

Studien zum biologischen Aufbau der Seitenkette von Phenylpropanen

Von

K. Kratzl*, W. Kisser, A. Graf und G. Hofbauer

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien

Mit 2 Abbildungen

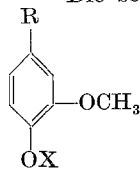
(Eingegangen am 26. Mai 1959)

Durch Autoradiographie, Extraktions- und Abbaueversuche wurde an Vanillinderivaten die Notwendigkeit einer freien phenolischen Hydroxylgruppe für den Einbau in die Kambiumzone der Fichte nachgewiesen. Die Oxydationsstufe des kernnahen C-Atoms ist nicht von entscheidender Bedeutung.

Durch Verabreichung von Methyl- ^{14}C -kreosol und Äthanololyse des gebildeten ligninartigen Körpers konnte Vanilloylacetyl [3-(OCH_3)-4-(OH)- $\text{C}_6\text{H}_3^{14}\text{COCOCH}_3$] isoliert und die Markierungsstelle lokalisiert werden. Aus demselben Produkt wurde nach Sulfitierung eine Sulfosäure erhalten, die bei anaerober alkalischer Hydrolyse aktives Vanillin und inaktiven Acetaldehyd lieferte. Der oxydative Abbau ergab eine hohe Ausbeute an aktivem Vanillin.

Durch diese Versuche wurde erstmalig die Fähigkeit der verholzenden Pflanze (Fichte) bewiesen, aus einem an sich unphysiologischen aromatischen C_7 -(C_6 - C_1)-Körper den C_9 -(C_6 - C_3)-Körper aufzubauen. Dieser Aufbau findet im Vergleich zur Umwandlung eines gegebenen C_9 -Körpers (z. B. Coniferin) nur in sehr geringem Maße statt.

Die schon früher hergestellten Verbindungen¹



A (X = H)

Kreosol (R = $^{14}\text{CH}_3$)
 Vanillylalkohol (R = $^{14}\text{CH}_2\text{OH}$)
 Vanillin (R = ^{14}CHO)
 Vanillinsäure (R = $^{14}\text{COOH}$)

B (X = CH_3)

Homoveratrol (R = $^{14}\text{CH}_3$)
 Veratrylalkohol (R = $^{14}\text{CH}_2\text{OH}$)
 Veratrumaldehyd (R = ^{14}CHO)
 Veratrumssäure (R = $^{14}\text{COOH}$)

* Herrn Prof. F. F. Nord (Fordham University, New York) zum 70. Geburtstag gewidmet.

¹ K. Kratzl, G. Billek, A. Graf und W. Schweers, Mh. Chem. 87, 60 (1956).

wurden durch Infusion² zweijährigen Fichtenästchen verabreicht. Nach Extraktion (e) war nur bei der Gruppe B, wie die Abb. 1 und 2 zeigen, die Aktivität durch Extraktion entfernbar. Die freie phenolische Hydroxylgruppe ist für die Fixierung der Substanzen verantwortlich, da sie nach Wegnahme eines Wasserstoffes zur Bildung von mesomeren Radikalen oder Kryptoionen³ notwendig ist.

Bemerkenswert ist, daß der Oxydationszustand am markierten C-Atom zunächst, rein qualitativ, kein unterschiedliches Verhalten bewirkt. Da wahrscheinlich Peroxydasen in den Cambiumzellen vorhanden sind,

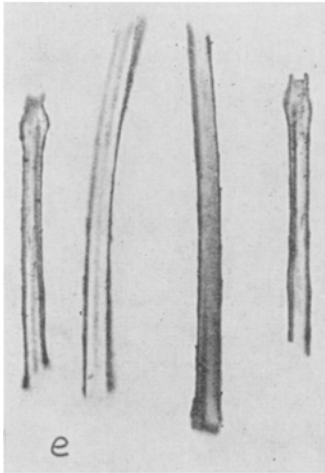


Abb. 1

Abb. 1. Gruppe A: Infusion von Vanillin-(carbonyl-¹⁴C). (e = extrahiert)

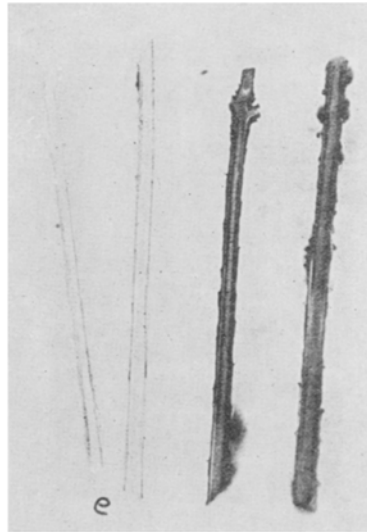


Abb. 2

Abb. 2. Gruppe B: Infusion von Veratrumaldehyd-carbonyl-¹⁴C). (e = extrahiert)

kann dieses Verhalten mit der *in vivo*-Bildung der biologisch geeigneten Oxydationsstufe gedeutet werden. *H. Booth* und *B. L. Saunders*⁴ haben eine biologische Oxydation der Methylgruppe zur Carbinol- und Carboxylgruppe bewiesen.

Ob sich aus diesen Verbindungen Lignin bildet, kann nur nach quantitativer Untersuchung der Ligninkriterien⁵ ausgesagt werden. Jedenfalls ist zum Nachweis des Aufbaues einer Phenylpropanseitenkette die

² *K. Kratzl* und *H. Faigle*, *Mh. Chem.* **89**, 708 (1958).

³ *K. Freudenberg*, *H. Reznik*, *W. Fuchs* und *M. Reichert*, *Naturwiss.* **42**, 29 (1955); *K. Freudenberg*, IV. Internat. Biochem. Kongr., Wien 1958; *E. Adler*, ebenda.

⁴ *H. Booth* und *B. C. Saunders*, *J. Chem. Soc. [London]* **1956**, 940.

⁵ *K. Kratzl* und *G. Billek*, *Holzforschung* **10**, 161 (1956), *Tappi* **40**, 269 (1957).

Isolierung eines definierten isotopenkonstanten C₆-C₃-Abbauproduktes notwendig, an dem auch die C-Folge bestimmt werden muß.

Diese Forderung erfüllt für einen gewissen, allerdings kleinen Teil des Ligninmoleküls die Äthanolyse⁶, die nach FeCl₃-Oxydation zu Vanilloylacetyl führt, dessen Reinigung und C-Folgebestimmung ausgearbeitet wurden⁷.

Das aktive Holz wird mit 3proz. äthanol. HCl behandelt und daraus das Diketon als Nickelsalz des Dioxims isoliert und gereinigt. Wegen der gegenüber Coniferin sehr geringen Aktivität des Diketons bei den Verbindungen A (Tab. 1 und 2) konnte zunächst keine Isotopenkonstanz erreicht werden. Qualitativ deuten aber schon diese Versuche darauf hin, daß alle Verbindungen, allerdings in geringem Maße, in der für Lignin charakteristischen Weise eingebaut werden.

Tabelle 1

Substanz	Holz g	Hibberts distillable oil		% der einges. Aktivität
		mg	Zerf./min	
Kreosol	6,09	80,1	7160	0,015
Vanillylalkohol	5,03	115,7	2730	0,010
Vanillin	4,93	89,2	6240	0,014
Vanillinsäure	3,24	41,0	15550	0,099

Tabelle 2

	Nickelsalz I			Nickelsalz II		
	mg	spez. Akt. dpm/mg	Gesamtakt. dpm	mg	spez. Akt. dpm/mg	Gesamtakt. dpm
Kreosol	17,4	366	6380	8,9	153	1360
Vanillylalkohol	23,9	76	1820	6,4	89	570
Vanillin	26,8	83	2175	7,4	156	1150
Coniferin	52,6	398	20930	35,6	355	12640

Um zu isotopenkonstanten Produkten zu kommen, wurde ein Kreosol, da es den (rein chemisch gesehen) reaktionsträgsten Substituenten besitzt, mit besonders hoher Aktivität hergestellt ($1,76 \cdot 10^6$ dpm/mg) und davon 60,8 mg entsprechend einer Gesamtaktivität von $10,8 \cdot 10^7$ dpm infundiert. Die Autoradiogramme der extrahierten Ästchen zeigten wiederum eine deutliche Fixierung der Aktivität. Das nach Extraktion und Trocknung feingemahlene Holz (19,04 g) wurde äthanolysiert und wie beschrieben⁷ auf Vanilloylacetyl aufgearbeitet. Das hieraus erhaltene Nickelsalz wurde mit 12 n H₂SO₄ zersetzt, das Diketon mit Äther

⁶ A. B. Cramer, M. J. Hunter und H. Hibbert, J. Amer. Chem. Soc. **61**, 509 (1939).

⁷ K. Kratzl, G. Billek, E. Klein und K. Buchtela, Mh. Chem. **88**, 721 (1957).

extrahiert und erneut gefällt. Diese Operation wurde noch zweimal bis zur Aktivitätskonstanz des Nickelsalzes wiederholt. Tab. 3 gibt die Ausbeuten und spezifischen Aktivitäten der einzelnen Nickelsalzfraktionen wieder:

Tabelle 3

	Ausbeute mg	spez. Akt. dpm/mg	dpm/mMol Diketon
Nickelsalz I	336	1860	$4,70 \cdot 10^5$
Nickelsalz II	161	1413	$3,57 \cdot 10^5$
Nickelsalz III	105	1058	$2,67 \cdot 10^5$
Nickelsalz IV	75	1002	$2,53 \cdot 10^5$

Zum Nachweis, daß keine „Verschmierung“ die Ursache der Aktivität im Ni-Salz sein kann, wurde⁸ aus dem Kreosol mit Pilzenzym gemäß der *Freudenbergschen* Methodik⁹ ein DHP hergestellt. Es liefert natürlich bei der Äthanolyse keine *Hibbertschen* Körper. Ein analoges hochaktives DHP im Gemisch mit inaktivem Fichtenholz äthanolysiert, gab weitgehend inaktives Vanilloylacetyl.

Weiters wurden Mitreißversuche gemacht¹⁰. 2% eines besonders hochaktiven Vanillins mit 10^6 dpm/mg wurden inaktivem Diketon zugesetzt und die Nickelsalzfällungen und -spaltungen analog durchgeführt. (Die Aktivität des Vanillins durch Oxydation aus dem biologischen Versuch der Kreosolinfusion war viel geringer, nur $15,7 \cdot 10^4$ dpm/mg.) Im Blindversuch sanken die 1063 dpm/mg der ersten Fällung auf 15,6 nach der vierten und 10,2 nach der fünften Fällung. Nur 0,04% des Vanillins waren dann im Ni-Salz des Diketonoxims nachweisbar. Entgegen diesem außerordentlich starken Abfall des mitgerissenen Vanillins sanken im biologischen Versuch mit dem Kreosol (Infusion) die dpm/mg nur auf 55%. Verunreinigungen durch mitgefälltes Vanillin können deshalb weitgehend ausgeschlossen werden.

Zur Lokalisierung der Aktivität wurde das Diketon mittels KJO_4 zu Vanillinsäure und Essigsäure aufgespalten⁷. Die Essigsäure wurde als p-Bromphenacyl-ester gefällt. Die Vanillinsäure wurde auf Aluminiumplättchen aufsublimiert und gelangte so zur Messung.

Tabelle 4

<i>Essigsäure</i>	<i>Vanillinsäure</i>
Plättchen 1: 280 Imp./20 Min.	Plättchen 1: 1360 dpm/mg
Plättchen 2: 269 Imp./20 Min.	Plättchen 2: 1250 dpm/mg
Blindwertmittel: 272 Imp./20 Min.	Plättchen 3: 1440 dpm/mg
	Plättchen 4: 1290 dpm/mg

⁸ Diese Versuche verdanken wir Herrn Dr. K. *Buchtela*, Dissertation Universität Wien 1957.

⁹ K. *Buchtela*, Dissertation Universität Wien 1957.

¹⁰ Herrn Dr. G. *Billek* danken wir für diesen Versuch.

Bei der Essigsäure liegt die Zahl der Impulse innerhalb der Blindwertschwankung. Die Aktivität der Substanz ist daher, wenn überhaupt vorhanden, nur äußerst gering.

Die ziemlich starke Streuung der Vanillinsäurewerte läßt sich bei der angewandten Meßmethodik nicht vermeiden. Die aus den Werten berechnete mittlere molare Aktivität beträgt 224 000 dpm/mMol in relativ guter Übereinstimmung mit dem Nickelsalz (253 000 dpm/mMol).

Der bei der Äthanololyse hinterbliebene „Holzrückstand“ wurde zur Aktivitätsbestimmung der Naßoxydation unterworfen. Seine spez. Aktivität betrug 5717 dpm/mg, das entspricht einer Gesamtaktivität von $55,0 \cdot 10^6$ dpm oder 51% (!) der eingesetzten Aktivität.

Der „Holzrückstand“ wurde nun weiters nach *K. Freudenberg, W. Lautsch* und *K. Engler*¹¹ oxydativ zu Vanillin abgebaut, welches als m-Nitrobenzhydrazon (mNBH) gefällt wurde. Das erhaltene mNBH wurde zur Reinigung mit HgCl₂ gespalten¹², das Vanillin mit Äther extrahiert und erneut gefällt. Die Aktivitätsmessung ergab:

Aktivität in dpm/mg mNBH: 7605

Aktivität in dpm/mMol: $2,496 \cdot 10^6$

Aktivität in dpm/mg Vanillin: 15 760

Aus den gefundenen molaren Aktivitäten lassen sich nun die sogenannten Verdünnungsgrade berechnen¹³. Diese sind als Quotient der molaren Aktivität des eingesetzten Kreosols und der molaren Aktivität der isolierten Abbausubstanz definiert. Sie betragen für Vanilloylacetyl und Vanillin:

Vanilloylacetyl: 975

Vanillin: 98,9

Diese Verdünnungsgrade hängen aber noch wesentlich vom Verhältnis der eingesetzten Gesamtaktivität zur verwendeten Holzmenge ab. Sie stellen daher kein absolutes Maß für den Einbau einer markierten Verbindung in die Pflanze dar. Wohl aber kann man die Verdünnungsgrade verschiedener Abbauprodukte ein und desselben Versuchs miteinander vergleichen. Bildet man den Quotienten

$$\frac{\text{Verdünnungsgrad des Vanilloylacetyls}}{\text{Verdünnungsgrad des Vanillins}} = 9,85,$$

so sieht man, daß das Kreosol nur zu rund einem Zehntel in den äthanolysierbaren Ligninanteil (C₆-C₃-Körper) eingebaut wurde, im Vergleich zu jenem Teil, der durch oxydativen Abbau als Vanillin erfaßt

¹¹ *K. Freudenberg, W. Lautsch* und *K. Engler*, Ber. dtsh. chem. Ges. **73**, 167 (1940); *W. Lautsch*, Cellulosechem. **19**, 69 (1941).

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

¹³ *S. A. Brown* und *A. C. Neish*, Canad. J. Biochem. Physiol. **32**, 170 (1954); **33**, 948 (1955); Nature [London] **175**, 688 (1955).

wird. Zum Vergleich seien die analogen Werte, die bei einer Infusion von markiertem Coniferin-(3-¹⁴C) erhalten wurden, angegeben²:

Verdünnungsgrad des Vanilloylacetyls: 1223

Verdünnungsgrad des Vanillins: 1386

Der Quotient beider beträgt 0,88, liegt also nahe an 1. Der Einbau in den äthanolysierbaren Ligninanteil erfolgte hier in weitaus größerem Umfang als beim Kreosol, was nicht verwunderlich ist, da im Coniferin die C₃-Seitenkette bereits vorgebildet ist.

Sulfitierung und alkalische Hydrolyse

Als weiteres Ligninkriterium⁵ wurde die Sulfitierung zur Ligninsulfosäure und deren anaerobe alkalische Spaltung zu Vanillin und Acetaldehyd herangezogen¹⁴.

20 mg eines Kreosols von $1,67 \cdot 10^6$ dpm/mg wurden zehn zwoijährigen Fichtenästchen wie beschrieben² infundiert. Der Sulfitaufschluß¹⁴ ergab einen „Zellstoff“ mit einer Aktivität von 241 und 205 dpm/mg, während das Holzpulver 688 dpm/mg zeigte. Die anaerobe alkalische Hydrolyse mit 19,65% NaOH (N₂) ergab 0,55% Acetaldehyd und 1,73 und 1,83% an Vanillin (bez. auf Holzeinwaage). Der Acetaldehyd war vollkommen inaktiv, das Vanillin hatte 385 bzw. 365 dpm/mg, somit $5,8 \cdot 10^4$ dpm/mMol.

Diskussion

Man muß daher annehmen, daß das Kreosol zum großen Teil in der Pflanze in einen polymeren, nicht extrahierbaren Körper übergegangen ist, der bei oxydativem Abbau Vanillin liefert. *H. Richtzenhain*¹⁵ konnte zeigen, daß aus Kreosol mit dehydrierenden Fermenten niedermolekulare Stoffe gebildet werden, die bei der Oxydation Vanillin ergeben müßten, z. B. Stilbene etc.

Das wichtigste Resultat ist aber der in geringem Umfang nachgewiesene Aufbau der Seitenkette. *S. A. Brown* und *A. C. Neish*¹⁶ diskutieren in einer ausführlichen Arbeit die Möglichkeit des Aufbaus der C₃-Seitenkette. Es wurden allerdings bisher nur Vanillin bzw. andere aromatische Abbaualdehyde isoliert, so daß die Diskussion zum Aufbau der Seitenkette des Lignins zunächst mehr theoretischen Charakter trägt. In ausgezeichneten Versuchen haben sie bei Shikimisäure den Einbau in Lignin (Vanillinabbau)¹³ festgestellt. Diese Ergebnisse wurden durch die Arbeiten der Gruppe *F. F. Nord* und *W. J. Schubert*¹⁷ durch Lokali-

¹⁴ *K. Kratzl* und *G. Hofbauer*, Mh. Chem. **87**, 617 (1956); **89**, 96 (1958).

¹⁵ *H. Richtzenhain*, Chem. Ber. **82**, 447 (1949).

¹⁶ *D. Wright*, *S. A. Brown* und *A. C. Neish*, Canad. J. Biochem. Physiol. **36**, 1037 (1958).

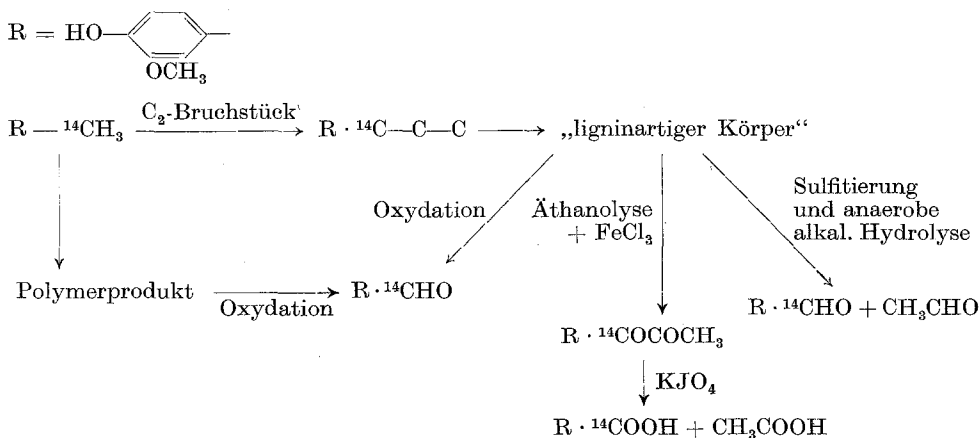
¹⁷ *G. Eberhardt* und *W. J. Schubert*, J. Amer. Chem. Soc. **78**, 2835 (1956).

sierungsreaktionen bestätigt und damit der Übergang des Hydroaromaten in den Aromaten gleicher C-Folge bewiesen. Wird Vanillin und p-Hydroxybenzoesäure¹³ gegeben, so werden diese in begrenztem Maße eingebaut. S. A. Brown und A. C. Neish¹³ schlagen vor, daß es wünschenswert wäre, eine Seitenkettenverlängerung nach der Aromatisierung nachzuweisen. Durch die hier angeführten Versuche ist ein solcher Nachweis gelungen, allerdings nur für einen kleinen Teil des Lignins.

Über den Mechanismus dieser Reaktion kann man bisher nur Vermutungen anstellen. Die Verknüpfung des Kreosols oder seines Oxydationsproduktes mit aktivem Acetat (CoA—S—COCH₃) wäre denkbar. Die Kondensation mit Acetaldehyd^{18, 19}, die direkt zu den *Hibbertschen* Ketolen führen würde, ist wegen des Fehlens von C-Methyl-Gruppen²⁰ im Lignin unwahrscheinlich.

Es sei hier nochmals erwähnt, daß die Zugabe von Kreosol ein unphysiologischer Vorgang ist, der mit der Ligninbildung *in vivo* an sich nicht viel zu tun hat, da Kreosol kein Stoffwechselprodukt ist. Die verholzende Pflanze hat trotzdem in geringem Maße die Fähigkeit, diesen Stoff unter Anknüpfung von zwei C-Atomen in einen ligninartigen Körper zu verwandeln. Diese Tatsache zeigt die Tendenz, auch sehr verschiedene unnatürliche Stoffe in einen „Pool“ überzuführen, um daraus die lebenswichtigen Phenylpropanprecursors und dann das Lignin zu synthetisieren.

Anschließend seien die Ergebnisse der Kreosolinfusion schematisch wiedergegeben.



¹⁸ T. Higuchi, Y. Ito und I. Kawamura, J. Japan Forestry Soc. **37**, 239 (1955); T. Higuchi, IV. Internat. Biochem. Kongr., Wien 1958.

¹⁹ C. Neuberg und J. Hirsch, Biochem. Z. **115**, 282 (1921).

²⁰ W. S. MacGregor, T. H. Evans und H. Hibbert, J. Amer. Chem. Soc. **66**, 41 (1944).

Experimenteller Teil

Die Versuchsmethodik wurde schon wiederholt beschrieben^{3,4}. *Infusion von Kreosol-¹⁴C*: 16 zweijährige Fichtenästchen wurden mit 60,8 mg aktivem Kreosol in 30 ml *Knopscher* Lösung versetzt (24 Stdn.). Frühling 1956, 1957 und 1958.

Holzgewicht nach Entfernung der Nadeln und Frühjahrstriebe 33,1 g. Extraktion je 24 Stdn. mit Aceton, Benzol, Alkohol und H₂O. (Trockengewicht [P₂O₅] 19,04 g Holz). Dieses wurde mit 150 ml 3proz. (absol. alkohol). HCl 48 Stdn. im N₂-Strom unter Rückfluß gekocht. Vom „Holzrückstand“ filtriert, mit 300 ml absol. Alkohol gewaschen, unter N₂ im Vak. auf 100 ml eingengt und mit 900 ml H₂O gefällt (Zentrifugieren des Äthanolignins ist nicht notwendig). Dann 72 Stdn. mit Äther extrahiert, wobei 3029 mg „*crude oil*“ resultieren, welche direkt, ohne Hochvakuumdestillation, der FeCl₃-Oxydation unterworfen wurden. Diese Menge wurde in 200 ml 1proz. äthanol. HCl gelöst, 2,4 g FeCl₃ · 6 H₂O zugesetzt und 4 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach üblicher Aufarbeitung resultieren 1060 mg Öl, welches in 200 ml H₂O gelöst, filtriert und mit 6 g Na-Acetat, 300 mg NiSO₄ und 500 mg NH₂OH · HCl 24 Stdn. am siedenden Wasserbad erhitzt wurde. 311 mg Ni-Salz; aus dem Filtrat fallen nach 24 Stdn. nach Zugabe von NiSO₄ und Hydroxylamin weitere 25 mg. Die Reinigung erfolgte in üblicher Weise durch Spaltung mit 12 n H₂SO₄ und neuerliche Fällung. Messungen siehe Tabelle.

Lokalisationsreaktionen

Inaktives Diketon: 50 mg Diketon wurden in 70 ml Wasser gelöst und hierauf 5 ml 1 n NaHCO₃-Lösung, 5 ml Na-Arsenitlösung (100 g/l) und 400 mg KJO₄ zugesetzt. Die Mischung wurde 1 Stde. bei Zimmertemp. und danach 5 Min. am siedenden Wasserbad stehen gelassen. Es tritt Dunkelfärbung ein. Nun werden weitere 15 ml Arsenitlösung zugesetzt und mit 4 ml verd. H₂SO₄ (1:4) angesäuert. Es wird filtriert und auf ein Volumen von ca. 150 ml gebracht. Hievon werden 100 ml abdestilliert, um die entstandene Essigsäure abzutrennen. Das Destillat wird mit n/10 NaOH schwach alkalisch gemacht und am siedenden Wasserbad eingedunstet, wobei das gebildete Natriumacetat zurückbleibt. Eventuell übergegangene Jodwasserstoffsäure stört die weiteren Reaktionen nicht. Das gebildete Natriumacetat wird in wenig heißem Äthanol gelöst, von ungelösten Anteilen abfiltriert und mit einer alkohol. Lösung von 500 mg p-Bromphenacylbromid versetzt. Der nach dem Eindunsten am Wasserbad hinterbleibende Rückstand wird in 5 ml reinem Äthanol gelöst und bis zur Trübung mit destill. Wasser versetzt. Die Ausbeute an p-Bromphenacyltester beträgt 38—41% (= 25—28 mg). Schmp. 82—84°.

Zur Isolierung der Vanillinsäure wird der obige Destillationsrückstand 24 Stdn. mit Äther extrahiert. Aus dem nach Abdampfen des Äthers hinterbleibenden dunklen Rückstand wird die Vanillinsäure durch Sublimation bei 150—160° unter Normaldruck isoliert. Hierzu wurde der Rückstand in kleine Edelstahlschälchen übergeführt. Die sublimierbaren Anteile werden auf einem darüber gelegten Aluminiumplättchen kondensiert. Die Vanillinsäure sublimiert in schönen Nadeln, die anfänglich meist durch geringe Mengen nicht umgesetzten Diketons schwach gelb gefärbt sind. Die Ausbeuten an Vanillinsäure betragen 20—25% (= 9—11 mg).

Aktives Diketon: 75 mg aktives Nickelsalz (entsprechend 57,5 mg Diketon) wurden mit 30 ml 12 n H_2SO_4 gespalten. Das erhaltene Diketon wurde — wie oben beschrieben — mit 400 mg KJO_4 oxydiert.

Die Ausbeute an Essigsäure-p-bromphenacyl-ester betrug 23,5 mg (= 31%). Die Substanz wurde in Edelstahlschälchen direkt unter dem Geigerzähler gemessen und erwies sich als inaktiv.

Die Vanillinsäure wurde nach der bereits beschriebenen Methode auf Aluminiumplättchen aufsublimiert (ca. 1—2 mg pro Plättchen). Die beiden ersten Plättchen wurden wegen des Gehalts an nicht umgesetztem Diketon verworfen. Vier Plättchen wurden unter dem Geigerzähler gemessen. Die Meßergebnisse sind in Tab. 4 wiedergegeben. Die starke Streuung der Werte ist der angewandten Methodik durchaus entsprechend.

Oxydativer Abbau des Holzrückstandes¹¹:

1 g Holzrückstand wurde in 60 ml 2 n NaOH mit 2,5 g Natrium-m-nitrobenzolsulfonat versetzt und in einem Drehautoklaven 4 Stdn. auf 165° erhitzt. Die erkaltete Lösung wird schwach angesäuert und durch Zusatz von Bicarbonat auf pH 7 eingestellt. Es scheidet sich ein flockiger Niederschlag ab, der jedoch nicht abgetrennt wird. Die wäßrige Lösung wird 24 Stdn. mit Äther extrahiert, die Ätherlösung eingedampft und der Rückstand mehrmals mit heißem Wasser ausgelaugt. Die entstandene Vanillinlösung wird filtriert und in der Hitze mit einer wäßrigen Lösung von 60 mg m-Nitrobenzhydrazid versetzt. Das Hydrazon scheidet sich als gelblichweißer, voluminöser Niederschlag ab. Nach 12stdg. Stehen wird abgesaugt. Ausb.: 43 mg. Das so erhaltene m-Nitrobenzhydrazon wurde zur Reinigung in 2 n NaOH gelöst und durch Zusatz von n $HgCl_2$ -Lösung gespalten¹². Das gebildete Vanillin wurde extrahiert und erneut gefällt. Ausb.: 39 mg Hydrazon.

Sulfiterung und alkalische Hydrolyse:

Auch über diese Versuchsmethodik wurde schon berichtet¹⁴. 20 mg Kreosol ($1,67 \cdot 10^6$ dpm/mg) wurden zehn zweijährigen Fichtenästchen wie oben verabreicht. Die Extraktion war analog. Es resultierten 19,1 g Holzpulver.

Für zwei Parallelbestimmungen (A und B) wurden nun je 3,5 g Holzpulver mit 2,8 g NaOH in 200 ml H_2O versetzt, 10 g SO_2 eingeleitet und in einem Bombenrohr eingeschlossen. Das Rohr wurde 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 die dunkelbraune Lösung vom Zellstoff abfiltriert:

A: 1,705 g Zellstoff (241 dpm/mg)

B: 1,780 g Zellstoff (205 dpm/mg)

Die Aldehydausbeuten: Das Filtrat vom Zellstoff wurde vom SO_2 -Überschuß befreit, wie üblich bei 140° C Badtemp. mit 19,65proz. NaOH anaerob alkalisch 8 Stdn. hydrolysiert und dann aufgearbeitet:

	A	B
	mg	mg
Ausbeuten an Acetaldehyd-2,4-DNPH ..	91,2	98,0
= mg Acetaldehyd	17,9	19,3
= % der Holzeinwaage	0,51	0,55
Ausbeuten an Vanillin-mNBH	125,5	132,6
= mg Vanillin	60,6	64,0
= % der Holzeinwaage	1,73	1,83

Messung der Radioaktivität der Aldehyde:

Das Acetaldehyd-2,4-DNPH war nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthanol völlig inaktiv.

Das Vanillin-mNBH wurde durch Spalten des Hydrazons mit HgCl₂ in alkalischer Lösung¹² und erneutes Fällen gereinigt.

Holzeinwaage A:		Holzeinwaage B:	
Vanillin-mNBH	dpm/mg	Vanillin-mNBH	dpm/mg
1mal gespalten	245	1mal gespalten	206
2mal gespalten a	184	2mal gespalten a	176
2mal gespalten b	188	2mal gespalten b	173
Vanillin	385	Vanillin	363

Der Österreichischen Gesellschaft für Holzforschung danken wir für die großzügige Unterstützung, die sie dieser Arbeit angedeihen ließ.