

Karl Freudenberg und Fernando P. Toribio

Der Abbau des Dehydrierungsproduktes aus Coniferylalkohol-[$^{14}\text{CH}_2\text{OH}$] und des in Gegenwart von Phenylalanin-[$^{14}\text{CO}_2\text{H}$] gewachsenen Lignins

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

(Eingegangen am 8. August 1968)

Das endständige C-Atom des Coniferylalkohols und Phenylalanins nimmt bei der Umwandlung in künstliches oder natürliches Lignin an keiner Kondensation teil, die zu einer Bildung von Chromanen und Cumaranen führen könnte. Auch sonst stehen die Versuche im Einklang mit den Vorstellungen über die Konstitution des Lignins.

In dieser und den folgenden Abhandlungen wird das Verhalten einiger markierter Ligninbausteine im Hinblick auf die Konstitution des Lignins geprüft. Damit verbunden sind synthetische Aufgaben, da die Ausbeute eines radioaktiven Präparates stets auf das eingeführte markierte Atom bezogen ist.

Versuche mit Coniferylalkohol-[$^{14}\text{CH}_2\text{OH}$]

Die Synthese von end- oder mittelständig markiertem Coniferylalkohol führt stets über die zugehörige Ferulasäure und ist am einfachsten, wenn zur Synthese dieser Säure Cyanessigsäure-[^{14}CN] oder -[$^{14}\text{CH}_2$] zur Verfügung steht¹⁻⁴). Im anderen Falle ist es nötig, auf die Malonsäure zurückzugreifen. Hierfür galt es, die optimalen Bedingungen der Kondensation des Vanillins mit einer gegebenen Menge Malonsäure aufzusuchen.

Die Ausbeute an Acetylferulasäure beträgt, bezogen auf Malonsäure, 78–81% d.Th. Mit alkoholfreiem Diazomethan wird daraus Acetylferulasäure-methylester in einer Ausbeute von 96–98% gewonnen. Unter Anwendung des von Freudenberg und Swaleh⁵) angeführten Verfahrens wird endständig markierter Coniferylalkohol der erwarteten Aktivität in einer Ausbeute von 54%, bezogen auf Malonsäure, erhalten. Bei der Synthese wird keine Streuung der Aktivität beobachtet; die aus diesem Coniferylalkohol gewonnene Veratrum-säure ist inaktiv.

¹) K. Freudenberg und F. Bittner, Chem. Ber. 86, 155 (1953).

²) K. Freudenberg und W. Fuchs, Chem. Ber. 87, 1924 (1954).

³) W. Fuchs, Chem. Ber. 88, 1875 (1955).

⁴) K. Kratzl und G. Billek, Holzforschung 7, 66 (1953).

⁵) K. Freudenberg und M. Swaleh, Chem. Ber. 102, 1316 (1969), nachstehend.

Hochmolekulares, mit kaltem n-Butanol⁶⁾ oder besser Essigester⁷⁾ extrahiertes Dehydrierungsprodukt aus Coniferylalkohol-[$^{14}\text{C}_2\text{H}_2\text{OH}$] entsteht in einer Ausbeute von 85–90%⁵⁾. Seine Zusammensetzung ist $\text{C}_9\text{H}_{6.75}\text{O}_2(\text{H}_2\text{O})_{0.45}(\text{OCH}_3)_{0.95}$; Mol.-Gew. der Einheit = 184; die Radioaktivität entspricht der des Coniferylalkohols. Der früher geschilderte Abbau führte zu fast inaktivem Veratrumsäure- und Dehydrodivatrumsäure-methylester, während der Isohemipinsäure-dimethylester 1.2% der



molekularen Aktivität des Dehydrierungsproduktes besaß. Es bleibt dahingestellt, ob dieser geringe Betrag durch Streuung oder eine in geringem Umfang eintretende Kondensation der prim. Carbinolgruppe einer beliebigen Einheit in die 5-Stellung einer anderen zustandekommt. Daß der aus dem Dehydrierungsprodukt abgespaltene Formaldehyd die erwartete Radioaktivität besitzt, wurde schon früher festgestellt¹⁾. Die Versuche stehen mit dem heutigen Konstitutionsbild des Lignins im Einklang. Bei der Kondensation tritt keine nennenswerte Streuung ein. Wichtig ist, daß bei der Bildung des Dehydrierungsproduktes Chroman- oder Cumaransysteme **1** oder **2** nicht oder nur in verschwindender Menge auftreten, denn sie müßten aktive Isohemipinsäure geben.

Der entsprechende Versuch wurde auch mit DL-Phenylalanin-[$^{14}\text{C}_2\text{CO}_2\text{H}$] ausgeführt. Es wurde nach dem früheren Verfahren⁸⁾ jungen Fichtentrieben eingegeben. Das Lignin hatte die Zusammensetzung $\text{C}_9\text{H}_{6.66}\text{O}_2(\text{H}_2\text{O})_{0.58}(\text{OCH}_3)_{0.76}$; Mol.-Gew. der Einheit 181. Dieses Lignin von sehr jungen Fichtenzweigen hat, wie dies auch früher beobachtet wurde⁹⁾, einen geringeren Methoxylgehalt als das Lignin des reifen Holzes. Auf diese Erscheinung wird im folgenden eingegangen¹⁰⁾.

Durch alkalische Hydrolyse, Methylierung und Oxydation ergab das Holz folgende Säuren, deren molekulare Radioaktivität in Prozenten der Radioaktivität der zugehörigen Lignineinheit ausgedrückt ist:

Veratrumsäure	2.4% Aktivität des Lignins
Anissäure	1.3% Aktivität des Lignins
Isohemipinsäure	6.7% Aktivität des Lignins

Die Ligninbildung im Holze hat sich in diesem Falle über 6 Wochen erstreckt (von der zweiten Hälfte Juli 1965 bis Anfang September). Bei einer derartig langen, aber unvermeidbaren Verweilzeit in der Pflanze und bei den zahlreichen Umwand-

⁶⁾ K. Freudenberg und B. Lehmann, Chem. Ber. **93**, 1345 (1960).

⁷⁾ H. Nimz, Chem. Ber. **96**, 478 (1963).

⁸⁾ K. Freudenberg, H. Reznik, W. Fuchs und M. Reichert, Naturwissenschaften **42**, 29 (1955).

⁹⁾ K. Freudenberg und B. Lehmann, Chem. Ber. **96**, 1850 (1963).

¹⁰⁾ K. Freudenberg, K. Penzien und H. Renner, Chem. Ber. **102**, 1320 (1969).

lungen, die das Phenylalanin auf dem Wege bis zum Lignin erleidet, ist radioaktive Streuung ein gewohnter Vorgang. Dennoch ist der Einbau der radioaktiven Substanz zum weitaus überwiegenden Teile derselbe wie bei dem künstlichen Dehydrierungsprodukt aus Coniferylalkohol. Wie in der folgenden Abhandlung beschrieben, wurde aus endständig markiertem Coniferin markiertes Holz hergestellt und daraus inaktive Veratrumsäure und Isohemipinsäure gewonnen. Der Versuch in der Pflanze verläuft also mit Coniferin einheitlicher als mit DL-Phenylalanin, dessen Antipoden sich möglicherweise nicht gleich verhalten.

Frau K. Penzien danken wir für die Anfertigung von Präparaten und Messungen der Radioaktivität.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Gewährung von Mitteln.

Beschreibung der Versuche

Acetylferulasäure-methylester: Die Lösung von 260 mg *Malonsäure-[1-¹⁴C]*, enthaltend 0.1 mC = 40 μ C/mMol, und 700 mg *Vanillin* in 4.5 ccm trockenem Pyridin und einigen Tropfen Piperidin wird erst 16 Stdn. bei 40°, dann 5 Stdn. bei 70° und schließlich 1 Stde. bei 100° gehalten. Zur erkalteten Lösung werden 5 ccm *Acetanhydrid* gegeben. Das Gemisch bleibt 15 Stdn. bei 20° stehen, wird i. Vak. eingedampft und auf Kieselgel (30 cm Länge, 3 cm \emptyset) mit *Benzol/Essigester/Eisessig* (85:14:1 Vol.) gereinigt. Ausb. 78–81% d. Th., Radioaktivität 20.2 μ C/mMol. Die 2proz. Lösung der Säure in Dioxan wird bei 10° tropfenweise mit einer alkoholfreien Lösung von *Diazomethan* (aus Toluolsulfonsäure-methylamid in Glykolmonoäthyläther) in Äther versetzt, nach bleibender Gelbfärbung noch 10 Min. bei derselben Temperatur aufbewahrt und i. Vak. eingedampft. Aus wenig Methanol wird der *Ester* mit einer Ausbeute von 96–98% aus der Säure gewonnen. Schmp. 122°¹¹⁾ (Mischprobe), Radioaktivität 19.6 μ C/mMol. Die Radioaktivität wurde hier wie in den folgenden Versuchen nach Verbrennung zu CO₂ in Lösung gemessen¹²⁾.

Der für die Dehydrierung verwendete Coniferylalkohol hatte die erwartete Aktivität, die durch Verdünnung auf 2.38 μ C/mMol herabgesetzt wurde.

Dehydrierungsprodukt aus Coniferylalkohol: Nach der früheren Vorschrift¹¹⁾ werden nur ungefähr 65% der theoretisch erwarteten Menge des Dehydrierungsproduktes erhalten. Um eine bessere Ausbeute zu erzielen, wurde durchweg mit der doppelten Konzentration gearbeitet; so wurden zu Beginn 1.6 g *Coniferylalkohol* in 5 ccm Aceton und 400 ccm Wasser eingesetzt und so fort. Der Puffer kann weggelassen werden. Das Zentrifugat wurde an der Luft getrocknet, mit kaltem Äthylacetat⁷⁾ ausgerieben, filtriert und bei 20° getrocknet.

Die Lösung in Äthylacetat wurde i. Vak. eingedampft, der Rückstand in wenig Aceton aufgenommen und den wäfr. Abgüssen von der Zentrifugierung zugefügt. Die trübe Lösung wurde i. Vak. auf 50 ccm eingeengt und erneut mit wenig *Peroxydase* und *Wasserstoffperoxid* dehydriert. Dies ergab nochmals eine kleine Menge Dehydrierungsprodukt, dessen Gesamtbetrag 85–90% des aus Coniferylalkohol erwarteten Wertes entsprach. Das Produkt unterschied sich vom Coniferylalkohol durch einen Mindergehalt von 2.3 Atomen Wasserstoff und einen Mehrgehalt von 0.45 Molekülen Wasser bei einem Methoxylgehalt von 0.95 statt 1.00. Das Dehydrierungsprodukt besaß pro Einheit in einer bei 100° getrockneten Probe dieselbe molekulare Radioaktivität wie der Coniferylalkohol. Für die Versuche sind jeweils mehrere Portionen der geschilderten Art zusammengenommen worden.

¹¹⁾ K. Freudenberg, K. Jones und H. Renner, Chem. Ber. **96**, 1844 (1963).

¹²⁾ F. Kalberer und J. Rutschmann, Helv. chim. Acta **44**, 1956 (1961).

Die Aktivität des Veratrumsäure-methylesters und des Dehydro-diveratrumsäure-dimethylesters lag wenig über der Grenze der Meßbarkeit, während der Isohemipinsäure-dimethylester 0.028 $\mu\text{C}/\text{mMol}$ ergab.

Der Versuch an den Fichten wurde mit 1 mC *DL-Phenylalanin*-[$^{14}\text{CO}_2\text{H}$], auf 165 mg verdünnt (1000 $\mu\text{C}/\text{mMol}$), ausgeführt. Die Lösung in 50 ccm Wasser wurde in Gaben von je 1 ccm 1-2-jährigen Trieben von jungen Fichten zugeführt^{8,9}). Nach 6 Wochen wurden die beschickten Seitenäste etwa 1 cm unterhalb des Tauchtriebs abgeschnitten, 20 Min. in Wasser gekocht und von Nadeln und Rinde befreit. Das Holz wurde getrocknet und zerkleinert, fein gemahlen und bei Raumtemperatur mit Aceton/Wasser (85:15 Vol.) mehrere Tage perkoliert. Man erhielt 37 g trockenes Holz mit 10.2 g Lignin. Aus einer kleinen Probe wurde das Lignin mit 70proz. Schwefelsäure nach *Klason* herauspräpariert. Es hatte die oben angegebene Zusammensetzung, das Mol.-Gew. der Einheit ist 180.7. Die spezif. Aktivität dieses Lignins betrug 0.4654 $\mu\text{C}/\text{mMol}$. Im Lignin befinden sich demnach 2.6% der eingegebenen Radioaktivität. 35 g Holzmehl wurden auf Abbausäuren verarbeitet^{11,13,14}). Bezogen auf das im Holz befindliche Lignin war die Ausbeute an Isohemipinsäure 2.5%, an Veratrumsäure 7% und an Anissäure 0.3%.

Die Radioaktivität ($\mu\text{C}/\text{mMol}$) war bei der

Isohemipinsäure	0.0312 oder 6.7% des Lignins
Veratrumsäure	0.0113 oder 2.4% des Lignins
Anissäure	0.0060 oder 1.3% des Lignins.

¹³) K. Freudenberg, C.-L. Chen und G. Cardinale, Chem. Ber. **95**, 2814 (1962).

¹⁴) K. Freudenberg und C.-L. Chen, Chem. Ber. **100**, 3683 (1967).