

Über das Verhalten von markiertem Coniferin in der verholzenden Pflanze

II. Mitteilung: Die Vanillin-Acetaldehydspaltung der aktiven
Ligninsulfosäuren

Von

K. Kratzl und G. Hofbauer

Aus dem I. Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 8. November 1957)

Durch Infusion von Coniferin-(3-¹⁴C) bzw. Coniferin-(2-¹⁴C) in Fichtenästchen wurde nach Sulfitierung und alkalischer Hydrolyse bei (3-¹⁴C)-Markierung aktives Vanillin und weitgehend inaktiver Acetaldehyd erhalten, bei (2-¹⁴C)-Markierung inaktives Vanillin und aktiver Acetaldehyd. Damit ist bewiesen, daß die Zimtalkoholseitenkette *in vivo* zu der des konjugierten Aldehydes oxydiert wird, wodurch sie nach Sulfitierung auch der „reversiblen Aldolspaltung“ zugänglich ist. Die beiden Spaltprodukte Vanillin und Acetaldehyd stammen aus demselben Phenylpropansystem (polymere Coniferylaldehyd-hydrosulfosäure).

Nachdem die Umwandlung der Seitenkette des Coniferins unter biologischen Bedingungen in äthanolysierbare Strukturelemente (Guajacylglycerin bzw. β -Aryläther¹) durch Äthanolyse von Coniferin-(3-¹⁴C)-implantaten² bewiesen war, zogen wir als weiteres Ligninkriterium³ die Spaltung der aktiven Ligninsulfosäure zu Vanillin und Acetaldehyd

¹ 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, Svensk Papperstidn. **55**, 238 (1952). — E. Adler und B. O. Lindgren, Svensk Papperstidn. **55**, 563 (1952).

² K. Kratzl und G. Billek, Holzforschung **10**, 170 (1956). — K. Kratzl, G. Billek, E. Klein und K. Buchtela, Mh. Chem. **88**, 721 (1957).

³ K. Kratzl, Mikrochim. Acta [Wien] **1956**, 159.

heran. Diese von uns gefundene Reaktion⁴ scheint für Lignin bzw. Ligninsulfosäure spezifisch zu sein: ihr Reaktionsmechanismus ist aber weniger geklärt⁵ als jener der Äthanolyse. Es dürfte sich um die Hydrolyse eines sulfitierten polymeren Coniferylaldehydsystems handeln⁴. Freie Coniferylaldehydseitenketten konnten im Lignin nur in geringen Mengen festgestellt werden⁵. *Freudenberg*⁶ fand in neuester Zeit, daß in den „Dimeren“ der enzymatischen Dehydrierungsprodukte des Coniferylalkohols ein Aldehyd des Dehydro-diconiferylalkohols enthalten ist.

In einer früheren Arbeit haben wir die experimentelle Methodik der anaeroben alkalischen Hydrolyse anlässlich einer Untersuchung von *Brauns* Nativlignin (Original) und *Freudenberg*schem DHP⁷ weiter ausgebaut. Die Spaltung der Sulfosäuren dieser Präparate ergab Vanillin und Acetaldehyd und in sehr kleinen Mengen Acetovanillon und Form-aldehyd⁸.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Applikation von Coniferin-(3-¹⁴C)⁹ (spez. Akt.: $1,4 \cdot 10^6$ dpm/mg) bzw. Coniferin-(2-¹⁴C)¹⁰ ($7,55 \cdot 10^4$ dpm/mg) in der Pflanze ein enzymatischer Polymerisationsvorgang eingeleitet, von dem vermutet wird, daß er einen der DHP-Bildung in vitro ähnlichen Verlauf nimmt und zu Ligninbildung führt. Zum Einbringen des aktiven Materials wurde diesmal die Aufsaugmethode¹¹ verwendet, weil hier keine schwere traumatische Verletzung des Holzgewebes eintritt bzw. keine lokalen Anhäufungen des markierten Coniferins stattfinden können. Auf die Isolierung des Lignins dieser Ästchen (etwa als HCl-Lignin) wurde wegen der manchmal schlechten Sulfitierbarkeit der Salzsäurelignine verzichtet. Das Holz wurde nach entsprechender Extraktion fein gemahlen und direkt dem Sulfitaufschluß (NaHSO₃, H₂SO₃) unterworfen. Nach Entfernen des Zellstoffes und SO₂-Überschusses wurde die Lösung anaerob alkalisch hydrolysiert, die flüchtige Aldehydkomponente in 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung aufgefangen und der Niederschlag durch Umkristallisieren bis zu konstanter Aktivität gereinigt. Im alkalischen Rückstand wurde das Vanillin

⁴ *K. Kratzl*, Mh. Chem. **78**, 173, 392 (1948). — *K. Kratzl* und *F. Rettenbacher*, Mh. Chem. **80**, 622 (1949).

⁵ *E. Adler* und *L. Ellmer*, Acta Chem. Scand. **2**, 839 (1948). — *E. Adler*, *K. J. Björkquist* und *S. Häggroth*, Acta Chem. Scand. **2**, 93 (1948). — *E. Adler* und *S. Häggroth*, Acta Chem. Scand. **3**, 86 (1949).

⁶ *K. Freudenberg*, Sympos. makromolek. Chem. (Prag 1957), Vortragsbericht 120.

⁷ Herrn Prof. *Freudenberg* danken wir für die Überlassung kleiner Mengen Zutropf-DHP, die gleichfalls nach Sulfitierung diese Spaltung ergaben.

⁸ *K. Kratzl* und *G. Hofbauer*, Mh. Chem. **87**, 617 (1956).

⁹ *K. Kratzl* und *G. Billek*, Holzforschung **7**, 66 (1953).

¹⁰ *K. Kratzl* und *G. Billek*, Mh. Chem. **84**, 406 (1953).

¹¹ *S. A. Brown* und *A. C. Neish*, Canad. J. Biochem. Physiol. **32**, 170 (1954); **33**, 948 (1955); Nature **175**, 688 (1955).

mit m-Nitrobenzhydrazid gefällt und nach bewährter Spaltungsmethode mit HgCl_2 und Alkali¹² auf konstante spezifische Aktivität gebracht (m-Nitrobenzhydrazid fällt die an sich sehr geringen Mengen Acetovanillon, die in dem Hydrolysenrückstand enthalten sind, nicht).

Die Tabelle 1 gibt die Ergebnisse der gravimetrischen Bestimmung dieser Aldehyde wieder.

Tabelle 1

| Bezeichnung der Ästchen | Ä I | Ä II | Ä III | Ä IV | Ä V |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Aktive Stelle am Coniferin | 2- ¹⁴ C | 2- ¹⁴ C | 3- ¹⁴ C | 3- ¹⁴ C | 3- ¹⁴ C |
| Holzeinwaage, g | 2,50 | 2,25 | 2,10 | 2,00 | 1,36 |
| Zellstoff, mg | 920 | 830 | 767 | 718 | 510 |
| Acetaldehyd, mg | 10,84 | 9,76 | 9,03 | 8,39 | 5,74 |
| „ % der Holzeinwaage | 0,43 | 0,43 | 0,43 | 0,42 | 0,42 |
| Vanillin, mg | 48,01 | 43,24 | 39,67 | 37,11 | 24,52 |
| „ % der Holzeinwaage | 1,92 | 1,92 | 1,89 | 1,86 | 1,80 |

Tabelle 2

| Bezeichnung der Ästchen | Ä I | Ä II | Ä III | Ä IV | Ä V |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Aktive Stelle am Coniferin | 2- ¹⁴ C | 2- ¹⁴ C | 3- ¹⁴ C | 3- ¹⁴ C | 3- ¹⁴ C |
| Infund. Aktivität, 10 ⁶ dpm | 0,755 | 0,755 | 14,0 | 14,0 | 5,6 |
| dpm des Extr./mg Holz: | | | | | |
| Benzol-Aceton | 1,40 | 1,34 | 13,74 | 9,36 | 3,07 |
| Äthanol | 0,57 | 0,58 | 12,04 | 4,75 | 2,29 |
| Wasser | 5,79 | 5,78 | 61,15 | 27,89 | 12,84 |
| dpm/mg Zellstoff | 34,7 | 28,4 | 452,0 | 325,7 | 71,7 |
| „ Acetaldehyd | 909,2 | 811,9 | 124,2 | 81,5 | 55,2 |
| „ Vanillin | 14,3 | 6,8 | 3960,0 | 4237,0 | 801,0 |

In Tabelle 2 ist zunächst die Aktivität des Coniferins in Zerfällen pro Minute (= Desintegrationen pro Minute = dpm) angegeben, das den Ästchen bei der Infusion angeboten und von ihnen praktisch restlos aufgenommen wurde. Da die Ästchen aber erst nach Entfernen der ebenfalls aktiv gewordenen Nadeln und Maitriebe weiter verwendet wurden, sind die angegebenen Zahlen nicht gleichbedeutend mit der Aktivität des verarbeiteten Holzes.

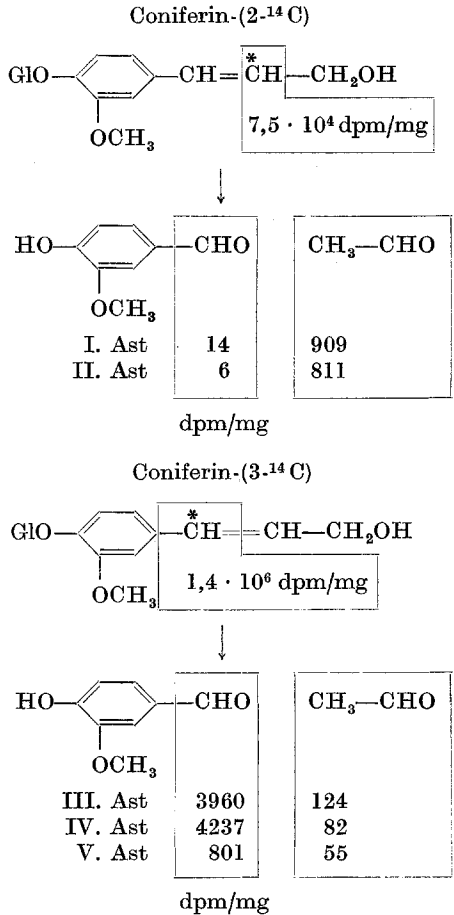
Die Messung der Extrakte zeigte, daß nur ein sehr geringfügiger Teil der Aktivität wieder ausgewaschen werden kann.

Die Aktivität des Zellstoffes dürfte von nicht aufgeschlossenen Ligninresten stammen, da das Produkt durchschnittlich 1,5% OCH_3 enthält.

Die in der Tabelle 2 für Acetaldehyd und Vanillin angegebenen Werte beziehen sich auf die bereits bis zu konstanter spezifischer Aktivität

¹² H. Silbernagel, Mh. Chem. 86, 256 (1955).

gereinigten Produkte. In der angefügten übersichtlichen Darstellung wird deutlich, daß die lokale Verteilung der Aktivität in den Spaltprodukten so vorliegt, wie sie nach dem vermuteten Reaktionsweg (Coniferin . . . Coniferylalkohol . . . Lignin mit polymerer Hydroconiferylaldehydsulfosäure-Seitenkette nach Sulfiterung . . . Vanillin-Acetaldehyd) zu erwarten ist.



Im Falle der Spaltung Coniferin-(2-¹⁴C)-markierter Ästchen ist nur der Acetaldehyd aktiv, während die am Vanillin gemessenen Werte kaum von Schwankungen des Blindwertes unterschieden werden können.

Das bei der Spaltung Coniferin-(3-¹⁴C)-markierter Ästchen anfallende Vanillin ist stark aktiv. Die beim Acetaldehyd (der hier inaktiv sein soll) verbleibende geringe Aktivität ist vermutlich auf Verunreinigungen zurückzuführen; es kann sich aber bei diesen nicht um Formaldehyd oder

Zuckerspaltprodukte¹³ handeln, die beide jedenfalls inaktiv sein müßten. Die Reinigung des Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazons ist bedeutend schlechter durchführbar als die des Vanillin-m-nitrobenzhydrazons.

Die Möglichkeit von Umlagerungen innerhalb einer C₃-Seitenkette vom reversiblen Aldotyp bei der alkalischen Spaltung wurde dadurch ausgeschlossen, daß Coniferin-(3-¹⁴C) mit Platinmohr zu Glucoconiferinaldehyd oxydiert und nach Alkalibehandlung¹⁴ die Radioaktivität der Spaltstücke untersucht wurde; die Acetaldehydfällung war inaktiv, während die Vanillinfraktion starke Aktivität zeigte.

An Hand der Ergebnisse kann die Zusammengehörigkeit der bei anaerober alkalischer Hydrolyse auftretenden Spaltprodukte Vanillin und Acetaldehyd als bewiesen angesehen werden.

Experimenteller Teil

1. *Infusion von Coniferin-(2-¹⁴C)*. Die Substanz hatte $7,55 \cdot 10^4$ dpm/mg (= Zerfälle pro Minute und mg). 20 mg wurden in 10 ml Knopscher Nährlösung gelöst. Zehn zweijährige Fichtenästchen wurden unter Wasser abgeschnitten und in je 1 ml der obigen Lösung eingetaucht. Die Flüssigkeit wurde nach Bedarf mehrmals mit Knopscher Nährlösung ergänzt. Nach 24 Stdn. wurde das Aufsaugen beendet. Die nicht eingesaugten Reste zeigten praktisch keine Aktivität. Zur weiteren Verarbeitung wurden je 5 Ästchen zusammengefaßt:

$$\begin{array}{l} 5 \text{ Ästchen (à 2 mg Coniferin-(2-}^{14}\text{C))} = 7,55 \cdot 10^5 \text{ dpm } \text{Ä I,} \\ 5 \text{ „ „ (, 2 „ „ „ „) } = 7,55 \cdot 10^5 \text{ „ „ } \text{Ä II.} \end{array}$$

2. *Infusion von Coniferin-(3-¹⁴C)*. Diese Substanz hatte $1,4 \cdot 10^6$ dpm/mg. Die Infusion erfolgte analog:

$$\begin{array}{l} 5 \text{ Ästchen (à 2 mg Coniferin-(3-}^{14}\text{C))} = 1,4 \cdot 10^7 \text{ dpm } \text{Ä III,} \\ 5 \text{ „ „ (, 2 „ „ „ „) } = 1,4 \cdot 10^7 \text{ „ „ } \text{Ä IV,} \\ 2 \text{ „ „ (, 1 „ „ „ „) } \\ 1 \text{ „ „ (, 2 „ „ „ „) } \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 5 \\ 5 \\ 2 \\ 1 \end{array}} \right\} = 5,6 \cdot 10^6 \text{ „ „ } \text{Ä V.}$$

Die Ästchengruppen Ä I bis Ä V wurden an der Luft getrocknet, die Nadeln abgestreift, Maitriebe entfernt und die verbleibenden zweijährigen Astteile gespalten und über P₂O₅ getrocknet.

3. *Die Extraktion*. Ä I bis Ä V wurden je 6 Stdn. in einem Soxhlet-Apparat mit Benzol-Aceton (1:1), Äthanol und Wasser extrahiert. Aliquote Teile des Extraktes wurden zur Messung der Radioaktivität vorbereitet, indem sie jeweils in ein kleines Stahlgefäß pipettiert wurden, dessen auswechselbarer Boden aus einem runden Aluminiumplättchen bestand. Nach Eindampfen des Extraktes wird die Aktivität des Rückstandes auf diesem Plättchen mit Hilfe des Geigerzählers gemessen. Die gezählten Impulse pro Minute (ipm) wurden in die effektiven Desintegrationen pro Minute (dpm) umgerechnet¹⁵.

Tabelle 3 gibt die Aktivität (in 10⁸ dpm) der gesamten Extraktmengen an.

¹³ E. Adler, Svensk Papperstidn. 50, Nr. 11 B, 9 (1947).

¹⁴ K. Kratzl und I. Keller, Mh. Chem. 83, 200 (1952).

¹⁵ Dissertation G. Hofbauer, Universität Wien (1957).

Tabelle 3

| | Ä I | Ä II | Ä III | Ä IV | Ä V |
|-----------------------------|------|------|-------|------|------|
| Benzol-Aceton-Extrakt . . . | 3,5 | 3,0 | 28,8 | 18,7 | 4,2 |
| Äthanolextrakt | 1,4 | 1,3 | 25,3 | 9,5 | 3,1 |
| Wasserextrakt | 14,5 | 13,0 | 128,4 | 55,8 | 17,5 |

4. *Sulfitaufschluß*. Die Ästchen wurden getrocknet und gewogen. Ä I = 2,50 g, Ä II = 2,25 g, Ä III = 2,10 g, Ä IV = 2,00 g, Ä V = 1,36 g. Sie wurden hierauf mit einer Schlagkreuzmühle fein gemahlen. Je 1 g wurde mit 100 ml einer Lösung von 1,4 g NaOH und 5 g SO₂ in 100 ml Wasser in einem Bombenrohr eingeschlossen und am nächsten Tag in einem Luftthermostaten gedreht, der innerhalb von 5 Stdn. auf 130° C angeheizt wurde. Nach 24 Stdn. wurde das Erhitzen beendet und vom ungelösten Zellstoff abfiltriert.

Die dpm/mg-Werte des Zellstoffes waren bei Ä I 34,7, Ä II 28,4, Ä III 452,0, Ä IV 325,7, Ä V 71,7.

Spaltung und Aldehydbestimmung. Das Filtrat des Zellstoffes wurde vom SO₂-Überschuß befreit, wie bereits beschrieben⁸ bei 140° C Badtemperatur unter reinem N₂ mit 19,7%iger NaOH hydrolysiert und der flüchtige Teil in 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung aufgefangen. Die Phenylhydrazone zeigten nach zweimaligem Umkristallisieren konstante Aktivität. Das aus dem Hydrolysenrückstand gewonnene Vanillin (Tabelle 1) war — in Form seines m-Nitrobenzhydrazons — nach zwei- bis dreimaligem Spalten und Ausfällen konstant aktiv. Die Werte wurden in „endlicher“ Schichtdicke gemessen¹⁵ und nach Aufnahme von Selbstabsorptionskurven durch Extrapolation gewonnen. Sie sind — auf Aldehyde umgerechnet — in Tabelle 2 angegeben.

Der Österr. Gesellschaft für Holzforschung sind wir für die Bereitstellung der Mittel zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. J. Kisser (Hochschule für Bodenkultur) danken wir für die Diskussion botanischer Fragen.