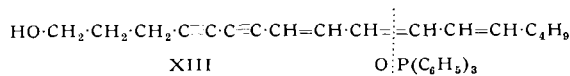
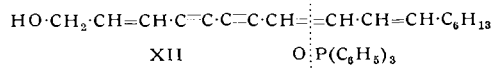
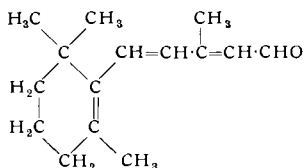


gewonnen wurden. So haben *F. Bohlmann* und *H.-G. Viehe*<sup>21)</sup> das Oenanthetol (XII) und Cicutol (XIII) dargestellt, deren Aufbau aus den folgenden schematisierten Formulierungen zu erkennen ist:

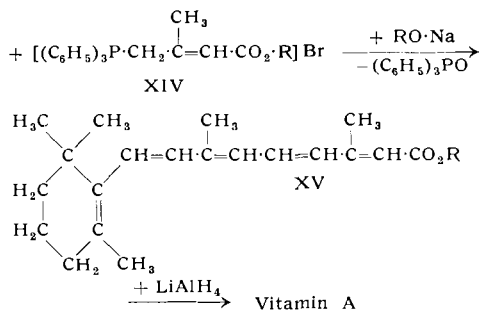


Über einen neuen Weg zum Vitamin A unterrichtet die folgende Reaktionsreihe<sup>22)</sup>:



<sup>21)</sup> Chem. Ber. 88, 1245, 1347 [1955].

<sup>22)</sup> DPB.-Anm. B. 32741 IVb/120 vom 25. Sept. 1954 der BASF-Ludwigshafen (Erfinder: G. Wittig u. H. Pommer).



γ-Brom-methyl-crotonsäureester wurde mit Triphenylphosphin zum Phosphonium-Salz XIV vereinigt, das bei seiner Umsetzung mit β-Jonyliden-acetaldehyd in Gegenwart von Natrium-alkoholat VitaminA-säureester XV lieferte. Das neue Verfahren ist einfacher als die bislang bekannten und führt in zufriedenstellender Ausbeute zum Endprodukt.

Wie hier dargelegt, dürfte die neue Methodik auf der Basis der Phosphin-alkylene, die uns nach mehrjähriger Forschung auf dem Gebiet der organischen Anionochemie zugefallen ist, in ihrer vielseitigen Anwendbarkeit die präparative Chemie bereichern.

Eingegangen am 9. Mai 1956

[A 734]

## Beiträge zur Erforschung des Lignins

Von Prof. Dr. K. FREUDENBERG, Heidelberg

Aus dem Chemischen Institut der Universität und dem Institut für die Chemie des Holzes und der Polysaccharide, Heidelberg\*)

Künstliche und natürliche Lignin-Präparate werden verglichen. Die Enzyme des Holzes erzeugen aus Coniferylalkohol dieselben Umwandlungsprodukte wie das Pilzenzym. Das 5-Carboxyl der Isohemipinsäure entstammt dem mittelständigen C-Atom des Coniferylalkohols.

Die Biosynthese eines Lignin-Präparates (künstliches Lignin), das dem natürlichen Lignin außerordentlich ähnlich ist, gelingt, wenn man die Oxydoreductase des Speisenchampignons auf Coniferylalkohol einwirken läßt. In ähnlicher Weise haben bereits 1908 *H. Cousin* und *H. Hérissay* das Enzym aus *Russula delica* auf Eugenol, Isoeugenol und andere Phenole einwirken lassen. Sie haben dabei Dimere und höhermolekulare Dehydrierungsprodukte dieser Phenole erhalten. Es ist selbstverständlich, daß Lignin nur aus solchen Substraten aufgebaut werden kann, die im Gewebe bei der Verholzung vorhanden sind. Die Dehydrierung des Eugenols, die unlängst von *S. M. Siegel*<sup>1)</sup> erneut bearbeitet worden ist, hat Interesse als Modellreaktion für die Lignin-Bildung, steht aber im übrigen nicht mit dem Lignin im Zusammenhang, weil Eugenol oder sein Glucosid im Bereich des Cambiums nicht angetroffen wird.

### 1. Das Enzympräparat

Das Enzympräparat aus Champignon<sup>2)</sup> wurde nur so weit angereichert, als es für unsere Zwecke nötig ist<sup>3)</sup>. Der kalt gewonnene wäßrige Preßsaft wird mit soviel Methanol versetzt, daß auf 70 Vol. der wäßrigen Lösung 30 Vol. Methanol kommen. Diese und die folgenden Operationen

werden bei 2–4 °C ausgeführt. Nach Entfernung des Niederschlags, der unwirksam ist, wird mit weiteren 133 Vol. Methanol versetzt, so daß jetzt auf 30 Vol. der ursprünglichen wäßrigen Lösung 70 Vol. Methanol kommen. Der dunkel gefärbte Niederschlag enthält die Hauptmenge des Enzyms. Er wird noch feucht mit Wasser ausgelaugt. Aus dem Filtrat wird das Enzym erneut mit Methanol (auf 30 Vol. der Lösung 70 Vol. Methanol) gefällt. Ausziehen mit Wasser und Fällung mit Methanol werden so lange wiederholt, bis eine farblose oder nahezu farblose Lösung erhalten wird. Sie verliert im Eisschrank in der Woche etwa 10% ihrer Wirksamkeit und muß daher alsbald verwendet werden. Zur Messung wird Dihydro-ferulasäure gewählt, deren Sauerstoff-Verbrauch im Meßbereich dem des Coniferylalkohols proportional ist. Eine Enzymeinheit ist diejenige Menge Enzym, die bei p<sub>H</sub> 5,5 und 25 °C in einer Lösung von 4 cm<sup>3</sup> in 40 min auf 3 mg Dihydro-ferulasäure 120 mm<sup>3</sup> Sauerstoff überträgt. Die Konzentration der Enzymlösung ist so einzustellen, daß dieser Verbrauch in mindestens 35 und höchstens 80 min erreicht wird. In diesen Grenzen ist die erforderliche Zeit umgekehrt proportional der Zahl der Enzymeinheiten. Die Ausbeute an Enzymeinheiten beträgt 20% der Einheiten des Rohextraktes. Der Reinigungsfaktor ist 150, das Gewicht pro Enzymeinheit 0,1 mg. Die Streuung dieser Durchschnittswerte ist groß. Vom rohen Preßsaft werden Tyrosin und 3,4-Dioxy-phenylalanin in Melanin verwandelt, vom gereinigten Saft nur das Dioxy-phenylalanin, während zur Schwärzung einer Tyrosin-Lösung der Zusatz einer Spur von Brenzcatechin erforderlich ist. Die Wirkung auf Coni-

\*) Vorgetragen in der Heidelberger Chemischen Gesellschaft am 3. Juli 1956.

<sup>1)</sup> Physiologia Plantarum 8, 20 [1955]; J. Amer. chem. Soc. 78, 1753 [1956].

<sup>2)</sup> Bearbeitet von M. Reichert u. G. Reuther.

<sup>3)</sup> An Enzymen anderer Herkunft haben *D. Keilin* u. *T. Mann* (Proc. Royal Soc. [London] Ser. B. 125, 187 [1938]) sowie *F. Kubowitz* (Biochem. Z. 292, 227 [1937]) Versuche zu weiterer Reinigung unternommen.

ferylalkohol oder Dihydro-ferulasäure wird jedoch nicht durch einen Zusatz von Brenzcatechin beeinflusst. Brenzcatechin wird von dem rohen und gereinigten Enzym rasch oxydiert, während Hydrochinon nur langsam angegriffen wird. Für die Umwandlung von 1 g Coniferylalkohol in Dehydrierungspolymerisat (DHP) genügen 100 Enzym-einheiten = 10 mg.

Die Funktion der Champignon-oxydoreductase besteht in der ersten Stufe darin, das Wasserstoff-Atom von der Phenol-Gruppe des Coniferylalkohols zu entfernen. Die Dimerisierung und die übrigen Reaktionen der Radikale verlaufen automatisch und führen infolgedessen zu Produkten, die wie das Lignin selbst optisch inaktiv sind. Die Dehydrierung des Coniferylalkohols kann nicht spezifisch sein. Sollten verschiedene Enzyme vorliegen, so können sie nur diese selbe Reaktion schneller oder langsamer ausführen. Aus diesem Grunde können auch mit anorganischen Oxydationsmitteln — unter anderem mit Wasserstoffperoxyd und Kobaltsalz und langsam mit Luft allein — die wichtigsten dimeren Dehydrierungsprodukte des Coniferylalkohols hergestellt werden. Sobald diese in der Natur enzymatisch gebildet sind, steht das Enzym verschiedenen Substraten gegenüber, die durch erneute Dehydrierung weiter kondensiert werden. Diese zweite Stufe der Reaktion kann mehr oder weniger spezifisch verlaufen, weil das eine Enzym mit dieser, das andere mit jener Substanz schneller reagieren könnte. In dem Gewebe, das in Verholzung begriffen ist, wurde außer Phenoldehydrase auch Peroxydase nachgewiesen<sup>4)</sup>. Auch hier dürfte aus demselben Grunde die erste Reaktion unspezifisch sein. Die sekundären Veränderungen jedoch, das sind die weiteren Dehydrierungen oder oxydativen Einwirkungen, können auch in diesem Falle spezifisch sein. Erneut wurde festgestellt, daß die Oxydoreductasen dieses Gewebes den Coniferylalkohol auf dieselbe Weise umwandeln wie das Pilzenzym.

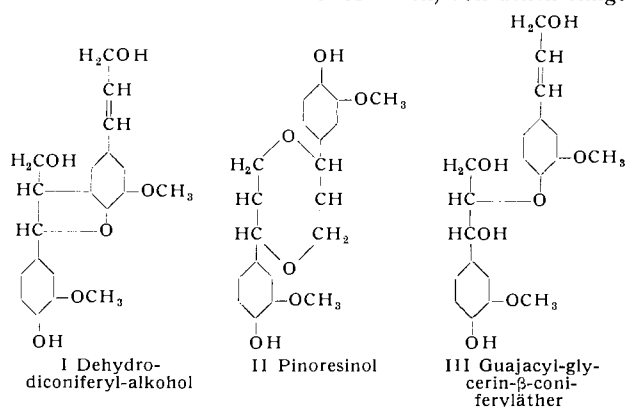
## II. Künstliches und natürliches Lignin

Dehydrierungspolymerisat kann mit Oxydoreductase auf zwei Wegen hergestellt werden.

### 1. Zulaufverfahren

Zu der Enzymlösung wird die verdünnte wäßrige Lösung des Coniferylalkohols auf einmal zugegeben und Luft durchgeleitet. Die Temperatur wird auf 20 °C gehalten, das  $p_H$  kann zwischen 5,5 und 7 variiert werden. Es hat sich gezeigt, daß bei kurzer Dauer des Versuchs oder bei Anwendung von wenig Enzym neben den übrigen Zwischenprodukten zunächst eine erhebliche Menge eines mit Diazo-benzolsulfosäure violett kuppelnden Stoffes entsteht, der bei längerer Dauer des Versuchs wieder verschwindet. Wenn genügend Niederschlag gebildet ist und kein Coniferylalkohol mehr nachgewiesen werden kann, wird der gesamte Ansatz mehrmals mit n-Butanol ausgeschüttelt. Hierbei gehen die im Wasser sowie in dem Niederschlag in reichlicher Menge vorhandenen dimeren und anderen niederen Dehydrierungsprodukte des Coniferylalkohols in das Butanol, während höher kondensiertes Material unlöslich bleibt. Dieses wandert im geeigneten Papierchromatogramm nicht, im Gegensatz zu den in Butanol löslichen Anteilen. Die im Butanol löslichen niedermolekularen Produkte bestehen zum größeren Teil aus den drei früher isolierten dimeren Dehydrierungsprodukten des Coniferylalkohols: Dehydro-diconiferylalkohol (I), DL-Pinoresinol (II) und Guajacylglycerin- $\beta$ -coniferyläther (III). Außerdem ist eine geringe Menge Coniferylaldehyd

anwesend. Ein kleinerer Teil besteht aus dem Gemisch von mindestens 15 weiteren Substanzen, von denen einige



allerdings nur spurenweise vorkommen. Will man auf diese Zwischenprodukte der Bildung des künstlichen Lignins hinarbeiten, so bedient man sich zweckmäßig des Zulaufverfahrens.

### 2. Zutropfverfahren

Um künstliches Lignin nach dem Zutropfverfahren herzustellen, wird die verdünnte wäßrige Lösung des Coniferylalkohols unter Durchleiten von Luft zu der gegebenen Enzymlösung in dem Maße zugetropft, wie der Coniferylalkohol verbraucht wird. Nach Beendigung des Zutropfens bleibt die Mischung unter Durchleiten von Luft noch ein bis zwei Tage stehen. Bei der Extraktion des Ansatzes mit Butanol gehen die in der wäßrigen Lösung und im Niederschlag befindlichen niedermolekularen Anteile in Butanol in Lösung. Sie sind dieselben wie im Falle des Zulauf-DHP. Aber ihr gegenseitiges Mengenverhältnis ist zugunsten der gelbkuppelnden Komponenten (insbesondere III) verschoben. Der in Butanol unlösliche höhermolekulare Anteil bildet je nach den Bedingungen zwei Drittel oder mehr des eingesetzten Coniferylalkohols. Dieser Anteil wird bei gewöhnlicher Temperatur getrocknet und kalt mit Dioxan ausgezogen, das 10% Wasser enthält. Der größere Teil löst sich. Dieser und der unlösliche Rest wird von Diazo-benzolsulfosäure wie das Lignin gelb gefärbt. In den Gemischen mit Dimeren überwiegen rot kuppelnde Komponenten. Das UV-Spektrum des im wäßrigen Dioxan löslichen Anteils entspricht im Verlauf dem Björkman-Lignin (s. unten). Die Extinktion ist allerdings ein wenig niedriger als beim Björkman-Lignin.

Wir wollen diese von Dimeren befreite Substanz in Zukunft Dehydrierungspolymerisat (DHP) nennen, während unsere früheren Präparate mit niedermolekularen Anteilen gemischte Dehydrierungspolymerisate waren. Diese rot kuppelnden, bei  $p_H$  5,5 hergestellten Gemische hatten eine höhere Extinktion<sup>5)</sup> als das gelb kuppelnde Björkman-Lignin und das neue Dehydrierungspolymerisat. Wir glauben, daß wir mit diesem dem natürlichen Lignin nähergekommen sind. Auch in der Pflanze dürfte das eindiffundierende Coniferin und der daraus abgespaltene Coniferylalkohol stets in größter Verdünnung dem gesamten Vorrat der reichlich vorhandenen Oxydoreductasen gegenüberstehen.

### 3. Björkman-Lignin

Björkman-Lignin<sup>6)</sup> wird gewonnen, wenn das unter Toluol auf das feinste gemahlene Holzmehl mit Lösungsmitteln wie Glykol-monomethyläther oder Dioxan-Wasser

<sup>4)</sup> K. Freudenberg, H. Reznik, H. Boesenberg u. D. Rasenack, Chem. Ber. 85, 641 [1952].

<sup>5)</sup> K. Freudenberg u. G. Schuhmacher, Sitz.-Ber. Heidelb. Akad. d. Wiss. 1953/1955, 3. Abh. S. 25, 1956.

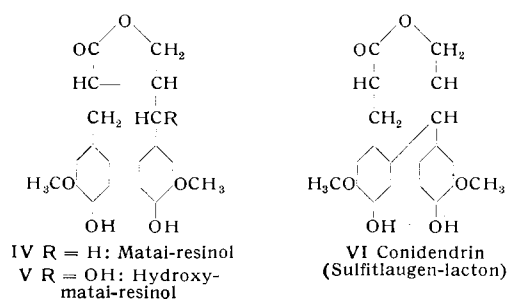
<sup>6)</sup> A. Björkman, Nature [London] 174, 1057 [1954]; Svenk. Kem. Tidskr. 67, 36 [1955]; Svensk Papperstidn. 13, 477 [1956]. Hier nennt Björkman sein Präparat M. W. L. (milled wood lignin).

(9:1) extrahiert wird. Es ist entweder eine Fraktion des Lignins, wie es im Holze liegt, oder es ist durch Totmahlen des höhermolekularen Lignins entstanden und löslich geworden. Es ist dem Dehydrierungspolymerisat neuer Darstellung äußerst ähnlich; der Vergleich ist aber noch nicht zu Ende geführt.

Dioxanlignin ist dem *Björkman*-Lignin ähnlich, enthält aber gegen 2% Chlor<sup>7)</sup>.

#### 4. Brauns-Lignin

Das lösliche Lignin (nach *F. Brauns*), das sich in geringen Mengen im gesamten Fichtenholze, also auch in den alten Holzschichten vorfindet, wird durch kalte Extraktion des Sägmehls mit Aceton-Wasser (17:3 Vol.) gewonnen. Der von Wasser befreite Auszug wird mit Schwefelkohlenstoff ausgerieben, der Rückstand in Aceton gelöst und mit Benzol gefällt. Die Umfällung wird wiederholt. Der Inhalt der Benzol-Lösung wird erneut mit Schwefelkohlenstoff behandelt. Dieses „lösliche Lignin“ besteht zur Hauptsache aus niedermolekularen, dem Coniferylalkohol-verwandten Anteilen; die wenigen bisher gekennzeichneten gehören der Klasse der Lignane an. Mit den sekundären Bausteinen des künstlichen Lignins hat das lösliche Lignin, soweit bisher bekannt, nur das Pinoresinol (II) gemein. Ob es



racemisch oder optisch aktiv ist, bleibt noch zu untersuchen. Im übrigen enthält das lösliche Lignin eine große Zahl niedermolekularer Anteile, darunter in sehr geringer Menge Matairesinol (IV) und Conidendrin (VI). In erheblicher Menge sind zwei mit Diazo-benzolsulfosäure gelb kupfelnde Anteile vorhanden, die schwer voneinander zu trennen sind. Der eine ist in Gestalt eines kristallinen Adduktes mit Kaliumacetat gefaßt worden; er ist optisch aktiv und läßt sich durch verdünnte Säure in das optisch aktive Conidendrin überführen. Wir teilen diesem Anteil vorläufig die Formel eines Hydroxy-matairesinols (V) zu. Es ist ohne Zweifel die Stammsubstanz des aus der Sulfit-Ablauge in sehr geringer Menge isolierbaren optisch aktiven Conidendrins (VI). Es ist nicht wahrscheinlich, daß diese Lignane und übrigen Anteile des „löslichen Lignins“ Komponenten des Fichtenlignins sind. Gegen eine solche Annahme spricht ihre optische Aktivität, die im Lignin nie angetroffen wurde und auf einen anderen Bildungsmechanismus schließen läßt. Wie schon betont, bilden die dimeren Dehydrierungsprodukte I, II und III die Hauptmenge der sekundären Bausteine des künstlichen Lignins. Sie entstehen durch Verlust von einem Wasserstoff-Atom aus jeder Molekel Coniferylalkohol; in III ist eine Molekel Wasser hinzutreten, wodurch die Oxydationsstufe jedoch nicht verändert wird. Durch erneuten Wasserstoff-Verlust werden die sekundären Bausteine untereinander verkettet. Mit wachsender Molekelgröße nähert sich

alsdann der Wasserstoff-Verlust pro Einheit der Zahl 2. Gefunden wurde im DHP ein Verlust von 1,7 H-Atomen. In den Lignin-Präparaten liegen C<sub>9</sub>-Einheiten vor, die in Übereinstimmung mit dem künstlichen Lignin zwei oder nahezu zwei Wasserstoff-Atome weniger als der Coniferylalkohol enthalten. Auch hier wird ein Zuwachs an Konstitutionswasser beobachtet. Die Bestandteile des löslichen (*Brauns*-)Lignins sind von vornherein Wasserstoff-ärmer. So beträgt beispielsweise im Hydroxy-matairesinol und Conidendrin das Defizit an Wasserstoff gegenüber dem Coniferylalkohol zwei Wasserstoff-Atome je C<sub>9</sub>. Wenn diese Substanzen, was der Versuch bestätigt, durch weitere enzymatische Dehydrierung zusammengeschweißt werden, so nähert sich der Wasserstoff-Verlust, auf die C<sub>9</sub>-Einheit bezogen, der Zahl 3. Enthielte das Lignin diese Komponenten in nennenswerten Mengen, so müßte es Wasserstoff-ärmer sein als es in Wirklichkeit ist. Auch dies ist ein wesentlicher weiterer Hinweis, daß an der Bildung des Lignins die niedermolekularen Bestandteile des löslichen (*Brauns*-)Lignins nicht oder nur unwesentlich beteiligt sind.

Lösliches (*Brauns*-)Lignin enthält fast doppelt soviel phenolisches Hydroxyl wie die natürlichen oder künstlichen Lignin-Präparate (s. unten).

Auch sollten, wenn die geschilderten im löslichen Lignin enthaltenen Lignane in das Lignin einkondensiert wären, in diesem mehr Lacton- und Phenol-Gruppen nachweisbar sein, als das *Björkman*-Lignin und das Zutropf-DHP übereinstimmend enthalten.

Der Unterschied zwischen löslichem (*Brauns*-)Lignin einerseits und Dehydrierungspolymerisat sowie Dioxanlignin<sup>8)</sup> andererseits gibt sich auch im folgenden kund: Mit Essigsäureanhydrid, Eisessig und Spuren von Perchlorsäure werden Benzofuran-Ringe unter Bindung von Acetyl aufgespalten<sup>9)</sup>. Das acetylierte lösliche (*Brauns*-)Lignin nimmt kein weiteres Acetyl auf. Beim Acetat des Dioxanlignins wird eine geringe Aufnahme wahrgenommen (etwa auf jede 5. Einheit eine Essigsäure), beim acetylierten, Dimere enthaltenden Dehydrierungspolymerisat wird eine Essigsäure auf 2–3 Einheiten verbraucht<sup>10)</sup>. Der Unterschied scheint auf der Gegenwart von gebundenem oder eingebautem Dehydro-diconiferylalkohol (I) zu beruhen. Im löslichen (*Brauns*-)Lignin befindet sich kein freier Dehydro-diconiferylalkohol. Im Dioxanlignin ist diese Substanz in eingebauter Form anzunehmen, und im Dehydrierungspolymerisat-Dimerengemisch (untersucht wurde Zulauf-Dehydrierungspolymerisat) kommt Dehydro-diconiferylalkohol in freier Form vor, daneben offenbar auch in gebundener.

Es ist möglich, daß das lösliche (*Brauns*-)Lignin unabhängig von der Lignin-Bildung nachträglich in dem Holz abgelagert wird. Vielleicht gehört es dem Harzsystem an.

#### 5. Cambialsaft

Versuche, die sekundären Lignin-Bausteine im wäßrigen, von Zellmaterial befreiten Saft des Cambialgebietes nachzuweisen, haben noch zu keinem klaren Ergebnis geführt. Angetroffene geringe Mengen von Coniferylalkohol sowie Substanzen I und II könnten während der Aufarbeitung entstanden sein. *K. Kratzl*<sup>11)</sup> gibt an, daß ein Extrakt des Saftes die unten beschriebenen *Hibbert*schen Ketone XI bis XIV liefert, was auf die Gegenwart der Substanz III, die nie ohne I und II auftritt, schließen läßt. Extrahiert man die äußersten eben angelegten Holzzellen mit Aceton, so erhält man ein unübersichtliches Gemisch, weil die

<sup>7)</sup> *K. Freudenberg* in *Paech und Tracey*: Mod. Meth. d. Pflanzenanalyse III, 509; Springer-Verlag 1955. Zu diesem Handbuchartikel sei nachgetragen, daß *O. Theander* (*Acta chem. Scand.* 6, 211 [1952]) aus *Sphagnum* 5% *Klason* „Lignin“ erhalten hat, das mit Nitrobenzol 0,6% p-Oxybenzaldehyd nebst wenig Vanillin, Formyl-vanillin und Syringa-aldehyd ergab. *Bror Holmberg* (Privatmitteilung) hat aus den Fruchtschäften des Mooses *Polytrichum commune* 13% Alkaliextrakt erhalten, der 3% p-Oxybenzaldehyd, Vanillin und Syringa-aldehyd ergab.

<sup>8)</sup> *K. Freudenberg* in: Fortschr. d. Chemie organ. Naturstoffe (*L. Zechmeister*) 11, 45 [1954].

<sup>9)</sup> Bearbeitet von *H. Wilk* u. *H. U. Leuck*.

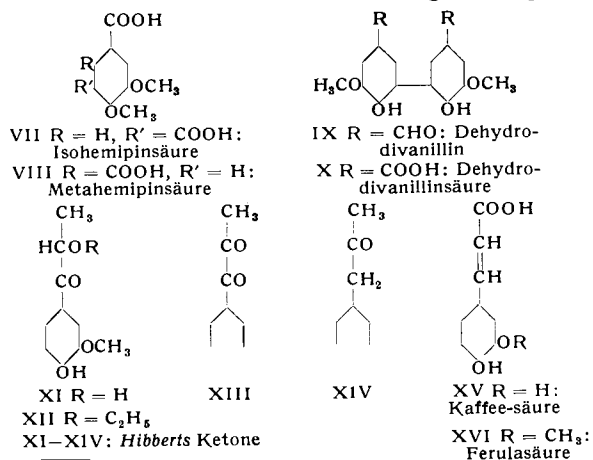
<sup>10)</sup> *K. Freudenberg, M. Reichert* u. *L. Knof*, Naturwissenschaften 41, 231 [1954]. <sup>11)</sup> Diese Ztschr. 68, 384 [1956].

Inhaltsstoffe der Harzgänge und der Markstrahlen mitgelöst werden. Falls das in Verholzung begriffene Gewebe die Zwischenprodukte des Dehydrierungspolymerisats überhaupt enthält, so sind sie nur in extrem geringer Menge vorhanden und werden sofort auf Lignin weiterverarbeitet.

### III. Versuche mit radioaktiv markierten Lignin-Bausteinen

Wenn Fichtenlignin mit starkem Alkali gekocht, dann methyliert und oxydiert wird, so entstehen, wie früher mitgeteilt, einige Prozente Isohemipinsäure (VII). *H. Richtzenhain* hat später gefunden, daß etwa ein Drittel dieser Isohemipinsäure auch dann auftritt, wenn ohne Vorbehandlung mit Alkali mittels Diazomethans methyliert und danach oxydiert wird. Aus künstlichem Lignin wird Isohemipinsäure auf den gleichen Wegen und in demselben Mengenverhältnis gewonnen. *K. Freudenberg* und *F. Bittner*<sup>12)</sup> haben gezeigt, daß Dehydrierungspolymerisat, das mit endständig markiertem Coniferylalkohol (Coniferylalkohol-(<sup>14</sup>CH<sub>2</sub>OH)) hergestellt war, keine radioaktive Isohemipinsäure liefert. Neuerdings<sup>13)</sup> wurde derselbe Versuch mit Dehydrierungspolymerisat aus Coniferylalkohol ausgeführt, der am mittleren Kohlenstoff-Atom der Seitenkette markiert war (Coniferylalkohol-( $\beta$ -<sup>14</sup>CH)). Jetzt besaß die Isohemipinsäure von beiderlei Herkunft die volle Radioaktivität. Derjenige Teil der Isohemipinsäure, der nach Alkali-Aufschluß gewonnen wird, entstammt ohne Zweifel der Lignin-Komponente Dehydro-diconiferylalkohol (I), während der andere Teil von einer entsprechenden Gruppierung herrührt, in der ein Cumarin-Ring geöffnet ist. Diese Gruppierung kann sich unter den sekundären Lignin-Bausteinen finden, die noch nicht erforscht sind, oder sie entsteht bei der weiteren Kondensation der sekundären Lignin-Bausteine untereinander. *H. Richtzenhain* hat des weiteren gefunden, daß geringe Mengen Meta-hemipinsäure (VIII) dann entstehen, wenn Lignin mit starker Salzsäure behandelt und dann auf Isohemipinsäure verarbeitet wird. Künstliches Lignin verhält sich ebenso. *K. Freudenberg* und *F. Bittner*<sup>12)</sup> haben gezeigt, daß bei Verwendung von endständig markiertem Coniferylalkohol eine teilweise radioaktive Meta-hemipinsäure entsteht. Bei Verwendung mittelständig markierten Coniferylalkohols bildet sich inaktive Meta-hemipinsäure. Das eine Carboxyl der Meta-hemipinsäure entsteht daher zum Teil durch Einkondensation des primären Carbinols, zum andern Teil aus dem Kohlenstoff-Atom der Seitenkette, das dem Guajacyl-Kern benachbart ist.

Früher wurde festgestellt, daß radioaktives Coniferin (<sup>14</sup>CH<sub>2</sub>OH) von Fichten an der Stelle eingebaut wird, an der zur Zeit des Versuchs die Verholzung im Gange war.



<sup>12)</sup> Chem. Ber. 86, 155 [1953].

<sup>13)</sup> K. Freudenberg u. F. Niedercorn, ebenda, im Druck.

*M. Reichert*<sup>14)</sup> konnte jetzt zeigen, daß durch Alkoholyse dieses radioaktiven Holzes die *Hibberts* Ketone XI bis XIV in radioaktiver Form entstehen. Der Versuch steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von *K. Kratzl*. Radioaktive Ferulasäure (XVI) wird ebenfalls eingebaut und liefert ein Lignin, aus dem die *Hibberts* Ketone gewonnen werden können. Merkwürdigerweise wird Glucoferulasäure nicht oder nur sehr spärlich eingebaut und liefert auch keine *Hibberts* Ketone. Wenn radioaktives Glucovanillin (<sup>14</sup>CHO) eingegeben wird, so wird es ebenso schnell wie Coniferin fixiert. Radioaktive *Hibberts* Ketone entstehen jedoch nicht aus solchem Holze. Daraus muß geschlossen werden, daß Vanillin zwar einkondensiert, aber nicht über eine C<sub>9</sub>-Stufe zu echtem Lignin verarbeitet wird. Daß radioaktives Phenylalanin eingebaut und nach der Oxydation mit Nitrobenzol und Alkali radioaktives Vanillin liefert, haben bereits *S. A. Brown* und *A. C. Neish*<sup>15)</sup> an anderen Pflanzen festgestellt. Bei der Äthanolyse des so gewonnenen radioaktiven Holzes entsteht der Hauptbestandteil der *Hibberts* Ketone, das  $\alpha$ -Oxo- $\beta$ -äthoxy-guajacylpropan in radioaktiver Form. Dagegen konnten die übrigen stets in geringerer Menge entstehenden *Hibberts* Ketone nicht wahrgenommen werden. Aus diesen Versuchen kann erneut gefolgert werden, daß das im Cambialsaft der Fichte vorhandene Coniferin die eigentliche Stammsubstanz des Lignins ist. Sind jedoch andere Phenole oder ihre Glucoside vorhanden, so können sie wie die eingegebene Ferulasäure in Lignin verwandelt werden oder sie können, wie das eingegebene Vanillin, in das Lignin einkondensiert werden, ohne jedoch echtes Lignin zu liefern.

Die Bildung radioaktiver *Hibberts* Ketone möchten wir als ein wesentliches Kriterium ansehen für die Entscheidung der Frage, ob eine radioaktive Substanz in Lignin verwandelt wird oder nicht. Coniferin oder Coniferylalkohol bilden für sich allein diese Ketone nicht. Die Quelle für die *Hibberts* Ketone ist die aus Coniferylalkohol entstehende Substanz III. Offenbar werden Phenylalanin und Ferulasäure in der Pflanze erst in Coniferylalkohol bzw. Coniferin verwandelt, ehe sie Lignin bilden. Da dies in unmittelbarer Nähe der Applizierungsstelle geschieht, folgt, daß das Coniferin im Gebiet des Cambiums gebildet wird.

### IV. Phenol-Gruppen im Lignin

Lange war umstritten, wieviel freie Phenol-Gruppen das Lignin enthält. Die unmittelbare Titration der Phenol-Gruppen nach *H. Brockmann* und *G. Meyer*<sup>16)</sup> hat ergeben<sup>17)</sup>, daß in Ligninsulfosäure, *Björkman*-Lignin, Dioxanlignin und Zutropf-Dehydrierungspolymerisat (nicht frei von Dimeren) 0,3–0,4 Phenol-Gruppen enthalten sind, bezogen auf die Phenylpropan-Einheit. Auch *T. Enkvist* ist beim *Björkman*-Lignin zu demselben Ergebnis gekommen. Diese Aussage wird unterstützt durch eine Untersuchung von *E. Adler* und *S. Hernestam*<sup>18)</sup>. Wenn im Benzol-Ring freies Phenolhydroxyl und Methoxyl nebeneinander vorkommen, wird durch Perjodsäure fast quantitativ Methanol freigelegt. Die Menge des Methanols und damit des Phenolhydroxyls entspricht dem obigen Werte. *O. Goldschmid* und vor allem *G. Aulin-Erdtman* haben nach einem optischen Verfahren Phenol-Gruppen bestimmt. Insbesondere *G. Aulin-Erdtman* findet niedrigere Werte. Das rührt daher, daß nach dem optischen Verfahren sterisch oder elektrostatisch behindertes Phenolhydroxyl nicht vollständig erfaßt wird. Solches Hydroxyl kann in den oben

<sup>14)</sup> Unveröffentlicht. <sup>15)</sup> Nature [London] 175, 688 [1955].

<sup>16)</sup> Chem. Ber. 86, 1514 [1953].

<sup>17)</sup> K. Freudenberg u. K. Dall, Naturwissenschaften 42, 606 [1955].

<sup>18)</sup> Svensk Kem. Tidskr. 67, 37 [1955].

erwähnten noch unerforschten sekundären Bausteinen enthalten sein, es kann sich aber auch bilden bei der Verknüpfung der sekundären Bausteine untereinander. Ein bestimmter Hinweis auf solches behindertes Hydroxyl liegt vor. J. C. Pew<sup>19)</sup> hat wahrscheinlich gemacht, daß im Lignin Diphenyl-Bindungen vorhanden sind, denn er hat durch oxydativen Abbau mit Nitrobenzol Dehydrodivanillin gefunden unter Bedingungen unter denen Modells-substanzen kein Dehydrodivanillin lieferten. *o,o'*-Dihydroxy-diphenyle lassen in Äthylendiamin zwei Säureäquivalente erkennen; im optischen Versuch tritt jedoch nur eines der Hydroxyle in Erscheinung. Die Thioglykolsäure-Derivate des *o*-<sup>20)</sup> und *p*-Vanillylalkohols haben titrimetrisch zwei Säureäquivalente, sind aber optisch so verschieden, daß Unsicherheiten entstehen, wenn sie als Modelle verwendet werden. Dies kann einer der Gründe dafür sein, daß an Thioglykolsäure-Lignin auf optischem Wege zu wenig Phenolhydroxyl gefunden wird. Im Gegensatz zu diesen Präparaten hat das lösliche Lignin nach Brauns einen höheren Gehalt an phenolischen Hydroxyl-Gruppen (0,5–0,7 pro C<sub>6</sub>). Dies dürfte mit der Gegenwart des Hydroxymataireins und anderer Lignane zusammenhängen.

G. Aulin-Erdtman und L. Högberg<sup>21)</sup> vergleichen nach dem  $\Delta\epsilon$ -Verfahren — durch Absorption im neutralen und alkalischen Gebiet — ein DHP-Präparat mit Modells-substanzen und mit Lignin-Präparaten. Verwendet wird ein DHP-Präparat, das aus unseren ersten Versuchen stammt (bei  $pH$  7 hergestellt). Um die Differenz zwischen den DHP-Kurven und den Kurven der früheren Modelle und des Lignins zu erklären, werden weitere Modelle herangezogen. Aus den hierzu benötigten neuen Modellen werden Schlüsse auf die Konstitution des DHP und seine Verschiedenheit mit dem Lignin gezogen.

Leider haben die Autorinnen übersehen, daß jenes DHP-Präparat längst überholt ist. 1952 haben K. Freudenberg und H. Hübner<sup>22)</sup> ein bei  $pH$  5,5 hergestelltes DHP beschrieben, das im Kurvenverlauf mit Lignin fast ganz übereinstimmt und nur eine etwas höhere Extinktion besitzt. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß die bisherigen DHP-Präparate mit Dimeren vermischt waren; ein DHP ist angeführt, das im Kurvenverlauf und auch in der Extinktion dem Lignin noch näher kommt als das DHP von 1952.

In einer früheren Abhandlung<sup>23)</sup> wurde durch unmittelbare Titration der Phenol-Gruppen gezeigt, daß schon die bisher von G. Aulin-Erdtman verwendeten Modelle unzureichend waren. Dieser Mangel kann durch beliebige Heranziehung weiterer Modelle nicht behoben werden. Wie sehr die  $\Delta\epsilon$ -Methode überfordert ist, wird besonders deutlich, wenn man die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen zahlreichen weiteren Zwischenstufen der DHP-Bildung bedenkt. Wenn die  $\Delta\epsilon$ -Kurven erklärt werden sollten, müßte eine Vielzahl von Modellen in einem Mengenverhältnis herangezogen werden, das noch festzustellen wäre.

In der schwedischen Arbeit finden sich keine Argumente gegen die von mir früher und jetzt vorgetragenen Ansichten über die Bildung und Konstitution des DHP und Lignins.

## V. Verschiedenes

Sinapinalkohol bildet in wäßriger Lösung mit Luft allein, schneller in Gegenwart von Cu-Ionen erhebliche Mengen von Syringaresinol<sup>24)</sup>.

Ein gutes Hilfsmittel für die Kennzeichnung der vielen Dehydrierungsprodukte des Coniferylalkohols ist die Reaktion mit Diazo-benzolsulfonsäure. Die Kupplungsfarbe auf den Chromatogrammen ist gelb, wenn benachbart zum Guajacyl-Rest ein Carbonyl wie im Acetovanillon oder ein Carbinol vorhanden ist wie im Guajacylglycerin-coniferyläther. Wenn jedoch eine Hydroxyl-Gruppe fehlt oder veräthert ist, treten kirschrote, braunrote oder violette Färbungen auf. Eine Ausnahme bildet der Coniferylaldehyd, dessen Kupplungsprodukt hell citronen-

gelb ist. Im Chromatogramm ist er durch starke Fluoreszenz im ultravioletten Licht zu erkennen.

Mit hydrotropen Lösungen<sup>25, 26)</sup>, z. B. 50 g *m*-xylolsulfonsaurem Natrium in 100 g Wasser wird bei 100 °C oder darüber aus Buchenholzmehl ein großer, aus Fichtenholzmehl ein kleiner Teil des Lignins in Lösung gebracht. Dieses Lignin hat ähnliche Eigenschaften wie das Essigsäurelignin<sup>27)</sup> nach der Entacetylierung. Es ist nicht sicher, daß es unverändert ist.

Tritium-haltiges Vanillin<sup>28)</sup> läßt sich gewinnen aus dem Dimethylacetal des benzylierten 5- oder 6-Brom-vanillins nach Umsetzung mit Butyl-lithium, Behandlung mit TOH-haltigem Wasser und Abspaltung der Schutzgruppen mit Salzsäure. Aus Tritio-vanillin können 5- oder 6-Tritio-coniferylalkohol und Dehydrierungspolymerisat sowie 5- oder 6-Tritioconiferin gewonnen werden; auch in der Seitenkette markiertes Tritioconiferin wurde bereitet. Bei dem Versuch, Kaffeesäure<sup>29)</sup> (XV) aus Vanillin und mittelständig radioaktiv markierter Malonsäure in Pyridin herzustellen, tritt rasche Selbstzersetzung ein, wenn die radioaktive Säure nicht mit viel inaktiver verdünnt ist. Coniferylaldehyd kann aus Acetyl-ferulasäurechlorid mit Hilfe von Natriumtrimethoxyborhydrid bei –60 °C in brauchbarer Ausbeute gewonnen werden<sup>28)</sup>. Ein Modell für das Thioglykolsäure-Lignin ist die erwähnte *o*-Vanillylthioglykolsäure. Sie läßt sich aus *o*-Vanillylalkohol und Thioglykolsäure (Mercaptoessigsäure) mit geringen Mengen Borfluorid herstellen. Auch Thioglykolsäure-lignin kann auf diesem Wege bei 20 °C gewonnen werden<sup>29)</sup>.

Bekanntlich erleidet der Coniferylalkohol durch Mineralsäuren in wäßriger Lösung rasche Polymerisation. Das Säurepolymerisat kuppelt mit gelber Farbe. Danach kann vermutet werden, daß das Molekulargewicht nicht sehr hoch und eine Endgruppe durch Wasseraddition abgeschlossen ist, wodurch ein gelb kuppelndes Endstück entstehen würde. Auch methylierte *p*-Hydroxymzimtalkohole werden leicht polymerisiert. Es ist vermutet worden, daß auch in das Lignin teilweise Polymerisationsprodukte eingebaut sind, z. B. des Guajacylglycerin-coniferyläthers (III). Diese Polymerisationen dürften analog der Styrol-Polymerisation verlaufen; Zimtalkohol bildet mit Säuren nur ein Dimeres, dessen Konstitution der ersten Stufe der Styrol-Polymerisation entspricht<sup>30)</sup>.

Nitroso-disulfonsaures Kalium ist zur Dehydrierungspolymerisat-Bildung aus Coniferylalkohol ungeeignet. Mit Vanillin liefert es in brauchbarer Ausbeute Dehydrodivanillinsäure (X). Aus Lignin oder Holz wurden keine definierten Abbauprodukte erhalten.

*m*- und *o*-Hydroxymzimtalkohol (*m*- und *o*-Cumaralkohol) werden durch verdünnte Mineralsäuren nicht verändert. *m*-Hydroxymzimtalkohol<sup>31)</sup> (Fp 88–89 °C; Gluco-*m*-cumaralkohol Fp 158 °C) ist zur Bildung eines Dehydrierungspolymerisates unfähig, während *o*-Hydroxymzimtalkohol<sup>32)</sup> (Gluco-*o*-cumaralkohol<sup>31)</sup>, Fp 129–131 °C) nur in minimaler Menge einen Dehydrierungspolymerisat-artigen Niederschlag liefert. Unter vergleichbaren Bedingungen werden die gleichen Mengen Sauerstoff aufgenommen von Coniferylalkohol in 2 min, von *p*-Cumaralkohol in 10 min, von *o*-Cumaralkohol in 170 min, von *m*-Cumaralkohol nichts.

Eingegangen am 16. Juli 1956 [A 748]

<sup>25)</sup> R. H. McKee, Brit. Pat. 560942 v. 30. 6. 1942; Ind. Engng. Chem. 38, 382 [1946].

<sup>26)</sup> P. H. Tragnard u. A. Eymery, Holzforsch. 10, 43 [1956]; die Verfasser stützen sich auf ein völlig überholtes Strukturbild des Lignins.

<sup>27)</sup> K. Freudenberg in: Fortschr. d. Chemie organ. Naturstoffe (L. Zechmeister) 11, 45 [1954].

<sup>28)</sup> Bearbeitet von W. Fuchs. <sup>29)</sup> Bearbeitet von K. Seib.

<sup>30)</sup> K. Freudenberg u. O. Ahlhaus, Mh. Chemie 87, 1 [1956].

<sup>31)</sup> Bearbeitet von W. Zacher.

<sup>32)</sup> P. Karrer u. P. Banerja, Helv. chim. Acta 32, 1692 [1949].

<sup>19)</sup> J. Amer. chem. Soc. 77, 2831 [1955].

<sup>20)</sup> Bearbeitet von K. Seib. <sup>21)</sup> Svensk Papperstidn. 59, 363 [1956].

<sup>22)</sup> Chem. Ber. 85, 1181 [1952]; vgl. hierzu auch diese Ztschr. 68, 84 [1956].

<sup>23)</sup> K. Freudenberg u. K. Dall, Naturwissenschaften 42, 606 [1955].

<sup>24)</sup> Bearbeitet von T. Fukuzumi.