

### 38. Josef Gierer: Die Reaktion von Chinonmonochlorimid mit Lignin. II. Isolierung und Identifizierung der gebildeten Farbstoffe<sup>1)</sup>

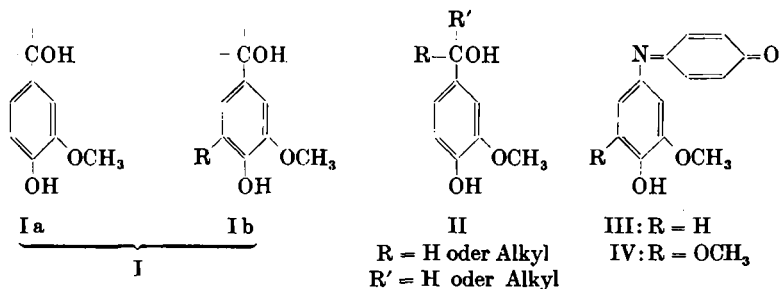
[Aus dem Schwedischen Holzforschungsinstitut, Holzchemische Abteilung, Stockholm]  
(Eingegangen am 19. September 1955)

*Herrn Professor Freudenberg zum 70. Geburtstage gewidmet*

Bei der Umsetzung von Chinonmonochlorimid mit Fichtenholzmehl (*Picea excelsa*) sowie mit „native lignin“ aus Fichtenholz entsteht ein krist. Indophenolfarbstoff, der sich mit dem aus Guajacol oder aus  $\alpha$ -[4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl]-propylalkohol entsprechend erhaltenen 2-Methoxy-phenolindophenol (III) identisch erweist. Die analoge Reaktion mit Espenholzmehl liefert ein Gemisch von III mit 2,6-Dimethoxy-phenolindophenol (IV), das chromatographisch trennbar ist.

In der I. Mitteilung<sup>1)</sup> wurde über die Reaktion von Chinonmonochlorimid mit verschiedenen Ligninpräparaten aus Fichtenholz berichtet und gezeigt, daß das Reagens auf die Guajacylcarbinolgruppen (Vanillylalkoholgruppen, I) im Fichtenholzlignin spezifisch ist.

Modellversuche ergaben, daß Chinonmonochlorimid in alkalischer Lösung aus substituierten Vanillylalkoholen (II) die Seitenkette als Aldehyd bzw. als Keton abspaltet und mit dem so freigelegten 4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl-Rest unter Bildung des 2-Methoxy-phenolindophenols (Chinon-mono-[4-hydroxy-3-methoxy-anil]) (III) kuppelt.



Nimmt man eine analoge Spaltung auch beim Fichtenholzlignin an, so müssen unkondensierte, d. h. in 5-Stellung nicht *C*-aryl-substituierte Guajacylcarbinolgruppen (Ia) dasselbe Indophenol (III) liefern. Beim Laubholzlignin hingegen ist auf Grund der von H. Hibbert und Mitarbb. veröffentlichten Ergebnisse der Äthanolyse<sup>2)</sup> und der Nitrobenzol-Oxydation<sup>3)</sup> ein Gemisch aus III und dem 2,6-Dimethoxy-phenolindophenol (Chinon-mono-[4-hydroxy-3,5-dimethoxy-anil]) (IV) zu erwarten.

<sup>1)</sup> I. Mitteil.: J. Gierer, Acta chem. scand. 8, 1319 [1954].

<sup>2)</sup> L. Brickman, J. J. Pyle, W. L. Hawkins u. H. Hibbert, J. Amer. chem. Soc. 62, 986 [1940]; L. Brickman, W. L. Hawkins u. H. Hibbert, ibid. 62, 2149 [1940].

<sup>3)</sup> R. H. J. Creighton, J. L. McCarthy u. H. Hibbert, J. Amer. chem. Soc. 63, 312 [1941].

Es gelang nun tatsächlich, das bei der Reaktion von Chinonmonochlorimid mit Brauns „native lignin“ sowie mit entharztem Fichtenholzmehl gebildete Indophenol in kristallisierter Form zu isolieren und durch Analyse, Schmelzpunkt, Absorptionsspektrum und Papierchromatographie als 2-Methoxy-phenolindophenol (III) zu identifizieren. Versuche zur Charakterisierung des nach dieser Spaltungsreaktion zurückbleibenden „Restlignins“ sind im Gange. Aus Espenholzmehl wurde bei gleicher Arbeitsweise erwartungsgemäß ein Gemisch aus III und IV erhalten, das durch Chromatographie an Aluminiumoxyd in seine Komponenten aufgeteilt werden konnte. Zu Vergleichszwecken wurden das Indophenol III aus Guajacol und aus  $\alpha$ -[4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl]-propylalkohol (Äthyl-guajacyl-carbinol) (II, R = H, R' = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) sowie das Indophenol IV aus Pyrogallol-1.3-dimethyläther und aus Syringaalkohol dargestellt und eine Methode zu ihrem papierchromatographischen Nachweis ausgearbeitet.

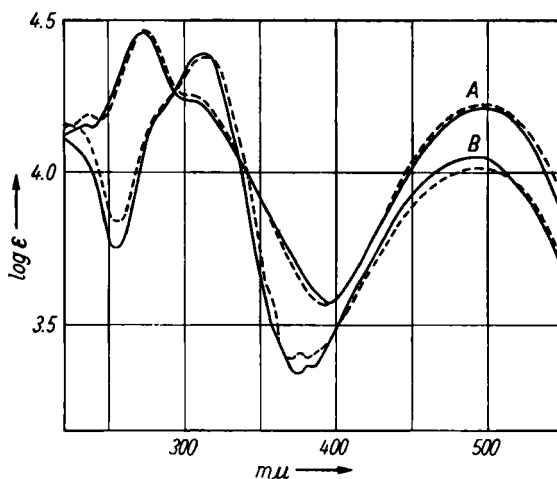
In Tafel 1 sind die wichtigsten analytischen Daten und Schmelzpunkte dieser aus Modellsubstanzen synthetisierten Indophenole zusammengestellt. Die Substanzen schmolzen etwas unscharf, da in der Gegend des Schmelzpunktes bereits allmähliche Zersetzung eintritt. Die untere Spalte der Tafel enthält zum Vergleich die entsprechenden Werte der aus den Holzmehlpräparaten und aus dem Fichtenholz-„native lignin“ nach der Kupplungsreaktion isolierten Indophenole.

Aus Tafel 1 ist klar ersichtlich, daß das Indophenol aus Fichtenholzmehl und aus Fichtenholz-„native lignin“ sowie das Indophenol A aus Espenholzmehl mit dem 2-Methoxy-phenolindophenol (III) aus Guajacol oder aus Äthyl-guajacyl-carbinol identisch ist. Das Indophenol B aus Espenholzmehl hingegen stimmt in seinen analytischen Daten sehr gut mit dem 2.6-Dimethoxy-phenolindophenol (IV) aus Pyrogallol-1.3-dimethyläther oder aus Syringaalkohol überein.

Tafel 1. Übersicht über die analytischen Daten der dargestellten Indophenole

Indophenol	OCH <sub>3</sub>		N		Schmp.	Misch-Schmp.
	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.		
III aus Guajacol .....	13.55	13.42	6.11	6.16	169–170°	—
III aus Äthyl-guajacyl-carbinol .....	13.55	13.21	6.11	5.71	166–170°	—
IV aus Pyrogallol-1.3-dimethyläther .....	23.94	23.50	5.41	5.38	185–186°	—
IV aus Syringaalkohol .....	23.94	23.98	5.41	5.31	184–186°	—
aus Fichtenholz-„native lignin“	13.55	13.33	6.11	5.84	167–169°	167–170°
aus Fichtenholzmehl .....	13.55	13.56	6.11	6.12	168–170°	168–170°
A aus Espenholzmehl .....	13.55	13.72	6.11	5.85	167–169°	166–170°
B aus Espenholzmehl .....	23.94	23.98	5.41	5.38	182.5–185°	182–186°

Die Identität der entsprechenden Indophenole wird weiterhin durch die untenstehenden Absorptionsspektren der Farbstoffe (Abbild. 1) sowie durch die Übereinstimmung im papierchromatographischen Verhalten (Tafel 2) bestätigt.



Abbild. 1. Absorptionsspektren der Indophenole (1 mg Indophenol in 100 ccm 96-proz. Äthanol, Messung im Beckman-Spektrophotometer, Modell DU).

Kurve A: Indophenol aus Guajacol (ausgezogen), Indophenol aus Fichtenholz-, „native lignin“ (gestrichelt); das Indophenol aus Fichtenholzmehl und das Indophenol A aus Espenholzmehl geben die gleiche Kurve.

Kurve B: Indophenol aus Pyrogallol-1.3-dimethyläther (ausgezogen), Indophenol B aus Espenholzmehl (gestrichelt)

Tafel 2. Verhalten der isolierten Indophenole bei der Papierchromatographie

Indophenol	$R_F$ -Werte	Farbe		
		in $\text{NH}_3$ -Atmosphäre	beim Trocknen	nach dem Trocknen
2-Methoxy-phenolindophenol(III) aus Guajacol, Äthyl-guajacyl-carbinol, Fichtenholz-, „native lignin“, Fichtenholzmehl oder Espenholzmehl (A) ....	0.57	violett	bräunlich	orange
	0.80	blauviolett	bläulich	blaugrau
2.6-Dimethoxy-phenolindophenol (IV) aus Pyrogallol-1.3-dimethyläther, Syringaalkohol oder Espenholzmehl(B)	0.71	braunviolett	olivgrün	ziegelrot

Da die Reaktion von Chinonmonochlorimid mit Fichten- und Espenholzmehl in heterogenem System vor sich geht und da außerdem die gebildeten Indophenolfarbstoffe durch verlustreiche Säulenchromatographie gereinigt werden müssen, ist es nicht möglich, aus den erzielten Ausbeuten auf die Menge der ursprünglich vorhandenen Vanillyl- resp. Syringaalkoholgruppen in den Holzmehlpräparaten zu schließen.

Die Kupplung mit „native lignin“ aus Fichtenholz erfolgt hingegen in homogener Lösung. Die Ausbeute an extrahierbarem 2-Methoxy-phenolindophenol (III) sollte daher der Menge solcher im „native lignin“ vorhandenen Vanillylalkoholgruppen entsprechen, deren aromatischer Ring nicht noch durch weitere C-Aryl-Bindungen, etwa in 5-Stellung, mit dem restlichen Ligninmolekül verbunden ist (Gruppen Ia). Während also die in der I. Mitteilung<sup>1)</sup> beschriebene kolorimetrische Bestimmungsmethode die Summe der Gruppen Ia und Ib erfaßt, kann das durch Chloroformextraktion gewonnene Indophenol natürlich nur aus Gruppen des Typus Ia stammen. Somit wird bei löslichen Ligninpräparaten eine Differenzierung der Vanillylalkoholgruppen (Guajacylcarbinolgruppen, I) in solche des Typus Ia und solche des Typus Ib möglich.

Die Ausbeute an 2-Methoxy-phenolindophenol (III) nach der Kupplungsreaktion mit „native lignin“ entspricht etwa 40% des kolorimetrisch ermittelten Anteils<sup>1)</sup> der Guajacylcarbinolgruppen (Ia und Ib) in diesem Ligninpräparat. Berücksichtigt man die während der Isolierung und Reinigung eingetretenen Substanzverluste, so scheint bei den Guajacylcarbinolgruppen (I) ungefähr das gleiche Verhältnis (1:1) zwischen in 5-Stellung unsubstituierten (Ia) und substituierten (Ib) Einheiten vorzuliegen, wie es B. Leopold<sup>4)</sup> auf Grund der bei Nitrobenzol-Oxydation erzielten Ausbeuten an Vanillin für alle Phenylpropanbausteine des Lignins angenommen hat.

Durch die Isolierung der Indophenole III und IV ist das Vorkommen von Vanillylalkoholgruppen im Fichtenholzlignin bzw. von Vanillylalkohol- und Syringaalkoholgruppen im Laubholzlignin eindeutig nachgewiesen.

Hrn. Prof. E. Adler, Chalmers Tekniska Högskola, Göteborg, und Hr. Prof. E. Hägglund, Svenska Träforskningsinstitutet, Stockholm, danke ich für ihr förderndes Interesse an dieser Arbeit.

### Beschreibung der Versuche

Isolierung des 2-Methoxy-phenolindophenols (III) nach Kupplung von Chinonmonochlorimid mit entharztem Fichtenholzmehl: 250 g mit Benzol-Alkohol (1:1) entharztes Fichtenholzmehl wurden mit der Lösung von 2.8 g Chinonmonochlorimid in 500 ccm Äthanol gut durchfeuchtet und 5 Stdn. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Hierauf wurde mit 2 l 0.25-proz. Natronlauge versetzt. Die Lösung färbte sich rasch tiefgrünblau. Nach 24stdg. Aufbewahren bei Zimmertemperatur unter zeitweiligem Umschütteln wurde vom Holzmehl abfiltriert, 2 mal mit etwas 0.25-proz. Natronlauge nachgewaschen und in die intensiv grünblaue Lösung bis zum deutlichen Farbumschlag nach Rot Kohlendioxyd eingeleitet. Der Farbstoff konnte dann der wäßrigen Lösung durch 5maliges Ausschütteln mit je 200 ccm Chloroform entzogen werden. Die vereinigten Chloroform-Extrakte wurden auf ca. 200 ccm eingengt, von geringem Niederschlag durch Filtration befreit und mit 14 g  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (nach Brockmann) versetzt. Destilliert man hierauf das Chloroform i. Vak. ab, so wird die gelöste Substanz gleichmäßig auf  $\text{Al}_2\text{O}_3$  adsorbiert. Es wurde vollkommen trocken gesaugt und der Rückstand (auf  $\text{Al}_2\text{O}_3$  adsorbierte Substanz) über eine in einem zylindrischen Scheidetrichter ( $\varnothing$  4.5 cm) befindliche, 8 cm lange  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Säule geschichtet. Durch leichtes Klopfen an der Trichterwand vor und nach Eintragen des Adsorbates konnte eine scharfe Abgrenzung der I cm hohen, rotvioioletten Schicht erreicht werden. Hierauf wurde mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$  vorsichtig über-

<sup>4)</sup> Svensk kem. Tidskr. 64, 21 [1952].

schichtet und auf das Ganze schließlich ein Wappetropfen aufgesetzt. Die Eluierung mit wassergesättigtem Chloroform wurde mit dem Hahn des Scheidetrichters so reguliert, daß 20 Tropfen pro Minute abtropften.

Das 2-Methoxy-phenolindophenol wanderte sehr langsam als prächtig violettes Band durch die  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Säule. Die austretende rote Chloroform-Lösung (insgesamt ca. 6 l) der Substanz wurde i. Vak. auf ca. 150 ccm eingengt, nach Zusatz von 250 ccm Hexan mit einem Glasstab etwas angerieben und im Eisschrank 24 Stdn. aufbewahrt. Es wurde dann vom ausgefallenen Niederschlag abdekantiert und dieser nochmals aus Chloroform-Hexan umkristallisiert. Das Indophenol wurde hierbei in schönen roten lanzettenförmigen Kristallen erhalten. Ausb. 165 mg, Schmp. 168–170°.

$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$  (229.2) Ber. N 6.11  $\text{OCH}_3$  13.55 Gef. N 6.12  $\text{OCH}_3$  13.56

Isolierung des 2-Methoxy-phenolindophenols (III) und des 2,6-Dimethoxy-phenolindophenols (IV) nach Kupplung von Chinonmonochlorimid mit entharztem Espenholzmehl (Mengenverhältnisse und Arbeitsweise wie beim Versuch mit Fichtenholzmehl): Bei Verwendung einer 10 cm langen  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Säule und von wasserfreiem Chloroform als Eluierungsmittel gelang es, das rascher wandernde 2,6-Dimethoxy-phenolindophenol (IV) (in adsorbiertem Zustand rotviolett) vom 2-Methoxy-phenolindophenol (III) (in adsorbiertem Zustand blauviolett) zum größten Teil zu trennen. Da die Zonengrenzen in der  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Säule wegen der ähnlichen Farbtöne der beiden Indophenole in adsorbiertem Zustand nur undeutlich sichtbar waren, wurde die sehr zeitraubende Eluierung in regelmäßigen Zeitabständen laufend papierchromatographisch (siehe S. 262) verfolgt. Die erste Fraktion enthielt 269 mg papierchromatographisch reines 2,6-Dimethoxy-phenolindophenol (IV), das aus Chloroform-Hexan in schönen gelbroten sternchenförmigen Kristallen anfiel. Schmp. 182.5–185°.

$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}$  (259.3) Ber. N 5.4  $\text{OCH}_3$  23.9 Gef. N 5.38  $\text{OCH}_3$  23.98

Die Substanz wurde vor der Analyse i. Hochvak. bei 70° getrocknet.

Es folgte dann eine Mittelfraktion (145 mg), die aus einem Gemisch beider Indophenole bestand und die nicht weiter aufgetrennt wurde.

Sobald im Eluat papierchromatographisch kein 2,6-Dimethoxy-phenolindophenol mehr festzustellen war, wurde die nunmehr tiefbraunrote Schicht des vor Beginn der Säulenchromatographie eingetragenen Adsorbates, sowie eine daran anschließende gelbe Zone vorsichtig entfernt und hierauf die Eluierung des in der Säule verbliebenen Restes mit 96-proz. Äthanol fortgesetzt. Die alkohol. Lösung wurde i. Vak. zur Trockne eingengt, der Rückstand (115 mg) mit Chloroform ausgezogen, die Chloroform-Lösung vom Ungelösten abfiltriert und erneut einer Säulenchromatographie ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Chloroform als Elutionsmittel) unterworfen. Aus den mittleren Fraktionen des Eluates konnte nach Einengen durch wiederholtes Umfällen aus Chloroform-Hexan papierchromatographisch reines 2-Methoxy-phenolindophenol (III) in Form von gelbroten Lanzetten gewonnen werden. Ausb. 22 mg; Schmp. 167–169°.

$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$  (229.2) Ber. N 6.11  $\text{OCH}_3$  13.55 Gef. N 5.85  $\text{OCH}_3$  13.72

In den letzten Fraktionen dieser zweiten Säulenchromatographie konnte papierchromatographisch Phenolindophenol nachgewiesen werden. Es ist jedoch fraglich, ob dieses durch Kupplung von Chinonmonochlorimid mit *p*-Hydroxybenzylalkoholgruppen des Lignins entstanden ist, da die Bildung einer geringen Menge dieses Indophenols auch bei bloßer Einwirkung von NaOH auf Chinonmonochlorimid beobachtet werden konnte. Durch Wiederholung des Kupplungsversuches unter Verwendung eines substituierten Chinonmonochlorimides dürfte diese Frage am einfachsten zu klären sein.

Isolierung des 2-Methoxy-phenolindophenols (III) nach Kupplung von Chinonmonochlorimid mit „native lignin“ aus Fichtenholz: 1 g „native lignin“ (14.68%  $\text{OCH}_3$ ) wurde in 100 ccm Äthanol gelöst, mit der Lösung von 0.6 g Chinonmonochlorimid in 30 ccm Äthanol und hierauf mit 100 ccm  $n_{20}$  NaOH versetzt und 24 Stdn. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die grünblaue Lösung wurde im Scheidetrichter mit ca. 100 ccm Chloroform unterschichtet und durch Einleiten von Kohlendioxyd neutralisiert (Farbumschlag nach Rot). Durch den lebhaften  $\text{CO}_2$ -Strom wurde der rote Farbstoff der wäßrig-alkohol. Schicht zum größten Teil entzogen, bevor

noch aus dieser das nach der Spaltungsreaktion zurückgebliebene „Restlignin“ teilweise ausgefallen war. Bei dieser Arbeitsweise werden Verluste an Farbstoff, die durch Adsorption am „Restlignin“ entstehen können, weitgehend vermieden. Es wurde weitere 4 Male mit Chloroform ausgeschüttelt und die Chloroform-Extrakte vereinigt. Die weitere Reinigung durch Säulenchromatographie erfolgte wie beim Fichtenholzmehl beschrieben.

Es wurden 54 mg kristallisiertes 2-Methoxy-phenolindophenol (III) erhalten, d. s. rund 37% der kolorimetrisch ermittelten Menge<sup>1)</sup> an Gruppen Ia und Ib (145.5 mg). Schmp. 167–169°.

$C_{13}H_{11}O_3N$  (220.2) Ber. N 6.11  $OCH_3$  13.55 Gef. N 5.84  $OCH_3$  13.33

In der Mutterlauge konnte wieder papierchromatographisch Phenolindophenol nachgewiesen werden, und es gilt das im vorstehenden Abschnitt Gesagte.

Darstellung von 2-Methoxy-phenolindophenol (III) und von 2,6-Dimethoxy-phenolindophenol (IV) aus Modellsubstanzen: Die Indophenole III und IV wurden aus Guajacol und aus Äthyl-guajacyl-carbinol (II,  $R = H$ ,  $R' = C_2H_5$ ) bzw. aus Pyrogallol-1,3-dimethyläther und aus Syringaalkohol durch Kupplung mit der äquimolaren Menge Chinonmonochlorimid in schwach alkalischer Lösung dargestellt.

Reinigung wie auf S. 260 beschrieben. Analysenwerte und Schmelzpunkte siehe Tafel 1. Papierchromatographisches Verhalten siehe Tafel 2.

Papierchromatographie der Indophenole: Für die papierchromatographische Trennung und Identifizierung der ligninchemisch interessanten Indophenole wurde mit 25-proz. Ammoniak ( $d$  0.91) gesättigtes *n*-Butanol als Lösungsmittelgemisch verwendet. Es wurde in sorgfältig abgedichteten Glaskammern auf Whatman-Papier Nr. 1 aufsteigend und bei einigen Versuchen auch absteigend chromatographiert.

Die als Indophenolate wandernden Substanzen hatten bei dieser Arbeitsweise genügend unterschiedliche  $R_F$ -Werte und zeigten sehr charakteristische Farbtöne, sowohl in der  $NH_3$ -gesättigten Atmosphäre der Chromatographiekammer, als auch beim und nach dem Trocknen an der Luft (siehe Tafel 2). Ein Nachteil der Methode liegt jedoch darin, daß die Indophenole während der Chromatographie in noch nicht näher untersuchter Weise chemisch verändert werden und daher nachher nicht mehr in der ursprünglichen Form isoliert werden können. So gibt analytisch reines 2-Methoxy-phenolindophenol (III) bei dieser Chromatographie 2 Flecken, die jedoch auf Grund ihrer charakteristischen Farbe vor allem beim und nach dem Trocknen an der Luft sehr leicht erkannt werden können. Das 2,6-Dimethoxy-phenolindophenol (IV) gibt zwar nur einen Fleck, wird aber ebenfalls während der Chromatographie chemisch verändert.

Alle Versuche, die Indophenole in neutralen Lösungsmittelgemischen zu chromatographieren, schlugen bisher fehl, da sie in Wasser zu schlecht, in allen untersuchten organischen Lösungsmitteln dagegen zu leicht löslich sind und daher mit der Lösungsmittelfront wandern. Auch einige Versuche, mit Hilfe der sogenannten „reversed phase chromatography“ (Verwendung acetylierten Papiers) die Indophenole zu trennen, führten nicht zum Ziel.

---