

KARL FREUDENBERG und JOHN M. HARKIN*)

Modelle für die Bindung des Lignins an die Kohlenhydrate

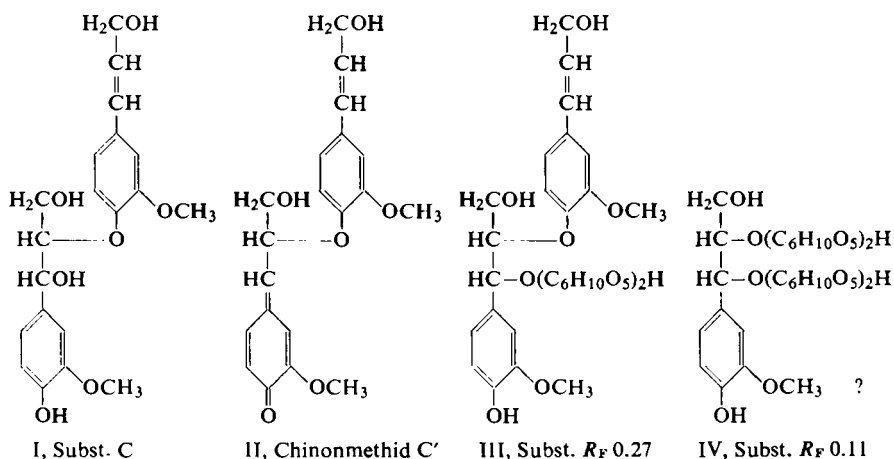
Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg und dem
Forschungsinstitut für die Chemie des Holzes und der Polysaccharide *)

(Eingegangen am 24. Juni 1960)

Herrn Richard Kuhn zum 60. Geburtstag

Die früher festgestellte Verbindung zwischen einem Dehydrierungsprodukt des Coniferylalkohols und dem Rohrzucker wurde genauer untersucht. Es handelt sich um eine Substanz der Formel III. Daneben tritt ein weiteres Produkt auf, das aus 2 Moll. Rohrzucker und einer Einheit Coniferylalkohol unter Dehydrierung entstanden ist und dem wir mit Vorbehalt die Zusammensetzung IV zuschreiben. Diese Verbindungen sind Modelle für die Bindung des Lignins an die Polysaccharide.

Vor Jahresfrist wurde gezeigt¹⁾, daß bei der Dehydrierung des Coniferylalkohols mit Laccase in gesättigter wäßriger Rohrzuckerlösung neben den üblichen Dehydrierungsprodukten des Coniferylalkohols eine stark hydrophile Substanz entsteht, die bei gelinder Hydrolyse durch Säuren in Glucose, Fructose und das bereits früher beschriebene^{2,3)} Dehydrierungsprodukt C des Coniferylalkohols (Guajacylglycerin-coniferyläther, I) zerfällt. In besserer Ausbeute entstand dieselbe Substanz, als eine Lösung von Coniferylalkohol und Rohrzucker in Dimethylformamid bei 20° mit Mangandioxyd behandelt wurde¹⁾. Unter den auch hierbei auftretenden Dehydrie-



*) Dem VERBAND DER CHEMISCHEN INDUSTRIE danken wir für die Überlassung von Mitteln.

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

2) K. FREUDENBERG und H. SCHLÜTER, Chem. Ber. **88**, 617 [1955].

3) K. FREUDENBERG und B. LEHMANN, Chem. Ber. **93**, 1354 [1960].

rungsprodukten des Coniferylalkohols fehlt in diesem Falle die Substanz C (I). Dies läßt sich damit erklären, daß bei Ausschluß von Wasser das zunächst gebildete und unmittelbar nachgewiesene⁴⁾ Chinonmethid C' (II) nicht in die Substanz C (I) übergehen kann. Die entstandene Rohrzucker Verbindung wurde als ein Addukt des Rohrzuckers an das Chinonmethid C' (II) angesprochen¹⁾, wobei unterstellt wurde, daß der Rohrzucker mit einer seiner drei primären Carbinolgruppen reagiert. Diese Substanz von den Begleitstoffen abzutrennen, gelang damals noch nicht in befriedigender Weise. Der Methoxylgehalt lag zwischen dem einer Additionsverbindung von 2 Moll. Chinonmethid (II) an 1 Mol. Rohrzucker und einer Additionsverbindung 1:1. Es kann sein, daß ein Rest des schwer entfernbaren Dimethylformamids einen zu hohen Methoxylgehalt vorgetäuscht hat.

Wir haben uns zunächst davon überzeugt, daß die enzymatisch gebildete Rohrzucker Verbindung mit dem Produkt übereinstimmt, das mit Mangandioxyd gewonnen wird. An letzterem Präparat wurde die Untersuchung durchgeführt. In einem System von n-Butanol und Wasser gelingt es, die Begleitstoffe durch Gegenstromverteilung abzutrennen. Emulsionen, die auf die detergierende Wirkung der Substanz zurückzuführen sind, werden durch Zugabe von 2% Pyridin vermieden. Zur Chromatographie dient die obere Phase eines Gemisches von Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5 Vol.-Tle.). Nach ihrem R_F -Wert wird die Verbindung „Substanz R_F 0.27“ genannt. Die chromatographisch reine Substanz wird in Gestalt eines glasartig erstarrenden hellen Sirups gewonnen. Dennoch ergaben die Analysen ein eindeutiges Resultat und beweisen, daß ein Additionsprodukt III von 1 Mol. Chinonmethid II an 1 Mol. Rohrzucker vorliegt. Die Hydrolyse ergab neben Substanz C (I) und polymerisierten Coniferyleinheiten 1 Mol. Glucose und 1 Mol. Fructose. Die Verbindung ist als ein Äther des Rohrzuckers mit der Substanz C (I) aufzufassen. Die Ätherbindung wird durch Wasserstoffion mit einer Geschwindigkeit gespalten, die von derselben Größenordnung ist wie die der Rohrzuckerspaltung. Es handelt sich nicht um eine glucosidische Bindung zwischen Rohrzucker und der Ligninkomponente, sondern um eine neuartige Ätherbindung. Diese ist ein Modell für die Bindung des Lignins mit den Kohlenhydraten des Holzes, die auch durch Hydrolyse gespalten wird. Der Kohlenhydratäther des Ligninbausteins enthält eine Phenolgruppe und kann durch erneute Dehydrierung oder durch Addition an ein Chinonmethid in das Lignin eingebaut werden. Das Lignin ist durch diesen Mechanismus auf die Kohlenhydrate aufgepfropft.

Wenn man Coniferylalkohol in Gegenwart von Rohrzucker mit Mangandioxyd in Dimethylformamid dehydriert, entsteht außer der Substanz III noch eine weitere, die ebenfalls mit Diazobenzolsulfonsäure eine Rotfärbung gibt, aber wesentlich stärker hydrophil ist als III. Ihr R_F -Wert ist 0.11. Diese Substanz R_F 0.11 (IV) hat die Zusammensetzung eines Adduktes von 2 Moll. Rohrzucker an eine Coniferyleinheit. Bei der gelinden Hydrolyse entstehen 2 Moll. Glucose und 1 Mol. Fructose; das zweite Molekül Fructose ist fester an die Coniferyleinheit gebunden. Es liegt nahe, anzunehmen, daß das eine Molekül Rohrzucker wie in Verbindung III mit der Coniferyleinheit verknüpft ist; es läßt sich vermuten, daß das zweite Molekül Rohrzucker

⁴⁾ K. FREUDENBERG, G. GRION und J. M. HARKIN, Angew. Chem. 70, 743 [1958].

in ätherartiger Bindung mit dem mittelständigen Kohlenstoffatom der Seitenkette verbunden ist. Diese Ätherbindung müßte durch einen Radikal-Mechanismus zustande kommen, den zu erörtern voreilig wäre.

Wir haben unsere besondere Aufmerksamkeit auf die Frage gerichtet, ob die Verbindung IV auch bei der enzymatischen Dehydrierung des Coniferylalkohols in Gegenwart von Rohrzucker entsteht. Dies ist der Fall. Es muß also damit gerechnet werden, daß die Einheit des dehydrierten Coniferylalkohols imstande ist, sich an zwei Stellen mit Kohlenhydraten zu verbinden.

Wenn der Coniferylalkohol in einer Lösung von Rohrzucker in Dimethylformamid mit Braunstein dehydriert wird, so entsteht außer den Verbindungen III und IV eine mit Diazobenzolsulfonsäure nicht kuppelnde Verbindung (R_F 0.39), die wie der Rohrzucker im Chromatogramm mit Bleitetraacetat sichtbar gemacht wird. Wir haben sie jedoch im enzymatischen Ansatz nicht angetroffen. Sie ist weniger hydrophil als der Rohrzucker (R_F ca. 0.06) oder die Verbindung IV (0.11) und III (0.27). Wir haben keine Vorstellung davon, um was es sich hier handelt. Wenn Rohrzucker in Dimethylformamid ohne Gegenwart von Coniferylalkohol mit Braunstein behandelt wird, so bildet sich diese Substanz nicht. Ebenso wenig bildet sie sich, wenn Coniferylalkohol in Abwesenheit des Rohrzuckers in Dimethylformamid dehydriert wird.

Die oben angedeutete Möglichkeit, daß Carbinole des Rohrzuckers in die Radikalübertragung der Aroxye hineingezogen werden können, hat sich an den Zimtalkoholen bestätigt. Wenn das blaue Tri-tert.-butyl-phenoxyl-Radikal⁵⁾ unter Stickstoff in trockenem Dioxan mit Zimtalkohol oder 3.4-Dimethoxy-zimtalkohol zusammengebracht wird, so entfärbt es sich unter Bildung der betreffenden Aldehyde. Vermutlich wird dem Carbinol erst ein Wasserstoffatom entzogen, worauf sich das entstandene Radikal zu Aldehyd und Carbinol disproportioniert. Mit Coniferylalkohol entstehen unter diesen Bedingungen rotkuppelnde Dehydrierungsprodukte wie Substanz A, H, J⁶⁾ und andere, höhermolekulare. Gleichzeitig tritt Coniferylaldehyd nebst anderen Aldehyden von Ligninzwischenprodukten auf. Die Aldehyde verdanken demnach ihre Entstehung einem Radikalmechanismus. — Läßt man das blaue Radikal in wäßrigem Dioxan auf Coniferylalkohol einwirken, so entstehen die oben genannten und alle übrigen Zwischenprodukte der enzymatischen Ligninsynthese.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Herstellung des Gemisches der Rohrzuckerverbindungen

Die Mischung von 32 g Coniferylalkohol und 90 g trockenem Rohrzucker mit 500 ccm wasserfreiem Dimethylformamid wurde unter Ausschluß der Luftfeuchtigkeit gerührt. Die Feststoffe lösten sich bis auf einen kleinen Bodensatz von Rohrzucker. Nach Zugabe von 35 g gut getrocknetem Mangandioxyd¹⁾ wurde unter Einleiten von trockener Luft weitergerührt. Nach 9 Tagen konnte nur noch sehr wenig Coniferylalkohol chromatographisch nachgewiesen werden; der Braunstein wurde abfiltriert und mit trockenem Dimethylformamid gewaschen. Die vereinigte Lösung wurde bei 40°/0.1 Torr zu einem Sirup eingeeengt. Durch Zugabe von absol. Äthanol und Impfung konnte die Hauptmenge des in Lösung befindlichen Rohrzuckers abgeschieden und entfernt werden. Das Äthanol wurde entfernt und der Rückstand in mit Wasser gesättigtem Essigester aufgelöst.

⁵⁾ E. MÜLLER und K. LEY, Chem. Ber. **87**, 927 [1954].

⁶⁾ Formeln siehe K. FREUDENBERG und M. FRIEDMANN, Chem. Ber. **93**, 2138 [1960].

Die Papierchromatogramme in der Mischung von Dimethylformamid und Xylol (9:2 Vol.) oder in Xylol/Methyläthylketon/Formamid (25:25:4) zeigten das bekannte Bild der Zwischenprodukte der Ligninbildung³⁾, wobei aber der Guajacylglycerin- β -coniferyläther C fehlte. Besser sind folgende Gemische: Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5 Vol., obere Phase, Gemisch a) und 10:2:4 (Gemisch b). In ihnen lassen sich die beiden Modellsubstanzen III und IV sowie die nicht kuppelnde Substanz voneinander und von den Dehydrierungsprodukten des Coniferylalkohols trennen. Die R_F -Werte zeigt die nachstehende Tabelle zusammen mit der in dieser Mischung nicht angetroffenen Substanz C. Die große Menge der übrigen Dehydrierungsprodukte des Coniferylalkohols wandert mit der Front.

R_F	Gemisch a	Gemisch b
Rohrzucker	0.05	0.05
Substanz IV	0.11	0.10
Substanz III	0.27	0.23
unbek. Substanz	0.39	0.35
Substanz C (I)	0.52	0.47

Als der gleiche Ansatz wie oben mit 100 g MnO_2 unter reinem Stickstoff gerührt wurde, war die Reaktion erst nach 30 Tagen beendet; dabei war im Endprodukt der Anteil an Coniferylaldehyd und hochpolymerem Dehydrierungsprodukt größer als bei dem belüfteten Präparat.

Bei einem Versuch mit 16 g Coniferylalkohol, 40 g Rohrzucker und 20 g wasserfreiem Kupferacetat in 150 ccm Dimethylformamid war der Coniferylalkohol nach Aufnahme von weniger als 0.25 O_2 (497 ccm) nach 4 Tagen verbraucht. Die Substanzen III und IV konnten neben Dehydrierungsprodukten des Coniferylalkohols chromatographisch identifiziert werden. Die Trennung durch Gegenstromverteilung gelang nicht, weil das Kupferacetat mitgeschleppt wurde.

Trennung durch Gegenstromverteilung

Das in Essigester gelöste, aus den vereinten, mit MnO_2 bereiteten Ansätzen stammende Substanzgemisch wurde durch 700 Überführungen im Gegenstromapparat (200 Gläser von 50 ccm) mit einem Gemisch von Wasser und Essigester (1:1 Vol.) grob getrennt. Die gesuchten Substanzen befanden sich in den Gläsern 5–35 (IV) und 85–200 (III). Die Lösungen enthielten noch Rohrzucker und Dehydrierungsprodukte des Coniferylalkohols. Jede der beiden Fraktionen wurde mit einem Gemisch von n-Butanol-(I) und Wasser (1:1 Vol.), dem 2% Pyridin zugesetzt waren, im Gegenstrom verteilt. Fraktionen, die keine Substanz III enthielten, wurden entfernt und durch reines Lösungsmittelgemisch ersetzt. Nach 850 Überführungen wurden diejenigen Fraktionen gesammelt, die chromatographisch reine Substanz III enthielten. Die wasserhaltigen Lösungen wurden i. Hochvak. bei 40–50° eingeeengt; kleine Platinschnitzel verhindern dabei das Stoßen der Flüssigkeit. Etwa 2.7 g reine Substanz III wurden gewonnen; die im Rohprodukt enthaltene Menge ist jedoch erheblich größer.

Substanz III, $C_{32}H_{44}O_{17}$ (700.7)	Ber.	C 54.85	H 6.33	OCH ₃ 8.85
	Gef. a)	C 53.50	H 6.33	OCH ₃ 8.85
	b)	C 55.75	H 6.06	OCH ₃ 8.90
	c)	C 55.58	H 6.25	OCH ₃ 8.66

Die Probe a) wurde bei 50°, die Proben b) und c) bei 90° getrocknet, bis das Gewicht nach 3 weiteren Tagen der Trocknung konstant blieb. Die Wägungen der hellbraunen, glasartigen Substanz müssen im geschlossenen Gefäß vorgenommen werden, da sie äußerst hygroskopisch ist. Die Substanz III zeigt die für die Glucose-Fructofuranose-Bindung des Rohrzuckers

charakteristische grüne Farbe mit Diazouracil⁷⁾. Diese Reaktion ist jedoch nicht empfindlich genug, um als Nachweisreaktion bei Chromatogrammen zu dienen. Die Substanz R_f 0.39 gibt diese Reaktion nicht.

Hydrolyse von III

Nach milder Hydrolyse mit *p*-Toluolsulfonsäure oder 1-proz. Salzsäure (70°, 10 Min.) ergab Substanz III, wie aus dem Papierchromatogramm zu ersehen war, Glucose, Fructose und Guajacylglycerin- β -coniferyläther neben polymerem Material. Entsprechend dem Verfahren von A. HERZFELD⁸⁾ für die Bestimmung des Invertzuckers wurden 568 mg III in 10 ccm 0.2-proz. Salzsäure 12 Min. auf 70° erwärmt. Als Kriterium der Spaltung diente das Verschwinden von III im Papierchromatogramm. Dies bedeutet, daß der Lignin-Rohrzucker-Äther mit ungefähr derselben Geschwindigkeit wie der Rohrzucker selbst gespalten wird. Nach der Hydrolyse betrug die Drehung im 2-dm-Rohr -1.18° ; für die zu erwartende Menge Invertzucker berechnet sich für 2α -1.22° . Demnach kommt bei der Substanz III 1 Mol. Rohrzucker auf 1 Mol. Guajacylglycerin- β -coniferyläther.

Zur Bestimmung der Glucose müssen Salzsäure und Phenole entfernt werden. Die Menge einer standardisierten Lösung von basischem Bleiacetat, die benötigt wurde, um die Salzsäure in der Hydrolysenmischung zu fällen, wurde durch einen Kontrollversuch bestimmt. Nach Abzentrifugieren des basischen Bleichlorids wurde zur Fällung der Ligninfraktion weiteres basisches Bleiacetat zugegeben. Der Überschuß an Blei wurde mit fester Kohlensäure als Bleicarbonat gefällt. Die Glucose wurde im Hydrolysat nach dem von G. M. KLINE und S. F. ACREE⁹⁾ abgeänderten Verfahren von WILLSTÄTTER und SCHUDEL bestimmt.

Nach der Neutralisation der Gesamtlösung mit Natronlauge und Phenolphthalein wurden abwechselnd dreimal 5 ccm und einmal 3 ccm 0.1 *n* Jodlösung und dreimal 7.5 und einmal 4.5 ccm 0.1 *n* NaOH zugegeben. Nach 2 Min. wurde mit 20 ccm 0.1 *n* HCl angesäuert und das freigesetzte Jod mit 0.1 *n* Na₂S₂O₃ zurücktitriert. Nach Abzug des Nullwerts für die Adsorption des Jods an das Phenolphthalein waren 16.0 ccm 0.1 *n* Jodlösung verbraucht. Für die Glucose aus 568 mg III sind 16.2 ccm zu erwarten.

Substanz IV

Von der Substanz IV konnten nach 3000 Stufen im Umlauf mit dem Gemisch von Butanol/Wasser/Pyridin rund 3 g in reinem Zustand isoliert werden. Ein Teil der Substanz, der mit Rohrzucker und aromatischen Verbindungen verunreinigt war, blieb ungetrennt.

C₃₄H₅₄O₂₅ (862.8) Ber. C 47.30 H 6.30 OCH₃ 3.58

Gef. C 46.73 H 6.50 OCH₃ 3.76, 3.65

Auch diese Substanz ist ein hellbraunes, sehr hygroskopisches Glas; sie muß vor der Methoxylbestimmung in Wasser oder Resorcin aufgelöst werden, damit sie sich mit der Jodwasserstoffsäure mischt. Die Substanz IV wurde analog Substanz III mit Salzsäure gespalten. Da aber der größte Teil der aromatischen Substanz in Lösung blieb und nicht wie oben als ein Säurepolymerisat ausfiel, war das Hydrolysat leicht braun gefärbt, so daß die Drehung nicht genau gemessen werden konnte. Ihr Glucosegehalt wurde aber wie oben mit NaOJ bestimmt.

Aus 560 mg IV sind bei der Säurespaltung 234 mg Glucose zu erwarten, die 26 ccm *n* Jodlösung entsprechen. Nach der Hydrolyse und Abtrennung des phenolischen Anteils mit basischem Bleiacetat wie oben wurden 28 ccm Jodlösung und 45 ccm 0.1 *n* NaOH portions-

⁷⁾ H. RAYBIN, J. Amer. chem. Soc. **55**, 2603 [1933]; **59**, 1402 [1937].

⁸⁾ „Sugar Analysis“ herausgeg. von C. A. BROWNE und F. W. ZERBAN, 3. Aufl., S. 407, John Wiley & Sons, New York 1941.

⁹⁾ I. c. ⁸⁾ S. 898.

weise zugegeben. Mit 0.1 *n* Thiosulfat wurden 2.0 ccm Jodlösung zurücktitriert, demnach waren 26 ccm Jodlösung verbraucht.

Der Gesamtzuckergehalt aus der Hydrolyse der Substanz IV wurde nach J. H. LANE und L. EYNON¹⁰⁾ gemessen. Eine Lösung des Reagenzes nach F. SOXHLET¹¹⁾ wurde gegen Glucose, Fructose und Invertzucker standardisiert. 2.37 g IV wurden wie oben hydrolysiert, mit NaOH neutralisiert; die Lösung wurde auf 250 ccm aufgefüllt.

Jeweils 20 ccm dieser Lösung wurden entweder unmittelbar gegen Soxhlet-Lösung titriert oder nach Abtrennen des Phenolkörpers mit basischem Bleiacetat oder durch Adsorption auf dem stark basischen Austauscherharz IRA 400. Wenn man von der verbrauchten Soxhlet-Lösung den Anteil abzieht, der auf die oben bestimmte Glucose entfällt, bleiben pro 20 ccm soviel ccm verbrauchte Lösung, wie 34–35 mg Fructose entsprechen. Wenn aus Substanz IV 2 Moll. Fructose abgespalten werden, sollten in den Proben von 20 ccm je 79 mg Fructose enthalten sein; gefunden wurden 34.5 mg, also nicht ganz die Hälfte. Das heißt, daß bei der Hydrolyse von IV außer zwei Glucosemolekülen etwas weniger als ein Mol Fructose entstehen. Der phenolische Rest nach der Hydrolyse von IV enthält demnach noch ein Molekül Fructose. Dieser Rest kuppelt in der Tat rötlich-braun, wandert nicht im Xylol/Methyläthylketon/Formamid-Gemisch und reagiert mit Bleitetraacetat. Die Substanz IV gibt auch eine grüne Färbung mit Diazouracil⁷⁾; der phenolische Rest nach der Hydrolyse dagegen nicht.

10) l.c.⁸⁾, S. 753.

11) l.c.⁸⁾, S. 746.

VOLKER FRANZEN und CHRISTIAN MERTZ

Zum Mechanismus der Hofmann-Eliminierung bei Sulfoniumsalzen

Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg

(Eingegangen am 28. Juni 1960)

*Herrn Professor Dr. Richard Kuhn zum 60. Geburtstag
in Dankbarkeit und Verehrung gewidmet*

Triäthylsulfoniumbromid und -jodid setzen sich glatt mit Tritylnatrium zu Triphenylmethan, Diäthylsulfid und Äthylen um. Der Angriff der Base am Sulfoniumsalz erfolgt zum überwiegenden Teil an den Methylengruppen, wie Versuche mit $(\text{CH}_3\text{CD}_2)_3\text{SX}$ ($\text{X} = \text{Br}, \text{I}$) ergaben. Die Faktoren, die das Verhältnis dieser α' - β -Eliminierung zur β -Eliminierung beeinflussen, werden diskutiert. *n*-Heptyl-(4)-dimethylsulfoniumbromid reagiert mit Tritylnatrium glatt zu *trans*-Hepten-(3).

Untersuchungen von G. WITTIG und Mitarbb.¹⁾ über die Umsetzung von alkalischen Verbindungen mit Tetraalkylammoniumsalzen haben zu der Ansicht

1) G. WITTIG und R. POLSTER, Liebigs Ann. Chem. **599**, 13 [1956]; J. RABIAN und G. WITTIG, Bull. Soc. chim. France **1957**, 798; G. WITTIG und R. POLSTER, Liebigs Ann. Chem. **612**, 102 [1958]; G. WITTIG und T. F. BURGER, ebenda **632**, 85 [1960].