

Über das Verhalten von markiertem Coniferin in der verholzenden Pflanze*

(I. Mitteilung)

Von

K. Kratzl, G. Billek, E. Klein und K. Buchtela

Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 25. Juni 1957)

Coniferin-(3-¹⁴C) wurde in verholzendes Fichtengewebe im-
plantiert. Nach Extraktion geringer löslicher Anteile wurde
das Holzpulver einer Äthanolyse unterworfen, wobei aktives
Vanilloylacetyl-(3-¹⁴C) isoliert werden konnte. Die Lokalisie-
rung der Aktivität in der Seitenkette des Vanilloylacetyls wird
beschrieben.

Die Aktivität aller Äthanolyseprodukte wurde gemessen,
einzelne oxydativ zu Vanillin, Vanillinsäure und Oxalsäure
abgebaut. Durch Vergleich der molaren spezifischen Aktivität
der isolierten Reinsubstanzen mit der Aktivität des eingesetzten
Coniferins konnten „Verdünnungsgrade“ errechnet werden, die
das Ausmaß der Umwandlung des Coniferins in die einzelnen
Fraktionen wiedergeben.

Im Rahmen unserer heutigen Kenntnis von der Biogenese des Lignins
kommt dem Coniferin als unmittelbare Vorstufe des Lignins besondere
Bedeutung zu¹. Zahlreiche, vor allem mit radioaktivem Coniferin durch-
geführte Versuche ergaben, daß dieses von verschiedensten pflanzlichen
Geweben aufgenommen und in Produkte weitgehender Ligninähnlichkeit
umgewandelt wird. Diese Vorgänge sind auf die lebenden Zellen des
Holzverbandes beschränkt und hier vorwiegend auf die Zonen der
Ligninbildung; der Einfluß von Fermenten ist unverkennbar^{1, 2}. Lösungs-

* Herrn Prof. F. Wessely zum 60. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

¹ K. Freudenberg, *Angew. Chem.* **68**, 84 (1956). — K. Freudenberg, *Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe* **11**, 43 (1954). — K. Freudenberg, H. Reznik, W. Fuchs und M. Reichert, *Naturwiss.* **42**, 29 (1955). — T. Higuchi, *Physiol. Plantarum* **10**, 356 (1957).

² K. Kratzl und G. Billek, *Holzforsch.* **10**, 161 (1956).

mittel, die Lignin nicht angreifen, entfernen nach Anwendung markierten Coniferins auf pflanzliche Gewebe daraus nur einen unbedeutenden Anteil der Aktivität. Bei einer Isolierung des Lignins wird die gesamte Aktivität in typischen Ligninfraktionen wiedergefunden und kann aus diesen nicht abgetrennt werden³.

Schließlich wurden durch die von der Schule *Freudenbergs*¹ durchgeführten enzymatischen Polymerisationen des Coniferylalkohols in Form der sogenannten DHP's Präparate hoher Ligninähnlichkeit erhalten, so daß dem Coniferylalkohol mit großer Wahrscheinlichkeit die Rolle einer unmittelbaren Vorstufe des Lignins zukommt. In qualitativer Hinsicht scheint dieser Weg der Biogenese des Lignins gesichert. Beobachtungen der letzten Zeit lassen jedoch gewisse Zweifel an der Ausschließlichkeit des Reaktionsablaufes auftreten. Nicht nur mit Coniferin, sondern auch mit einer sehr großen Anzahl anderer Verbindungen, von denen einige konstitutionell von typischen Ligninstrukturelementen sehr weit entfernt sind, konnten ebenfalls „ligninähnliche“ Produkte erhalten werden^{4, 5}. Andererseits wurde beobachtet, daß markiertes Coniferin auch in jenen Teilen der Pflanzen unlösliche Polymere bildet, die an sich nicht verholzt sind (Nadeln usw.), so daß hier eine echte Ligninbildung bezweifelt werden muß⁶.

Der Nachweis des Lignins ist durch zahlreiche Reaktionen zu erbringen, von denen jede einzelne allein angewandt, keinesfalls eindeutige Aussagen gestattet. Erst eine Kombination einer möglichst großen Zahl derartiger Ligninkriterien ermöglicht Schlüsse von hohem Wahrheitswert^{2, 7}. Aber selbst bei Anwendung aller bekannten Reaktionen ist ein Identitätsbeweis ausgeschlossen. Schließlich erfassen diese Reaktionen immer nur einen Teil des Lignins (50 bis 60%). Durch quantitative Verfolgung dieser Reaktionen können aber Schlüsse auf eine mehr oder minder große Ligninähnlichkeit gezogen werden.

Äthanolyse

Als eine Methode zum Nachweis hoher Ligninähnlichkeit wird in vorliegender Arbeit die *Äthanolyse nach Hibbert*⁸ herangezogen. Um die im folgenden erwähnten Fraktionen zu definieren, sei diese Methodik hier kurz gestreift.

Das vorextrahierte Holz wird mit 3%iger äthanol. Salzsäure erhitzt. Der „Holzrückstand“ verbleibt unlöslich. Das eingeeengte Filtrat wird mit

³ K. *Freudenberg* und F. *Bittner*, Chem. Ber. **86**, 155 (1953).

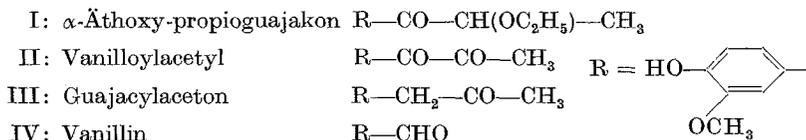
⁴ F. F. *Nord*, Naturwiss. **44**, 35 (1957). — W. J. *Schubert*, S. N. *Acerbo* und F. F. *Nord*, J. Amer. Chem. Soc. **79**, 251 (1957).

⁵ S. A. *Brown* und A. C. *Neish*, Canad. J. Biochem. Physiol. **32**, 170 (1954); **33**, 948 (1955); Nature **175**, 688 (1955).

⁶ H. *Reznik* und R. *Urban*, Planta **47**, 1 (1956).

⁷ K. *Kratzl*, Microchim. Acta **1956**, 159.

Wasser versetzt, wobei das „Äthanollignin“ ausfällt. Das wäbr. Filtrat wird erschöpfend mit Äther extrahiert, als Ätherrückstand wird *Hibberts* „crude oil“ erhalten. Nach Eindampfen der wäbr. Lösung hinterbleibt eine Zuckerfraktion („Zucker“). Das „crude oil“ wird im Hochvak. destilliert; man bezeichnet das Destillat nach *Hibbert* als „distillable oil“. Dieses kann in die einzelnen „*Hibberts*chen Bausteine“ getrennt werden^{8, 9}. Im Fall des Coniferenlignins sind dies:



Als äthanolysierbares Strukturelement wird von *Adler*¹⁰ das Guajacylglycerin und dessen β -Aryläther angegeben. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß aus dem β -Coniferyläther des Guajacylglycerins (Zwischenprodukt III der Reihe *Freudenbergs*) gleichfalls alle *Hibberts*chen Bausteine erhalten werden konnten². Coniferin selbst gibt unter den Bedingungen dieser Reaktion keinen der *Hibberts*chen Bausteine. Erst ein Übergang der Seitenkette des Coniferins in eine höhere Oxydationsstufe ermöglicht die Bildung dieser Guajacylpropanketone und -ketole. Somit ist die Bildung der *Hibberts*chen Bausteine eine typische Ligninreaktion, die von allen bekannten Ligninpräparaten und ligninhaltigen Geweben gezeigt wird, so daß diese ohne weiteres zum Nachweis der Verholzung herangezogen werden kann⁹. Es ist damit auch auszuschließen, daß etwa Adsorbate und artificielle Polymere des Coniferins eine echte Ligninbildung vortäuschen. In früheren Arbeiten haben wir den Nachweis erbracht, daß die nach Implantation markierten Coniferins in Fichtenästchen und nachfolgender Äthanolyse deren Holzes erhaltenen *Hibberts*chen Bausteine aktiv sind¹¹.

Hierfür wurde an Hand von Autoradiogrammen die aktivste Gewebeschicht der Ästchen herausgeschnitten, um Präparate möglichst hoher Aktivität zu erhalten. Die Äthanolyseprodukte wurden am Papier chromatographiert. Die Aktivität der einzelnen Flecken der *Hibberts*chen Bausteine war jedoch zu gering, um auf dem Autoradiogramm Spuren zu hinterlassen. Lediglich

⁸ *A. B. Cramer, M. J. Hunter und H. Hibbert, J. Amer. Chem. Soc.* **61**, 509 (1939). — *L. Brickman, W. L. Hawkins und H. Hibbert, ibid.* **62**, 2149 (1940).

⁹ *K. Kratzl und W. Schweers, Mh. Chem.* **85**, 1046, 1166 (1954); *Chem. Ber.* **89**, 186 (1956).

¹⁰ *E. Adler und S. Yllner, Svensk Papperstidn.* **57**, 78 (1954); *Acta Chem. Scand.* **7**, 570 (1953). — *E. Adler und K. J. Björkquist, Acta Chem. Scand.* **5**, 241 (1951). — *E. Adler, B. O. Lindgren und U. Saeden, Svensk Papperstidn.* **55**, 245 (1952). — *E. Adler und S. Yllner, ibid.* **55**, 238 (1952). — *E. Adler und B. O. Lindgren, ibid.* **55**, 563 (1952).

¹¹ *K. Kratzl, G. Billek und W. Schweers, XIV. Intern. Kongreß für reine und angewandte Chemie, Zürich 1955, Abstracts of Papers, S. 377.*

der Startfleck wurde abgebildet. In diesem Fall war die Verdünnung durch inaktives Material zu groß gewesen. Eine Anreicherung des aktiven Materials konnte erzielt werden, indem insgesamt 1,2 mg des Öls in Form eines 20 cm langen Streifens chromatographiert wurde. Die Substanzen in den danach erhaltenen Zonen wurden durch Elution konzentriert und erst dann auf eine photographische Schicht einwirken gelassen. Damit konnte der Nachweis der Bildung aktiver *Hibbertscher* Bausteine erbracht werden, ein Ergebnis, das auch von *Freudenberg* bestätigt wurde¹. Überraschend war jedoch die außerordentlich geringe Aktivität, die zwar nicht genau gemessen, aber doch überschlagsmäßig geschätzt werden konnte¹².

Um quantitative Aussagen zu ermöglichen, wurden Versuche zur Isolierung der „*Hibbertschen* Bausteine“ in präparativem Maßstab unternommen. Es gelang wohl an einer Zellulosepulversäule (S & S, Nr. 123) und Verwendung von Wasser-Benzin-(Sdp. 100 bis 110°)-Chloroform-Methanol (5 : 7 : 2 : 1) das *Hibbertsche* Öl in Mengen von einigen Milligramm einwandfrei zu trennen. Gleichzeitig wurden Versuche unternommen, aus den einzelnen Substanzen kristallisierte Derivate herzustellen, an denen eine exakte Aktivitätsmessung durchgeführt werden kann. Dies führte zunächst nicht zum Ziel, vor allem, da das Hauptprodukt der Äthanolyse, das α -Äthoxypropionguajakon (I), ungewöhnlich schwer zu reinigen ist. Lediglich Vanilloylacetyl (II) kann über das Nickelsalz seines Dioxims leicht abgetrennt und auf konstante spezifische Aktivität gebracht werden; es ist aber in nur geringer Konzentration im Öl vorhanden. Es war naheliegend, durch geeignete Vorbehandlung des *Hibbertschen* Öls die Ausbeute an Vanilloylacetyl zu erhöhen, was schließlich durch die Anwendung einer Oxydation mit Eisen(III)-chlorid gelang. Papierchromatographische Analyse ergab, daß hierbei sowohl das Hauptprodukt α -Äthoxypropionguajakon (I) als auch α -Hydroxypropionguajakon quantitativ in Vanilloylacetyl (II) umgewandelt wurden. Damit war die Möglichkeit gegeben, auf eine Trennung an der Säule zu verzichten. Es konnte so eine viel größere Ausgangsmenge eingesetzt werden.

10 Ästchen, denen insgesamt 25 mg Coniferin (3-¹⁴C) implantiert wurden, ergaben 10,75 g Holzpulver, welches äthanolysiert und nach Oxydation des Öls zum Nickelsalz des Vanilloylacetyldioxims aufgearbeitet wurde; dieses wurde durch Spalten und neuerliches Fällen („Nickelsalz II“) gereinigt. Die Tabelle I gibt die erhaltenen Fraktionen sowie deren Aktivität wieder.

Von den insgesamt im Coniferin eingesetzten $33,8 \cdot 10^6$ Zerf./min konnten somit nur etwa ein Siebentel wiedergefunden werden. Zweifellos sind bereits bei der Implantation sehr starke Verluste eingetreten. Außerdem besaßen die nicht zum Abbau eingesetzten Nadeln eine be-

¹² W. Schweers, Dissertation Universität Wien (1955).

Tabelle I

	mg	Spezif. Aktivität (Zerf./min .mg)	Molare Aktivität ($\mu\text{C}/\text{mMol}$)	Totale Aktivität (Zerf./min)
Coniferin.....	25	1 351 100	219,3	33 800 000
„Holzrückstand“	5059,1	947		4 791 000
„Äthanollignin“	901,3	827		745 400
„distillable oil“	531,5	574		305 100
„Zucker“	2761,5	0	0	0
„Nickelsalz I“	52,6	398	0,0452	20900
„Nickelsalz II“	35,7	355	0,0404	12700
Vanillinsäure aus Di- keton.....		532	0,0403	
Essigsäure aus Diketon		0	0	

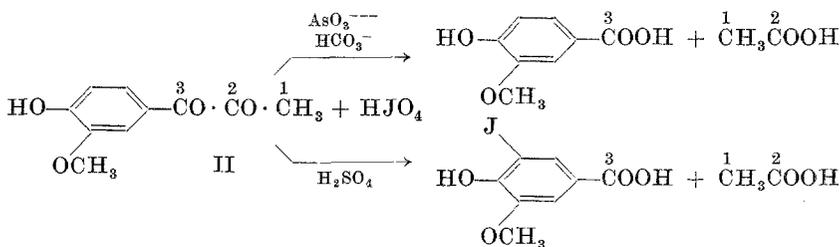
trächtliche Aktivität. Unbeschadet der ungünstigen Aktivitätsbilanz ist es jedoch auffallend, daß von allen Fraktionen die *Hibbertschen* Bausteine die geringsten Aktivitäten aufwiesen. Wohl ist damit der Übergang des Coniferins in ein Strukturelement mit äthanolysierbarer Seitenkette hinlänglich bewiesen, gleichzeitig aber auch die Tatsache, daß Coniferin vorwiegend in höhermolekulare, nicht äthanolysierbare Anteile des Lignins eingebaut wird.

Lokalisierungsreaktionen

Der geringe Umfang, mit dem Coniferin in die äthanolysierbaren Seitenketten eingebaut wird, läßt Zweifel an der Unmittelbarkeit dieses Vorganges auftreten. Sollten biologische Kreisprozesse durchlaufen werden, so müßte sich die Aktivität über das gesamte Phenylpropan-skelett verteilen. Wir haben daher Methoden ausgearbeitet, die es gestatten, die *Hibbertschen* Bausteine zwecks Lokalisierung der Aktivität schrittweise abzubauen. Es war naheliegend, für Vanilloylacetyl die Perjodsäurespaltung anzuwenden. Als jedoch vorerst in saurer Lösung gearbeitet wurde¹³, traten einige Schwierigkeiten auf. Wohl konnte die Essigsäure in guter Ausbeute isoliert werden, an Stelle der erwarteten Vanillinsäure erhielten wir jedoch die bislang unbekannte 5-Jodvanillinsäure. Die Konstitution dieses Abbauproduktes wurde mit einer aus 5-Jodvanillin¹⁴ erhaltenen 5-Jodvanillinsäure sichergestellt, deren Synthese im experimentellen Teil berichtet wird. Die Jodierung der Vanillinsäure konnte jedoch verhindert werden, indem die Bildung von freiem Jod durch Anwendung von Natriumarsenit in bikarbonatalkalischer Lösung vermieden wird:

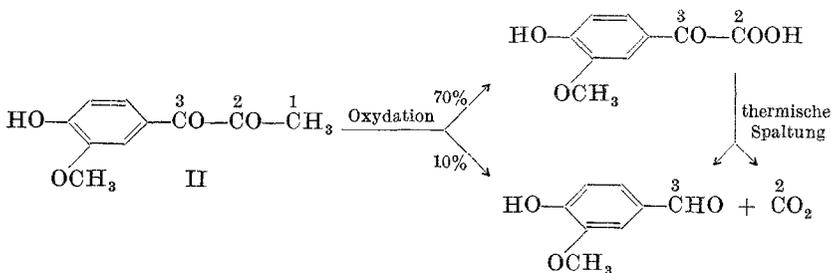
¹³ P. Clutterbuck und F. Reuter, J. Chem. Soc. London 1935, 1467.

¹⁴ H. Erdtman, Svensk Kem. Tidskr. 47, 223 (1935). — L. C. Raiford und E. H. Wells, J. Amer. Chem. Soc. 57, 2590 (1935).



Die Anwendung dieses Abbaues gestattet es, die Seitenkette so aufzuspalten, daß die Aktivität der Atome C-1 + C-2 und C-3 getrennt bestimmt werden kann. Auch α -Hydroxy-propionguajakon läßt sich analog spalten; es wird hierbei Acetaldehyd erhalten. Dieser Abbau fand jedoch in vorliegender Arbeit keine praktische Anwendung².

Unterwirft man das *Hibbertsche* Öl sowie einzelne der Bausteine der Oxydation nach *Freudenberg-Lautsch-Engler*¹⁵, so wird erwartungsgemäß in hoher Ausbeute Vanillin erhalten. Arbeitet man jedoch bei tieferer Temperatur (100°), so sinkt die Vanillinausbeute beträchtlich, andererseits wird Vanilloylameisensäure gebildet, die sich durch Extraktion des angesäuerten Reaktionsgemisches und nachfolgender Fällung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin leicht isolieren läßt. Die hohe Ausbeute an Vanilloylameisensäure sowie die Möglichkeit, sie selbst wie auch deren 2,4-Dinitrophenylhydrazon thermisch zu dekarboxylieren, läßt diese Methode für den Abbau der markierten Bausteine besonders geeignet erscheinen. Es wird erst die Aktivität der Atome C-2 + C-3 der Seitenkette erfaßt, das Kohlendioxyd der Dekarboxylierung stammt aus dem Atom C-2.



Ergänzend sei erwähnt, daß vor kurzem *McCarthy* und Mitarbeiter¹⁶ Vanilloylameisensäure unter den Reaktionsprodukten der alkalischen Spaltung der Ligninsulfosäure auffinden konnte.

¹⁵ K. Freudenberg, W. Lautsch und K. Engler, Ber. dtsh. chem. Ges. **73**, 167 (1940).

¹⁶ D. W. Glennie, H. Techlenberg, E. T. Reaville und J. L. McCarthy, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 2409 (1955).

Beide Abbaumethoden wurden an einem synthetischen Vanilloylacetyl-(3-¹⁴C)¹⁷ ($2,25 \cdot 10^5$ Zerf./mMol · min) getestet und verliefen ohne Verschmierung der Aktivität. Die nach der Perjodsäurespaltung erhaltene Vanillinsäure enthielt mit $2,1 \cdot 10^5$ Zerf./mMol · min die gesamte der eingesetzten Aktivität, die Essigsäure, als p-Bromphenacyl-ester isoliert, war mit 710 Zerf./mMol · min praktisch inaktiv. Der oxydative Abbau eines anderen Vanilloylacetyl-(3-¹⁴C)-Präparates ($432 \cdot 10^3$ Zerf./mMol · min) ergab Vanilloylameisensäure, als 2,4-Dinitrophenylhydrazon isoliert, mit einer Aktivität von $432 \cdot 10^3$ Zerf./mMol · min. Das bei Dekarboxylierung erhaltene Kohlendioxyd war inaktiv. Das Vanillin besaß die gleiche spezifische Aktivität. Somit sind diese beiden Methoden zur Lokalisierung von Aktivitäten geeignet.

Infolge der nur sehr geringen Menge an „Nickelsalz II“ konnte an diesem nur eine Abbaumethode in Anwendung gebracht werden. Wir haben hierfür den Perjodsäureabbau gewählt. Das „Nickelsalz II“ wurde neuerlich gespalten und das Diketon abgebaut. Die durch Sublimation gereinigte Vanillinsäure besaß 532 Zerf./mg · min. Die spezifische Aktivität von 0,0403 μ C/mMol hatte sich demnach gegenüber dem Vanilloylacetyl des „Nickelsalzes II“ (0,0404 μ C/mMol) nicht geändert. Der p-Bromphenacyl-ester der abgespaltenen Essigsäure war inaktiv (vgl. Tabelle 1). Auf Grund dieses Ergebnisses sind etwaige Umlagerungen in der Seitenkette des Coniferins während der Aufnahme und Fixierung durch die pflanzliche Zelle und während der nachfolgenden Äthanolyse mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Das Atom C-3 der Seitenkette ist mit Sicherheit daran nicht beteiligt. Ein Platzwechsel der beiden, in obigem Versuch inaktiv verbliebenen Atome C-1 und C-2 bleibt jedoch im Bereich der Möglichkeit.

Durch Einsatz eines Coniferins-(2-¹⁴C)¹⁸ und Abbau des Vanilloylacetyls zur Vanilloylameisensäure ist eine zur Klärung dieser Frage eindeutige Methode gegeben.

Da das Nickelsalz des Diketons aus dem *Hibbertschen* Öl nach Oxydation mit Eisen(III)-chlorid erhalten wird und somit zum größten Teil aus dem Hauptprodukt der Äthanolyse, dem α -Äthoxypropionguajakon (I) stammt, gelten diese am Diketon gewonnenen Ergebnisse zwangsläufig für die Hauptmenge der *Hibbertschen* Bausteine. Lediglich das in kleinen Mengen anfallende Guajacylacetone konnte nicht erfaßt werden. Der Nachweis der Entstehung eines aktiven Vanillins besitzt nur geringe Bedeutung, da dieses zweifellos auch aus dem Coniferin selbst ohne Einwirkung biologischer Vorgänge entstehen kann. Ein Vergleich der Aktivität des *Hibbertschen* Öls mit der Aktivität des daraus isolierten Vanilloyl-

¹⁷ K. Kratzl, G. Billek, A. Graf und W. Schweers, Mh. Chem. 87, 60 (1956).

¹⁸ K. Kratzl und G. Billek, Mh. Chem. 84, 406 (1953).

acetyls läßt den Schluß zu, daß auch die nicht erfaßten Bausteine, im besonderen Vanillin, in aktiver Form vorlagen.

Sowohl *Hibbertsches* Öl als auch die Fraktionen „Holzrückstand“ und „Äthanollignin“ sind kaum einheitlich und formelmäßig nicht zu definieren. Damit kann auch deren molare spezifische Aktivität nicht angegeben werden. Auch der in der Ligninchemie oftmals geübte Vorgang, aus dem Methoxylgehalt auf die Phenylpropaneinheit des Lignins zu schließen, ist schwierig, da während der Äthanolyse Äthoxygruppen neu gebildet und diese neben dem Methoxylgehalt bestimmt werden müßten.

Oxydativer Abbau

Um den Grad des unterschiedlichen Einbaues des Coniferins quantitativ zu erfassen, wurden die Fraktionen „Holzrückstand“ und „Äthanollignin“ einem oxydativen Abbau¹⁵ unterworfen und das so entstehende Vanillin über dessen m-Nitrobenzhydrazon bis zur konstanten spezifischen Aktivität gereinigt¹⁹. Außerdem konnten nach diesem Abbau Vanillinsäure und Oxalsäure isoliert werden. Hierbei waren jedoch Präparate konstanter spezifischer Aktivität mangels ausreichender Substanzmengen nicht in jedem Fall zu erhalten. Die Meßwerte sind in Tabelle 2 vereinigt.

Tabelle 2

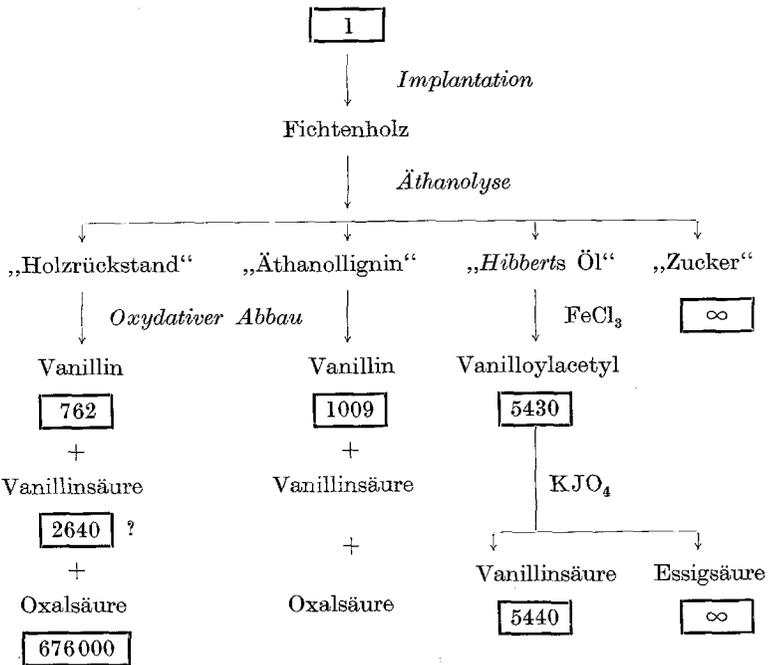
	Spezifische Aktivität (Zerf./min. mg)	Molare Aktivität (μ C/mMol)
Vanillin (als m-Nitrobenzhydrazon)		
aus „Holzrückstand“	2038	0,287
aus „Äthanollignin“	1546	0,217
Vanillinsäure		
aus „Holzrückstand“	1100 (?)	0,083 (?)
Oxalsäure		
aus „Äthanollignin“	8	0,0003244

Auch hier sind Unterschiede unverkennbar. Das Coniferin wird derart eingebaut, daß es nach Äthanolyse in größerem Umfang im unlöslichen (höherpolymeren?) Anteil („Holzrückstand“) verbleibt. Das „Äthanollignin“, eine äthanollösliche Ligninfraktion von niederem Polymerisationsgrad, enthält bereits weniger der eingesetzten Aktivität. Eine noch geringere Aktivität besaß das *Hibbertsches* Öl und damit auch die daraus isolierten Guajacylpropanketone und -ketole (vgl. Tabelle 1). Die Vanillinsäure scheint demselben Strukturelement zu entstammen wie Vanillin. Die Oxalsäure sollte entsprechend der Annahme, daß sie aus den beiden endständigen C-Atomen der Seitenkette der Phenylpropaneinheit gebildet wird, inaktiv sein. Die sehr geringe, aber einwandfrei nachweisbare Aktivität verbleibt zunächst unklar.

¹⁹ H. Silbernagel, Mh. Chem. 86, 256 (1955).

Bei den im Verlauf des Abbaues erhaltenen Reinstoffen kann man die molaren spezifischen Aktivitäten angeben (vgl. Tabellen 1 und 2) und diese mit der molaren spezifischen Aktivität des eingesetzten Coniferins ($219,3 \mu\text{C}/\text{mMol}$) vergleichen. Es lassen sich so „Verdünnungsgrade“ ($= \frac{219,3 \mu\text{C}/\text{mMol}}{\mu\text{C}/\text{mMol des Reinstoffes}}$) errechnen, die ein Maß für den Umfang der Bildung der einzelnen Fraktionen aus dem vorgegebenen Coniferin darstellen. In ähnlicher Weise haben *Brown* und *Neish*⁵ verfahren, um die Wirksamkeit zahlreicher als Ligninvorstufen möglich erscheinender Substanzen zu testen. Erst beträchtliche Unterschiede im Verdünnungsgrad ließen unterschiedliches Verhalten annehmen. In unserem Fall wurde jedoch der Abbau von einer einzigen Holzprobe ausgehend — ohne Verdünnung mit inaktivem Material — durchgeführt. Damit berechtigen hier bereits weitaus geringere Unterschiede der Verdünnungsgrade zu konkreten Aussagen. Tabelle 3 gibt ein Schema des gesamten Abbaues und bei den Reinstoffen die ermittelten Verdünnungsgrade an.

Tabelle 3
Coniferin-(3-¹⁴C)



Entsprechend diesen Ergebnissen kann über das Verhalten eines in Fichtengewebe implantierten Coniferins *zusammenfassend* ausgesagt werden:

Coniferin bzw. das Aglucon wird größtenteils in polymere Anteile des Lignins eingebaut. Bei nachfolgender Äthanolyse verbleibt es vorwiegend in den unlöslichen Fraktionen. In achtfach geringerem Ausmaß werden daraus äthanolysierbare Seitenkettenstrukturen (β -Arylguaajacyläther) gebildet, die als Quelle der *Hibbertschen* Bausteine anzusehen sind. Da das kernnahe C-Atom des Coniferins bei Ein- und Abbau unverändert an dieser Stelle verbleibt, findet kein totaler Umbau der Seitenkette statt, der Phenylpropankörper des Coniferins stellt demnach im Intermediärstoffwechsel eine gewisse Endstufe dar. Dies und der Nachweis der Inaktivität der Zuckerfraktionen schließen eine Teilnahme am Kohlehydratstoffwechsel aus. Ob die verholzende Pflanze ihr Lignin über Coniferin als Zwischenprodukt aufbaut, ist durch diese Versuche noch nicht bewiesen. Ein der Pflanze zugeführtes Coniferin geht in polymere Körper über, die qualitativ dem Lignin ähnlich sind, in quantitativer Hinsicht jedoch die obgenannten Unterschiede aufweisen.

Experimenteller Teil

Ausgangsmaterial

Die Implantationen wurden in einem Bundesforst in Gugging bei Wien an mehrjährigen Fichten an 10 zweijährigen Seitentrieben durchgeführt. Die Rinde der Seitentriebe wurde U-förmig bis zum Cambium eingeschnitten, der Rindenlappen abgehoben und 2 bis 3 mg $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Coniferin²⁰ ($1,35 \cdot 10^6$ Zerf./mg \cdot min, $219,3 \mu\text{C/mMol}$) eingelegt. Die Implantationsstelle wurde mit Bast verbunden und mit Baumwachs verschmiert. Da ein quantitatives Einbringen der Substanz nicht möglich ist, kann ein exakter Wert der eingesetzten Aktivitätsmenge nicht angegeben werden; insgesamt wurden 25 mg Coniferin verwendet.

Die Ästchen verblieben 1 Monat am Baum. Nach dem Abschneiden wurden sie der Hälfte nach gespalten, je 6 Stdn. in Benzol-Aceton, Äthanol und Wasser extrahiert und an der Luft getrocknet. Die Lokalisierung der Aktivität erfolgte mittels Autoradiographie. Stücke von je 1 cm Länge wurden in einer Schlagkreuzmühle mit einem Sieb von 60 mesh gemahlen.

Äthanolyse

10,6 g Holzpulver wurden mit 70 ml 3%iger äthanol. Salzsäure 48 Stdn. im CO_2 -Strom unter Rückfluß und mechanischem Rühren zum Sieden erhitzt⁸. Das erkaltete Reaktionsprodukt wurde abgesaugt und mit 100 ml absol. Äthanol gewaschen. Der bei 80° und 10 Torr getrocknete Rückstand („Holzrückstand“) wog 5,06 g. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck im CO_2 -Strom auf 50 ml eingengt und mit 400 ml Wasser versetzt. Das ausgefallene „Äthanollignin“ wurde über ein Faltenfilter filtriert, in 50 ml Äthanol gelöst, neuerlich mit 400 ml Wasser versetzt und zentrifugiert. Der Rückstand (0,901 g) wurde wie „Holzrückstand“ getrocknet. Die vereinigten wäbr. Lösungen wurden 48 Stdn. mit Äther extrahiert, der Extrakt mit Natriumsulfat getrocknet und im CO_2 -Strom unter vermindertem Druck zur Trockene gedampft. Die Ausbeute an „crude oil“ betrug 0,937 g.

²⁰ K. Kratzl und G. Billek, *Holzforsch.* **7**, 66 (1953).

Die wäßr. Lösung wurde unter vermindertem Druck zur Trockene gedampft und ergab als Rückstand 2,765 g eines grauen, größtenteils wasserlöslichen Pulvers, das im weiteren als „Zucker“ bezeichnet wird.

Das „crude oil“ wurde bei einem Druck von $5 \cdot 10^{-5}$ bei 100 bis 120° in einem Kugelrohr destilliert. Das Destillat („distillable oil“) fiel als hellgelbes Öl in einer Ausbeute von 0,531 g an.

Oxydation: 0,531 g „distillable oil“ wurden in 50 ml absol. Äthanol gelöst, mit 400 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ versetzt und 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wurde die Lösung in 100 ml Wasser gegossen und bis zur Sättigung Ammoniak eingeleitet. Nach kurzem Stehen wurde die Lösung erwärmt und vom schwarzen Eisenoxydhydrat-Niederschlag filtriert. Nach gründlichem Waschen des Niederschlages mit heißem Wasser wurde das Filtrat mit konz. Salzsäure auf ein pH von 1 gebracht. Die Lösung wurde 24 Stdn. mit Äther extrahiert, der Extrakt getrocknet und schonend abgedampft. Die Ausbeute an oxydiertem Öl betrug 279 mg.

Fällung des Vanilloylacetyls: 279 mg oxydiertes Öl wurden in 50 ml Wasser mit 1,5 g Natriumacetat, 100 mg Nickelchlorid und 100 mg Hydroxylaminchlorhydrat 24 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Danach wurde filtriert und das Filtrat neuerlich mit den gleichen Mengen an Natriumacetat, Nickelchlorid und Hydroxylamin versetzt. Nach weiterem 24stünd. Erhitzen wurde abgesaugt, die beiden Niederschläge vereinigt und im Vak. bei Zimmertemp. getrocknet (52,6 mg) und die Aktivität gemessen.

Danach wurde dieses „Nickelsalz I“ in 37 ml 12 n H_2SO_4 24 Stdn. bei Zimmertemp. und 4 Stdn. bei 40° belassen, von geringen Verunreinigungen filtriert und 10 Stdn. mit Äther extrahiert. Aus dem Ätherrückstand wurde erneut das Nickelsalz hergestellt, welches diesmal weitaus reiner, das heißt in einer hellroten Färbung anfiel. Ausbeute an „Nickelsalz II“: 35,7 mg.

Abbau: „Nickelsalz II“ wurde erneut mit Schwefelsäure gespalten und die so erhaltenen 20 mg Vanilloylacetyl mittels der nachfolgend beschriebenen Oxydation mit Perjodsäure abgebaut. Trotz der geringen Menge an Ausgangsmaterial waren die bei Vanillinsäure und p-Bromphenacylester erzielten Ausbeuten für eine Aktivitätsmessung durchaus ausreichend.

Aktivitätsmessungen: Für das Ausgangsmaterial Coniferin-(3- ^{14}C) sowie für „Holzrückstand“, „Äthanollignin“ und „distillable oil“ wurde die Methode der Na ^{14}O -Oxydation und anschließender Messung des Bariumkarbonats in unendlich dicker Schicht²¹ herangezogen.

Um Verluste zu vermeiden, kam für die beiden Nickelsalze nur eine Messung der Substanz an sich in Frage. Die Blättchen wurden durch Sedimentation einer äther. Suspension in dem von Calvin²² angegebenen Gerät hergestellt. Hierfür mußte jedoch die Selbstabsorptionskurve des Nickelsalzes ermittelt werden. Die geringe Aktivität des angefallenen Nickelsalzes verhinderte die Aufnahme einer exakten Kurve an diesem selbst. Folglich wurde aus einem bereits früher beschriebenen Vanilloylacetyl-(3- ^{14}C)¹⁷ das Nickelsalz des Dioxims hergestellt. Aus diesem wurde dann

²¹ H. Schmid und K. Schmid, Helv. Chim. Acta 36, 498 (1953); Herrn Prof. Dr. H. Schmid (Universität Zürich) sind wir für wertvolle Ratschläge auf dem Gebiete der Messung radioaktiver Verbindungen zu besonderem Dank verpflichtet.

²² M. Calvin, Isotopic Carbon, S. 118. New York: J. Wiley and Sons Inc. 1949.

eine Selbstabsorptions-Korrekturkurve ermittelt. Sämtliche Messungen wurden unter Verwendung eines Endfenster-Zählrohres durchgeführt.

Für die Fraktion „Zucker“ käme auf Grund der vorhandenen Menge eine Naßoxydation durchaus in Frage. Da jedoch in einem Vorversuch nach der direkten Plättchenmethode festgestellt werden konnte, daß diese inaktiv war, wurde auf eine genauere Aktivitätsbestimmung verzichtet.

Die im allgemeinen Teil dieser Arbeit angegebenen Meßwerte stellen den Durchschnitt aus bis zu 12 Messungen dar. Die Aktivitätsbestimmung der einzelnen Proben jeweils auf mindestens 10000 Impulse ausgezählt, so daß der statistische Fehler unter $\pm 1\%$ liegt.

Abbau des Vanilloylacetyls

Oxydation mit Perjodsäure

140 mg Vanilloylacetyl werden in 40 ml einer 0,5 n wäbr. Natriumbikarbonatlösung gelöst, mit 50 ml 0,1 n Natriumarsenitlösung und 7,5 ml einer 0,5 m Perjodsäurelösung versetzt und 40 Min. auf 50° erwärmt. Nach dem Abkühlen wird mit verd. Schwefelsäure angesäuert, das ausgeschiedene Jod mit Natriumarsenitlösung reduziert und die Lösung einer Wasserdampfdestillation unterworfen (zirka 1 Std.).

Das Destillat wird mit 0,1 n NaOH titriert, am Wasserbad zur Trockene gedampft und der Rückstand in 2 ml Äthanol unter Erwärmen gelöst. Nach Zugabe von 0,1 g p-Bromphenacylbromid wird 1 Std. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt, heiß filtriert, das Filtrat auf die Hälfte eingeeengt und bis zur bleibenden Trübung mit Wasser versetzt. Nach guter Kühlung werden 78,5 mg (= 43%) p-Bromphenacylester der Essigsäure vom Schmp. 86° erhalten.

Der Rückstand der Wasserdampfdestillation wird 36 Stdn. mit Äther extrahiert und die so erhaltene rohe Vanillinsäure durch Sublimation bei Normaldruck und 140° von einem geringen Anteil nicht umgesetzten Vanilloylacetyls befreit. Die Reinheitsprüfung erfolgt mittels Papierchromatographie. Ausbeute 30 mg (= 25%) vom Schmp. 209°.

Oxydation mit Natrium-m-nitrobenzolsulfonat

500 mg Vanilloylacetyl werden in 50 ml 2 n NaOH mit 2,5 g Natrium-m-nitrobenzolsulfonat 3 Stdn. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt.

Vanillin: Die Lösung wird auf pH 7 eingestellt, mit etwas Natriumbikarbonat gepuffert und mit Äther erschöpfend (24 Stdn.) extrahiert. Der nach Abdampfen erhaltene Rückstand wird in heißem Wasser gelöst, die Lösung mit 100 mg m-Nitrobenzhydrazid in wenig Wasser versetzt, mit einigen Tropfen Essigsäure angesäuert und 24 Stdn. stengelassen. Ausbeute: 60 mg (= 7%) Vanillin-m-nitrobenzhydrazon. Die weitere Reinigung erfolgt durch Spaltung des Hydrazons mit Quecksilber(II)-chlorid¹⁹ und erneutem Fällen als Hydrazon.

Die wäbr. Phase im Extraktor wird angesäuert und erneut mit Äther erschöpfend extrahiert. Der Rückstand aus der äther. Lösung besteht vorwiegend aus Vanilloylameisensäure neben geringen Mengen Vanillinsäure. Rohausbeute 390 mg.

Vanilloylameisensäure: Durch mehrmaliges Umkristallisieren obigen Rückstandes aus Benzol wird diese Säure mit einem Schmp. von 132° rein erhalten und ist identisch mit einem nach McCarthy¹⁶ hergestellten Präparat.

2,4-Dinitrophenylhydrazon: Eine wäbr. Lösung von 390 mg des rohen Säuregemisches gibt nach Fällung mit einer salzsauren Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin 650 mg (= 67%) Hydrazon vom Schmp. 223 bis 224°.

$C_{15}H_{12}O_8N_4$ (368,25). Ber. C 47,88, H 3,21.
Gef. C 47,89, 47,82, H 3,25, 3,41.

Decarboxylierung: Das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der Vanilloylameisensäure spaltet beim Erhitzen auf seinen Schmp. CO_2 ab. Dieses würde als Bariumkarbonat gemessen und war inaktiv.

Papierchromatographie: Für die Reinheitsprüfung der einzelnen Abbauprodukte sowie für die Ausarbeitung der Verfahren zur Spaltung bewährte sich eine aufsteigende Papierchromatographie unter Verwendung von Äthanol-Wasser-wäbr. Ammoniak (80:16:4) als Steigflüssigkeit. Sprühreagens: nach *Folin-Denis*²³. Bei Verwendung von S & S, 2043 b, fanden wir folgende R_f -Werte: Vanilloylameisensäure 0,26, Vanillinsäure 0,43, Vanillin 0,58 und Vanilloylacetyl 0,64.

Oxydativer Abbau der Ligninpräparate

1 g „Holzrückstand“ (bei „Äthanollignin“ entsprechend weniger) und 2,5 g Natrium-m-nitrobenzolsulfonat werden in 60 ml 2 n NaOH in einem Edelstahldrehautoklav $3\frac{1}{2}$ Stdn. auf 165° erhitzt. Die erkaltete Lösung wird auf pH 7 eingestellt und der flockig ausfallende „polymere Phenolkörper“²⁴ abgesaugt. Nach der Trocknung wird dieser mit Äther, der für die nachfolgende Extraktion verwendet wird, ausgekocht.

Das Filtrat wird im Extraktor, nach Zusatz von Kaliumchlorid, um Schäumen zu unterdrücken, mit Äther erschöpfend extrahiert (24 bis 36 Stdn.), die Ätherlösung abgedampft und der Rückstand mehrmals mit Wasser ausgekocht. Diese Vanillinlösung wird, wie oben beschrieben, mit m-Nitrobenzhydrazid gefällt und durch Spalten und erneutem Fällen¹⁹ bis zur konstanten spezifischen Aktivität gereinigt.

Die wäbr. Phase wird mit Salzsäure angesäuert und erneut mit Äther erschöpfend extrahiert. Die im Äther enthaltenen Säuren können durch mehrmaliges Digerieren mit heißem Benzol weiter aufgetrennt werden. Die Benzollösung enthält vorwiegend Vanillinsäure, die bei Normaldruck und 140° sublimiert. Der benzolunlösliche Anteil wird in Wasser gelöst und die darin enthaltene Oxalsäure mit Calciumchlorid gefällt.

Aktivitätsmessungen: Vanillin-m-nitrobenzhydrazon wurde jeweils auf Al-Plättchen in endlicher Schichtdicke gemessen, die wir durch Sedimentation einer wäbr. Suspension herstellten. Die Werte sind mittels einer Selbstabsorptionskurve²⁵, aufgenommen an einem synthetischen Präparat¹⁷, korrigiert worden. Die Vanillinsäure wurde direkt auf Al-Plättchen sublimiert, die Oxalsäure als Calciumoxalat in unendlich dicker Schicht gemessen.

Die Synthese der 5-Jod-vanillinsäure

5-Jod-vanillin nach Erdtman¹⁴ bzw. Raiford und Wells¹⁴

Acetyl-5-jod-vanillin: 4,3 g 5-Jod-vanillin werden mit 65 ml Essigsäureanhydrid und 30 ml Pyridin 2 Stdn. am siedenden Wasserbad erwärmt.

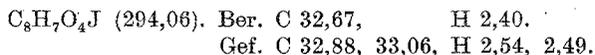
²³ O. Folin und W. Denis, J. Biol. Chem. 12, 239 (1912).

²⁴ K. Kratzl und H. Silbernagel, Mitteilungen der Österr. Gesellschaft f. Holzforsch. 7, 71 (1955); 8, 9 (1956).

²⁵ G. Hofbauer, Dissertation Universität Wien (1957).

Danach wird unter vermindertem Druck zur Trockene gedampft und der Rückstand aus 30 ml Eisessig-Wasser (1:1) umkristallisiert. Ausbeute: 4 g (= 80%) vom Schmp. 107°¹⁴.

5-Jod-vanillinsäure: 4 g Acetyl-5-jod-vanillin werden in 40 ml Pyridin gelöst, auf 60° erwärmt und langsam mit 3 g Kaliumpermanganat in 20 ml heißem Wasser versetzt. Nach dem Erkalten wird vom Braunstein abfiltriert, dieser mit Äthanol gewaschen und das Filtrat zur Entfernung des Pyridins einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Die wäßr. Lösung wird zur Spaltung der Acetylgruppe mit dem gleichen Volumen 1 n NaOH versetzt und 24 Stdn. bei Zimmertemp. stehen gelassen. Nach dem Ansäuern mit verd. Schwefelsäure werden 2 g roher Säure erhalten, die nach Umkristallisieren aus viel Wasser 1,3 g (= 55%) vom Schmp. 228° ergeben.



Wir danken Herrn Prof. Dr. *J. Kisser* und Herrn *G. Linhardt* † (Hochschule für Bodenkultur, Wien) für die Durchführung der Implantationen und Diskussion botanischer Fragen. Die Österr. Gesellschaft für Holzforschung unterstützte diese Arbeiten in großzügiger Weise, wofür hier bestens gedankt sei.