

CCA - 72

547.458.84:541.6

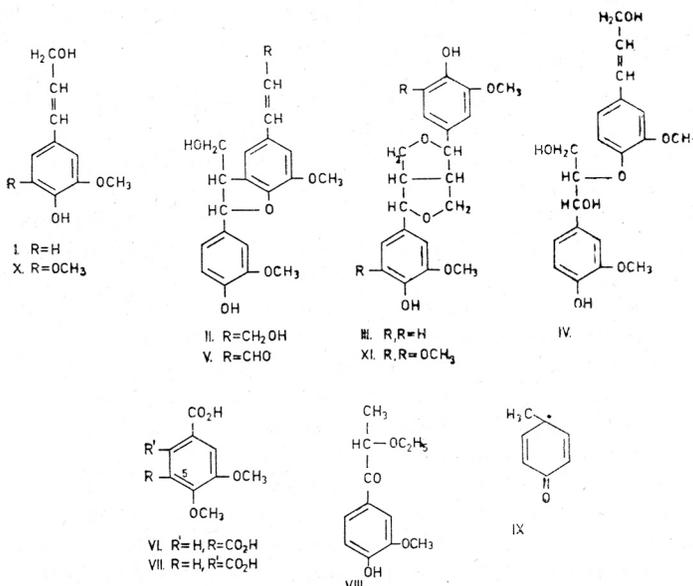
Beiträge zur Struktur des Lignins

Karl Freudenberg

Universität Heidelberg

Eingegangen am 8. Juni 1957.

Vor 8 Jahren ist es gelungen, durch Dehydrierung des Coniferylalkohols I unter biologischen Bedingungen ein dem Coniferen-Lignin ähnliches Produkt zu bereiten. Wir verwendeten Luftsauerstoff in Gegenwart der angereicherten Enzyme des Speisechampignons. Sie enthalten Laccase¹. Zuerst bilden sich bimolekulare Dehydrierungsprodukte, deren wichtigste isoliert und aufgeklärt worden sind². Zu den früheren (Dehydrodiconiferyl-alkohol II, DL-Pinosin III, Guajacylglycerin- β -coniferyläther IV) hat sich jetzt ein viertes dimeres gesellt, der Aldehyd des Dehydrodiconiferylalkohols V³. Diese Zwischenprodukte werden durch weitere Dehydrierungskondensation, vielleicht auch teilweise durch Polymerisation, in das hochmolekulare künstliche Lignin verwandelt, das wir Dehydrierungspolymerisat (DHP) genannt haben. Das Gemisch der genannten dimeren Zwischenprodukte bildet etwa 80% der Ligninbausteine. Davon ist IV der grösste, V der kleinste Anteil. Die restlichen 20% bestehen



I. Coniferylalkohol; II. Dehydro-diconiferylalkohol; III. Pinoresinol; IV. Guajacylglycerin- β -coniferyl-äther; V. Aldehyd des Dehydro-diconiferylalkohols; VI. Isohemipinsäure; VII. Metahemipinsäure; VIII. α -Äthoxy-propioquajacon; IX. Eine der mesomeren Grenzformen des dehydrierten *p*-Cresols; X. Sinapinalkohol; XI. Syringaresinol.

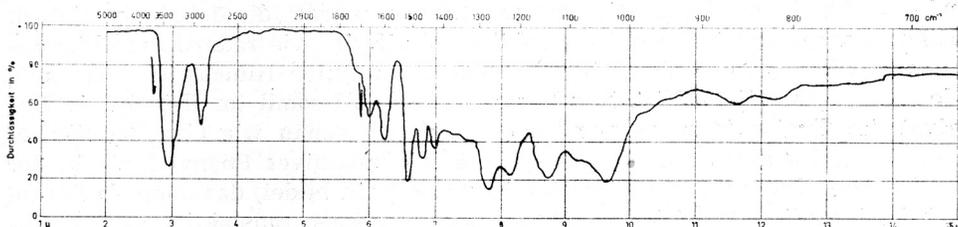
aus mindestens 15 weiteren Umwandlungsprodukten des Coniferylalkohols. Es erweist sich als zweckmässig, den Coniferylalkohol in verdünntester wässriger Lösung in dem Masse in die Fermentlösung tropfen zu lassen wie er verbraucht wird. Das ausgefallene DHP muss durch Lösungsmittel von beigemengten Dimeren und anderen niedermolekularen Produkten befreit werden.

Die Dehydrierungsreaktion ist unspezifisch. Statt des Pilzferments kann die Lösung von Kupfer(II)salzen in Gegenwart von Luft⁴ oder von Peroxydase mit äusserst verdünntem Hydroperoxyd verwendet werden¹. In beiden Fällen sind die dimeren Zwischenprodukte dieselben wie bei dem Versuch mit Pilzferment. Die Dehydrasen des Holzes sind Laccase und Peroxydase und verhalten sich ebenso. Es ist jedoch möglich, dass das Mengenverhältnis der dimeren Zwischenprodukte bei den verschiedenen Dehydrierungsverfahren voneinander abweicht.

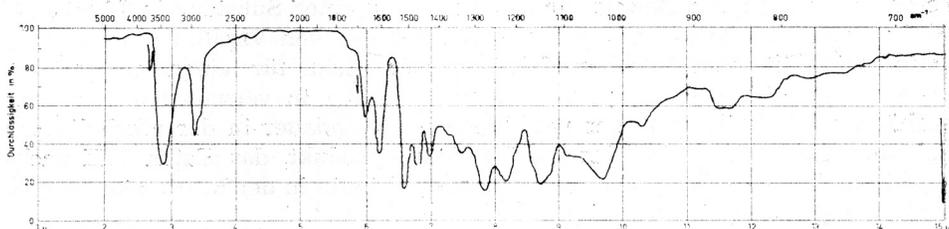
In wichtigen Versuchen hat A. Björkman⁵ gezeigt, dass ein grosser Teil des Coniferen-Lignins nach der Mahlung des Holzes unter Toluol durch organische Lösungsmittel extrahiert werden kann. In geringen Mengen entstehen hierbei niedermolekulare Produkte, darunter Coniferylalkohol, Coniferylaldehyd und Spuren von Vanillin. Sie lassen sich entfernen, ebenso wie eine dunkelgefärbte Fraktion, die offenbar ein höheres Molekulargewicht hat. Früher habe ich die Vermutung ausgesprochen², dass dieses Lignin (Milled wood Lignin, MW-Lignin, aus *Picea abies* = *Picea excelsa*) nach Björkman durch mechanischen Abbau entsteht. Dass dies zutrifft, wurde jetzt bewiesen. Wenn das von niedermolekularen Anteilen befreite MW-Lignin erneut gemahlen wird, entstehen neben Coniferylalkohol und -aldehyd sowie Spuren von Vanilin chromatographisch nachweisbare Zertrümmerungsprodukte in grosser Zahl. Sie sind, wie zu erwarten, nicht identisch mit den Bausteinen II—V des biochemischen Ligninaufbaues.

Unser DHP und das MW-Lignin wurden verglichen.^{3, 6, 7} Sie stimmen in der Elementarzusammensetzung überein bis auf einen Unterschied im Methoxylgehalt. Setzt man den Methoxylgehalt des DHP = 100, so beträgt der des MW-Lignins 94%. Es ist bekannt, dass das natürliche Lignin auf die C₆-Einheit bezogen stets ein geringes Defizit an Methoxyl aufweist (0,06 bis 0,10 Methoxyl). Zur Erklärung dieses Fehlbetrages glauben wir, weiter unten einen Beitrag geben zu können. Ausserdem enthält das MW-Lignin stets einige Prozente gebundene Kohlenhydrate. Die Infrarotspektren sind bis auf Kleinigkeiten identisch (Abb. 1). Der Unterschied besteht in einem etwas grösseren Carbonylgehalt des MW-Lignins und in einem kleinen Mehrbetrag an Doppelbindungen im DHP. Die Ultravioletspektren sind, was Kurvenverlauf, Lage der Minima und Maxima anbelangt, identisch. Dagegen ist die Extinktion beim DHP durch den ganzen Messbereich im allgemeinen um den Faktor 1,2 bis 1,3 höher. Dieser Unterschied rührt von dem genannten Mehrbetrag an Doppelbindungen in DHP her. Der Unterschied ist erklärlich. DHP ist nicht Jahre und Jahrzehnte lang abgelagert wie das natürliche Lignin, dessen Gehalt an Doppelbindung durch Oxydation, Polymerisation oder Kondensation herabgemindert sein dürfte. Der Gehalt an Gesamthydroxyl sowie phenolischen Hydroxyl (0,3 bis 0,4 pro C₆ Einheit) ist bei beiden Präparaten gleich⁸. Die Ultravioletspektren beider Präparate zeigen die bekannte Rot-Verschiebung wenn sie in alkalischer Lösung gemessen

werden. Die Differenzkurve ($\Delta\epsilon$ -Kurve) ist nach Lage der Minima und Maxima bei beiden Präparaten identisch. Entsprechend der höheren Extinktion des DHP sind bei diesem die Ausschläge der Differenzkurve ein wenig grösser. Dieser Unterschied beruht nicht auf einem verschiedenen Gehalt an Phenolhydroxyl. Wir sehen in dem einander entsprechenden Verlauf der Differenzkurven einen starken Hinweis darauf, dass sich die Präparate ausserordentlich nahestehen. Durch Mahlung des DHP entstehen dieselben Bruchstücke wie aus MW-Lignin.



MW-Lignin



DHP

Die Reaktion mit Chinonimidchlorid ist in qualitativer und quantitativer Hinsicht beiden Präparaten gleich. Auch ist der Betrag an abspaltbarem Formaldehyd (1,5 bis 2%) in beiden Fällen derselbe. Isohemipinsäure VI kann aus beiden Präparaten auf 2 verschiedenen Wegen gewonnen werden. Wenn die Substanz mit Diazomethan methyliert und alsdann oxydiert wird, so entsteht in beiden Fällen ein geringer Betrag (etwa 1%) der Säure. Ein grösserer Betrag (2,5 bis 3,5%) wird in beiden Fällen erhalten⁹ wenn das Präparat mit starkem Alkali behandelt, methyliert und oxydiert wird. Wenn die Präparate mit Mineralsäure erwärmt und dann, wie geschildert, auf Isohemipinsäure verarbeitet werden, so entsteht neben dieser bei beiden Präparaten ein kleiner Betrag an Metahemipinsäure VII. Es ist übrigens möglich, dass die Pinoresinolkomponente des Lignins und DHP die Quelle für die Metahemipinsäure ist, da sich Pinoresinol entsprechend verhält⁷.

Vor einiger Zeit haben wir DHP aus Coniferylalkohol I hergestellt, der am mittleren Kohlenstoffatom der Seitenkette radioaktiv markiert war. Die aus diesem DHP auf beiden Wegen hergestellte Isohemipinsäure besass die volle Radioaktivität⁹. Wir können danach behaupten, dass mehr als 90% der Carboxylgruppe in der 5-Stellung der Isohemipinsäure aus dem β -Kohlenstoffatom der Seitenkette stammt. Die Isohemipinsäure entstammt einer An-

ordnung, die im Lignin teils in einer Form vorliegt, die wie II zum Benzofuranring geschlossen ist, teils in einer nicht zum Ring geschlossenen Form.

Wir haben früher berichtet, dass das Coniferin, wenn es in der Coniferylkomponente radioaktiv markiert ist, nach der Einführung in junge Fichten radioaktives Lignin liefert. Dasselbe ist der Fall nach Eingabe von radioaktivem Phenylalanin¹⁰. Wir haben uns nicht damit begnügt, die Umwandlung der radioaktiven Substanz in Lignin an dem Abbau zu Vanillin zu erkennen, sondern uns davon überzeugt, dass in beiden Fällen radioaktive C₉-Körper wie im Lignin vorliegen. Zu diesem Zweck wurde die Aethanolyse nach Hibbert angewendet. Sowohl radioaktives Coniferin, wie radioaktives Phenylalanin liefern nach Eingabe in die Fichte radioaktive Hibbert'sche Ketone¹¹, deren Hauptanteil VIII ist. Das Phenylalanin wird somit im Holz in ein Derivat des Guajacylpropans verwandelt, das sich genau wie Coniferylalkohol verhält. Tatsächlich wurde gefunden,⁷ dass radioaktives Phenylalanin in der Fichte zunächst isolierbares radioaktives Coniferin bildet, das dann zu Lignin wird. Dieses liefert auf den zwei geschilderten Wegen radioaktive Isohemipinsäure. Offenbar geht der Weg von Shikimisäure zur Prephensäure und von dieser über Phenylbrenztraubensäure oder Phenylalanin zum Coniferin. Auch K. Kratzl betont, dass der beste Beweis für den Übergang einer Substanz in Lignin die Bildung der Hibbert'schen Ketone ist. Die Bildung von Vanillin bei der Oxydation mit Hilfe von Nitrobenzol halten wir nicht für einen genügenden Beweis. Die Hibbert'schen Ketone entstehen häufig in verschiedene Mengenverhältnis. Dies rührt von der verschiedenen Kochdauer in der alkoholischen Salzsäure her¹¹. Es genügt das stabilste Hauptprodukt, das Keton VIII nachzuweisen. Alle diese Versuche zeigen, dass das Lignin in der Fichte auf dieselbe Weise entsteht wie in vitro.

Im Cambialsaft der Fichte wurden neben Coniferin in sehr geringen Mengen gefunden: Coniferylalkohol, Chinasäure, Hydroxymatairesinol und Pinoresinol⁷ (die beiden letzteren aus Harzgängen?). Wenn der Saft kurze Zeit bei 25° steht, so kommen Shikimisäure und Protocatechusäure hinzu. Wenn ein solches Brenzcatechinderivat mit dem aus dem Coniferin freigelegten Coniferylalkohol in den Bereich der dehydrierenden Fermente des in Verholzung begriffenen Gewebes gelangt, so wird es in das entstehende Lignin einkondensiert. Das Vorkommen im Cambialsaft ist ein Hinweis auf das oben erwähnte Defizit an Methoxyl im Lignin. Vielleicht sind Brenzcatechinkörper nicht methylierte Nebenprodukte oder Durchgangsprodukte der Coniferinsynthese. Die Dehydrierung des Coniferylalkohols führt in erster Stufe zu Radikalen, die sich ohne Mitwirkung von Enzymen automatisch zu optisch inaktiven dimeren Produkten stabilisieren. Coniferylaldehyd und Vanillin treten auch auf, aber nur 1/10% oder darunter. Bei der Dimerisierung spielen Chinomethide mit Radikalnatur eine wichtige Rolle. Aber die Dehydrierung unter Dimerisation, wie sie R. Pummerer¹² und D. H. R. Barton¹³ beim *p*-Cresol (Bildung des *p*-Chinomethidradikals IX) beobachtet haben, kommt beim Coniferylalkohol nicht oder nur in verschwindendem Umfange vor. Würde dehydrierter Coniferylalkohol über eine Radikalform reagieren, die der des dehydrierten *p*-Cresols IX entspricht, so könnte nach der Methylierung und Oxydation aus β -ständig markierten Coniferylalkohol keine radioaktive Isohemipinsäure entstehen.

Die zuerst entstehenden dimeren Dehydrierungsprodukte reagieren nicht sehr schnell weiter zu höhermolekularen Produkten. Es gelingt die Dehydrierung des Coniferylalkohols so zu führen, dass zunächst keine höheren Dehydrierungsprodukte oder Polymerisate entstehen, obwohl der grösste Teil des Coniferylalkohols schon verbraucht ist. Erst bei längerer Einwirkung des Dehydrierungsmittels treten höher molekulare Produkte auf. Sie entstehen aus den Dimeren, die grösstenteils bekannt sind, und können durch erneute Dehydrierung mit nachfolgender Kondensation der Dimeren, oder wie auch früher schon hervorgehoben, durch echte Polymerisationsvorgänge nach Art der Styrolpolymerisation aus Dimeren entstanden sein. Vielleicht bilden zwischendurch entstehende Chinonmethide das Bindemittel. Ein DHP, das aus den geschilderten dimeren Zwischenprodukten durch fortgesetzte Dehydrierung mit oder ohne zusätzliche Polymerisation entsteht, lässt alle bisher bekannten chemischen Eigenschaften des Lignins erklären, insbesondere den Sulfitaufschluss in allen seinen Phasen.

Die geringe Menge (etwa 2%) acetonlöslicher Produkte aus Fichtenholz besteht ungefähr zu einem Drittel aus methoxylfreien nichtphenolischen Substanzen. Ein Drittel wird von zahlreichen Lignanen gebildet, die zum Teil kristallisiert erhalten worden sind¹⁴. Ein weiteres Drittel, das sich von niedermolekularen Produkten befreien lässt, hat Lignincharakter (Lignin nach Brauns). Es ist dem Lignin nach Björkman und unserem DHP neuester Darstellung ähnlich, enthält jedoch mehr Sauerstoff, der vielleicht Lactongruppen angehört.

Die Dehydrierung des Sinapinalkohols X mit Pilzferment und dosiertem Luftsauerstoff, oder durch Peroxydase und vorsichtig bemessenen Mengen Hydroperoxyd, oder durch Kupfersulfat mit einer beschränkten Menge Luftsauerstoff führt zu Syringaresinol XI (etwa 80%)¹⁵. Wir haben den Eindruck, dass die Dehydrierung des Sinapinalkohols, wenn er mit keinem anderen Oxyzimt-alkohol gemischt ist, ausschliesslich oder fast ausschliesslich über das Syringaresinol verläuft. Dieses wird durch dehydrierende Mittel seinerseits angegriffen und über amorphe Produkte hinweg schliesslich weitgehend abgebaut. Eines der Endprodukte ist Dimethoxybenzochinon. Im Cambium des Flieders (Syringa) wurde Coniferin neben Syringin festgestellt⁷.

LITERATUR

1. Erkannt an der Bildung von Purpurogallin in Gegenwart von Luftsauerstoff. K. Freudenberg und B. M. Harkin, unveröffentlicht. Darstellung des Pilzferments: K. Freudenberg, *Angew. Chem.* **68** (1956) 508. Da die Dehydrierungsreaktion unspezifisch ist, haben wir auf die nähere Kennzeichnung der Enzyme keinen Wert gelegt. Infektion der Ansätze, die nur wenige Tage bei 20° stehen, haben wir nie beobachtet, *vergl.* H. G. Mason und M. Cronyn, *J. Am. Chem. Soc.* **77** (1955) 491.
2. Übersichten: K. Freudenberg, *Angew. Chem.* **68** (1956) 84, 508; A. v. Wacek, *Österr. Chem. Ztg.* **57** (1956) 33.
3. K. Freudenberg und B. Lehmann, unveröffentlicht.
4. K. Freudenberg und Erich Fischer, unveröffentlicht.
5. A. Björkman *Nature (London)* **174** (1954) 1057; *Svensk Kem. Tidskr.* **67** (1955) 36; *Svensk Papperstid.* **59** (1956); **60** (1957) 158, 243, 285, 329.
6. K. Freudenberg und K. Dall, unveröffentlicht.

7. K. Freudenberg und F. Niedercorn, unveröffentlicht.
8. K. Freudenberg und K. Dall, *Naturwissensch.* **42** (1955) 606
9. K. Freudenberg und F. Niedercorn, *Chem. Ber.* **89** (1956) 2168.
10. K. Freudenberg, *Angew. Chemie* **68** (1956) 508.
11. K. Freudenberg und M. Reichert, unveröffentlicht.
12. R. Pummerer, D. Melamed und H. Puttfarcken, *Ber.* **55** (1922) 3116.
13. D. H. R. Barton, A. M. Deflorin und O. E. Edwards, *Chem. & Ind.* (London) **1955**, 1039; *J. Chem. Soc.* **1956**, 530.
14. K. Freudenberg, und L. Knof, unveröffentlicht.
15. K. Freudenberg, Harkin und T. Fukuzumi, unveröffentlicht.

IZVOD

Prilog strukturi lignina

Karl Freudenberg

Dan je pregled novijih dostignuća u kemiji lignina, zajedno s rezultatima najnovijih, većinom još neobjavljenih eksperimenata.

UNIVERSITÄT HEIDELBERG

Primljeno 8. lipnja 1957.