet für die freundliche Beratung.

1) IX. Mittel.: K. FREUDENBERG, K. JONES und H. RENNER, Chem. Ber. **96**, 1844 [1963], vorstehend.

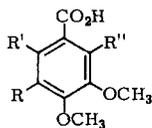
2) K. FREUDENBERG und F. NIEDERCORN (Radioakt. Isot. u. Lignin VIII), Chem. Ber. **91**, 591 [1958].

3) a) K. FREUDENBERG und C.-L. CHEN, Chem. Ber. **93**, 2533 [1960]; b) K. FREUDENBERG, C.-L. CHEN und G. CARDINALE, Chem. Ber. **95**, 2814 [1962].

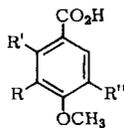
4-Methoxy-isophthalsäure (VI), 4-Methoxy-*o*-phthalsäure (VII), Trimethoxy-*o*-phthalsäure (VIII) und aus dieser durch Decarboxylierung entstandene 2.3.4-Trimethoxy-benzoesäure (IX). Vielleicht ist auch die Veratrumsäure sehr schwach radioaktiv. Einige nicht identifizierte Säuren scheinen auch aktiv zu sein.



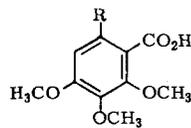
I



II: R = CO₂H, R', R'' = H
 III: R' = CO₂H, R, R'' = H
 IV: R'' = CO₂H, R, R' = H



V: R, R'' = CO₂H, R' = H
 VI: R = CO₂H, R', R'' = H
 VII: R' = CO₂H, R, R'' = H



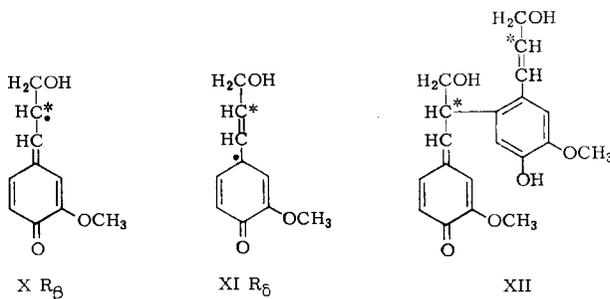
VIII: R = CO₂H
 IX: R = H

Daß die Dehydro-diveratrumsäure inaktiv ist, war zu erwarten. Auf der anderen Seite war die Aktivität der Isohemipinsäure vorauszusehen. Ihr radioaktives Kohlenstoffatom entstammt ganz oder zur Hauptsache dem in das Lignin eingebauten Dehydro-diconiferylalkohol (Formel V der vorstehenden Abhandlung). Aber die Isohemipinsäure besitzt nur 29% der molaren Radioaktivität des aus demselben Holze bereiteten, mit methoxylärmeren Beimengungen vermischten Lignins. Bei der Berechnung ist die — unbewiesene — Annahme gemacht, daß die Beimengung und der echte Ligninanteil des Klason-Lignins dieselbe Aktivität besitzen. Wenn dagegen alle Aktivität des Klason-Lignins in dem echten Ligninanteil vereinigt wäre, fiel die Aktivität der Isohemipinsäure auf 20%; wäre die Aktivität des Nicht-Ligninanteils stärker als die des Lignins, so könnte statt 29% ein höherer Wert zutreffend sein. Der inaktive Teil der Isohemipinsäure entstammt Gruppierungen, an denen das mittelständige C-Atom nicht beteiligt ist, z. B. Biphenylanordnungen⁴⁾ oder anderen Kondensationen. Der Versuch sagt über die Menge des Dehydro-diconiferylalkohols im Lignin nichts aus.

Auch die beiden Dimethoxy-*o*-phthalsäuren müssen — jede für sich — verschiedener Herkunft sein. Die Radioaktivität der Metahemipinsäure und Hemipinsäure beträgt 15% und 10% der des Klason-Lignins; auch diese Zahlen sind ungewiß, aber ihr Verhältnis zur Radioaktivität der Isohemipinsäure steht fest. Der radioaktive Anteil sagt aus, daß in der *o*-Stellung zur Seitenkette des ursprünglichen Guajacylrestes, also in Stellung 6 oder 2, das mittelständige Kohlenstoffatom einer zweiten Coniferyleinheit eingetreten ist. Eine der möglichen Erklärungen hierfür bietet die Annahme, daß bei der Dehydrierung des Coniferylalkohols zu den 3 bisher belegten mesomeren Radikalformen eine vierte hinzukommt (XI), die wir R₈ nennen. Diese Form ist uns bisher nicht begegnet. Wenn sie mit der hauptsächlich begünstigten Form R_β (X) reagiert, so kann sich durch Dienonphenol-Umlagerung ein Zwischenprodukt (XII) bilden, das auf der einen Seite ein Chinonmethid, auf der anderen ein substituierter Coniferylalkohol ist. Dieses Zwischenprodukt wird kaum aufzufinden sein, denn als Chinonmethid unterliegt es den zahlreichen Reaktionen eines solchen, als substituierter Coniferylalkohol wird es sehr rasch weitere Dehydrierung erleiden. Man wird also dieser Anordnung nur eingebaut in größeren Verbänden begegnen. Nach der Methylierung und Oxydation wird XIV aktive Metahemipinsäure (III) liefern. Reagiert das C-Atom 2, so entsteht ein mit XII isomeres Produkt, das aktive

⁴⁾ I. c.^{3b)}, S. 2819.

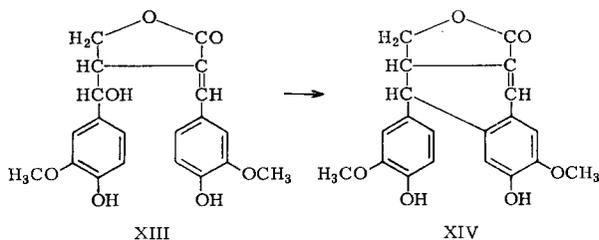
Hemipinsäure (IV) bildet. Auch die *p*-Cumar- und Sinapinkomponente liefern je eine aktive *o*-Phthalsäure, über deren Aktivitätsgrad wir noch nichts wissen. Die versuchte



Erklärung für den radioaktiven Teil der *o*-Phthalsäuren bedarf der Bestätigung, denn es ist nicht sicher, ob nach der Reaktion zwischen X und XI die Bedingungen für eine Dienonphenol-Umlagerung gegeben sind.

Eine andere Erklärung ist einfacher: Wenn das mesomere Radikal des dehydrierten Coniferylalkohols durch inter- oder intramolekularen Wasserstoffaustausch Radikale in 6- und 2-Stellung des Benzolkerns bildet, wäre die Bildung der *o*-Phthalsäuren erklärt. Hierzu paßt die Wahrnehmung⁵⁾, daß 6-Deutero-coniferylalkohol bei der enzymatischen Dehydrierung etwa 8%, 2-Deutero-coniferylalkohol einige Procente Deuterium verlieren. Schließlich ist zu erwähnen, daß E. MÜLLER⁶⁾ unter den mesomeren Grenzformen der Aroxyde auch Radikale in *m*-Stellung zum Sauerstoff formuliert.

Ähnliche Rätsel gibt die Bildung des nicht radioaktiven Teils der *o*-Phthalsäuren auf. Für den inaktiven Anteil der Metahemipinsäure und Hemipinsäure bietet sich eine mögliche Erklärung in dem Lignenolid XIII, das neuerdings unter den Dehydrierungsprodukten des Coniferylalkohols aufgefunden wurde⁷⁾ und nach dem Ringschluß zum hypothetischen Cyclolignan XIV das Ausgangsmaterial für die inaktiven *o*-Phthalsäuren bilden kann.



Im übrigen müssen inaktive *o*-Phthalsäuren entstehen, wenn die Stellung 2 oder 6 des einen dehydrierten Coniferylalkohols mit einem nicht radioaktiven C-Atom eines zweiten reagiert.

⁵⁾ K. FREUDENBERG und V. JOVANOVIĆ, unveröffentlicht.

⁶⁾ E. MÜLLER, A. RIEKER und K. SCHEFFLER, Liebigs Ann. Chem. **645**, 92 [1961].

⁷⁾ K. FREUDENBERG und H. GEIGER, Chem. Ber. **96**, 1265 [1963].

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Markiertes Fichtenholz und Lignin: Die Lösung von 0.2 mC DL-Phenylalanin- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$ (63.4 mg) in 40 ccm Wasser wurde Anfang Juni 1960 in Gaben von je 1 ccm 4jährigen Fichten durch Tauchtriebe⁸⁾ zugeführt. Die Flüssigkeiten waren nach 24 bis 48 Stdn. aufgesaugt. Ende Oktober wurden die beschickten Seitenäste etwa 1 cm unterhalb der Tauchtriebe abgeschnitten und mit Schere und Rasierklingen von Nadeln und Rinde befreit. Das kleingeschnittene Holz wurde im Starmix unter 150 ccm Methanol/Wasser (9:1) Vol. zerkleinert, nach der Trocknung fein gemahlen, gesiebt und mit 3 l Aceton/Wasser (6:1 Vol.) mehrere Tage perkoliert, bis sich eine Probe der Extraktionslösung nur noch ganz schwach mit diazotierter Sulfanilsäure färbte. Die Masse wog lufttrocken 17.7 g. Das *Holzmehl* wurde zur Vorhydrolyse mit 400 ccm 1-proz. Schwefelsäure 1 Stde. in gelindem Sieden gehalten, gewaschen und an der Luft getrocknet (11.8 g lufttrocken). Die Ligninbestimmung⁹⁾ ergab 29.2%, bezogen auf das nichthydrolysierte trockene Holz. Die Zusammensetzung des Ligninpräparates ist oben erörtert.

Abbauprodukte: 10 g des vorbehandelten *Holzmehls* wurden methyliert, mit wäbr. Alkali gekocht, methyliert und oxydiert³⁾. Nach Entfernen des größten Teils der *Dehydro-diveratrumsäure* (I)³⁾, die sich nicht als radioaktiv erwies, wurden die Fraktionen gesammelt, die den Hauptanteil der *Isohemipinsäure* (II) enthielten. Daraus wurde der reine *Isohemipinsäure-dimethylester* herauspräpariert. Die Mutterlaugen wurden den übrigen Säurefraktionen beigegeben und erneut auf der Säule fraktioniert.

Die Abbausäuren wurden zunächst auf dem Papierchromatogramm auf Radioaktivität geprüft. Dieser Versuch diente nur zur Orientierung. Im Methandurchflußzählrohr wurde ein wie früher¹⁰⁾ hergestelltes Chromatogramm untersucht. Radioaktiv wurden die Stellen folgender Säuren sowie einige nicht identifizierte Einzelstellen gefunden.

Abbausäuren	R _F
Methoxytrimesinsäure	0.03
Stelle zwischen Methoxytrimesinsäure und 4-Methoxy-isophthalsäure	
4-Methoxy-isophthalsäure	0.07
Isohemipinsäure	0.11
Metahemipinsäure	0.15
Hemipinsäure	0.17
Trimethoxy- <i>o</i> -phthalsäure	0.19
4-Methoxy- <i>o</i> -phthalsäure	0.20
Stelle langsamer als Dehydro-diveratrumsäure	<0.27
Stelle schneller als Dehydro-diveratrumsäure	>0.27
Veratrumsäure (?)	0.43
2.3.4-Trimethoxy-benzoesäure	0.45
Stelle langsamer als Trimethylgallussäure	<0.54
Stelle schneller als Trimethylgallussäure	
Anisoylameisensäure (?)	>0.54

Nicht radioaktiv sind Anissäure, 2-Methoxy-benzoesäure, Trimethylgallussäure, die 3 methoxylierten Biphenyl-dicarbonsäuren und die Diphenyläther-dicarbonsäuren. Über die aliphatischen Säuren sowie die Benzolpentacarbonsäure kann nichts ausgesagt werden.

⁸⁾ K. FREUDENBERG, H. REZNIK, W. FUCHS und M. REICHERT (Radioaktive Isotope und Lignin, III), *Naturwissenschaften* **42**, 29 [1955].

⁹⁾ K. FREUDENBERG und TH. PLOETZ, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **73**, 754 [1940]; TH. PLOETZ, *Cellulosechemie* **18**, 49 [1940].

¹⁰⁾ l. c.^{3b)}, S. 2816/7.

Der Messung der Radioaktivität ging die präparative Trennung der Säuren voraus. Verwendet wurde DAM-Austauschpulver (Schleicher & Schüll) mit einer Mischung von Benzol/Eisessig/Wasser (8:11:4 Vol.)³⁾. Jene Fraktionen, die hauptsächlich *Isohemipinsäure* (II), *Hemipinsäure* (IV) und *Metahemipinsäure* (III) enthielten, wurden gesammelt und mit *Diazomethan* methyliert. Zunächst wurde auf einer Cellulosesäule (Whatman Standard-Grade) mit Cyclohexan/Dimethylformamid (40:1 Vol.) fraktioniert. Daran schloß sich eine Auftrennung auf kleinen Aluminiumoxydsäulen (Woelm neutral) mit Benzol/Äther (erst 6:4 Vol., dann 4:6 Vol.) an. Dabei wurden Fraktionen mit reinem *Isohemipinsäure-dimethylester*, reinem *Hemipinsäure-dimethylester* und reinem *Metahemipinsäure-dimethylester* gewonnen.

Verdünnung der Präparate: 9.81 mg reiner, radioaktiver *Isohemipinsäure-dimethylester* wurde mit 20 mg *inaktivem Ester* aus 6 ccm Methanol/Wasser umkristallisiert. Man erhielt 22.4 mg lange Nadeln, die aus 3.5 ccm Methanol/Wasser erneut umkristallisiert wurden. Davon wurde ein Teil zur Verbrennung und Bestimmung der Radioaktivität in Form von CO₂ im Gaszählrohr verwendet. Der andere Teil wurde erneut umkristallisiert und gleichfalls bestimmt. Schmp., R_F -Wert und Radioaktivität der dritten und vierten Umkristallisation waren gleich. — Von reinem, radioaktivem *Hemipinsäure-dimethylester* wurden 1.80 mg mit 24.92 mg reinem, *inaktivem Hemipinsäure-dimethylester* verdünnt. Die Zählungen im Gaszählrohr ergaben bei der zweiten Umkristallisation Konstanz der Impulsraten. — 11.185 mg radioaktiver *Metahemipinsäure-dimethylester* wurden mit 35 mg *inaktivem Metahemipinsäure-ester*, Schmp. 84–85.5°, vermischt und aus Methanol/Wasser (1:3) umkristallisiert. Die zweite und dritte Umkristallisation ergaben innerhalb der Fehlergrenze die gleichen Zählraten.

Bestimmung der Radioaktivität: Die radioaktiven Messungen erfolgten mit Hilfe einer „Anlage zur Gasphasenmessung von Radiokohlenstoff“ (FRIESEKE & HOEPFNER), die H. SIMON und Mitarbeiter¹¹⁾ beschrieben haben.

	Aktivität
<i>Lignin</i> (Mol.-Gew. 174)	
0.697 $\mu\text{C} \times 174/12.035$ mg	= 1.008
0.718 $\mu\text{C} \times 174/12.34$ mg	= 1.012
	Mittel = 1.010 $\mu\text{C}/\text{mMol}$

<i>Isohemipinsäure-dimethylester</i> (Mol.-Gew. 254.2), Verdünnungsfaktor (V. F.) = 3.04
3. Krist.: 0.00185 $\mu\text{C} \times 254.2 \times 3.04/4.925$ mg = 0.290
4. Krist.: 0.00184 $\mu\text{C} \times 254.2 \times 3.04/4.815$ mg = 0.295
Mittel = 0.292 $\mu\text{C}/\text{mMol}$

oder 29% des Lignins

<i>Metahemipinsäure-dimethylester</i> (Mol.-Gew. 254.2), V. F. = 4.13
2. Krist.: 0.000628 $\mu\text{C} \times 254.2 \times 4.13/4.49$ mg = 0.1468
3. Krist.: 0.000617 $\mu\text{C} \times 254.2 \times 4.13/4.38$ mg = 0.1493
Mittel = 0.148 $\mu\text{C}/\text{mMol}$

oder 14.7% des Lignins

<i>Hemipinsäure-dimethylester</i> (Mol.-Gew. 254.2), V. F. = 14.84
2. Krist.: 0.000165 $\times 254.2 \times 14.84/6.33$ mg = 0.098
3. Krist.: 0.000168 $\times 254.2 \times 14.84/6.33$ mg = 0.100
Mittel = 0.099 $\mu\text{C}/\text{mMol}$

oder 9.8% des Lignins

¹¹⁾ H. SIMON, H. DANIEL und J. F. KLEBE, *Angew. Chem.* 71, 303 [1959].