

Gaschromatographische Analyse von Ligninoxydationsprodukten

V.* Zwei trimere Abbauprodukte aus Fichtenlignin

SAM LARSSON und GERHARD E. MIKSCHÉ

*Institutionen för organisk kemi, Chalmers Tekniska Högskola och Göteborgs Universitet,
Fack, S-402 20 Göteborg 5, Schweden*

Methyliertes Björkman-Lignin aus Fichtenholz wurde in zwei Stufen (KMnO_4 bei pH 11–12 und H_2O_2 bei pH 9–10) oxydativ abgebaut. Das resultierende Gemisch von Carbonsäuren wurde mit Diazomethan verestert und die Methylester wurden in einem Gaschromatograph-Massenspektrometer analysiert. Bisher sind so die Methylester von 35 ein- und zweikernigen aromatischen Carbonsäuren identifiziert worden.^{1a-c} In dieser Arbeit wird über den Nachweis von zwei weiteren, aus je drei Kernen aufgebauten Abbausäuren berichtet. Die Strukturaufklärung der zwei dreikernigen Abbausäuren zeigte, dass die bei der Untersuchung der zweikernigen Abbausäuren gewonnenen Anschauungen über die Verknüpfungsweise der aromatischen Ringe auch für höher kondensierte Strukturen gelten.

Bei einem in zwei Stufen durchgeführten oxydativen Abbau (KMnO_4 bei pH 11–12 und H_2O_2 bei pH 9–10) von methyliertem Björkman-Lignin aus Fichte (*Picea abies*) wird ein Gemisch von Carbonsäuren überwiegend aromatischer Natur erhalten.^{1a-c} Das aus den Abbausäuren nach Umsetzung mit Diazomethan erhaltene Gemisch der Methylester wurde nach einer Vorfraktionierung durch Säulenchromatographie in einem Gaschromatograph-Massenspektrometer untersucht. Bisher konnten so 35 einen oder zwei aromatische Ringe enthaltende Abbausäuren nachgewiesen werden;^{1b,c} von diesen waren schon früher etwa 20 bei der Oxydation von methyliertem und alkalisch aufgeschlossenem Fichtenholz erhalten worden.²

In dieser Arbeit soll über den Nachweis von zwei weiteren, aus drei aromatischen Kernen aufgebauten Abbausäuren berichtet werden.

In der Fraktion 52 aus der Säulenchromatographie des Estergemisches^{1b} wurden bei der gaschromatographischen Analyse zwei Komponenten auf-

* IV. Mitteilung siehe Lit. 1d.

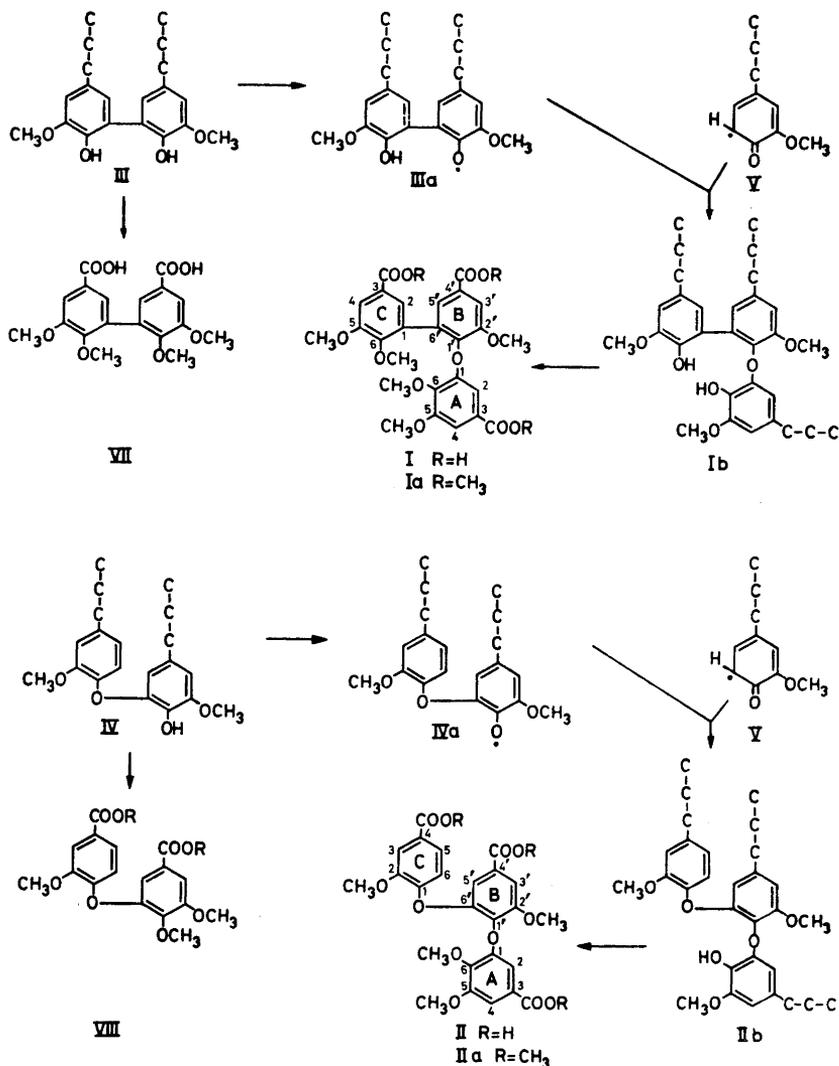
gefunden, die, verglichen mit den zweikernigen Estern, aussergewöhnlich lange Retentionszeiten aufwiesen. Es war naheliegend, diesen Komponenten Trimercharakter zuzuschreiben.

Die Komponente mit der kürzeren Retentionszeit zeigte im Massenspektrum ein Molekülion bei der Massenzahl 570. Mit Ausnahme des Fragments der Massenzahl 539 ($M^+ - 31$) wurden bei Massenzahlen über 60 keine Fragmente von mehr als 5 % der Intensität des Molekülions aufgefunden. Im Massenspektrum der anderen Komponente (Molekülion bei $m/e = 556$) fehlten ebenfalls der Interpretation des Spektrums förderliche charakteristische Bruchstücke. Die Aufklärung der Strukturen der beiden Komponenten gelang unter Zuhilfenahme von gesicherten Befunden über die Bildung des Lignins.

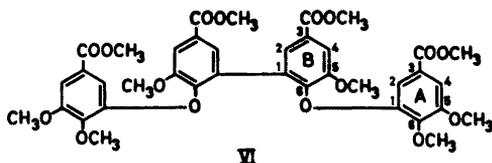
Da die Seitenketten der Phenylpropaneinheiten beim oxydativen Abbau bis zu den Carboxylgruppen abgebaut werden, kommen für eine Verknüpfung der methylierten, oxydationsresistenten aromatischen Kerne nur solche Bindungstypen in Betracht, die unter den Bedingungen des oxydativen Abbaus ebenfalls nicht angegriffen werden. Es sind dies die Biaryl- und die Diarylätherbindung. Da die Verknüpfung der Phenylpropaneinheiten im Lignin schrittweise erfolgt, ergibt sich ferner, dass die Strukturen, aus denen die beiden trimeren Säuren beim oxydativen Abbau gebildet werden, sich von Biaryl- bzw. Diarylätherstrukturen herleiten, die im Laufe der Biogenese des Lignins durch eine Biaryl- oder Diarylätherbindung mit je einem weiteren aromatischen Ring verknüpft worden sind.

Unter den Biaryl- und Diarylätherbindungen des Fichtenlignins dominieren die Biarylstrukturen vom Typ III (Abbauprodukt VII) bzw. die Diarylätherstrukturen vom Typ IV (Abbauprodukt VIII). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Strukturen, aus denen die beiden Trimerkomponenten beim oxydativen Abbau entstanden sind, sich von den Strukturtypen III und IV ableiten, und zwar in der Weise, dass die jeweils noch hinzukommende Phenylpropaneinheit als Phenylrest oder Phenylätherrest an die Strukturen III und IV durch Radikalkopplung angefügt ist. Da in den Strukturen III und IV die reaktionsfähigen Positionen in 2-, 4- und 6-Stellung zu dem den Phenoxylsauerstoff tragenden Kohlenstoff blockiert sind, ist eine Kopplung der diesen entsprechenden Radikale IIIa und IVa mit dem Radikal V vorwiegend über den Phenoxylsauerstoff zu erwarten. Die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung über die freien Kernpositionen in 3- und 5-Stellung zum Phenoxylsauerstoff ist sicher sehr gering.^{1c,d} Die einzige Kopplungsmöglichkeit, die zu einer oxydationsresistenten Bindung führt, ist also in beiden Fällen eine (O,6)-Kopplung unter Ausbildung einer Diphenylätherbindung. Aus den so entstandenen Strukturen Ib und IIb sollten nach Methylierung und oxydativem Abbau die Säuren I und II und durch deren Umsetzung mit Diazomethan die Ester Ia und IIa gebildet werden.

Die Molekulargewichte der Trimethylester Ia und IIa stimmten mit den aus den Massenspektren der gaschromatographisch getrennten Komponenten erhaltenen Massenzahlen der Molekülionen überein. Zur eindeutigen Identifizierung wurden die Vergleichspräparate Ia und IIa synthetisch dargestellt und deren Massenspektren mit denen der entsprechenden gaschromatographischen Komponenten verglichen. In beiden Fällen konnte die für die letzteren vorgeschlagene Struktur bestätigt werden.



Der Komponente mit der kürzeren Retentionszeit und der Masse 570 kommt somit die Struktur eines 2',5,6-Trimethoxy-6'-(3-carbomethoxy-5,6-dimethoxyphenyl)-diphenyläther-3,4'-dicarbonsäure-dimethylesters (Ia) zu. Das Vergleichspräparat wurde durch Umsetzung des Dikaliumsalzes von 5,5'-Dehydro-divanillinsäure-dimethylester mit 5-Brom-veratrumsäure-dimethylester bei 230° in Gegenwart von Cu-Bronze dargestellt. Der Ester Ia wurde über die Tricarbonsäure I vom Schmp. 253 – 256° gereinigt. Als Nebenprodukt der Synthese wurde der aus vier aromatischen Kernen aufgebaute Ester VI erhalten.



Die aromatischen Ringe der Komponente IIa sind durch zwei Diphenylätherbindungen verknüpft. Die Synthese des Vergleichspräparates IIa erfolgte in einem Schritt durch gleichzeitige Umsetzung des Kaliumsalzes von 5-Brom-vanillinsäure-methylester mit dem Kaliumsalz von Vanillinsäure-methylester und mit 5-Brom-veratrumsäure-methylester. Nach Reinigung des Reaktionsgemisches auf einer Al_2O_3 -Säule wurde der 2',5,6-Trimethoxy-6'-(4-carbomethoxy-2-methoxy-phenoxy)-diphenyläther-3,4'-dicarbonsäure-dimethylester (IIa) in geringer Ausbeute rein erhalten.

Die synthetisch erhaltenen Präparate I, Ia, IIa und VI lieferten Protonenresonanzspektren, die mit den angegebenen Strukturen im Einklang stehen. Die Werte für chemische Verschiebung, und die Kopplungskonstanten sind im exp. Teil angeführt.

Die Ausbeuten an Ia und IIa beim oxydativen Abbau betragen 0,04 bzw. 0,02 % vom Gew. des Lignins. Dabei muss beachtet werden, dass beim oxydativen Abbau der methylierten Ausgangsstrukturen Ib und IIb zu den Säuren I bzw. II je drei Seitenketten zu den aromatischen Carboxylgruppen oxydiert werden müssen. Weiterhin sind im Lignin bei einem Teil der Strukturen Ib und IIb die phenolischen Hydroxylgruppen wahrscheinlich veräthert; dieser Anteil ist der Methylierung und damit dem zu I und II führenden Abbau nicht zugänglich. Die früher^{1c} aufgefundene 5',6,6'-Trimethoxy-diphenyläther-2,3',4'-tricarbonsäure dürfte ein Abbauprodukt einer im Lignin am Phenoxyloxygenstoff in Ring C verätherten Trimerstruktur Ib darstellen.

Trimerstrukturen vom Typ Ib sind schon früher unter den Produkten der enzymatischen Dehydrierung von 4-Hydroxy-3-methoxy-propiofenon³ aufgefunden worden. Eine Verbindung vom Strukturtyp IIb ist eines der Produkte der enzymatischen Dehydrierung von 4-Propylguajakol.⁴ Die Ester der Abbausäuren I und II wurden auch nach oxydativem Abbau von mit H_2O_2 -Peroxydase dehydriertem *erythro*-Guajacylglycerin- β -(2-methoxyphenyl)-äther⁵ aufgefunden.⁶

Die Strukturaufklärung der zwei trimeren Abbauprodukte Ia und IIa aus Fichtenlignin zeigt, dass die bei der Untersuchung der Dimerfraktion^{1a-c} gewonnenen Anschauungen über die Verknüpfungsweise der aromatischen Ringe auch für höherkondensierte Strukturen gelten.

EXPERIMENTELLER TEIL

Oxydativer Abbau. Auftrennung des Gemisches der Methylester der Abbausäuren. Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Siehe exp. Teil der 2. Mitteilung dieser Reihe.^{1b}

Der Ester Ia wurde in den Fraktionen 51 und 52, der Ester IIa in der Fraktion 52 aus der Säulenchromatographie aufgefunden.

Zur Bestimmung der Retentionszeiten wurde isotherm bei einer Temp. von 260° chromatographiert. *Retentionszeiten:* Ia 38,0 Min; IIa 44,5 Min.

Massenspektren der Verbindungen Ia und IIa. (Teilmassenspektren; nur Bruchstücke mit einer relativen Intensität ≥ 3 und einer Massenzahl > 45 wurden beachtet, ausgenommen solche Bruchstücke geringerer Intensität, die an der Bildung metastabiler Ionen beteiligt sind).

Ia.										
<i>m/e</i>	570	539	507	479	359	344	343	327	313	299
<i>relat. Int.</i>	100	12	4	4	5	3	3	5	4	3
IIa.										
<i>m/e</i>	285	209	194	59						
<i>relat. Int.</i>	3	7	5	16						

Metastabile Ionen (*m/e*, *m/e* berechnet, für Übergang): 508, 509,6, 570→539; 451, 450,9, 570→507; 259,5, 259,5, 313→285; 188, 187,6, 570→327; 180, 180,1, 209→194; 76,5, 76,6, 570→209.

IIa.										
<i>m/e</i>	556	525	510	493	482	375	360	343	329	299
<i>relat. Int.</i>	100	12	3	3	3	2	8	6	3	3
<i>m/e</i>	262,5	247	209	194	181	59				
<i>relat. Int.</i>	3	4	4	3	3	8				

Metastabile Ionen (*m/e*, *m/e* berechnet, für Übergang): 494, 495,7, 556→525; 437,5, 437,1, 556→493; 314, 313,7, 375→343; 301, 300,7, 360→329; 253, 252,9, 556→375; 247, 246,9, 525→360; 211,5, 211,5, 556→343; 180, 180,1, 209→194; 78,6, 78,6, 556→209.

Die Massenspektren wurden mit einem MS 902 Massenspektrometer der Firma AEI, England, aufgenommen. *Temperatur der Ionenquelle*: Ia 185°; IIa 190°. *Elektronenenergie*: 70 eV. Die mit dem Gerät LKB 9000 erhaltenen Massenspektren der Verbindungen Ia und IIa unterschieden sich trotz der wesentlich höheren Temperatur der Ionenquelle (300°) von den mit dem Gerät von AEI erhaltenen nur geringfügig.

Bemerkungen zu den Massenspektren. Das Bruchstück der Masse 209 ist beiden Estern gemeinsam. Es sollte durch Spaltung der die Ringe A und B verbindenden Diarylätherbindung, und zwar zwischen Äthersauerstoff und Ring B, entstanden sein. Auch im hier nicht beschriebenen Massenspektrum der Verbindung VI tritt ein Fragment der Masse 209 auf. Ebenfalls den drei Verbindungen Ia, IIa und VI gemeinsam ist das Fragment bei *m/e*=194 (209-15). Einer Spaltung der Diarylätherbindung zwischen den Ringen A und B in Verbindung Ia sind wahrscheinlich auch die Bruchstücke bei *m/e*=359 und 327, in Verbindung IIa die Bruchstücke bei *m/e*=375 und *m/e*=360 zuzuschreiben. Diese Fragmentierungsreaktionen verlaufen unter mehrfacher H-Verschiebung; eine Deutung des Fragmentierungsvorganges ist schwierig.

Protonenresonanzspektren. Aufgenommen mit einem 60 MHz Varian A-60 Gerät. Ca. 20-proz. Lösungen in CDCl₃ (Ia, IIa und VI) sowie in Hexadeutero-aceton (I). Tetramethylsilan als innerer Standard.

a) *Ringprotonen* (Ring; Proton; Chem. Verschiebung, δ -Wert in ppm (Multiplizität); Kopplungskonst. in Hz).

I. A; 2, 6,28 (d); 4, 6,73 (d); $J_{2,4}=1,75$. B; 3', 7,07 (d); 5', 6,95 (d); $J_{3',5'}=2,0$. C; 2, 7,14 (d); 4, 7,28 (d); $J_{2,4}=1,9$.

Ia. A; 2, 6,86 (d); 4, 7,03 (d); $J_{2,4}=1,85$. B; 3' oder 5', 7,56 (d); 3' oder 5', 7,60 (d); $J_{3',5'}=2,0$. C; 2 oder 4, 7,74 (d); 2 oder 4, 7,76 (d); $J_{2,4}=2,15$.

IIa. A; 2, 7,02 (d); 4, 7,27 (d); $J_{2,4}=1,95$. B; 3', 7,22 (d); 5', 7,48 (d); $J_{3',5'}=1,9$. C (siehe die nachfolgende Erläuterung); 3, 7,57 (m); 5, 7,57 (m); 6, 6,90 (t); $J_{3,5}\approx 2,0$; $J_{3,6}\approx 0$; $J_{5,6}=8,9$.

Die Protonen in Ring C zeigen ein ABX-Spektrum. Das mit Hilfe der obigen Werte berechnete Spektrum⁷ stimmt gut mit dem beobachteten überein (H-3 und H-5 geben als AB-Teil des Spektrums ein Sextett, gebildet durch Überlagerung zweier Quartette; der X-Teil des Spektrums zeigt ein durch Überlagerung von je zwei Spitzen gebildetes Triplet mit einer zentralen Spitze von geringer Intensität).

VI. A; 2, 6,16 (d); 4, 6,75 (d); $J_{2,4}=1,95$. B; 2, 7,21 (d); 4, 7,36 (d); $J_{2,4}=2,0$.

b) *O-Methylprotonen* (Chem. Verschiebung, δ -Wert in ppm; Zahl der OCH₃-Gruppen).

I. 3,17 (1); 3,23 (1); 3,35 (2); 3,39 (1).

Ia. Die chemische Verschiebung der O-Methylprotonen wurde relativ zur O-Methylgruppe bei $\delta=3,76$, festgelegt als 3,760, gemessen. 3,76 (1); 3,775 (1); 3,818 (1); 3,837 (2); 3,872 (1); 3,884 (1); 3,957 (1).

IIa. Die chemische Verschiebung der *O*-Methylprotonen wurde relativ zur *O*-Methylgruppe bei $\delta = 3,78$, festgelegt als 3,780, gemessen. 3,78 (1); 3,809 (1); 3,824 (1); 3,833 (1); 3,842 (1); ca. 3,844 (1); 3,846 (1).

VI (Ringe A und B). 3,64 (2); 3,67 (1); 3,87 (1); 3,89 (1).

Synthesen

2',5,6-Trimethoxy-6'-(3-carboxy-5,6-dimethoxyphenyl)-diphenyläther-3,4'-dicarbonsäure (I). Aus 3,62 g 5,5'-Dehydro-divanillinsäure-dimethylester⁹ und 2,24 g *K*-*tert*-butylat wurde in Methanol-Toluol das Dikaliumsalz dargestellt. Ein inniges Gemisch dieses Salzes (3,7 g) mit 2,1 g 5-Bromveratrumsäure-methylester⁹ und 0,6 g Kupferbronze wurde unter N_2 2 Stunden auf 230° sowie 4 Stunden auf 240–245° erwärmt. Das in Aceton aufgeschlämmte Reaktionsprodukt wurde unter Erhitzen am Rückfluss portionsweise mit Dimethylsulfat und Kaliumcarbonat versetzt. Dann wurde vom Rückstand abfiltriert, das Filtrat zur Trockene gebracht und der Rückstand in $CHCl_3$ aufgenommen. Die Chloroformlösung wurde mit verd. NaOH und H_2O gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und das nach Vertreiben des Lösungsmittels erhaltene Öl im Kugelrohr destilliert. Ein Teil (220 mg) der bei 220–240°/0,02 Torr übergehenden Fraktion (960 mg) kristallisierte aus Äther-Methanol. Nach Umkristallisieren aus Essigester- $CHCl_3$ sowie aus Methanol- $CHCl_3$ wurden farblose Prismen des 6,6'-Bis-(3-carbomethoxy-5,6-dimethoxy-phenoxy)-5,5'-dimethoxy-biphenyl-3,3'-dicarbonsäure-dimethylesters (VI) erhalten; Schmp. 197–199°. Für das Molekülion von VI wurde eine Masse von 750,2139 gefunden. (Ber. für $C_{38}H_{38}O_{16}$: $M = 750,21596$.)

Aus der Mutterlauge von VI wurden nach Verseifen mit methanolischer KOH 230 mg der 2',5,6-Trimethoxy-6'-(3-carboxy-5,6-dimethoxyphenyl)-diphenyläther-3,4'-dicarbonsäure (I) erhalten. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Essigester-Methanol zeigte diese Säure einen Schmp. von 253–256°; unregelmässige, farblose Prismen. (Gef.: C 59,09; H 4,60; OCH_3 29,36. Ber. für $C_{38}H_{34}O_{18}$ (528,48): C 59,09; H 4,58; OCH_3 29,36.)

Durch Behandeln der Säure I mit Diazomethan in Äther-Methanol wurde der Ester Ia dargestellt. Farblose Prismen vom Schmp. 111–113° aus Methanol. Die Probe für die Elementaranalyse wurde am Kühlfinger destilliert. (Gef.: C 61,20; H 5,53; OCH_3 43,17. Ber. für $C_{28}H_{30}O_{12}$ (570,56): C 61,05; H 5,30; OCH_3 43,51.)

2',5,6-Trimethoxy-6'-(4-carboxy-2-methoxy-phenoxy)-diphenyläther-3,4'-dicarbonsäure (II). Ein gut homogenisiertes Gemisch, bestehend aus 10,5 g des Kaliumsalzes von 5-Brom-vanillinsäure-methylester,¹⁰ 7,7 g des Kaliumsalzes von Vanillinsäure-methylester (die beiden Kaliumsalze wurden aus den entsprechenden Phenolen in Methanol-Toluol dargestellt), 9,6 g 5-Brom-veratrumsäure-methylester⁹ und 3,3 g Cu-Pulver, wurde unter N_2 4 Stunden auf 180° und dann weitere zwei Stunden auf 225–230° erhitzt. Nach Erkalten wurde das Reaktionsprodukt in warmem Chloroform aufgeschlämmt, Petroläther zugegeben, und die grauschwarze Fällung abfiltriert. Der nach Abdampfen des Lösungsmittels verbleibende Rückstand wurde in Toluol gelöst und die Lösung mit verd. NaOH und H_2O gewaschen. Nach Trocknen und Vertreiben des Lösungsmittels wurde der Rückstand im Kugelrohr destilliert. Die Fraktion (2,3 g), in der sich der Ester IIa befand, ging bei 240–250°/0,03 Torr über. 1 g dieser Fraktion wurde in wenig Benzol gelöst und auf eine mit 50 g Al_2O_3 (Merck, neutral, für die Chromatographie) gefüllte Säule von den Abmessungen 42 × 1,2 cm aufgebracht. Zuerst wurde mit 20 % Äther in Cyclohexan (0,5 Liter) und dann mit 30 % Äther in Cyclohexan (1,5 Liter) chromatographiert. Während des Durchsatzes der letzten 500 ml des Lösungsmittelgemisches wurden insgesamt 414 mg des Esters eluiert. Der Ester IIa kristallisierte in farblosen, kugelförmigen Kristalldrusen aus Methanol; Schmp. 127–129°. (Gef.: C 60,41; H 5,09; OCH_3 39,16. Ber. für $C_{28}H_{28}O_{12}$ (556,53): C 60,43; H 5,07; OCH_3 39,03.)

Durch Verseifen mit methanolischer KOH wurde die 2',5,6-Trimethoxy-6'-(4-carboxy-2-methoxy-phenoxy)-diphenyläther-3,4'-dicarbonsäure (II) erhalten. Amorphes weisses Pulver aus Eisessig- H_2O . Die Substanz beginnt bei ca. 145° zu sintern. (Gef.: C 58,28; H 4,36; OCH_3 23,86. Ber. für $C_{28}H_{28}O_{12}$ (514,46): C 58,37; H 4,31; OCH_3 23,86.)

Die Analysen wurden unter Leitung von Dr. J. Zak am Mikroanalytischen Laboratorium am Inst. f. physik. Chemie d. Univ. Wien ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. E. Adler danken wir für wertvolle Diskussionen. Für die Ermöglichung der massenspektrometrischen Analyse (LKB 9000) sind wir Herrn Prof. Dr. E. von Sydow zu Dank verpflichtet.

Diese Arbeit wurde von der Westvaco Corp., New York, unterstützt.

LITERATUR

1. a) Larsson, S. und Miksche, G. E. *Acta Chem. Scand.* **21** (1967) 1970; b) *Ibid.* **23** (1969) 917; c) *Ibid.* **23** (1969) 3337; d) *Ibid.* **25** (1971) 647.
2. Freudenberg, K., Chen, C.-L. und Cardinale, G. *Chem. Ber.* **95** (1962) 2814; Freudenberg, K. und Chen, C.-L. *Ibid.* **100** (1967) 3683.
3. Pew, J. C. und Connors, W. J. *J. Org. Chem.* **34** (1969) 585.
4. Pew, J. C., Connors, W. J. und Kunishi, A. *Chimie et biochimie de la lignine, de la cellulose et des hémicelluloses, Actes du symposium international de Grenoble 1964*, Les impr. réunies de Chambéry 1965, S. 229.
5. Miksche, G. E., Gratzl, J. und Fried-Matzka, M. *Acta Chem. Scand.* **20** (1966) 1038.
6. Brunow, G., Larsson, S. und Miksche, G. E. *Unveröffentlicht.*
7. Pople, J. A., Schneider, W. G. und Bernstein, H. J. *High Resolution Nuclear Magnetic Resonance*, McGraw, New York 1959.
8. Erdtman, H. *Svensk Kem. Tidskr.* **47** (1935) 223.
9. Whaley, W. H., Starker, L. und Meadow, M. J. *J. Org. Chem.* **18** (1955) 833.
10. Harris, M. M., Potter, W. G. und Turner, E. E. *J. Chem. Soc.* **1955** 145.

Eingegangen am 27. Juni 1970.