

KARL FREUDENBERG und BERNHARDT LEHMANN

Aldehydische Zwischenprodukte der Ligninbildung

Aus dem Chemischen Institut der Universität und dem
Forschungsinstitut für die Chemie des Holzes und der Polysaccharide, Heidelberg
(Eingegangen am 1. März 1960)

Unter den Zwischenprodukten der enzymatischen Ligninbildung *in vitro* wurden die Aldehyde des Dehydro-diconiferylalkohols (E) und des Guajacyl-glycerin-coniferyläthers (F) gefunden. E wurde durch Natriumborhydrid in den bekannten Dehydro-diconiferylalkohol (A) umgewandelt. Die Konstitution von F wurde aus dem Zwischenprodukt der Ligninbildung Guajacyl-glycerin-coniferyläther (C) abgeleitet. Der kristallinisch erhaltene Dinitrophenyläther von C liefert bei der Oxydation mit Mangandioxyd den Dinitrophenyläther von F. Die Menge der aldehydischen Zwischenprodukte E und F beträgt einige Prozente der übrigen Ligninbausteine. Ihre Isolierung ist möglich geworden nach umfassenden Studien über die geeigneten Gemische für die Papier- und Säulenchromatographie. Eine Übersicht über die Papierchromatogramme wird mitgeteilt.

In den zwei letzten Jahren wurde es zur Gewißheit, daß das biosynthetische Lignin aus Coniferylalkohol und das Coniferenlignin, abgesehen von einigen Prozenten *p*-Cumar- und Sinapinalkohol-Komponente im Naturstoff, identisch sind und daß auch ihr Bildungsmechanismus übereinstimmt¹⁻⁴⁾. Die Zwischenprodukte, die bei der Biosynthese auftreten, geben daher Auskunft über die Konstitution des Lignins. Wenn Coniferylalkohol in Gegenwart von Luftsauerstoff in verdünnter wäßriger Lösung der Wirkung der Laccase, eines kupferhaltigen Proteins, ausgesetzt wird, so lassen sich in einem bestimmten Stadium der Dehydrierung durch Chromatographie etwa 40 verschiedene Abwandlungsprodukte des Coniferylalkohols erkennen. Die mengenmäßig wichtigsten unter ihnen sind isoliert und durch Abbau oder Synthese aufgeklärt worden. Sie sind der Dehydro-diconiferylalkohol A (II), das DL-Pinoresinol B und der Guajacyl-glycerin-coniferyläther C (IV). Ihre Bildung läßt sich durch die Annahme erklären, daß der des Phenolwasserstoffs beraubte Coniferylalkohol, ein Aroxylradikal, in verschiedenen mesomeren Zuständen auftritt und daß diese Radikale sich durch Dimerisation absättigen. Neben diesen hauptsächlichen Zwischenprodukten tritt in minimaler Menge der Coniferylaldehyd I (D) auf. Er entsteht wohl durch Autoxydation aus Coniferylalkohol ohne Mitwirkung von Enzymen.

Bei der Suche nach weiteren Zwischenprodukten diente als Ausgangsmaterial das Gemisch der Zwischenprodukte, das aus Coniferylalkohol nach dem Zulauf-Verfahren hergestellt⁵⁾ und mit Butanol bei gewöhnlicher Temperatur extrahiert wurde. Zur

1) K. FREUDENBERG, Chem. Ber. 92, LXXXIX [1959].

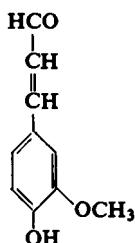
2) Bull. Soc. chim. France 1959, 1748.

3) Nature [London] 183, 1152 [1959].

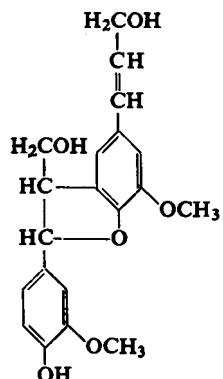
4) K. FREUDENBERG, J. prakt. Chem. 10, 220 [1960].

5) K. FREUDENBERG, Angew. Chem. 68, 508 [1956].

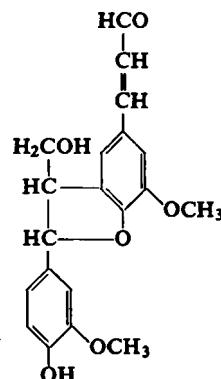
ersten Trennung wird dieser Extrakt auf eine große Cellulosesäule gebracht. Zur Elution dient ein Gemisch von Xylool und Dimethylformamid (9 : 2 Vol.). Die Fraktionen, die eine gesuchte Substanz enthalten, werden im Vakuum eingeengt und erneut mit demselben Lösungsmittelgemisch über eine kleinere Cellulosesäule geführt.



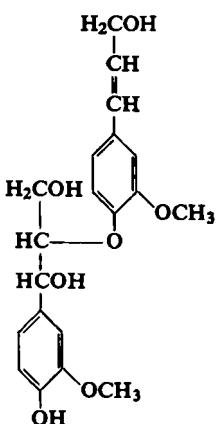
I (D)
Coniferylaldehyd



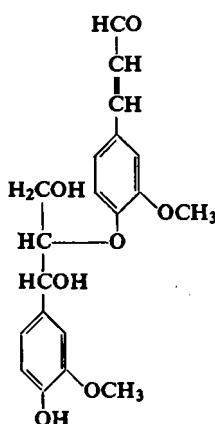
II (A) Dehydro-diconiferylalkohol



III (E) Aldehyd des
Dehydro-diconiferylalkohols



IV (C) Guajacyl-
glycerin-coniferylather

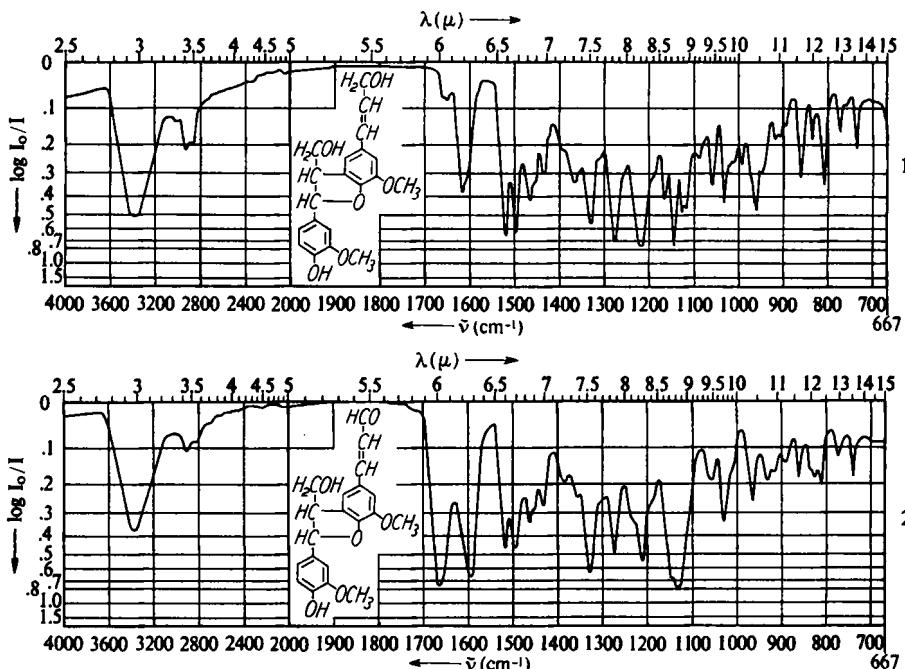


V (F) Aldehyd des Guajacyl-
glycerin-coniferylathers

In der Masse der Dehydrierungsprodukte lassen sich zwei weitere Carbonylverbindungen dadurch erkennen, daß sie im Papierchromatogramm die Fluoreszenz des Papiers im UV-Licht auslöschen und als dunkle Flecken erscheinen. Ferner geben sie eine braungelbe Färbung beim Besprühen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Mit Phloroglucin-Salzsäure erscheint eine violettrote Färbung, die auf α,β -ungesättigte Carbonylgruppen hinweist⁶⁾. Sie wurden Substanz E und F genannt. Mit Diazo-benzolsulfonsäure färbt sich E rot und F gelb. E verläßt die Säule früher als F.

6) J. v. WIESNER, S.-B. Akad. Wiss. Wien, math.-naturwiss. Kl. 77, 60 [1878]; E. ADLER, K. J. BJÖRKQUIST und S. HÄGOROTH, Acta chem. scand. 2, 93 [1948]; E. ADLER und L. ELLMER, ebenda 2, 839 [1945].

Aus einem Teil der Fraktionen von E wurde das 2,4-Dinitrophenylhydrazone in Kristallen gewonnen, aus einem anderen Teil die Substanz selbst in kristalliner Form. Sie wurde durch Natriumborhydrid zum Dehydro-diconiferylalkohol A (II) reduziert, der in Kristallen isoliert wurde. Die Analyse des Dinitrophenylhydrazons und der freien Substanz E sowie das Infrarot- und Ultraviolettspektrum beweisen die Konstitution III eines Aldehyds des Dehydro-diconiferylalkohols A (II).



IR-Spektren des Dehydro-diconiferylalkohols (A) (Abbildung. 1)
und des entsprechenden Aldehyds (E) (Abbildung. 2), gepreßt in KBr

Es gelang nicht, die Substanz F zur Kristallisation zu bringen, woran möglicherweise die zur Umlagerung neigende sek. α -Carbinolgruppe schuld ist. Der Dinitrophenyläther kristallisiert. Es gelang, den früher beschriebenen Dinitrophenyläther des Guajacyl-glycerin-coniferylathers mit aktivem Mangandioxyd⁷⁾ zum Dinitrophenyläther des ungesättigten Aldehyds V zu oxydieren, der sich mit dem Dinitrophenyläther des Aldehyds F (V) identisch erwies.

Der Anteil der beiden Aldehyde beträgt in dem Gemisch der Zwischenprodukte nur einige Prozente. Wie alle niedrigmolekularen Zwischenprodukte verschwinden sie bei der weiteren Dehydrierung des Gemisches der niedrigmolekularen Bausteine. Da die Verbindungen Phenole sind, können sie auf verschiedene Weise in das Ligningefüge eingebaut werden. Die Aldehyde E und F können aus den zugehörigen Alkoholen A und C durch Autoxydation entstehen; tatsächlich oxydieren sich A (II) und C (IV) an der feuchten Luft zu den Aldehyden. Es ist aber auch möglich, daß sie sich durch

⁷⁾ Übersicht: R. M. EVANS, Quart. Rev. (chem. Soc., London) 13, 61 [1959].

Dehydrierung eines Gemisches von zunächst gebildetem Coniferylaldehyd mit Coniferylalkohol bilden. Die Aldehyde D, E und F sind, in das Lignin eingebaut, die wesentlichen Träger jener Farbreaktionen, die auf Zimtaldehydgruppen zurückzuführen sind.

Durch Gegenstromverteilung wurden größere Mengen des früher beschriebenen Guajacyl-glycerin-coniferyläthers C (IV) gewonnen. Es gelang, den Tetra-azobenzoyl-ester sowie den Dinitrophenyläther von C zur Kristallisation zu bringen.

Vor kurzem wurde die Isolierung weiterer Zwischenprodukte der Ligninbildung erwähnt^{1-3,8)}. Sie färben sich mit Diazobenzolsulfonsäure violett- bzw. braun-rot. Sie entstehen aus dem Chinonmethid C^{1,2,9)}, das die Vorstufe der Substanz C (IV) ist, durch Addition von Coniferylalkohol bzw. von Dehydro-diconiferylalkohol A. In vorläufigen Formeln¹⁻³⁾ dieser Substanzen H und J wurde angenommen, daß sich die Zimtalkoholgruppen des Coniferylalkohols und der Substanz A an das Chinonmethid addieren. Die naheliegende Annahme, daß die Phenolgruppen diese Reaktion eingehen, wurde damals zurückgestellt, weil stereochemische Bedenken bestanden. Diese haben sich als unberechtigt erwiesen^{4,10)}. Die Substanzen H und J sind α,β -Bis-aryläther des Guajacyl-glycerins, H ist Guajacyl-glycerin- α,β -bis-coniferyläther, J ist Guajacyl-glycerin- α -[dehydro-diconiferyl]- β -coniferyläther.

Die zahlreichen Zwischenprodukte der Ligninbildung erscheinen bei der Dehydrierung des Coniferylalkohols und verschwinden im Verlauf der weiteren Dehydrierung in dem Maße, wie sich höhere Aggregate bilden. Von den zwischendurch in größter Menge auftretenden Zwischenprodukten A (II), B (Pinoresinol) und C (IV) verschwindet B schneller als A und C sowie A schneller als C. H und J treten verhältnismäßig früh in reichlichen Mengen auf und verschwinden alsbald wieder. Andere finden sich nur in geringer, zum Teil in sehr geringer Menge, sei es, daß sie nur in beschränktem Umfang entstehen oder alsbald nach ihrer Bildung bevorzugt weiter reagieren. Das letztere dürfte vor allem von der Substanz K (Bis-dehydro-coniferylalkohol) gelten, die ein Diphenylderivat¹¹⁾ ist.

Die bisher isolierten und in der Konstitution aufgeklärten Zwischenprodukte der Ligninbildung sind:

- A Dehydro-diconiferylalkohol (II)¹²⁾
- B DL-Pinoresinol¹⁻⁴⁾
- C Guajacyl-glycerin- β -coniferyläther (IV)¹²⁾
- D Coniferylaldehyd (I)¹²⁾
- E Aldehyd des Dehydro-diconiferylalkohols (III)¹²⁾
- F Aldehyd des Guajacyl-glycerin-coniferyläthers (V)¹²⁾
- G Dehydro-dipinoresinol^{1-4,8)}
- H Guajacyl-glycerin- α,β -bis-coniferyläther⁴⁾
- J Guajacyl-glycerin- α -[dehydro-diconiferyl]- β -coniferyläther^{4,10)}
- K Bis-dehydro-coniferylalkohol^{2,4,1)}
- L DL-Epipinoresinol^{11a)}

⁸⁾ K. FREUDENBERG und A. SAKAKIBARA, Liebigs Ann. Chem. 623, 129 [1959].

⁹⁾ K. FREUDENBERG und G. GRION, Chem. Ber. 92, 1355 [1959].

¹⁰⁾ K. FREUDENBERG und M. FRIEDMANN, unveröffentlicht.

¹¹⁾ K. FREUDENBERG und K.-C. RENNER, unveröffentlicht.

^{11a)} inzwischen aufgefunden. ¹²⁾ Formel in dieser Abhandlung.

Schema der Chromatogramme im Gemisch II (Xylo/Methyläthylketon/

Gemisch II		Farbe mit Diazobenzolsulfonsäure	a) UV ohne, b) mit Diazobenzolsulfinsäure c) Dinitrophenylhydrazin	Gemisch I	
Substanz	RF			Substanz	RF
—Start				—Start	
29		gelb		29	
28		gelb			
26		gelb		27	rosa
25	25	gelb			
24	23	violettrot		26	
		gelb		24	
22		rotviolett			25
21		braungelb			
J		violettrot		J	
C	0.040	gelb		23	
20		gelb		22	
K		rotbraun			
19		rotviolett			
18		gelb			
17		violett		21	
16	0.070	braungelb			
15		braungelb			
H	0.083	violett		17	
F	0.089	gelb	b) dunkler Fleck c) braungelb	K	
A	0.110	rot		H	
G	0.115	dunkelrot		14	rosa
				C	0.090
				G	0.100
					120 h
48 h					
13	0.128	braunrosa	a) ultramarinblaue Fluoreszenz	19	0.110
12	0.142	dunkelrot		20	0.118
				16	0.126
				15	0.137
				13	0.156
11	0.170	dunkelrot		A	0.170
				F	0.172
					48 h

Formamid 25:25:1 Vol.) und Gemisch I (Xylool/Dimethylformamid 9:2 Vol.)

Gemisch II		Farbe mit Diazobenzolsulfinsäure	a) UV ohne, b) mit Diazobenzolsulfinsäure c) Dinitrophenylhydrazin	Gemisch I	
Substanz	RF			Substanz	RF
11	0.170	dunkelrot		A	0.170
				F	0.172
10	0.200	dunkelgelb		12	0.200
9	0.210	violettrot	a) dunkelbl. Fluoresz. b) grünbl. Fluoresz.	11	0.219
Conif.- Alkohol	0.240	violett		10	0.235
				9	0.30
E	0.32	dunkelrot	a) dunkler Fleck c) braun	E	0.32
8	0.38	rosa		Conif.- Alkohol	0.37
B	0.43	rot		B	0.42
16 h					18 h
7	0.45	rot		6	0.46
6	0.47	rosa	a) hellblaue Fluoresz.		
Vanillin	0.51	braungelb	b) dunkelblau c) braun	5	0.52
D	0.53	zitronengelb	a) stabili. Fluoresz. c) braun	4	0.54
				D	0.57
5	0.60	dunkelgelb		Vanillin	0.59
				1	0.62
4	0.73	rosa	a) dunkler Fleck	3	0.65
3	0.80	orangerot	a) hellblaue Fluoresz. b) violette Fluoresz.		
2	0.91	weinrot	a) ultram.-bl. Fluor. b) dunkelroter Fleck	2	0.70
5 h					4 1/2 h
1	0.92	ziegelrot	b) rotbraun-orange		

In der vorstehenden Tabelle werden in schematisierter Form die mit zwei Lösungsmittelgemischen entwickelten Chromatogramme der Lignin-Zwischenprodukte mitgeteilt. Die beiden Schemata entstehen durch das Aneinandersetzen von 4 je 50 cm langen Chromatogrammen, deren jeweilige Laufzeit bei den Substanzen angegeben ist, die dann gerade das Ende des Papierbogens erreichen. Sie können auch unmittelbar von einem 2 m langen Chromatogramm erhalten werden. Die Flecke sind durch senkrechte Striche bezeichnet, deren Länge etwa den relativen Mengen entspricht; das Diagramm gilt für Zwischenprodukte, die sowohl nach dem Zulauf- wie Zutropf-Verfahren⁵⁾ hergestellt waren. Wie schon erwähnt, diente für diese Arbeit ein biosynthetisches Lignin, das nach dem Zulauf-Verfahren hergestellt war. Mit dieser Bezeichnung soll ausgedrückt werden, daß man den Coniferylalkohol auf einmal zu der Lösung des Enzyms zulaufen läßt. Im Gegensatz dazu entsteht das Zutropf-Lignin dadurch, daß zur belüfteten Enzylösung die verdünnte Lösung des Coniferylalkohols in dem Maße zutropft, wie er verbraucht wird. Die Mischungen von Zwischenprodukten, die nach beiden Verfahren entstehen, unterscheiden sich in der Menge der einzelnen Bestandteile. Neben den Hauptkomponenten A–C überwiegen beim Zulauf-Verfahren die violettrot-kuppelnden Substanzen bis zum Verschwinden des Coniferylalkohols, besonders H und J. Letztere treten im Zutropf-Verfahren zurück gegenüber den gelb-kuppelnden Substanzen 16, 23, 26 und 29, den Substanzen E und F und auch G. Substanz G ergibt in Gemisch I einen besonders langen, schmalen Fleck. Substanz K ist am besten in einem hydrierten Ansatz durch die Fluoreszenz im kurzweligen UV zu erkennen.

Wo R_F -Werte unter 0.1 angegeben sind, geschieht dies nur, um das Verhältnis zu den R_F -Werten der benachbarten Substanzen zu kennzeichnen. Die gleiche Bedeutung hat die in einigen Fällen eingetragene dritte Dezimale der R_F -Werte. – Die R_F -Werte sind zur Hauptsache eine Funktion des Hydroxylgehaltes pro ursprüngliche Coniferylalkoholeinheit und der Zahl dieser Einheiten im Molekül.

Dem WIRTSCHAFTSMINISTERIUM VON BADEN-WÜRTTEMBERG und dem FONDS DER CHEMIE danken wir für die Bereitstellung von Mitteln. Wir danken Fräulein S. SCHWAB für die Herstellung des Coniferylalkohols.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Zur Chromatographie diente die Mischung von Xylol/Dimethylformamid (9 : 2 Vol., Gemisch I) und Xylol/Methyläthylketon/Formamid (25 : 25 : 1 Vol., Gemisch II¹³⁾). Das Papier (Schleicher & Schüll 2043 b mgl) wird bei Verwendung von Gemisch I mit Aceton/Dimethylformamid (8 : 2) 15 Min. getränkt. Man läßt das Aceton verdunsten und trägt die Probe in einem leicht verdunstenden Lösungsmittel auf. Im Falle von Gemisch II wird mit Essigsäure-äthylester/Formamid (8 : 2 Vol.) getränkt. Während die Chromatogramme laufen, muß die Feuchtigkeit sorgfältig ferngehalten werden. In beiden Fällen müssen die zu besprühenden Chromatogramme getrocknet werden. Bei Gemisch I genügt der Heißluftstrom des Föns, bei Gemisch II kann außerdem 10 Min. bei 90°/15 Torr getrocknet werden. Die Diazobenzolsulfinsäure (0.01 g) wird vor dem Gebrauch mit 0.2 g Na₂CO₃ in 10 ccm Wasser gelöst. Zum

¹³⁾ A. ZAFFARONI, R. B. BURTON und E. H. KEUTMANN, Science [New York] 111, 6 [1950]; R. B. BURTON, A. ZAFFARONI und E. H. KEUTMANN, J. biol. Chemistry 188, 763 [1951]; F. KAISER, Chem. Ber. 88, 556 [1955].

Erkennen der Carbonylgruppe wird mit einer gesätt. Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2 n HCl besprüht (gelbbraune Färbung). Die R_F -Werte einiger Dinitrophenyläther (Gemisch I) seien mitgeteilt:

2,4-Dinitrophenyläther von	R_F
Coniferylaldehyd	0.71
Coniferylalkohol	0.65
Substanz F	0.53
Substanz C	0.43
Substanz H	0.23
Substanz J	0.15

Herstellung der Mischung der Zwischenprodukte (Zulauf-Verfahren): 5 l Wasser, in denen 500 Enzymeinheiten¹⁴⁾ enthalten sind, werden mit 1 l Citratpuffer, pH 5.5¹⁴⁾ sowie 5 l einer 0.6-proz. Lösung von Coniferylalkohol in Wasser versetzt. Diese Lösung wird durch Schütteln von 30 g Coniferylalkohol mit 5 l Wasser während 90 Min. mit folgender Filtration hergestellt. Durch eine Fritte strömen stündlich 15 l Luft in die zu rührende Mischung. Die Temperatur wird auf 20° gehalten. Nach 45 Min. beginnt die Trübung. Nach 8 1/2 Stdn. wird die Luftzufuhr abgestellt und die Reaktion durch Zugabe von 1 g Natriumcyanid unterbrochen. Der Coniferylalkohol ist zu diesem Zeitpunkt gerade verbraucht. Unter Rühren werden 1.9 kg reines Natriumchlorid eingetragen. Dabei fällt ein großer Teil der Produkte aus. Flüssigkeit und Niederschlag werden mit 2.2 l Butanol-(1) in 5 Portionen ausgeschüttelt; die wässrige Schicht gibt mit sodaalkalischer Diazobenzolsulfonsäurelösung fast keine Farbreaktion mehr. Die ausgeschiedenen höhermolekularen Anteile sammeln sich in der Grenzschicht an. Sie werden mit Butanol ausgewaschen und entfernt. Die aus zwei Ansätzen stammenden Butanol-extrakte (je 30 g Coniferylalkohol) werden vereinigt und – die letzten zuerst – i. Vak. unter Stickstoff bei einer Badtemperatur von 55° zu einem hellbraunen Sirup eingedampft, wobei sich Natriumchlorid abscheidet. Der Sirup wird in 300 ccm trockenem Dimethylformamid gelöst und durch Zentrifugieren von Natriumchlorid befreit. Unter 3 Torr werden 120 ccm abdestilliert. Die Lösung wird unter Rühren mit 20 g Cellulosepulver und 810 ccm Xylol versetzt. Dabei schlägt sich der größte Teil des Materials in feiner Verteilung am Cellulosepulver nieder.

Erste Trennung: Hierfür wird eine große, unterteilte Säule verwendet. Ihre 4 Einheiten, je 40 cm hoch und 9 cm breit, sind mit einer Filterplatte G 2 als Boden und oben mit einem kleinen seitlichen Ansatzstutzen versehen. Die Schliffe werden mit wenig Silikonfett gedichtet.

500 g Linterspulver Nr. 124, Schleicher & Schüll, werden in 2.5 l Dimethylformamid mit einem rasch laufenden starken Rührer in dünnem Strahl eingerührt. Der Brei wird rasch in einen Säulenteil eingegossen und mit einem Vibromischer innerhalb einiger Minuten von unten nach oben durchgemischt. Man verschließt oben mit einem großen Gummistopfen und lässt 9 Stdn. absitzen, wobei von Zeit zu Zeit aufgeschlammtes Cellulosepulver nachgefüllt wird; beim obersten Säulenteil lässt man 2 cm unter dem Ansatz frei. Die Gesamthöhe der Cellulosefüllung beträgt 130 cm. In der zusammengesetzten Säule werden die Flüssigkeitsspiegel bei einer Tropfgeschwindigkeit von 20 ccm in 8 Min. einreguliert; zum Equilibrieren werden 25 l Xylol/Dimethylformamid (9 : 2 Vol., Gemisch I) durchgegeben.

Das beladene Cellulosepulver wird auf den obersten Säulenteil gebracht und zunächst die beim Ausfällen entstandene gesättigte Lösung durchgesetzt, worauf reines Lösungsmittelgemisch folgt. Je 40 ccm werden in Bechergläsern bei 50°/15 Torr im Vakuumtrockenschränk bis zur Sirupkonsistenz eingedampft. Die Fraktionen werden chromatographiert (S. 1360), ihre

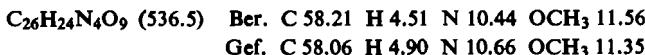
¹⁴⁾ D'Ans-LAX, Taschenbuch für Chemiker und Physiker, Springer-Verlag, Berlin 1943, S. 1592.

Zählung erfolgt vom Austreten der Substanz 2 ab. Sie verlassen die Säule, von wenigen Ausnahmen abgesehen, entsprechend dem Schema zu Gemisch I der Tabelle auf S. 1358 und 1359.

Feintrennung: Es wird eine kleinere, sechsteilige Säule verwendet, deren Einheiten 34 cm hoch und 3 cm breit sind. Die Gesamthöhe der Cellulosefüllung beträgt 120 cm. Die Teile werden locker mit trockenem Pulver gestopft. Man lässt 1 l Dimethylformamid, dann 4 l Gemisch von Xylool/Dimethylformamid (9 : 2) durchlaufen, reguliert die Flüssigkeitsspiegel, bringt das Cellulosepulver (3.5 g) mit dem Material oben auf und beginnt die Eluierung mit Gemisch I mit einer Tropfgeschwindigkeit von 20 ccm in 15 Min.

Substanz E: Die Fraktionen 55—240 der ersten Trennung (je 40 ccm) wurden auf 3 kleinen Säulen zur Feintrennung eingesetzt; auf der ersten Säule Fraktion 55—130, auf der zweiten 131—201 und auf der dritten 202—240.

Dinitrophenylhydrazon: Die Rückstände der 40-ccm-Fraktionen 17—19 der ersten kleinen Säule, die neben Substanz E noch Substanz B enthielten, wurden in 10 ccm absol. Äthanol gelöst, von Ungelöstem abgesaugt und tropfenweise unter Umschütteln mit 2 ccm Dinitrophenylhydrazin-Lösung¹⁵⁾ versetzt. Sofort fiel ein Niederschlag aus. Er wurde nach 15 Stdn. mit Alkohol gewaschen, aus warmem Äthanol/Wasser umgefällt und aus absol. Äthanol umkristallisiert. Ausb. 21.5 mg Polyeder, Schmp. 185—186°.



Zur Kristallisation der Substanz E wurden zusammengefaßt: von der 1. kleinen Säule Frakt. 20—24, von der 2. Säule Frakt. 49—64 und von der 3. Säule Frakt. 46—62.

Die Lösung des teilweise kristallisierten Materials in 40 ccm Methylenchlorid wurde bei 20° mit Tierkohle aufgeheilt, unter Stickstoff auf 10 ccm eingeeigt und mit Petroläther (40 bis 60°) versetzt. Dabei schieden sich 360 mg hellrötliche Spieße ab. Nach zweimaligem Umkristallisieren auf dieselbe Weise wurden farblose Spieße vom Schmp. 156—157° erhalten, die sich an der Luft rasch gelb färbten. — Aus der Mutterlauge ließen sich noch 70 mg reine Substanz gewinnen. Zur Analyse wurde frisch umkristallisiertes Material mit wenig Methylenchlorid und Äther farblos gewaschen und bei 50° i. Vak. getrocknet.



UV-Spektrum in Dioxan¹⁶⁾/Wasser (9 : 1), 0.016 g/l

λ_{max}	229	272	291—292 (Schulter)	340 μm
$\log \epsilon$	4.28	3.66	3.80	4.24

Substanz A aus E: Die Lösung von 100 mg E in 5 ccm Methanol wurde mit 0.9 ccm 2 n NaOH auf p_{H} 9 gebracht und tropfenweise mit der Lösung von 100 mg Natriumborhydrid in 4 ccm Methanol, die 1 Tropfen 2 n NaOH enthielt, innerhalb von 5 Min. versetzt. Nach 10 Min. hellte sich die rote Lösung nach Hellgelb auf. Nach 2 1/2 Stdn. wurde auf 0° gekühlt und mit 1.1 ccm vorgekühlter HCl (d 1.06) auf p_{H} 3 gebracht. Dabei entwickelte sich Wasserstoff. Nach Zugabe von 20 ccm Wasser und Abdestillieren des Methanols im Stickstoffstrom i. Vak. bei 25° Außentemperatur trübe sich die wäßrige Lösung. Sie wurde mit 50 ccm Chloroform in Portionen extrahiert. Der Chloroformextrakt wurde mit je 5 ccm Wasser, 5-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Als das Chloroform i. Vak. abdestilliert worden war, hinterblieb ein farbloser Schaum (90 mg). Er wurde mit einigen Tropfen einer Mischung von Methylenchlorid und Äther (2 : 1 Vol.) versetzt, wobei sich zunächst alles löste, nach Anreiben aber bald kristallisierte. Nach Waschen mit Methylenchlorid/Äther (1 : 1) wurden 83 mg Rohprodukt erhalten. Sie wurden in 18 ccm Methylenchlorid gelöst. Die Flüs-

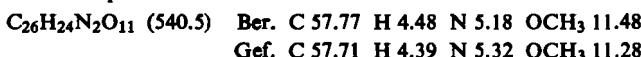
¹⁵⁾ Dinitrophenylhydrazin-phosphat. G. D. JOHNSON, J. Amer. chem. Soc. 73, 5888 [1951].

¹⁶⁾ Gereinigt nach W. STUMPF, Monogr. zu Angew. Chem. und Chemie-Ing.-Technik 68, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1956.

sigkeit wurde mit Tierkohle entfärbt, bis zur beginnenden Ausscheidung auf 6 ccm eingeengt und mit 10% Äther versetzt, wobei wieder eine Lösung erhalten wurde. Die Flüssigkeit wurde mit Petroläther von 40–60° angetrübt und im Eisschrank der Kristallisation überlassen. Nach Waschen mit wenig Methylchlorid wurden 68 mg der Substanz A in weißen Kristallen erhalten, Schmp. 157.5–158.5°. Der Misch-Schmp. mit authent. Material (Schmp. 158.0 bis 158.5°) war 157.5–158.5°. Die IR-Spektren der reduzierten Substanz E und Substanz A sind ebenfalls identisch.

Substanz F: Die zusammengefaßten Fraktionen 378–458 der ersten Trennung wurden zur Feintrennung auf einer kleinen Säule mit Xylo/Dimethylformamid (9:1) eluiert. Dabei ergeben die Fraktionen 105–118 reine Substanz F, 119–139 Substanz F mit wenig Substanz A. Kristallisationsversuche verliefen negativ, auch das Dinitrophenylhydrazon blieb amorph.

Dinitrophenyläther: Die Fraktionen 105–134 wurden nochmals über eine Säule (Durchmesser 1 cm, Höhe der Cellulose 80 cm) mit demselben Lösungsmittel gereinigt. Die Fraktionen 17–23 mit etwa 120 mg reiner Substanz F wurden mit wenig Methylchlorid gewaschen, in 15 ccm Aceton gelöst und mit Tierkohle aufgehellt. Die Lösung wurde i. Vak. auf 5 ccm eingeengt, mit der Lösung von 40 mg NaHCO₃ in 1.5 ccm Wasser und mit 1 ccm Aceton, das 90 mg Dinitrofluorbenzol enthielt, versetzt. Nach 7 Stdn. war die Reaktion beendet (Prüfung durch Tüpfeln mit Diazobenzolsulfosäure). Nach Zugabe von 6 ccm Wasser schied sich ein hellbraunes Öl ab. Nach längerem Stehenlassen im Eisschrank wurden 3 Tropfen Dimethylformamid zugesetzt, worauf das Öl allmählich erstarrte. Nach wiederholtem Umkristallisieren aus Methanol/Wasser und aus Äthanol wurden bei erneuter Verwendung von Methanol/Wasser kleine Prismen erhalten, die, aus Essigester/Methanol (5:1) umkristallisiert, bei 146–147° schmolzen. *R_F*-Wert in Gemisch I: 0.53.



Oxydation des Dinitrophenyläthers der Substanz C: Die Lösung von 0.2 g Dinitrophenyläther der Substanz C (Schmp. 132–133.5° s. unten) in 75 ccm Aceton wurde bei Raumtemperatur 1 1/2 Stdn. mit 2 g 6 Stdn. bei 115° getrocknetem MnO₂^{9,17)} gerührt. Die zentrifugierte Flüssigkeit wurde mitsamt dem zum Auswaschen benutzten Methanol i. Vak. eingedampft, zuletzt nach Zugabe von 10 ccm Chloroform. Der Rückstand wurde mehrmals mit warmem Chloroform extrahiert und ein geringer unlöslicher Anteil entfernt. Die Chloroformlösung wurde auf eine 50 cm hohe, 10 mm weite Aluminiumoxydsäule (Aluminiumoxyd Woelm neutral, mit Chloroform eingeschlämmt) gebracht. Zur Elution ging man vom Chloroform schrittweise zu Essigsäureäthylester und von diesem zu Methanol/Essigsäureäthylester-Mischungen 5:1 und 1:1 über. Die Fraktionen mit der Substanz vom *R_F*-Wert 0.53 (Gemisch I) wurden gesammelt.

Aus Essigester/Methanol (5:1) wurden dicke, weißgelbe Prismen erhalten, die bei 147–149° schmolzen. Kristallisiert man jedoch aus Methanol/Wasser um, so erhält man Nadeln, die bei 136–138° schmelzen. Sie liefern, aus Essigester/Methanol umkristallisiert, die Kristalle vom Schmp. 147–149° zurück. Diese wurden zur Analyse verwendet.



Der Misch-Schmp. mit dem aus dem Dehydrierungsgemisch gewonnenen Präparat liegt bei 146–147°. Die IR-Spektren beider Substanzen sind identisch.

Substanz C wurde aus einem folgendermaßen hergestellten Gemisch der Dehydrierungsprodukte gewonnen. 40 g Coniferylalkohol wurden durch Schütteln in 6 l Wasser gelöst und

¹⁷⁾ J. ATTENBURROW, A. F. B. CAMERON, J. H. CHAPMAN, R. M. EVANS, B. A. HEMS, A. B. A. JANSEN und T. WALKER, J. chem. Soc. [London] 1952, 1094.

von Ungelöstem befreit. Hierzu wurden 1000 Enzymeinheiten⁵⁾ in 6 l Wasser und 1 l Pufferlösung von p_{H} 5.5 gegeben. Nach 20 Min. Belüftung begann die Trübung, nach 5 Stdn. wurde die Reaktion mit 1 g NaCN unterbrochen; bei Eintrühen von 2.2 kg NaCl fiel ein hellgelbes Material aus.

Das Reaktionsgemisch wurde mit 2 l Butanol in 12 Portionen extrahiert, wobei sich fast alles im Butanol löste. Die Extrakte wurden — die letzten zuerst — bei 35° Wasserbadtemperatur unter Stickstoff i. Vak. auf etwa 30 ccm eingedampft, wobei sich NaCl abschied. Der hellgelbe Sirup wurde mit 80 ccm Dimethylformamid versetzt und vom NaCl abgesaugt. Aus dieser Lösung wurde das restliche Butanol i. Vak. abdestilliert, wodurch 60 ccm Konzentrat erhalten wurden.

Eine Gegenstrom-Apparatur mit 200 Gefäßen zu 50 ccm wurde folgendermaßen beschickt: Die Gefäße 3—13 erhielten je 5 ccm des Dimethylformamid-Konzentrates (etwa 35.5 g Substanzgemisch), 20 ccm Wasser und 25 ccm Äther; in die Röhren 1 und 2 sowie 14—200 wurden je 5 ccm Dimethylformamid, 20 ccm Wasser und 25 ccm Äther gegeben. Man arbeitete nach dem Durchlaufverfahren. Zunächst wurde zur Sättigung der Phasen 15 Min. geschüttelt. Dann folgte die erste Überführung. Bis zur 30. Überführung dauerte die Absitzzeit 30 Min., dann 10 und schließlich 5 Min. Die Auf trennung wurde durch Tüpfeln mit diazotierter Sulfanilsäure verfolgt. Sie erfolgte etwa in der Reihenfolge des Schemas für Gemisch II der Tab. S. 1358 und 1359. Durch Chromatographie der unteren Phase mit Gemisch I und II wurden die in der Maschine verbliebenen Substanzen festgestellt. — Die zusammengehörenden Fraktionen wurden unter Stickstoff aus einem Bad von 55° bei 15 Torr auf etwa 150—200 ccm abdestilliert. Jetzt wurde bei 3 Torr weiter eingeengt. Da einige Substanzen (z. B. C) beim Eintrocknen Umwandlungen erleiden, wurden sie unmittelbar in den nicht zu konzentrierten Dimethylformamidlösungen verarbeitet.

Bei der 250. Überführung kristallisierte in den Gefäßen 20—35 Substanz A aus, die abgetrennt wurde. In den Gefäßen 125—132 schied sich die Substanz B ab, die ebenfalls herausgenommen wurde. Substanzen 1 bis 7 waren nach 340 Überführungen, Substanz B bis G nach 800 Überführungen und die große Menge der Substanz A nach etwa 1780 Überführungen aus der Maschine ausgetreten. Die restlichen Substanzen lagen vorgetrennt über die Maschine ausgebreitet vor: Substanz C befand sich mit ihrem Begleiter, Substanz 20, in den Gefäßen 42—85, die, wie oben beschrieben, zu einem Dimethylformamid-Konzentrat von 10 ccm aufgearbeitet wurden.

Feintrennung: Dieses Konzentrat wurde auf die gleiche Weise mit demselben Lösungsmittelgemisch behandelt. Nach 3500 Überführungen lag Substanz C allein in den Gefäßen 100—130 vor, in den Gefäßen 131—180 die Substanzen C und 20. Die Füllung der Gefäße 100—130 wurde entnommen und durch frisches Phasengemisch ersetzt. Nach 4100 Überführungen wurde aus den Gefäßen 140—160 nochmals reines C gewonnen.

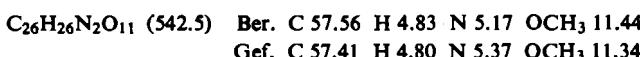
Isolierung der Substanz C: Aus den Fraktionen 101—130 (nach 3500 Überführungen) wurde der Äther i. Vak. abdestilliert. Die verbleibende untere Phase wurde mit NaCl nicht ganz gesättigt und mit 800 ccm Methylenchlorid in 15 Portionen vollständig extrahiert. Die mit Natriumsulfat getrockneten Extrakte wurden i. Vak. unter Stickstoff eingedampft, bis etwa 100 ccm Dimethylformamidlösung zurückblieben. Davon wurden an der Öl pumpe unter Stickstoff noch 10 ccm abdestilliert; über Nacht schied sich ein geringer Salzniederschlag ab, der entfernt wurde; es verblieben 90 ccm erstes Konzentrat der Substanz C.

Auf die gleiche Weise wurden die Gefäße 140—160 (nach 4100 Überführungen) aufgearbeitet. So wurden 20 ccm zweites Konzentrat der Substanz C erhalten.

Dinitrophenyläther der Substanz C: Das zweite Konzentrat der Substanz C wurde mit reinem Dimethylformamid auf 30 ccm verdünnt und unter Rühren mit 600 mg Dinitrofluorbenzol

versetzt; bei der Zugabe von 320 mg Natriumhydrogencarbonat in 10 ccm Wasser trat unter Dunkelfärbung und Erwärmung sogleich eine Trübung ein. Nach 3 Stdn. wurde mit 30 ccm Wasser versetzt und der Niederschlag durch Zusatz von 10 ccm Äthanol teilweise gelöst. Zur Hydrolyse des überschüss. Dinitrofluorbenzols blieb die Mischung 5 Stdn. stehen. Danach wurde die filtrierte Lösung mit weiteren 30 ccm Wasser versetzt, wobei ein weißgelber Niederschlag ausfiel, der langsam kristallinisch wurde. Nach 48 Stdn. hatten sich zusätzlich Nadeln gebildet. Durch Umkristallisation aus 100 ccm warmem Methanol und folgendem Eindunsten auf 60 ccm wurden 0.43 g lange, blaßgelbe Nadeln erhalten, die chromatographisch einheitlich waren. Weitere Umkristallisationen ergaben ein Produkt vom Schmp. 145–146°, jedoch auch manchmal vom Schmp. 130–131°. Beide verhalten sich chromatographisch gleich und sind ineinander überführbar.

Aus 30 ccm des ersten Dimethylformamid-Konzentrates der Substanz C wurden auf die gleiche Weise nach einer Umkristallisation aus Methanol 0.15 g vom Schmp. 130–131° erhalten. Zur Analyse diente das hochschmelzende Produkt, nachdem es 12 Stdn. i. Vak. über P_2O_5 – $CaCl_2$ bei 65° getrocknet worden war.



R_f in Gemisch I 0.43.

Tetra-azobenzoylester der Substanz C: 20 ccm des ersten Dimethylformamid-Konzentrates der Substanz C wurden bei 35° Wasserbadtemp. und 3 Torr unter Stickstoff auf 0.5 ccm eingegengt und mit 30 ccm trockenem Pyridin sowie mit 1.29 g Azo-benzoylchlorid¹⁸⁾ in kleinen Portionen versetzt. Nach 1 stdg. Aufbewahren bei Raumtemperatur wurde 48 Stdn. bei 50° gehalten. Danach wurden zur Zerstörung des Chlorids und etwa gebildeten Anhydrids 10 ccm Wasser zugegeben. Nach 1 Stde. wurde bei 3 Torr auf wenige ccm eingedampft und mit 10 ccm Wasser versetzt, der ausgefallene Niederschlag zerkleinert und im Exsikkator getrocknet (1.31 g). Die Masse wurde mit 35 ccm Chloroform in Portionen behandelt und von der großenteils unlöslich gebliebenen, blaßrosa gefärbten Azobenzolcarbonsäure abfiltriert. Der dunkelrote Chloroformextrakt wurde mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und auf eine Aluminiumoxydsäule (Durchm. 15 mm, Höhe 12 cm, Aluminiumoxyd Woelm neutral, mit Chloroform eingeschlämmt) gegeben. Zur Eluierung diente Chloroform. Die restliche Säure blieb als hellrote Zone am oberen Rand haften. Der Hauptteil wanderte rasch durch die Säule und ergab 0.15 g reinen Tetra-azobenzoylester. Zur Umkristallisation wurden 60 mg in 7 ccm Aceton kalt gelöst, mit 7 ccm Äthanol versetzt und bei 0° im offenen Kolben aufbewahrt; zunächst bildeten sich Flocken, die nach Anreiben nach 5 Tagen kristallisierten. Wiederholung der Umkristallisation auf dieselbe Weise lieferte rote Polyeder vom Schmp. 107–109°. Sie wurden 12 Stdn. bei 55° über P_2O_5 – $CaCl_2$ i. Vak. getrocknet.



R_f -Werte (dunkle Flecke im langwelligen UV und dunkelgelbe Flecke im sichtbaren Licht): in Gemisch I 0.84; in Cyclohexan, mit Dimethylformamid halb gesättigt, 0.30.

Dinitrophenyläther des Coniferylaldehyds: Die gelbe Lösung von 0.2 g Coniferylaldehyd¹⁹⁾ in 3 ccm Aceton wurde mit einer Lösung von 0.15 g $NaHCO_3$ in 3.5 ccm Wasser versetzt, wobei ein weißer Niederschlag entstand. Unter Kühlen und Umschütteln ließ man eine Lösung von 0.32 g Dinitrofluorbenzol in 1.5 ccm Aceton zutropfen und rührte die Mischung bei

¹⁸⁾ M. P. FREUNDLER, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 142, 1153 [1906]; Bull. Soc. chim. France [4] 1, 221 [1907]; K. LADENBURG, E. FERNHOLZ und E. S. WALLIS, J. org. Chemistry 3, 297 [1939]; W. S. REICH, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 208, 589 [1939]; K. FREUDENBERG und E. PLANKENHORN, Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 621 [1940].

¹⁹⁾ K. FREUDENBERG und R. DILLENBURG, Chem. Ber. 84, 67 [1951].

Raumtemperatur; nach 2 Stdn. wurde 1 ccm Aceton zugefügt. Nach 10 Stdn. wurden noch 0.05 g festes NaHCO_3 sowie 0.15 g Dinitrofluorbenzol in 1 ccm Aceton zugegeben und weitere 3 Stdn. gerührt.

Mit 7.0 ccm Wasser fiel das Produkt in blaßgelben Flocken aus. Es wurde abgesaugt und mit 50-proz. Methanol und Wasser gewaschen, sodann 3 mal mit je 20 ccm heißem Methanol extrahiert; aus dem Filtrat wurden 0.29 g große blaßgelbe Rhomben erhalten. Schmp. 159–160°.

Dieselbe Substanz wird durch Oxydation von Coniferylalkohol-dinitrophenyläther mit Braunstein erhalten. 1.00 g Coniferylalkohol-dinitrophenyläther²⁰⁾ wurde in 55 ccm trockenem Aceton gelöst und mit 70 ccm Tetrachlorkohlenstoff versetzt. Nach Zugabe von 10.0 g MnO_2 wurde gerührt. Während der Oxydation wurden im Abstand von 15 Min. Proben entnommen und im Gemisch I chromatographiert; sie zeigten, daß die Oxydation bereits nach 1/4 Stde. vollständig war. Nach 1 Stde. wurde von MnO_2 abzentrifugiert, dieses mit Aceton/Tetrachlorkohlenstoff gewaschen, die Lösung filtriert und i. Vak. unter Stickstoff eingedampft. Ausbeute 90% d. Th. Anrühren mit wenig Methanol führte zur Kristallisation. Zweimalige verlustreiche Umkristallisation aus 50 ccm warmem Methanol lieferte blaßgelbe Prismen vom Schmp. 159–160° (Mischprobe).

$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_7$ (344.3) Ber. C 55.81 H 3.51 OCH_3 8.14 Gef. C 55.72 H 3.62 OCH_3 8.19

R_F -Werte: In Gemisch I 0.71; in Cyclohexan, mit Dimethylformamid halb gesättigt, 0.73. Die IR-Spektren der auf beiden Wegen gewonnenen Präparate sind identisch.

²⁰⁾ K. FREUDENBERG und G. ACHTZEHN, Chem. Ber. 88, 13 [1955].

HERMANN STETTER und CLAUS WULFF

Über Verbindungen mit Urotropin-Struktur, XVIII¹⁾

Über die Bromierung des Adamantans

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität München

(Eingegangen am 7. März 1960)

Die Bromierung des Adamantans verläuft nach einem ionischen Chemismus. Es wurde gefunden, daß Katalysatoren vom Friedel-Crafts-Typ diese Bromierung sehr stark katalysieren. Je nach Wahl des Katalysators und der Reaktionsbedingungen gelingt es, schrittweise alle tertiären Wasserstoffatome des Adamantans durch Brom zu substituieren, wobei 1.3.5.7-Tetrabrom-adamantan die Endstufe der Bromierung darstellt. Die Stellung des Halogens konnte für alle bromierten Adamantane bewiesen werden.

Die Einwirkung von Brom auf Adamantan ergibt ein einheitliches Monobrom-adamantan, für welches die Struktur eines *1-Brom-adamantans* (I) bewiesen werden konnte²⁾. Auch mit einem großen Überschuß von Brom bei Temperaturen bis zu 150° entsteht diese Verbindung als einziges Reaktionsprodukt.

¹⁾ XVII. Mitteil.: H. STETTER und E. RAUSCHER, Chem. Ber. 93, 1161 [1960].

²⁾ H. STETTER, M. SCHWARZ und A. HIRSCHHORN, Chem. Ber. 92, 1629 [1959].