

HORST NIMZ, KEIZO NAYA und KARL FREUDENBERG \*)

## Die enzymatische Dehydrierung des Ferulasäureesters und seines Gemisches mit Coniferylalkohol \*\*)

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

(Eingegangen am 28. Februar 1963)

Die enzymatische Dehydrierung des Ferulasäure-äthylesters führt zu einem Gemisch verschiedener Substanzen, unter denen als wichtigste der in den Dehydro-diconiferylalkohol überführbare Diäthylester I isoliert wurde. Bei der Dehydrierung eines Gemisches des Ferulasäure-äthylesters mit Coniferylalkohol wird ein Monocarbonsäureester II erhalten, der bei der Reduktion gleichfalls Dehydro-diconiferylalkohol ergibt.

Als vor einigen Jahren eine Übersicht über die im Chromatogramm auftretenden zahlreichen Dehydrierungsprodukte des Coniferylalkohols aufgestellt wurde<sup>1)</sup>, erhielt eine hydrophobe, schnell laufende Substanz die Ziffer 3. Sie trat nicht regelmäßig und nur in sehr geringer Menge auf und wurde neuerdings als Ferulasäure-äthylester erkannt<sup>2)</sup>. Dieser ist das Ausgangsmaterial für die Herstellung des Coniferylalkohols, und sein Auftreten im Chromatogramm der Dehydrierungsprodukte verdankt er der häufig nicht vollständig zu Ende gehenden Reduktion. Es war zu befürchten, daß unter den von uns angezeigten Dehydrierungsprodukten des Coniferylalkohols auch solche vorkommen, die als Komponente den dehydrierten Ferulasäure-äthylester enthalten. Deshalb wurde die enzymatische Dehydrierung des Ferulasäure-äthylesters sowie seines Gemisches mit Coniferylalkohol untersucht. Wie zu erwarten, entstehen in beiden Fällen zahlreiche Produkte, die zunächst chromatographisch charakterisiert wurden. Es hat sich gezeigt, daß in dem früheren Chromatogramm der Dehydrierungsprodukte des Coniferylalkohols diese Substanzen nicht vorkommen, und es hat sich auch sonst kein Anhaltspunkt ergeben, daß sie in wahrnehmbarer Menge bei der Dehydrierung des mit Spuren des Esters verunreinigten Coniferylalkohols auftreten. Seither wird auf die Entfernung des Esters aus dem zu unseren Versuchen dienenden Coniferylalkohol geachtet. Es genügt, die

\*) Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danken wir für die Gewährung von Mitteln.

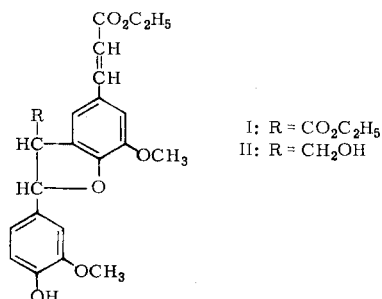
\*\*) Die seit Jahren untersuchte Dehydrierung des Coniferylalkohols und der Zwischenprodukte der Ligninbildung wäre nicht möglich ohne die regelmäßige und sachkundige Herstellung dieses empfindlichen Alkohols und anderer Präparate. Wir sprechen bei dieser Gelegenheit Fräulein S. SCHWAB für ihre sorgfältige präparative Arbeit unseren aufrichtigen Dank aus.

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

2) K. FREUDENBERG und H. NIMZ, Chem. Ber. **95**, 2057 [1962].

mit wenig Dioxan versetzte, erstarrte Schmelze des Coniferylalkohols zwischen dicken Lagen von Filtrierpapier bei 250 at auszupressen. Auch wiederholte Umkristallisation des Coniferylalkohols aus Methylenchlorid führt zum Ziele.

Im Gemisch der Dehydrierungsprodukte des *trans*-Ferulasäure-äthylesters findet sich, die übrigen Bestandteile an Menge überwiegend, die kristallisierende Substanz I. Sie bildet einen Mono-dinitrophenyläther und liefert mit Lithiumaluminiumhydrid den bekannten Dehydro-diconiferylalkohol. Wenn ein hälftiges Gemisch von Ferulasäure-äthylester und Coniferylalkohol dehydriert wird, so entsteht ein Gemisch, aus dem isoliert wurden: der Diäthylester I, Pinoresinolid<sup>3)</sup> sowie ein Kondensationsprodukt aus dehydriertem Ferulasäure-äthylester und Coniferylalkohol. Bei der Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid entsteht daraus gleichfalls der Dehydro-diconiferylalkohol. Aus der Fluoreszenz geht hervor, daß die Substanz entsprechend I gebaut und daher ein Zimtsäureester der Konstitution II ist.



Eine andere Beimengung des Coniferylalkohols ist der Dihydro-coniferylalkohol<sup>4)</sup>, der regelmäßig bei der Reduktion des Ferulasäure-äthylesters mit Lithiumaluminiumhydrid in geringen Mengen als Nebenprodukt entsteht und schwer aus dem Coniferylalkohol zu entfernen ist. Wenn er, wie immer, in kleinen Mengen dem Coniferylalkohol beigemischt ist, wird er im Chromatogramm von diesem überdeckt. Bei der Dehydrierung mit überschüssigem Coniferylalkohol tritt er als Substanz 20 auf, die als Guajacylglycerin- $\beta$ -dihydroconiferyläther erkannt wurde. Substanz 20 ist also kein echtes Dehydrierungsprodukt des Coniferylalkohols. Aus gereinigtem Coniferylalkohol wird die Substanz 20 nicht erhalten.

<sup>3)</sup> K. FREUDENBERG und H. GEIGER, Chem. Ber. 96, 1265 [1963].

<sup>4)</sup> H. NIMZ, Chem. Ber. 96, 478 [1963].

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

**7-Methoxy-5-[2-carbäthoxy-vinyl]-2-[4-hydroxy-3-methoxy-phenyl]-3-carbäthoxy-2.3-dihydro-benzofuran (I):** Eine Lösung von 2.22 g *Ferulasäure-äthylester* in 750 ccm Äthanol und 750 ccm Wasser, das 0.2 mg kristallisierte *Peroxydase* enthält, wird innerhalb von 24 Stdn. unter Rühren tropfenweise mit 1275 ccm einer 0.02-proz. wäßrigen Lösung von *Hydroperoxyd* versetzt. 12 Stdn. nach Beginn, wenn die Hälfte zugetropft ist, wird erneut 1 ccm einer 0.02-proz. Peroxydaselösung zugegeben. Die Lösung wird i. Vak. auf 200 ccm eingengt, mit Kochsalz gesättigt und mit Essigester extrahiert, bis die wäßrige Phase mit der natriumcarbonataikalischen Lösung von Diazobenzolsulfonsäure keine Farbreaktion mehr anzeigt. Der Essigester wird i. Vak. unter Stickstoff eingedampft, bis ein Sirup hinterbleibt. Er wird auf einer Säule (3 × 55 cm) von Kieselsäure-Celite (5:1, Gewicht) mit Cyclohexan/Essigester (2:1 Vol.) aufgetrennt. Die zuerst austretende einheitliche Fraktion enthält den Ester. Farblose Nadeln aus Essigester und Cyclohexan, Schmp. 148.5–149.5°, Ausb. 465 mg (21 % d. Th.). Mit diazotierter Sulfanilsäure tritt Rotfärbung auf. In Gemisch I<sup>1)</sup>  $R_F = 0.74$ , in Gemisch II  $R_F = 0.86$ .

$C_{24}H_{26}O_8$  (442.4) Ber. C 65.15 H 5.93 OCH<sub>3</sub> 28.05 Gef. C 65.01 H 5.71 OCH<sub>3</sub> 27.73

Bei dieser Rechnung sind die Äthoxylgruppen als Methoxyl eingesetzt. Bei den nächsten Substanzen wird ebenso verfahren.

**2.4-Dinitrophenyläther:** Das Gemisch von 66 mg des *Esters I*, 111 mg *Dinitrofluorbenzol*, 75 mg Natriumhydrogencarbonat und 2 ccm Dimethylformamid wird 20 Stdn. bei 20° geschüttelt, filtriert und bei 0.1 Torr zum Sirup eingedampft. Aus Essigester und Cyclohexan werden Kristalle vom Schmp. 154.5–155.5° erhalten. Ausb. 36 mg.

$C_{30}H_{28}N_2O_{12}$  (608.6) Ber. C 59.2 H 4.63 N 4.60 OCH<sub>3</sub> 20.39  
Gef. C 59.58 H 4.56 N 4.88 OCH<sub>3</sub> 20.36  
N/OCH<sub>3</sub> Ber. 1:2 Gef. 1.06:2

**Reduktion von I zu Dehydro-diconiferylalkohol:** Diäthylester I wird wie üblich mit Lithiumaluminiumhydrid in Äther bei –15° reduziert. Nach der Chromatographie auf einer Säule aus Kieselsäure-Celite (5:1) mit Benzol/Aceton (3:1) und durch wiederholte Kristallisation aus Essigester und Cyclohexan werden Kristalle vom richtigen Schmp. erhalten<sup>5,6)</sup> Mischprobe, IR-Spektrum und  $R_F$ -Werte in den Gemischen I und II ergeben die Übereinstimmung mit dem Dehydro-diconiferylalkohol.

**7-Methoxy-3-hydroxymethyl-5-[2-carbäthoxy-vinyl]-2-[4-hydroxy-3-methoxy-phenyl]-2.3-dihydro-benzofuran (II):** Das Verfahren ist dasselbe wie bei der Substanz I mit dem Unterschied, daß gleichzeitig mit der doppelten Menge *Peroxyd* die Lösung von 1.8 g *Coniferylalkohol* in 900 ccm Wasser zugetropft wird. Im Chromatogramm wird angezeigt: Der Diäthylester I ( $R_F = 0.74$  Gemisch I und 0.86 Gemisch II), der *Monoäthylester II* ( $R_F = 0.50$  Gemisch I und 0.60 Gemisch II), *Pinoresinolid*<sup>3)</sup> ( $R_F = 0.32$  Gemisch I und 0.38 Gemisch II, wie bei dem früheren Präparat<sup>3)</sup>); eine unbekannte, orangekuppelnde Substanz ( $R_F = 0.24$  Gemisch I und 0.23 Gemisch II).

Das sirupöse Gemisch wird in einer Cellulosesäule (3 × 90 cm) mit Xylol/Dimethylformamid (9:2 Vol.) in 10 Fraktionen aufgetrennt. Aus der Fraktion 1 wird der Diäthylester I durch wiederholtes Umkristallisieren mit einer Ausbeute von 4% erhalten. Die Fraktion 3 wird nach Entfernung des Lösungsmittels aus Essigester/Cyclohexan kristallisiert. Ausb.

<sup>5)</sup> K. FREUDENBERG und H. H. HÜBNER, Chem. Ber. **85**, 1181 [1952].

<sup>6)</sup> K. FREUDENBERG, J. HARKIN, M. REICHERT und T. FUKUZUMI, Chem. Ber. **91**, 581 [1958].

an II 3%, Schmp. 167.5–169°. Die Kupplungsfarbe mit diazotierter Sulfanilsäure ist rot. Die Substanz II fluoresziert auf dem Papier im Ultraviolett wie der Diäthylester I. Die  $R_F$ -Werte sind oben angegeben.

$C_{22}H_{24}O_7$  (400.4) Ber. C 65.98 H 6.04  $OCH_3$  23.25 Gef. C 65.49 H 6.26  $OCH_3$  23.36

Alle diese Feststellungen lassen auf die Konstitution II schließen.

Die Fraktion 4 wird durch die oben mitgeteilten  $R_F$ -Werte und die Überführung in den Dinitrophenyläther als *Pinoresinolid* identifiziert. Ausb. 5% Rohprodukt.

*Pinoresinolid-bis-dinitrophenyläther*: Kristalle aus Essigester und Methanol. Schmp. 191.5 bis 193.5°. Früher ist das Präparat trotz guter Analysenwerte nicht kristallisiert erhalten worden<sup>3)</sup>.

$C_{32}H_{24}N_4O_{15}$  (704.6) Ber. C 54.54 H 3.43 N 7.96  $OCH_3$  8.80

Gef. C 54.35 H 3.44 N 7.70  $OCH_3$  9.12

N:  $OCH_3$  Ber. 2:1 Gef. 1.87:1

In Benzol/Aceton (15:1 Vol.) ist auf Kieselgel-Dünnschicht  $R_F = 0.24$ , in Übereinstimmung mit dem früheren Präparat.

---