

Zur quantitativen Bestimmung der monomeren Äthanolysenprodukte aus dem Lignin monocotyler und dicotyler Angiospermen*

Von

K. Kratzl und **P. Claus**

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 14. Dezember 1961)

Es wird eine Methode beschrieben, um die durch Äthanolyse des Holzes bzw. von Lignin und FeCl_3 -Oxydation erhältlichen Aryldiketone möglichst quantitativ zu bestimmen. Dies wird durch Fällung der entsprechenden Dioxime als Nickelsalze, Rückgewinnung der Diketone durch saure Spaltung und Ausmessung ihrer Extinktionsmaxima im ultravioletten Licht erreicht. Die Fehlerquellen, insbesondere die unterschiedliche Empfindlichkeit der Diketone, werden diskutiert. Auf diesem Weg wurde auch erstmalig p-Hydroxybenzoylacetyl unter den durch Äthanolyse aus monocotylen Angiospermen gewonnenen Monomeren nachgewiesen. Eine weitere Anwendung ist die Untersuchung verschieden stark verrotteter Strohproben. Die überraschende biologische Stabilität der äthanolysierbaren Ligninanteile, selbst bei starker Verrottung, soll hervorgehoben werden. Da für den Abbau von Lignin durch Äthanolyse zu Monomeren eine Guajacylglycerin- β -Aryläthervernetzung verantwortlich sein dürfte (*Adler*), wurde auch eine zweite, von uns gefundene, ebenfalls auf das Vorhandensein solcher Strukturen im natürlichen Lignin zurückführbare Abbaureaktion (Sulfitierung und anaerobe alkalische Hydrolyse, Isolierung der entstandenen aromatischen Hydroxyaldehyde und flüchtigen Aldehyde) zum Vergleich herangezogen. Mit beiden Methoden konnte gezeigt werden, daß jedenfalls im Lignin monocotyler und dicotyler Angiospermen wesentlich mehr Guajacylbausteine im Vergleich zu den Syringylbausteinen in äthanolysierbarer Form vorhanden sind, als auf Grund der Ergebnisse der alkalischen Nitrobenzoloxydation angenommen werden könnte.

* Herrn Prof. Dr. O. Kratky zum 60. Geburtstag gewidmet.

Die Schwierigkeit, Lignin namentlich für biologische Versuche zu definieren, führte uns zur Aufstellung sogenannter Ligninkriterien¹, wobei es wünschenswert ist, alle bisher bekannten Reaktionen, die zu definierten Spaltprodukten des Lignins führen, möglichst exakt zu verfolgen. Eine für die Charakterisierung des Lignins wesentliche Reaktion ist die von *H. Hibbert*² aufgefundene Äthanolyse des Lignins, die von uns 1954 erstmals als Ligninkriterium herangezogen wurde^{1,3}.

Es wurde eine Mikrovariante ausgearbeitet und die monomeren Äthanolysenprodukte, die sogenannten „*Hibbert*schen Körper“, papierchromatographisch getrennt. Es handelt sich bei diesen Produkten um folgende Verbindungstypen:



R ist bei den Gymnospermen der Guajacylrest (3-Methoxy-4-hydroxyphenyl, Ia–f), bei dicotylen Angiospermen sowohl der Guajacylrest als auch der Syringylrest (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyphenyl, IIa–f); bei monocotylen Angiospermen wurden bisher unter den bei der Äthanolyse entstandenen Produkten noch keine monomeren „*Hibbert*schen Körper“ mit der auf Grund der Auffindung von p-Hydroxybenzaldehyd nach alkalischer Nitrobenzolyoxydation zu erwartenden Gruppierung $R = p$ -Hydroxyphenyl (IIIa–e) neben den Guajacyl- und Syringylverbindungen aufgefunden, wohl aber p-Hydroxybenzaldehyd (III f).

Wir untersuchten mittels Äthanolyse verschiedene ligninhaltige und ligninähnliche Stoffe³, darunter erstmalig das Endprodukt (DHP) und die Zwischenprodukte der biologischen Dehydrierung von Coniferylalkohol¹ sowie zahlreiche radioaktiv markierte Lignine^{1,3}. Ebenso wurde ein DHP, das aus p-Hydroxyzimtalkohol erhalten wurde, der Äthanolyse unterworfen, wobei IIIa sowie IIIc unter den Produkten nachgewiesen werden konnten. Damit wurde die prinzipielle Äthanolysierbarkeit auch der ligninähnlichen Strukturen bewiesen, welche die für monocotyle Angiospermen charakteristische p-Hydroxyphenylgruppierung enthalten; für den Naturstoff Lignin konnte dies allerdings noch nicht bestätigt werden.

Die Schwierigkeit bei der Untersuchung der Äthanolysenprodukte besteht darin, daß, während beim äthanolytischen Abbau von Gymnospermen-ligninen sechs Hauptprodukte aufgefunden werden, bei dem von dicotylen Angiospermen 12 und bei dem von monocotylen Angiospermen 18 Hauptprodukte zu erwarten sind. Schon die Auftrennung der Abbauprodukte aus einem Lignin dicotyler Angiospermen stieß auf Schwierigkeiten³. Aus diesem Grund war auch bei markierten Ligninen zur quantitativen Auswertung bereits eine Beschränkung auf einen Verbindungs-

¹ K. Kratzl, Holz als Roh- und Werkstoff **19**, 219 (1961).

² M. J. Hunter, A. B. Cramer und H. Hibbert, J. Amer. Chem. Soc. **61**, 516 (1939); s. a. F. E. Brauns und D. A. Brauns, The Chemistry of Lignin, Suppl. Volume, New York and London 1960, S. 440, 459.

³ K. Kratzl und W. Schweers, Mh. Chem. **85**, 1046 (1954); **85**, 1166 (1954); Chem. Ber. **89**, 186 (1954).

typ, nämlich auf die Diketone (Ib, IIb) nötig, welche durch Ferrichlorid-oxydation angereichert wurden⁴. Die später ausgearbeitete Methode der Dünnschichtchromatographie erleichterte die Trennung und Anreicherung der Diketone, die so als isotopenkonstante Abbauprodukte erhalten werden konnten⁵.

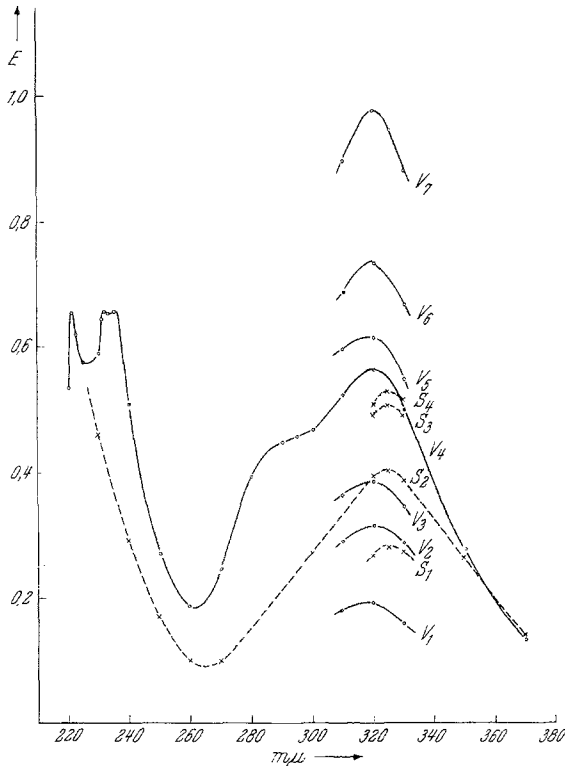


Abb. 1. UV-Spektren von Vanilloylacetyl (Ib) und Syringoylacetyl (IIb) in äthanolischen Lösungen verschiedener Konzentration (in γ/ml)

Ib: V_1	3,83	IIb: S_1	6,30
V_2	6,53	S_2	9,45
V_3	7,65	S_3	11,34
V_4	11,48	S_4	12,60
V_5	13,06		
V_6	15,30		
V_7	19,13		

Es war nun naheliegend, die Mengen der durch Äthanolyse erhaltenen, durch Ferrichloridoxydation angereicherten Diketone mittels Auswertung ihrer Absorptionsmaxima im UV-Spektrum quantitativ zu messen, um

⁴ K. Kratzl, G. Billek, E. Klein und K. Buchtela, Mh. Chem. **88**, 721 (1957); K. Kratzl und E. Klein, Mh. Chem. **86**, 847 (1955); K. Kratzl, G. Billek, A. Graf, G. Hofbauer, K. Buchtela und E. Klein, Angew. Chem. **68**, 384 (1956).

⁵ K. Kratzl und G. Puschmann, Holzforsch. **14**, 77 (1960).

bei Ligninen verschiedener Herkunft bessere Kriterien zu erhalten, aber auch, um biologische Prozesse (z. B. den biologischen Abbau von Holz bzw. Lignin durch Verrottung und eventuelle Veränderungen an den Substituenten des aromatischen Kerns beim biologischen Aufbau) besser studieren zu können¹.

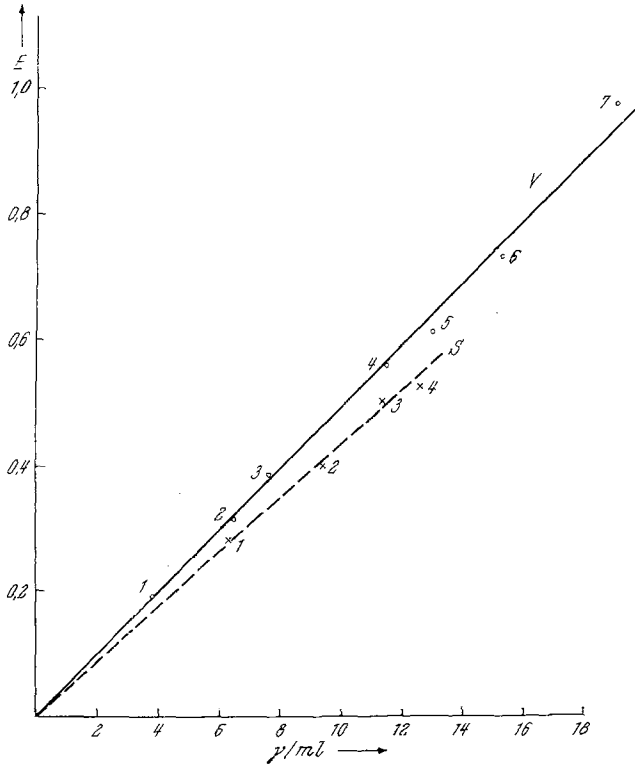


Abb. 2. Eichgerade zur quantitativen Bestimmung von Vanilloyl- und Syringoylacetyl mittels UV-Spektren. (Abhängigkeit der Extinktion bei 320 bzw. 325 m μ von der Konzentration).

Inzwischen war eine Arbeit von *O. Töppel*⁶ erschienen, die sich mit der quantitativen Bestimmung der „Hibbertschen Körper“ aus Fichtenholz befaßt und ihre papierchromatographische Trennung sowie spektrometrische Auswertung empfiehlt. Diese an sich genaue und exakte Methode ist jedoch bei komplizierten Gemischen vieler Bausteine wegen der gerade in den Chromatogrammen von Angiospermen-Äthanolysenölen auftretenden Überlagerungen der vielfältigen Flecken praktisch nicht anwendbar. Wir haben deshalb die Oxydation zu den Diketonen beibehalten und diese quantitativ getrennt und bestimmt.

⁶ *O. Töppel*, *Holzforsch.* **14**, 139 (1960).

Da in letzter Zeit die Diskussion über das Verhältnis des Guajacyl- zum Syringyl- bzw. zum p-Hydroxyphenyl-baustein lebhaft geworden ist⁷, glauben wir, dazu — zumindest was den äthanolysierbaren Ligninanteil betrifft — mit dieser quantitativen Auswertung einen Beitrag leisten zu können.

Die Methode: Die Diketone wurden in üblicher Weise^{3,4} durch Äthanolyse und Ferrichloridoxydation erhalten. Allerdings sind die „Hibbertschen Körper“ ziemlich empfindlich, worauf auch O. Töppel⁶ hinweist. Der absolute analytische Wert scheint auch durch die unterschiedliche Empfindlichkeit gegen Ferrichloridoxydation beeinflusst zu sein, jedoch kann durch vorsichtiges Arbeiten und genaues Einhalten der einmal gewählten Bedingungen (s. exper. Teil) eine gewisse Reproduzierbarkeit der Werte erreicht werden. Im besonderen stellen die Werte für die Syringylkomponente entsprechend der größeren Empfindlichkeit der Syringylgruppierung gegenüber Ferrichloridoxydation nur untere Grenzwerte dar.

Die UV-Spektren des Vanilloyl- (Ib) und des Syringoylacetyls (IIb), aufgenommen in äthanolischer Lösung, zeigen charakteristische Maxima bei 320 bzw. 325 m μ . Die Extinktionen beider Substanzen bei diesen Maxima folgen im gewünschten Konzentrationsbereich (3—20 γ /ml) gut dem Lambert-Beerschen Gesetz.

Anwendung auf monocotyle und dicotyle Angiospermen

Zunächst wurde Edelkastanienholz mit einem bekannten Verhältnis der bei alkalischer Nitrobenzoloxydation erhaltenen Abbaualdehyde⁸ (Vanillin zu Syringaaldehyd = 1:3) der Äthanolyse unterworfen, ferner als Vertreter der monocotylen Angiospermen in gleicher Weise zwei Strohsorten (Roggenstroh I und II). Die Versuchsergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Auffällig ist hierbei, daß sich bei der Äthanolyse von Kastanienholz das Verhältnis der Guajacyl- zu den Syringylbausteinen zu etwa 1:1 ergab. Wenn auch mit einem Verlust speziell von Syringylbausteinen während der Aufarbeitung gerechnet werden muß, so ist doch das nach alkalischer Nitrobenzoloxydation erhaltene Verhältnis von Vanillin zu Syringaaldehyd (1:3) für die Guajacyl- und Syringylbausteine im äthanolysierbaren Ligninanteil keineswegs anzunehmen. Dies steht in gewisser Übereinstimmung mit den in neuester Zeit namentlich von K. Freudenberg⁷ angenommenen Werten, der zu dem Schluß kommt, daß das natür-

⁷ K. Freudenberg und G. Singh Sidhu, *Holzforsch.* **15**, 33 (1961); K. Freudenberg und Chen-Loung-Chen, *Chem. Ber.* **93**, 2533 (1960); K. Freudenberg, *Holz als Roh- und Werkstoff* **18**, 282 (1960).

⁸ K. Kratzl, K. Buchtela, J. Gratzl, J. Zauner und O. Ettingshausen, *Tappi* (im Druck).

liche Angiospermenlignin (Buchenlignin) etwa 48% Guajacyl- und 44% Syringylkomponente enthält (der Rest soll die p-Hydroxyphenylgruppierung aufweisen), also jedenfalls einen wesentlich höheren Prozentsatz an Guajacylbausteinen fordert, als bisher angenommen wird. Die Übereinstimmung mit unseren aus der Äthanolyse gewonnenen Werten scheint eher Zufall als in der Äthanolysierbarkeit der beiden Bauelemente begründet zu sein. Allerdings müßte eine Vernetzung bzw. die Vernetzungsbereitschaft der Guajacylbausteine in der Stellung 5 des aromatischen

Tabelle 1

	Äthanolysen- rückstand*	Äthanolysen- rohöl*	Nickelsalz*	Vanilloylacetyl: Syringoylacetyl**
Edelkastanie	46,3	10,6	1,90	1,04 : 1 1,04 : 1
Roggenstroh I	47,5	11,0	1,20	1,60 : 1 1,66 : 1
Roggenstroh II *** . . .	46,0	8,8	2,65	1,58 : 1 1,60 : 1

* Angaben in % der eingesetzten Menge an Holz- bzw. Strohmehl.

** Das erhaltene Diketongemisch wurde jeweils zweimal chromatographisch getrennt und spektrometrisch gemessen.

*** Dieses Stroh wurde für die später beschriebenen Versuche mit verrotteten Strohproben verwendet.

Kerns, die als Ursache für die verhältnismäßig geringe Ausbeute an Vanillin gegenüber der an Syringaaldehyd beim oxydativen Abbau von Angiospermenlignin angeführt werden, die Äthanolysierbarkeit zu *Hibbert*-schen Monomeren der Gruppe I eher einschränken. Über die Äthanolysierbarkeit der dem Guajacylglycerin bzw. dessen β -Aryläther entsprechenden Syringylglycerinmodelle ist noch nichts bekannt, dagegen werden in biosynthetischen Ligninen mit Syringylkomponenten zu Monomeren der Gruppe II äthanolysierbare Anteile aufgefunden, wie die mit *K. Buchtela* durchgeführte Äthanolyse eines Misch-DHP von Coniferylalkohol und Sinapinalkohol-3- ^{14}C bewies⁹.

Bemerkenswert ist, daß bei dieser Mischpolymerisation bei einem Ausgangsmischverhältnis von 66,7% Coniferylalkohol und 33,3% Sinapinalkohol aus der spezifischen Aktivität des Misch-DHP eine Bildung aus 62,5% Coniferyl- und 37,5% Sinapinkomponente errechnet werden konnte. Es waren dabei 80% des Coniferyl- und 66% des Sinapinalkohols einpolymerisiert worden. *K. Freudenberg* fand, daß bei einer Mischpolymerisation von Coniferyl- und Sinapinalkohol selbst bei einem Angebot eines Überschusses an Sinapinalkohol das Verhältnis von einkondensiertem Coniferylalkohol zur Sinapinkomponente den Wert 1 nicht erreichte⁷. Die Äthanolyse des von uns hergestellten Mischpolymerisats ergab ein Diketon IIb, welches annähernd die

⁹ *K. Kratzl und K. Buchtela*, Mh. Chem. **90**, 1 (1959).

gleiche spezifische molare Aktivität wie das Ausgangsprodukt zeigte. Der Sinapinalkohol wird also in das Misch-DHP in Form von äthanolysierbaren Strukturen eingebaut, wobei keine Tendenz gefunden werden konnte, die Sinapinkomponente bevorzugt einzubauen.

Vergleich der Äthanolyse mit dem Abbau durch Sulfitierung und anaerobe alkalische Hydrolyse

Wie unsere neuesten Versuche zeigten¹⁰, kann man für das Auftreten der sogenannten Vanillin-Acetaldehyd-Spaltung bei anaerober alkalischer Hydrolyse der Ligninsulfosäure gleichfalls eine β -Arylverknüpfung von Guajacylglycerinstrukturen als verantwortlich annehmen. Es kann also auch diese Abbaureaktion als Ligninkriterium herangezogen werden. Deshalb wurden einige Vertreter von monocotylen und dicotylen Angiospermen auch der Sulfitierung und Hydrolyse unterworfen (Buchenholz, Roggenstroh und Bambus). Der Sulfitaufschluß geht bei monocotylen Angiospermen bekanntlich schwer und erfolgt wie üblich¹¹, ebenso die Normhydrolyse mit Alkali¹¹. Die papierchromatographische Trennung und die UV-spektrometrische Bestimmung erfolgte nach *J. E. Stone* und *M. J. Blundell*¹². Bei dem näher untersuchten Buchenholz, das beim oxydativen Abbau mit Nitrobenzol das Verhältnis Vanillin zu Syringaaldehyd zu 1:3 ergab, wurden bei obigem Verfahren die beiden Aldehyde im Verhältnis 1:1 gefunden; es ergab sich also gegenüber den Ergebnissen der Nitrobenzoloxydation ein deutliches Mehr an Guajacylkomponente — ähnlich wie bei der Äthanolyse des Kastanienholzes. Sowohl unter den Abbaualdehyden aus Stroh als auch unter den aus Bambus wurden beträchtliche Mengen an *p*-Hydroxybenzaldehyd gefunden. Im Falle von Bambus betrug das Verhältnis von Vanillin zu Syringaaldehyd zu *p*-Hydroxybenzaldehyd 1,64:1:0,62. Jedenfalls zeigen auch diese wenigen Versuche, daß bei einer ganz anderen Reaktion, die sich allerdings aus demselben Strukturprinzip erklären läßt, die Prozentsätze von Vanillin und Syringaaldehyd nicht mit den Verhältnissen beim oxydativen Abbau, sondern eher mit den bei der Äthanolyse für die entsprechenden C_6 — C_3 -Verbindungen erhaltenen übereinstimmen. Diese Auffindung von *p*-Hydroxybenzaldehyd unter den nach Sulfitierung und Hydrolyse erhaltenen Spaltprodukten ließ uns vermuten, daß bei den monocotylen Angiospermen eine *p*-Hydroxyphenylglycerinruppierung (bzw. deren β -Aryläther) vorhanden sein müßte. Dies müßte dann auch die Isolierung

¹⁰ *K. Kratzl, W. Kisser, J. Gratzl* und *H. Silbernagel*, *Mh. Chem.* **90**, 771 (1959); *K. Kratzl*, *Paper och trä* **11**, 643 (1961).

¹¹ *K. Kratzl* und *G. Hofbauer*, *Mh. Chem.* **87**, 617 (1956); **89**, 96 (1958).

¹² *J. E. Stone* und *M. J. Blundell*, *Analyt. Chem.* **23**, 771 (1951); *H. W. Lemon*, *Analyt. Chem.* **19**, 846 (1947).

der „Hibbertschen Körper“ IIIa—f bzw. nach Ferrichloridoxydation des Diketons IIIb ermöglichen.

Nachweis von p-Hydroxybenzoylacetyl (IIIb) nach Äthanolyse von Ligninen monocotyler Angiospermen

Zunächst wurde festgestellt, daß das zu erwartende Hauptäthanolysenprodukt der Gruppe III, nämlich IIIa, bei der Ferrichloridoxydation

zumindest teilweise in das Diketon IIIb übergehen kann. Die Ausbeuten sind dabei allerdings ziemlich gering.

In den Chromatogrammen von destilliertem, aus Roggenstroh bzw. Bambus gewonnenem Äthanolysenöl war bereits vor der Ferrichloridoxydation neben den Hauptflecken ein sehr schwacher Fleck gefunden worden, der nach seinem R_F -Wert (0,11) dem Diketon IIIb entsprach. Die übliche Aufarbeitung ergab 26,5 mg hochvakuumdestilliertes Diketongemisch, das auf vier breiten Chromatogrammbögen getrennt wurde. Das p-Hydroxybenzoylacetyl wurde eluiert, zur Reinigung nochmals chromatographiert und im UV vermessen.

Eine mengenmäßige Abschätzung weist auf ca. 1% p-Hydroxybenzoylacetyl im Diketongemisch hin. Für

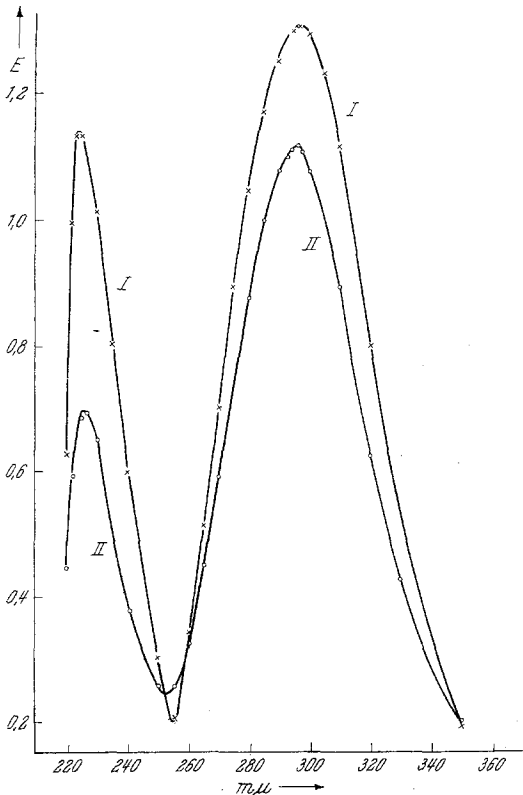


Abb. 3. UV-Spektrum von p-Hydroxybenzoylacetyl (IIIb)
I analytisch aus Roggenstroh gewonnenes IIIb
II synthetisch gewonnenes IIIb

eine solche Abschätzung war wie bei den beiden anderen Diketonen nur das langwellige Maximum brauchbar.

Damit ist dieser Baustein als Äthanolysenabbauprodukt gegenüber den anderen von geringer Bedeutung; seine Auffindung weist aber darauf hin, daß auch im Lignin monocotyler Angiospermen äthanolysierbare Grundstrukturen vom Typ des p-Hydroxyphenylglycerins bzw. dessen β -Aryläthers vorhanden sein dürften.

Anwendung zur Untersuchung biologischer Abbauprodukte
des Lignins

Der β -Coniferyläther des Guajacylglycerins spielt bei der Biosynthese des Lignins eine große Rolle (*Freudenbergs* Zwischenprodukt III) und ist als einziges unter den Zwischenprodukten der biologischen Dehydrierung von Coniferylalkohol zu den „*Hibbertschen* Körpern“ äthanolysierbar. Nach unbestätigten Untersuchungen von *T. Fukuzumi*¹³ soll er unter den biologischen Abbauprodukten des Lignins aufgefunden werden können. Wir untersuchten nun einige verrottete Strohproben in bezug auf ihre Äthanolysierbarkeit, nicht nur, um über die Beständigkeit der äthanolysierbaren Strukturelemente bei Verrottung, sondern um auch über die Verteilung von Syringyl- und Guajacylbausteinen während der Verrottung Aussagen machen zu können.

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. *H. Flaig** wurden Roggenstrohproben verschiedenen Verrottungsgrades zur Untersuchung herangezogen. Das Stroh war in einer stickstoffhaltigen Nährlösung, der noch eine Bodensuspension zugefügt worden war, der Verrottung unterworfen worden. Herr Prof. *Flaig* fand für die von uns untersuchten Proben die in Tab. 2 zusammengestellten analytischen Daten¹⁴.

Tabelle 2

Strohproben *	S-Lignin **	OCH ₃	Organ. N **
A Roggenstroh II	18,78	3,42 **	0,32
B 70 Tage, ohne N	20,84	94,8 ***	0,29
C 120 Tage, 1% N	42,2	58,6 ***	2,43
D 180 Tage, 1% N	49,3	57,5 ***	2,77
E 240 Tage, 1% N	51,2	51,6 ***	3,07
F S-Lignin von E	—	9,93 †	1,88 †

* Es wird die Verrottungsdauer angegeben; N bedeutet Zusatz von Stickstoff zur Nährlösung in Form von NH₄NO₃. 1% N bedeutet Zusatz von 1% Stickstoff in Form von NH₄NO₃, bezogen auf Strohtrockensubstanz.

** In Prozent, bezogen auf organische Substanz.

*** In Prozent, bezogen auf ursprüngliches Methoxyl der Strohtrockensubstanz vor der Verrottung.

† In Prozent, bezogen auf aschefreies Schwefelsäurelignin.

Unsere Ergebnisse der Äthanolyse finden sich in Tab. 3.

Auch diese Resultate zeigen, daß, was den äthanolysierbaren Ligninanteil betrifft, immer relativ mehr Guajacylkomponenten gefunden wer-

¹³ *T. Fukuzumi*, Bull. Agr. Chem. Soc. Japan **24**, 728 (1960).

¹⁴ *W. Flaig*, *U. Schobinger* und *H. Deuel*, Chem. Ber. **92**, 1973 (1959); Dissertation *H. Maeder*, Univ. Gießen (1960).

* Herrn Prof. Dr. *H. Flaig*, Institut für Biochemie des Bodens, Braunschweig-Völkenrode, danken wir für die großzügige Überlassung der Proben und Analysenresultate.

Tabelle 3

Strohprobe *	Äthanolysen- rückstand **	Äthanolysen- rohöl **	Nickelsalz **	Vanilloylacetyl : Syringoylacetyl ***
A Roggenstroh II . . .	46,0	8,8	2,65	1,58 : 1 1,60 : 1
B 70 Tage, ohne N . . .	51,0	9,4	2,32	1,80 : 1 1,76 : 1
C 120 Tage, 1% N . . .	51,1	8,8	1,40	1,72 : 1 1,78 : 1
D 180 Tage, 1% N . . .	55,9	6,05	0,70	2,25 : 1 2,14 : 1
E 240 Tage, 1% N . . .	53,3	6,31	0,45	2,55 : 1 2,88 : 1
F S—Lignin von E . .	90,8	2,13	0,20	0,83 : 1 0,90 : 1

* Erklärung siehe Tab. 2.

** Angaben in % des eingesetzten Strohmehl.

*** Das erhaltene Diketongemisch wurde jeweils zweimal chromatographisch getrennt und spektrometrisch gemessen.

den, als bisher aus den Ergebnissen der alkalischen Nitrobenzoxoydation hervorging. Das Verhältnis dieser Guajacyl- und Syringylkomponenten ändert sich bei fortschreitender Verrottung. Die Gesamt-Äthanolysierbarkeit nimmt deutlich ab. Immerhin ist sie auch noch nach 240 Tagen Verrottungszeit zu einem beträchtlichen Teil erhalten, und sogar das aus der am längsten der Verrottung ausgesetzten Strohprobe isolierte Schwefelsäurelignin ist zwar wenig, aber doch noch äthanolysierbar. Die chemisch, namentlich gegen hydrolytische Eingriffe ziemlich labile Guajacylglycerin- β -Arylätherverknüpfung¹⁰ zeigt also eine überraschende biologische Stabilität, wenn man bedenkt, daß das Stroh im Laufe der Verrottung sehr starken Umwandlungen unterworfen ist (Holocellulose wurde zu etwa 95%, α -Cellulose nahezu vollständig, Lignin etwa zur Hälfte abgebaut; es scheinen auch bereits Entmethylierungen aufzutreten).

Experimenteller Teil

Normäthanolyse: 2 g feingemahlene Holzmehl werden mit 15 ml 3proz. absol.-alkohol. HCl 48 Stdn. bei 90—100° im Bombenrohr geschüttelt. Der Rückstand wird abfiltriert, mit 25 ml absol. Alkohol gewaschen, die äthanol. Lösung im Vak. auf etwa 10 ml eingeeengt, in 80 ml Wasser gegossen, filtriert, der Niederschlag nochmals in 10 ml absol. Alkohol gelöst, neuerlich mit 80 ml Wasser gefällt und abfiltriert. Die vereinigten Filtrate werden 24 Stdn. mit Äther extrahiert; nach dem Trocknen der Ätherlösung mit Na₂SO₄ wird der Äther im Vak. abgedampft und der ölige Rückstand im Vakuumexsikkator für die Wägung getrocknet. Das Öl wird in 10 ml Alkohol gelöst, 100 mg FeCl₃ · 6 H₂O zugefügt und 4 Stdn. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten werden 20 ml Wasser zugefügt, fast zum Sieden erhitzt, mit NH₃

gefällt und noch heiß filtriert und mit 20 ml Wasser gewaschen. Das Filtrat wird mit verd. H_2SO_4 auf $\text{pH} = 1$ gebracht und mit Äther 24 Stdn. extrahiert. Nach dem Trocknen der Ätherlösung und Abdampfen des Äthers im Vak. wird das oxydierte Öl mit 15 ml heißem Wasser portionenweise ausgezogen. Unlösliche Anteile werden jeweils durch einen Wattebausch filtriert; sie geben wohl noch mit weiterem heißem Wasser gelbbraune Lösungen, aus denen jedoch kein Nickelsalz der Diketoxime fällbar ist. Die wäßrige Lösung wird mit 0,5 g Natriumacetat und 50 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und 50 mg $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ versetzt und in N_2 -Atmosphäre 24 Stdn. am siedenden Wasserbad erhitzt, das gefällte Nickelsalz über CaCl_2 getrocknet und durch Erhitzen mit (je nach der Menge des erhaltenen Nickelsalzes) 15—20 ml 10proz. H_2SO_4 am siedenden Wasserbad und N_2 gespalten. Nach 24stdg. Ätherextraktion, Trocknung der Ätherlösung und Abdampfen des Äthers im Vak. werden die Diketone in 0,5 ml Alkohol aufgenommen, papierchromatographisch durch Entwicklung mit der oberen Phase eines Gemisches von Wasser—Benzin—Chloroform—Methanol (5:7:2:1) auf Schleicher & Schüll 2043b³ getrennt, die Flecken als an einer Breitseite zu einer Spitze auslaufende Rechtecke ausgeschnitten, die Substanz aufsteigend mit Äthanol in die Spitze getrieben und durch Auftropfen von Äthanol aus einer Kapillare, wobei die die Substanz enthaltende Spitze nach unten hängt, mit 5 ml Äthanol eluiert. Die Extinktionen der erhaltenen Lösungen werden mit dem Beckman-Spektrometer gemessen.

Normsulfiterung und anaerobe alkalische Hydrolyse: 1 g Holzmehl, 1,4 g NaOH und 5 g SO_2 in 100 ml Wasser werden im Bombenrohr 24 Stdn. bei Zimmertemp. stehen gelassen, dann langsam auf ca. 130° erhitzt und 24 Stdn. bei dieser Temp. geschüttelt. Der Rückstand wird filtriert, mit 20 ml Wasser gewaschen, das Filtrat durch Erhitzen auf 80° und Durchleiten von N_2 vom SO_2 befreit. Dann werden 25 g NaOH zugefügt und die Lösung im Stickstoffstrom erhitzt (Badtemp. 140°); dabei werden die flüchtigen Aldehyde in einer 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung aufgefangen. Nach Beendigung der Spaltung wird mit HCl gerade angesäuert, bicarbonatalkalisch gemacht und mit Äther 24 Std. extrahiert. Die gewonnenen Aldehyde werden nach *J. E. Stone* und *M. J. Blundell*¹² mit der oberen Phase eines Gemisches Petroläther—n-Butyläther—Wasser (6:1:1) auf Schleicher & Schüll 2043b papierchromatographisch entwickelt und wie oben eluiert. Das Eluat wurde nach *H. W. Lemon*¹² mit 2 ml 0,2proz. äthanol. KOH versetzt und mit Äthanol auf 25 ml aufgefüllt; die Extinktion dieser Lösung wird im Beckman-Spektrometer gemessen.

Herrn Prof. Dr. *H. Flaig* danken wir bestens für die freundliche Zusammenarbeit, der Österreichischen Gesellschaft für Holzforschung sind wir für die Bereitstellung von Mitteln zu Dank verpflichtet.

Der Österreichischen Akademie der Wissenschaften danken wir für die Subventionierung aus den Mitteln der *Seegen*-Stiftung.