

HORST NIMZ

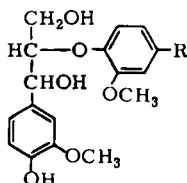
Isolierung von Guajacylglycerin- β -coniferyläther aus Fichtenholz

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

(Eingegangen am 8. August 1964)

Die milde Acidolyse von Fichtenholz mit 2-proz. Essigsäure bei 100° ergibt in geringer Ausbeute drei „dimere“ Phenole, die sich chromatographisch sehr ähnlich verhalten. Eines davon ist der Guajacylglycerin- β -coniferyläther (I), der nach katalytischer Hydrierung in einen kristallinen Dinitrophenyläther übergeführt wird.

Nach gegenwärtigen Vorstellungen¹⁾ ist das Coniferenlignin als ein Dehydrierungs-polymerisat von *p*-Hydroxy-zimtalkoholen, vornehmlich des Coniferylalkohols, aufzufassen. Bei der enzymatischen Dehydrierung des Coniferylalkohols *in vitro* entstehen als Zwischenprodukte dimere Phenole, unter denen der Guajacylglycerin- β -coniferyläther (I)²⁾ mengenmäßig überwiegt.



I: R = CH=CH-CH₂OH

II: R = CH₂-CH₂-CH₂OH

Die natürliche Bildung des Coniferenlignins wird jedoch nur in geringem Umfange über dimere Produkte des Coniferylalkohols erfolgen, da dessen Konzentration im Cambium äußerst gering ist. Reagieren zwei dehydrierte Coniferylalkoholmoleküle miteinander zu I, so sollte dieses, da es nur eine Phenolgruppe besitzt, endständig in das Lignin eingebaut werden und daher in einigen Fällen¹⁾ durch eine milde Hydrolyse wieder abspaltbar sein. Außerdem bleibt die Doppelbindung in der Seitenkette beim Einbau von I in das Lignin erhalten. Olefinische Doppelbindungen sind im Fichtenlignin in geringer Menge nachgewiesen worden³⁾. — Überwiegend reagiert der Coniferylalkohol im Cambium jedoch mit bereits gebildeten oligomeren Zwischenprodukten unter Ausbildung nichtendständiger Guajacylglycerin- β -arylätherbindungen. Es ist nicht möglich, dimere Spaltstücke des Lignins zu isolieren, die diese Bin-

¹⁾ K. FREUDENBERG, *Holzforschung* **18**, 3 [1964].

²⁾ K. FREUDENBERG und H. SCHLÜTER, *Chem. Ber.* **88**, 617 [1955].

³⁾ E. ADLER, *Paperi ja Puu* **11**, 634 [1961]; B. O. LINDGREN und H. MIKAWA, *Acta chem. scand.* **11**, 826 [1957].

dungen noch enthalten. Letztere sind beim Ligninabbau nur indirekt durch Äthanololyse⁴⁾, Acidolyse⁵⁾ und Sulfittierung⁶⁾ nachgewiesen worden.

Daher sollte der direkte Nachweis endständiger Guajacylglycerin- β -coniferyl-äthergruppen im Coniferenlignin eine wichtige Stütze für die gegenwärtige Auffassung über den Bildungsmechanismus und die Struktur des Lignins, wie sie von K. FREUDENBERG¹⁾ vertreten wird, darstellen. — 1960 haben T. FUKUZUMI⁷⁾ und 1963 NORD und Mitarbb.⁸⁾ angegeben, daß sie beim enzymatischen Abbau von Fichtenlignin den Guajacylglycerin- β -coniferyläther im Chromatogramm angetroffen haben. Auf Grund der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchsergebnisse ist für diese Verbindung der chromatographische Nachweis allein jedoch nicht ausreichend.

Wird feingemahlene Fichtenholz, das zuvor mit Aceton/Wasser (9:1 Vol.) erschöpfend extrahiert wurde, mit 2-proz. Essigsäure bei 100° eine Woche perkoliert, so gehen etwa 10% seines Trockengewichtes in Lösung. Der eingeeengte Extrakt enthält neben Kohlenhydraten in geringer Menge drei Phenole, die im Aceton/Wasser-Extrakt nicht vorkommen. Sie verhalten sich chromatographisch sehr ähnlich. Zur Papierchromatographie werden die früher⁹⁾ beschriebenen, bewährten Lösungsmittelgemische I und II auf vorgetränktem Papier verwendet. Mit Gemisch I zeigen alle drei Phenole den gleichen R_F -Wert wie authentischer Guajacylglycerin- β -coniferyläther. Mit Gemisch II erfolgt eine Auftrennung in zwei dicht beieinanderliegende Flecke. Die Kupplungsfarbe aller drei Phenole mit diazotierter Sulfanilsäure ist gelb. — Schneller laufende Phenole konnten nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Sie sind jedenfalls höchstens in Spuren vorhanden. Dagegen treten in geringer Menge Phenole mit kleinerem R_F -Wert auf, die vermutlich höhermolekular sind und nicht untersucht wurden.

Der Guajacylglycerin- β -coniferyläther (I) läßt sich durch Chromatographie an Kieselgel von den beiden anderen Phenolen, die zusammen bleiben, abtrennen. Seine Ausbeute aus Holz beträgt 0.1 bis 0.2%. Er wird quantitativ zum Guajacylglycerin- β -dihydroconiferyläther (II) hydriert, der sich chromatographisch vom Ausgangsmaterial unterscheidet und dieselben R_F -Werte wie synthetisches II besitzt. Schließlich wird II in den kristallinen 2.4-Dinitro-phenyläther übergeführt, dessen Identität mit authentischem Produkt¹⁰⁾ durch R_F -Wert, Schmp. und Misch-Schmp. bewiesen wird.

Die Strukturbestimmung der beiden anderen Phenole, die im folgenden als Phenol Ph₁ und Ph₂ bezeichnet werden, ist bisher nicht gelungen. Zunächst bereitet ihre

4) M. J. HUNTER, A. B. CRAMER und H. HIBBERT, J. Amer. chem. Soc. **61**, 516 [1939]; E. ADLER und S. YLLNER, Svensk Papperstidn. **57**, 78 [1954]; K. KRATZL, W. KISSER, J. GRATZL und H. SILBERNAGEL, Mh. Chem. **90**, 771 [1959].

5) E. ADLER, J. M. PEPPER und E. ERIKSOO, Ind. Engng. Chem. **49**, 1391 [1957]; K. LUNDQUIST, Acta chem. scand. **16**, 2303 [1962].

6) B. O. LINDGREN, Svensk Papperstidn. **55**, 78 [1952].

7) Bull. agric. chem. Soc. Japan **24**, 728 [1960].

8) H. ISHIKAWA, W. J. SCHUBERT und F. F. NORD, Arch. Biochem. Biophysics **100**, 131 [1963].

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

10) K. FREUDENBERG und W. EISENHUT, Chem. Ber. **88**, 626 [1955].

Trennung Schwierigkeiten. Sie gelingt nur, und auch dann nur teilweise, wenn an einer Cellulosesäule mit Xylol/Methyläthylketon/Formamid (25 : 25 : 1 Vol.) chromatographiert wird. Hinterher läßt sich aber das Formamid nicht quantitativ entfernen. Dagegen gelingt die Trennung der Dinitrophenyläther der beiden Phenole befriedigend. Daher wurde auf die Trennung der beiden freien Phenole verzichtet. Sie wurde nur in kleinem Maßstab zwecks Zuordnung der beiden Dinitrophenyläther durchgeführt. Das Formamid wurde im Hochvakuum bei 70° Badtemperatur möglichst weitgehend entfernt und der Rückstand sofort mit 2.4-Dinitro-fluorbenzol umgesetzt. Aus Substanzmangel konnten bisher nur die beiden Dinitrophenyläther von Ph₁ und Ph₂ und deren Acetate analysenrein erhalten werden. Alle vier Verbindungen sind amorph, wodurch die analytischen Daten etwas unsicher werden. Mit Sicherheit besitzen jedoch beide Phenole je zwei phenolische und zwei alkoholische Hydroxylgruppen. Mit einiger Vorsicht lassen sich ferner die Bruttoformeln C₂₀H₂₆O₆ (Phenol Ph₁) und C₂₀H₂₄O₇ (Phenol Ph₂) aufstellen. Die auf Holz bezogene Ausbeute beträgt für beide Phenole je etwa 0.3‰.

Die Phenole I, Ph₁ und Ph₂ sind als dimere Abbauprodukte des Fichtenlignins aufzufassen. Es muß aber betont werden, daß sie ausschließlich aus peripheren Gruppen des Lignins stammen, da der Hauptanteil des Lignins nicht angegriffen wird. Die gewählten Acidolysebedingungen lassen außerdem den Schluß zu, daß diese Phenole über leicht hydrolysierbare Sauerstoffbindungen an das Restlignin gebunden sind. Möglich wären Benzylarylätherbindungen, die vor kurzem¹¹⁾ im Lignin nachgewiesen wurden. Solche endständigen Benzylaryläther sind im Ligninschema von K. FREUDENBERG¹¹⁾ bei den Einheiten 1 und 13 c angedeutet.

Die beschriebene Methode stellt eine schonende Acidolyse bei großer Verdünnung dar. Außerdem werden in Lösung gegangene Anteile sehr schnell dem Temperatureinfluß entzogen. Über die Anwendung dieser Methode auf die Äthanolyse von Fichten- und Buchenholz wird später berichtet werden. Verwendet man bei der beschriebenen Methode anstelle von 2-proz. Essigsäure eine 1-proz. wäßr. Perpropionsäure, so gehen 51–53% vom Trockengewicht des Fichtenholzes sehr schnell in Lösung. Zurück bleibt schneeweiße Cellulose. Für 100 g Fichtenholz benötigt man 6l Perpropionsäurelösung bei einer Extraktionszeit von ungefähr 5 Stdn. Der eingeengte Extrakt enthält jedoch, entgegen früheren Angaben über die Einwirkung von Peressigsäure auf Fichtenholz¹²⁾, nur sehr geringe Mengen niedermolekularer phenolischer Substanzen.

Tabelle der R_F-Werte

Die Zusammenstellung zeigt R_F-Werte, die in den früher⁹⁾ beschriebenen Gemischen I und II auf vorgetränktem Papier sowie durch Dünnschichtchromatographie auf „Kieselgel G“ (E. Merck, Darmstadt) mit den Lösungsmittelgemischen Benzol/Aceton (3 : 2) (III) und Cyclohexan/Aceton (2 : 1) (IV) erhalten werden.

¹¹⁾ K. FREUDENBERG, J. M. HARKIN und H. K. WERNER, *Naturwissenschaften* **50**, 476 [1963]; *Chem. Ber.* **97**, 909 [1964].

¹²⁾ A. POLJAK, *Holzforschung* **5**, 31 [1951]; Schering Akt.-Ges. (Erf. A. POLJAK), *Dtsch. Bundes-Pat.* 1 013 285 [1957], *C. A.* **53**, 22949 [1959].

Substanz	R_F -Werte in den Gemischen			IV
	I	II	III	
Guajacylglycerin- β -coniferyläther (I)	0.090	0.040	0.24	
Guajacylglycerin- β -dihydroconiferyläther (II)	0.118	0.050	0.25	
Phenol Ph ₁	0.090	0.040	0.35	
Phenol Ph ₂	0.091	0.035	0.35	
Dinitrophenyläther von II			0.40	
Dinitrophenyläther von Ph ₁			0.54	
Dinitrophenyläther von Ph ₂			0.63	
Acetat des Dinitrophenyläthers von Ph ₁				0.35
Acetat des Dinitrophenyläthers von Ph ₂				0.35

Herrn Prof. K. FREUDENBERG danke ich für seine Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit sowie der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT für die Gewährung von Mitteln.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Gewinnung des Rohextraktes: 200 g lufttrockenes Fichtenholzmehl (*Picea excelsa*) (Trockengewicht 175 g), das zuvor mit Aceton/Wasser (9:1 Vol.) bei 20° erschöpfend extrahiert worden war¹³⁾, wird bei 100° mit 2-proz. wäbr. Essigsäure perkoliert. Hierfür wird das Holzmehl in eine zylindrische Hülse (5 cm \times 25 cm), die mit einem axial angeordneten, unten offenen Glasrohr versehen ist, eingefüllt. Die verd. Essigsäure wird von oben in das Glasrohr eingetropft, durchfließt das Holzmehl von unten nach oben und fließt oben kontinuierlich ab. Die Hülse taucht in ein auf 100° erwärmtes Glycerinbad. Man stellt die Zutropfgeschwindigkeit so ein, daß pro Tag etwa 2 1/2 l Extrakt erhalten werden. Nach 8 Tagen lassen sich im eingeeengten Extrakt keine Phenole mehr nachweisen. Die Lösung wird i. Vak. unter N₂ auf etwa 1 l eingeeengt und 5 mal mit je 250 ccm n-Butanol extrahiert. Auftretende Emulsionsbildung kann durch Zugabe von etwas Aceton verhindert werden. Die vereinigten Butanol-extrakte werden i. Vak. unter N₂ möglichst vollständig vom Butanol befreit.

Abtrennung der Phenole I, Ph₁ und Ph₂: Der oben erhaltene Rohsirup wird einer Gegenstromverteilung in einer Apparatur nach F. A. VON METZSCH mit 100 Gefäßen zu je 10 ccm Inhalt und Dimethylformamid/Wasser/Essigester (2:3:5 Vol.) als Phasengemisch unterworfen. Nach 250 Überführungen im Durchlaufverfahren enthalten die Gefäße 55–90 das Gemisch der drei Phenole I, Ph₁ und Ph₂. Sie werden gemeinsam i. Vak., zuletzt bei 1 Torr, unter N₂ zum Sirup eingeeengt. Die Ausb. ist unterschiedlich, im Durchschnitt 700 mg.

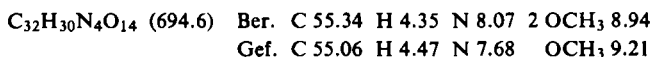
Guajacylglycerin- β -coniferyläther (I): Das sirupöse Phenolgemisch (700 mg) wird auf einer Kieselgelsäule (3 cm \times 75 cm) mit dem Eluierungsgemisch Benzol/Aceton (5:3 Vol.) getrennt. Die Fraktt. (je etwa 30 ccm) 48–72 enthalten das Gemisch der beiden Phenole Ph₁ und Ph₂, Ausb. 140 mg, die Fraktt. 115–145 den reinen *Guajacylglycerin- β -coniferyläther* (I), Ausb. 25 mg. Farbloser, chromatographisch einheitlicher Sirup. Die angegebenen Ausbeuten sind Mittelwerte aus mehreren Ansätzen.

Guajacylglycerin- β -dihydroconiferyläther (II): Die Lösung von 25 mg I in 10 ccm Methanol wird mit Pd/BaSO₄ (10-proz.) in einer Schüttelente unter H₂ bei 24° und Atmosphärendruck 2 Stdn. geschüttelt. Die filtrierte Lösung ergibt nach dem Einengen einen farblosen, chromatographisch einheitlichen Sirup. Der R_F -Wert stimmt mit dem authent. Materials¹⁰⁾ überein.

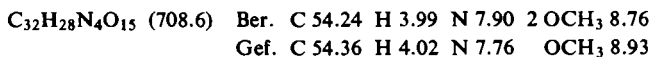
¹³⁾ Sägemehl wurde zunächst mit Aceton/Wasser extrahiert, dann getrocknet, in einer Schlagmühle feingemahlen und nochmals erschöpfend mit Aceton/Wasser extrahiert.

2,4-Dinitro-phenyläther von II: Das Gemisch aus 25 mg II, 45 mg 2,4-Dinitro-fluorbenzol, 30 mg NaHCO_3 und 2 ccm Dimethylformamid wird 15 Stdn. bei etwa 23° geschüttelt. Anschließend wird das Filtrat bei 1 Torr möglichst weitgehend vom Dimethylformamid befreit und der Rückstand auf einer Kieselgelsäule (1.2 cm \times 68 cm) mit dem Eluierungsgemisch Benzol/Aceton (9 : 4 Vol.) getrennt. Die Fraktt. (je 13 ccm) 36–54 enthalten den einheitlichen *Dinitrophenyläther*. Sie werden eingeeengt, der Rückstand wird in etwa 3 ccm Methanol gelöst, filtriert und mit einigen Tropfen Wasser bis zur beginnenden Trübung versetzt. Bei Raumtemperatur kristallisieren nach einigen Tagen blaßgelbe Nadeln vom Schmp. 149–150°. Misch-Schmp. mit authent.¹⁰ Produkt ohne Depression. Ausb. 7 mg (20%).

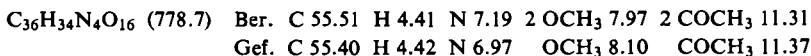
Dinitrophenyläther des Phenols Ph₁: 140 mg des Gemisches *Ph₁/Ph₂*, das bei der Isolierung von I durch Säulenchromatographie erhalten wird (s. o.), werden in 5 ccm Dimethylformamid gelöst und mit 220 mg 2,4-Dinitro-fluorbenzol sowie 150 mg Natriumhydrogencarbonat wie üblich umgesetzt. Die chromatographische Trennung erfolgt auf einer Kieselgelsäule (2 cm \times 95 cm) mit Benzol/Aceton (9 : 2 Vol.). Die Fraktt. (je etwa 25 ccm) 34–51 enthalten einheitlichen Dinitrophenyläther des Phenols *Ph₂* (s. unten), 52–60 ein Gemisch und 61–90 einheitlichen Dinitrophenyläther des Phenols *Ph₁*. Die Acetonlösung des Eindampfrückstandes der Fraktt. 61–90 wird zur Entfernung geringer Mengen gelöster Kieselsäure durch eine Cellulosesäule (1.2 cm \times 15 cm) filtriert. Durch Gefrietrocknung der Lösung des Produktes in Aceton/Cyclohexan wird ein blaßgelbes, amorphes Pulver erhalten, das zur Analyse 48 Stdn. bei 70°/1 Torr über P_2O_5 und Paraffinschnitzeln getrocknet wird. Ausb. 41 mg. Schmp. 84–98°.



2,4-Dinitro-phenyläther des Phenols Ph₂: Die vorstehend erhaltenen Fraktt. 34–51 werden eingeeengt, der Rückstand wird wie beim Phenol *Ph₁* gereinigt und getrocknet, Ausb. 42 mg blaßgelbes, amorphes Pulver. Schmp. 95–125°.



Acetat des Dinitrophenyläthers von Phenol Ph₁: Die auf 0° gekühlte Lösung von 50 mg des amorphen *Dinitrophenyläthers von Ph₁* in 1 ccm Pyridin wird mit 1 ccm *Acetanhydrid* 20 Stdn. bei 24° aufbewahrt. Danach werden Pyridin und Acetanhydrid durch Destillation an der Ölpumpe möglichst weitgehend entfernt und der Rückstand auf einer Kieselgelsäule (1.3 cm \times 50 cm) mit Cyclohexan/Aceton (4 : 1 Vol.) gereinigt. Die Fraktt. (je etwa 5 ccm) 30–48 enthalten das einheitliche *Acetat*. Die Abtrennung geringer Mengen gelöster Kieselsäure und die Trocknung erfolgen wie beim Ausgangsprodukt. Ausb. 29 mg blaßgelbes, amorphes Pulver.



Acetat des Dinitrophenyläthers von Phenol Ph₂: 50 mg des *Dinitrophenyläthers von Ph₂* werden, wie vorstehend beschrieben, umgesetzt und aufgearbeitet. Ausb. 33 mg blaßgelbes amorphes Pulver.

