

Über das Verhalten von markiertem Coniferin in der verholzenden Pflanze

3. Mitteilung

Von

K. Kratzl und H. Faigle

Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Wien

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 14. Oktober 1958)

Eine wäßrige Lösung von Coniferin (3-¹⁴C) wurde durch Infusion an zweijährige Fichtenäste verabreicht. Die Verteilung der Radioaktivität in Holz, Rinde, Seitentrieben und den Extrakten wurde gemessen. Die aus diesen Ergebnissen erstellte Bilanz ließ 90% der eingesetzten Radioaktivität erfassen.

Rinde und Holz wurden getrennt der *Hibbertschen* Äthanololyse unterworfen. Aus den dabei anfallenden Ligninfraktionen wurden aktive Reinsubstanzen (Vanillin und Vanilloylacetyl) gewonnen. Die molaren Aktivitäten dieser Verbindungen ergaben durch Vergleich mit der molaren Aktivität des Coniferins die „Verdünnungsgrade“; diese lassen Rückschlüsse über den Einbau des Coniferins in das Lignin zu. Die Ergebnisse zeigen, daß die Infusionsmethode den biologischen Verhältnissen eher gerecht wird als die Implantationsmethode.

In früheren Arbeiten wurde der Beweis erbracht, daß die verholzende Fichte aus implantiertem, aktivem Coniferin einen ligninähnlichen Körper aufbaut^{1, 2}. Die angewandten Ligninnachweisreaktionen ergaben allerdings nur eine qualitative Übereinstimmung des gebildeten radioaktiven Polymeren mit dem natürlichen Lignin. Als Ursachen dieser mangelnden Übereinstimmung wurden vermutet:

¹ K. Kratzl, G. Billek, E. Klein und K. Buchtela, Mh. Chem. **88**, 721 (1957).

² K. Freudenberg und F. Bittner, Chem. Ber. **86**, 155 (1953).

1. Die beträchtliche Gewebeerletzung bei der Implantation; die Substanz wurde in fester Form unter einen abgehobenen Rindenlappen gebracht.
2. Die Anhäufung von kristallisiertem Coniferin an der Implantationsstelle.

Diese unphysiologischen Bedingungen dürften zu bevorzugter Bildung nicht-natürlicher Coniferinpolymerisate geführt haben. Um den genannten Schwierigkeiten zu entgehen, wurde in dieser Arbeit die von *Brown* und *Neish*³ beschriebene Infusionsmethode zur Applikation des Coniferins verwendet. Diese Methode hat zudem den Vorteil, daß die exakte Aufstellung einer Aktivitätsbilanz möglich ist.

Aktivitätsbilanz

Zweijährige Fichtenästen wurden unter Wasser abgeschnitten und einzeln in Glasbecher gestellt, welche eine wäßrige Lösung von Coniferin (3-¹⁴C) enthielten. Nach 24 Stdn. war bis auf einen sehr geringen Rest alles aufgesaugt. Die Seitentriebe und Nadeln wurden daraufhin entfernt und die Rinde der zweijährigen Astteile vom Holz abgezogen. Durch Extraktion mit Benzol-Aceton (1:1), Äthanol und Wasser wurden — nebst

Tabelle 1

	Gesamtgewicht	dpm/mg der Substanz	Gesamt-dpm der Substanz	% der infund. Aktivität
Coniferin	25,0 mg	1 388 000	34 700 000	100,0
Holz extrahiert	13 826 mg	628	8 700 000	25,0
Benzol-Aceton-Extrakt von Holz	236 mg	1 150	270 000	0,8
Äthanolextrakt von Holz	193 mg	16 000	3 090 000	8,9
Wasserextrakt von Holz	223,5 mg	19 100	4 270 000	12,3
Rinde extrahiert	10 342 mg	98	1 020 000	2,9
Benzol-Aceton-Extrakt von Rinde	754 mg	830	625 000	1,8
Äthanolextrakt von Rinde	1 539 mg	445	685 000	2,0
Wasserextrakt von Rinde	1 643 mg	473	775 000	2,2
Seitentriebe und Nadeln	160 000 mg	74	11 840 000	34,1
Summe:			31 275 000	90,0

³ *S. A. Brown* und *A. C. Neish*, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **32**, 170 (1954); **33**, 948 (1955); *Nature [London]* **175**, 688 (1955).

löslichen Holzstoffen — die Reste von Coniferin bzw. dessen lösliche Umwandlungsprodukte entfernt. Das Autoradiogramm von extrahiertem Holz bzw. extrahierter Rinde läßt den Einbau des aktiven Ligninprogenitors erkennen:

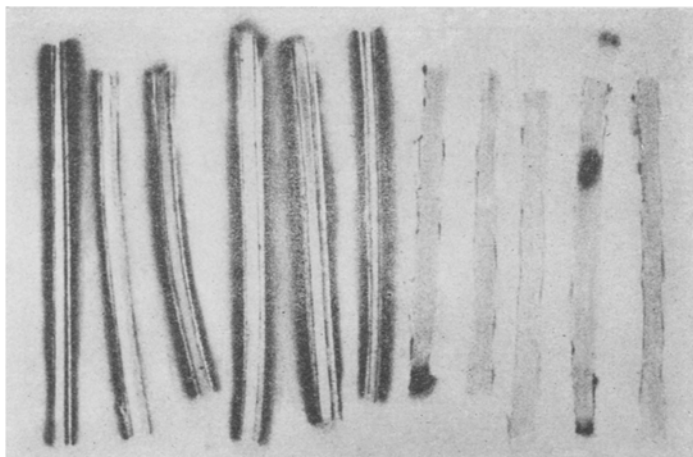


Abb. 1. Autoradiogramm von extrahiertem Holz (links) und extrahierter Rinde (rechts)

Zur Erfassung der gesamten Radioaktivität mußten Holz- und Rindenteil, sämtliche Extrakte sowie die Seitentriebe und Nadeln der Messung unterworfen werden.

Die Tabelle zeigt die Aktivitäten dieser Fraktionen im Vergleich zur eingesetzten Aktivität.

Bei den Extrakten ist unter Gesamtgewicht das Gewicht des Trockenrückstandes zu verstehen.

Die Aktivitätsbilanz weist ein Defizit von nur 10% der eingesetzten Aktivität auf. Substanzverluste beim Aufarbeiten der Proben dürften zur Hauptsache dafür verantwortlich sein. Das angebotene radioaktive Coniferin wurde zu 25% in das Holz und zu 3% in die Rinde der zweijährigen Astteile eingebaut. Die hohen Aktivitäten der Extrakte weisen darauf hin, daß ein ziemlich großer Teil des Coniferins zunächst entweder als solches oder in Form niedrigmolekularer Umwandlungsprodukte in der Pflanze deponiert wird. Möglicherweise war zur Jahreszeit der Infusion (Mitte Juli) die Verholzungsfähigkeit der Pflanze bereits zu gering, um in einer Versuchsdauer von nur 24 Stdn. einen höheren Anteil des angebotenen Ligninprogenitors einzubauen.

Lignin-Kriterien

Extrahierte, getrocknete und gemahlene Proben von Holz bzw. Rinde wurden nach *Hibbert* mit 3-proz. absol.-äthanol. Salzsäure aufgelös-

sen^{4, 5}. Dabei fielen folgende Ligninfraktionen an: „Holzrückstand“ (unlöslich, hochpolymer), „Äthanollignin“ (alkohollöslich, polymer), „Hibbert-Öl“ (Phenylpropankörper und Vanillin). Um eine Aussage über den Einbau des markierten Coniferins in die drei Fraktionen machen zu können, wurden diese zu definierten Verbindungen abgebaut: Aus „Holzrückstand“ und „Äthanollignin“ wurde nach *Freudenberg, Lautsch und Engler*⁶, durch Oxydation mit Natrium-m-nitrobenzolsulfonat im Autoklaven Vanillin hergestellt; dieses konnte als m-Nitrobenzhydrazon gefällt und als solches der Aktivitätsmessung unterzogen werden⁷. Da bei der Umwandlung von Coniferin in Lignin keine Umlagerung der Seitenkette stattfindet¹, repräsentiert das Carbonyl-C-Atom des Vanillins das markierte (kernnahe) 3-¹⁴C-Atom des verabreichten Coniferins.

Die wasserlösliche Fraktion umfaßt die sogenannten *Hibbert*-Bausteine:

I: α -Äthoxypropioquajacon, II: Vanilloylacetyl, III: Guajacylacetone, IV: Vanillin.

Durch Oxydation des Gemisches mit Eisen(III)-chlorid, kann der Hauptbestandteil, α -Äthoxypropioquajacon (I), quantitativ in Vanilloylacetyl (II) übergeführt werden¹. Dieses Diketon fällt dadurch in ausreichender Menge an; es eignet sich in Form des Nickelsalzes seines Di-oxims zur Abtrennung und Aktivitätsmessung.

Die molaren Aktivitäten der gewonnenen Reinstoffe Vanillin bzw. Vanilloylacetyl ergeben im Vergleich zur molaren Aktivität des eingesetzten Coniferins die

$$\text{„Verdünnungsgrade“} \left(= \frac{\text{mol. Akt. vom Coniferin}}{\text{mol. Akt. vom Reinstoff}} \right)$$

Tabelle 2

	Spezifische Aktivität dpm/mg	Molare Aktivität μ C/m Mol
Vanillin (als m-Nitrobenzhydrazon) aus „Holzrückstand“ von Holz ...	1 087	0,1542
aus „Äthanollignin“ von Holz ...	1 060	0,1504
Vanilloylacetyl (als Ni-Salz des Di-oxims) aus „Hibbert-Öl“ von Holz	2 000	0,1748
Vanillin (als m-Nitrobenzhydrazon) aus „Holzrückstand“ von Rinde ...	638	0,0905
aus „Äthanollignin“ von Rinde ...	526	0,0746
Vanilloylacetyl (als Ni-Salz des Di-oxims) aus „Hibbert-Öl“ von Rinde	nicht erhalten	

⁴ A. B. Cramer, M. J. Hunter und H. Hibbert, J. Amer. Chem. Soc. **61**, 509 (1939).

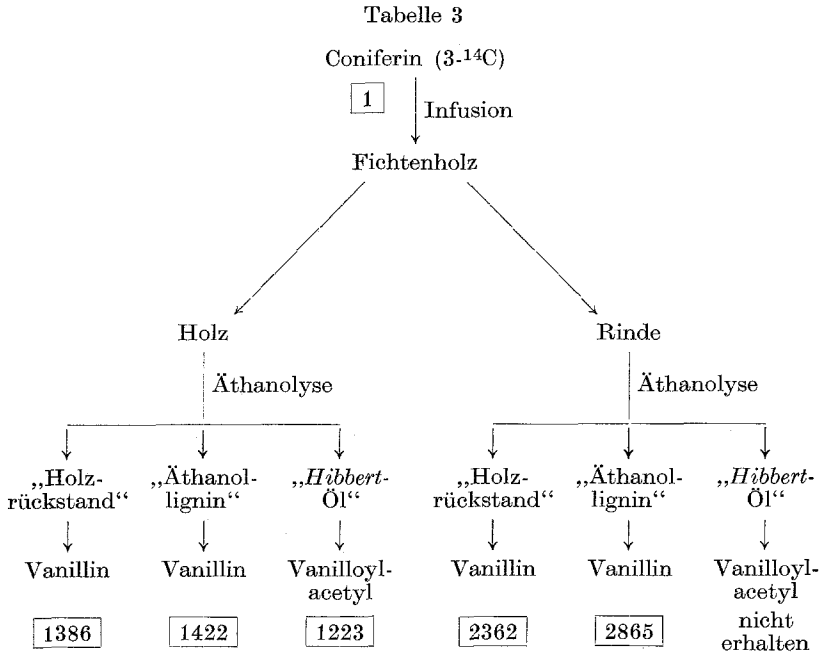
⁵ K. Kratzl und W. Schweers, Mh. Chem. **85**, 1046 (1954).

⁶ K. Freudenberg, W. Lautsch und K. Engler, Chem. Ber. **73**, 167 (1940).

⁷ H. Silbernagel, Mh. Chem. **86**, 256 (1955).

Tabelle 2 gibt für die verschiedenen Fraktionen die spezifischen und molaren Aktivitäten der zugehörigen Vanillin-m-nitrobenzhydrazone bzw. der Ni-Salze von Vanilloylacetyl an. Es handelt sich um Meßwerte von Verbindungen, die bis zur Konstanz der spezifischen Aktivität gereinigt worden waren (Mittelwerte aus 4—6 Messungen).

Mit Hilfe der molaren Aktivität des Coniferins (= 213,83 μ C/m Mol) errechnen sich folgende Verdünnungsgrade:



Es zeigt sich, daß die „Verdünnungsgrade“ des Coniferins für alle drei Ligninfraktionen des Holzes praktisch gleich groß sind. Die Verhältnisse beim Rindenlignin sind ähnlich, allerdings konnte kein Vanilloylacetyl erhalten werden. Die Verdünnung ist hier ungefähr doppelt so groß wie beim Holz.

Zusammenfassend kann ausgesagt werden:

Der Fichte (Mitte Juli) durch Infusion zugeführtes Coniferin wird innerhalb von 24 Stdn. zu etwa einem Drittel in das Lignin der zweijährigen Astteile eingebaut. Je ein weiteres Drittel des Coniferins bzw. seiner Umwandlungsprodukte liegt in den Extrakten und in den Seitentrieben samt Nadeln vor. Als wesentlichstes Ergebnis ist zu vermerken, daß die „Verdünnung“ des markierten Coniferins in allen Ligninfraktionen praktisch gleich ist. Das heißt, der Progenitor ergibt einen polymeren Körper, welcher in qualitativer und quantitativer Hinsicht durch die angewandten

Nachweisreaktionen praktisch nicht vom natürlichen Lignin zu unterscheiden ist.

Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen für implantiertes Coniferin¹: Der Progenitor wurde bei dieser Methode nur in sehr geringem Ausmaß in die äthanolysierbare Seitenkettenstruktur eingebaut, wohingegen er in etwa 7fach stärkerem Ausmaß in der unlöslichen Fraktion („Holzrückstand“) aufschien. Dies berechtigt zu dem Schluß, daß der Coniferin-„Stoß“ bei der Implantation zumindest teilweise zu Polymerisationen führte, die bei der normalen Verholzung nicht stattfinden.

In diesem Zusammenhang sei auf das *Freudenbergsche* Tauchtriebfahrverfahren hingewiesen⁸, welches eine Verabreichung aktiver Substanzen über längere Zeiträume zuläßt und Gewebeverletzungen sowie Anhäufungen aktiver Substanz weitgehend vermeiden läßt. Diese Applikationsmethode kommt daher den natürlichen Bedingungen sicher am nächsten. Die quantitative Bearbeitung ist mit Hilfe der Infusion allerdings leichter durchzuführen.

Wir danken der Österreichischen Gesellschaft für Holzforschung für die großzügige Hilfe, die sie dieser Arbeit angedeihen ließ.

Experimenteller Teil

1. Infusion von Coniferin (3-¹⁴C)

13 mg Coniferin (spez. Aktivität 1 388 000 dpm/mg) wurden in 13 ml *Knopscher* Nährlösung aufgelöst. 13 zweijährige Fichtenästchen wurden unter Wasser abgeschnitten und einzeln in kleine Glasbecher gestellt, die je 1 ml der Coniferinlösung enthielten. Der Flüssigkeitsstand wurde durch Zugabe reiner *Knop*-Lösung ungefähr konstant gehalten, nach 24 Stdn. wurde das Aufsaugen unterbrochen. Die in den Bechern zurückgebliebene Aktivität betrug nur 1 Promille der eingesetzten Gesamtaktivität. Die Seitentriebe und Nadeln wurden entfernt und die Äste der Länge nach halbiert; die Rinde wurde, noch in feuchtem Zustande vom Holz abgezogen.

2. Extraktion, Aktivitätsmessung

Die Entharzung von Rinde und Holz erfolgte getrennt, durch jeweils Sstdg. Extraktion mit Benzol-Aceton (1:1), Äthanol und Wasser. Zur Messung der Radioaktivität der Extrakte wurden aliquote Anteile in dem von *Calvin*⁹ angegebenen Gerät auf Aluminiumplättchen eingedampft, Gewicht und Aktivität der Trockenrückstände wurden bestimmt. Zur Messung diente ein *Geiger*-Gerät mit Endfenster-Zählrohr. Die Selbstabsorption der Trockenrückstände wurde durch Aufnahme von Absorptionskurven bestimmt.

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

⁹ *M. Calvin*, *Isotopic Carbon*, New York 1949, S. 118.

Die Messung der Radioaktivitäten von Holz und Rinde (beides extrahiert) sowie von Seitentrieben und Nadeln erfolgte durch nasse Oxydation der feingemahlenden und getrockneten Proben nach *Schmid* und *van Slyke* und Messung des anfallenden Bariumcarbonats in „unendlich“ dicker Schicht^{10, 11}.

3. Äthanolyse⁴

a) *Holz*: 13,51 g Holzpulver, hergestellt aus extrahiertem, getrocknetem Holz, wurden im CO₂-Strom mit 90 ml 3-proz. absol.-äthanol. HCl 48 Stdn. unter Rühren unter Rückfluß gekocht. Nach Erkalten wurde filtriert und mit 125 ml absol. Äthanol gewaschen. Es hinterblieb der „Holzrückstand“, Trockengewicht 7,18 g. Das auf 60 ml eingeeugte Filtrat wurde mit 500 ml Wasser versetzt, das dabei ausgefallene „Äthanollignin“ wurde abfiltriert, in 60 ml Äthanol gelöst und wieder mit 500 ml Wasser gefällt. Trockengewicht des „Äthanollignins“: 0,85 g. Die vereinigten, wäßrigen Filtrate wurden 48 Stdn. mit Äther extrahiert. Als Rückstand der Ätherlösung fielen beim Eindampfen 0,97 g gelbbraunes Öl („crude oil“) an. Die wäßrige Phase ergab als Trockenrückstand 3,61 g eines graubraunen Pulvers (nicht-radioaktive Kohlehydratabbauprodukte). Das „crude oil“ wurde bei 10⁻³ Torr und 120 bis 140° C im Kugelrohr destilliert, das Destillat bestand aus 0,64 g gelbem Öl („distillable oil“).

Oxydation: Das „distillable oil“ wurde in 50 ml Äthanol gelöst, mit 0,48 g FeCl₃ · 6 H₂O versetzt und 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach Beendigung wurden 150 ml Wasser und etwa 15 ml konz. Ammoniak zugesetzt; die Eisenhydroxydniederschläge wurden heiß abfiltriert. Das auf pH 1 eingestellte Filtrat wurde 24 Stdn. mit Äther extrahiert; nach Abdampfen des Äthers fielen 0,37 g „oxydiertes Öl“ an.

Fällung des Vanilloylacetyls: 0,37 g „oxydiertes Öl“ wurden in 75 ml acetatgepuffertem Wasser gelöst, die Lösung mit 0,30 g NiCl₂ · 6 H₂O und 0,30 g NH₂OH · HCl versetzt und 4 Tage bei 95—100° C belassen. Das entstandene Ni-Salz des Vanilloylacetyldioxims mußte zwecks Reinigung wieder gespalten werden (24stdg. Behandlung mit 45 ml 12 n H₂SO₄ bei 30° C). Nach Abtrennung geringer Rückstände wurde das saure Filtrat mit Äther extrahiert und das gereinigte Vanilloylacetyl, wie beschrieben, als „Nickelsalz“ gefällt.

b) *Rinde*: Die Aufarbeitung erfolgte analog; 10,02 g Rinde ergaben: 4,35 g „Holzrückstand“, 1,77 g „Äthanollignin“, 0,33 g „crude oil“.

Infolge der geringen Menge an „crude oil“ wurde dieses ohne Destillation direkt der Oxydation unterzogen. Es fielen 0,12 g „oxydiertes Öl“ an, welches jedoch sehr unrein war und bei der Behandlung mit Nickelchlorid und Hydroxylamin-hydrochlorid kein „Nickelsalz“ ergab.

4. Oxydativer Abbau der Ligninpräparate

Die Mengenverhältnisse für den Abbau der Fraktionen „Holzrückstand“ und „Äthanollignin“ von Holz und Rinde waren: 1 g Ligninpräparat, trocken; 2,5 g Natrium-m-nitrobenzolsulfonat, 60 ml 2 n Natronlauge. Das Gemisch wurde jeweils 3 ½ Stunden bei 165° C im Autoklaven behandelt. Das Vanillin

¹⁰ H. Schmid und K. Schmid, *Helv. Chim. Acta* **36**, 498 (1953).

¹¹ D. D. van Slyke, J. Plazin und J. R. Weisiger, *J. Biol. Chem.* **191**, 299 (1951).

wurde aus dem neutralisierten Reaktionsgemisch mittels Ätherextraktion abgetrennt und als m-Nitrobenzhydrazon gefällt. Die Reinigung erfolgte durch mehrmalige Spaltung dieser Verbindung mit HgCl_2 und neuerliches Ausfällen⁷.

Sowohl das „Nickelsalz“, als auch die Vanillin-m-nitrobenzhydrazone wurden in „endlich“ dicker Schicht auf Aluminiumplättchen gemessen. Zur Herstellung der Plättchen wurde eine Äthersuspension des „Nickelsalzes“ bzw. eine Petroläthersuspension von Vanillin-m-nitrobenzhydrazon in oben beschriebenen Gerät⁹ eingedampft. Die Korrektur der Meßwerte erfolgte mit Hilfe von Selbstabsorptionskurven der beiden Verbindungen^{12, 13}.

¹² E. Klein, Dissertation Univ. Wien (1956).

¹³ G. Hofbauer, Dissertation Univ. Wien (1957).