על המבנה הליגנין בצמחים ירוקים והשינויים החלים בו עקב התעכלותו בגוף מעלה – הגרה

חבור לשם קבלת התואר
„דוקטור לפילוסופיה"

מאת

הנס (חנן) מאיר

הוגש לסינט של האוניברסיטה העברית ירושלים, כסל"ו תש"ח

[illegible]

[illegible] [illegible]

[illegible] [illegible] [illegible]

[illegible] [illegible] [illegible]

לדעיתי

תודתי נתונה כזה לפרופ' ד"ר
א. פודור שקיבל עבודה זו תחת
חסותו, למר י. הסטרין, אדמי-
ניסטרטור כללי של התפנה לחקר
החקלאות ברחובות, שאיפשר לי
להוציאה לפועל ולד"ר א. כונדי
עבור הדרכתו היעילה והמסורה.

תוכן הענינים:

דף

הקדמה.....1

חלק 1.
א. שיטות הכנת הליגנינים.....3
ב. סגולות הליגנינים.....7

חלק 2.
על החנקן בליגנינים.....7

חלק 3.
הליגנין והפחמימיות הפולימריות.....12

חלק 4.
הקבוצות הפונקציונליות בליגנין:
א. הידרוקסיל ומתאוקסיל.....12
ב. קבוצות אלדהיד וקטו.....14

חלק 5.
על הפירוק של הליגנינים:
הקדמה.....15
א. חימצון בניטרובנזול.....16
ב. התכה ב- KOH.....18
ג. פירוק בעזרת בוהל חמוץ.....18
ד. שיטות חיזור.....20

חלק 6.
נסיונות לקביעת המשקל המולקולרי של הליגנינים.....21

חלק 7.
דיון על תוצאות הנסיונות:
א. לשאלת התהוות הליגנין בצמח.....22
ב. ההבדלים בין ליגנינים-הצמחים וליגנינים-העצים.....26
ג. מבנה הליגנינים.....27
ד. עיכול הליגנינים בגוף החי.....33

חלק נסיוני.....34

סיכום.....42

סכרות.....45

תוספת מס' 1: נוטחאות החמרים הנזכרים בעבודה

תוספת מס' 2: נוטחאות הליגנין

סיכום (באנגלית)

תוכן הענינים:

דף

הקדמה..... 1

חלק 1.
א. שיטות הכנת הליגנינים..... 3
ב. סגולות הליגנינים..... 7

חלק 2.
על החנקן בליגנינים..... 7

חלק 3.
הליגנין והפחמימיות הפולימריות..... 12

חלק 4.
הקבוצות הפונקציונליות בליגנין:
א. הידרוקסיל ומתאוקסיל..... 12
ב. קבוצות אלדהיד וקטו..... 14

חלק 5.
על הפירוק של הליגנינים:
הקדמה..... 15
א. חימצון בניטרובנזול..... 16
ב. התכה ב- KOH..... 18
ג. פירוק בעזרת כוהל חמוץ..... 18
ד. שיטות חיזור..... 20

חלק 6.
נסיונות לקביעת המשקל המולקולרי של הליגנינים..... 21

חלק 7.
דיון על תוצאות הנסיונות:
א. לשאלת התהדות הליגנין בצמח..... 22
ב. ההבדלים בין ליגנינו-הצמחים וליגנינו-העצים..... 26
ג. מבנה הליגנינים..... 27
ד. עיכול הליגנינים בגוף החי..... 33

חלק נסיוני..... 34

סיכום..... 42

סכרות..... 45

תוספת מס' 1: נוטחאות החמרים הנזכרים בעבודה

תוספת מס' 2: נוטחאות הליגנין

סיכום (באנגלית)

בארבעים השנים האחרונות הופיעו עבודות רבות ומקיפות על בעית הליגנין שבעצים; לעומת זאת עסקו רק מחקרים מעטים בליגנין שבצמחים הירוקים. ואפשר למנות כמה סיבות לכך:-

ליגנין הריהו אחד המרכיבים העיקריים שבעץ, אבל הצמחים הירוקים מכילים רק כמויות קטנות באופן יחסי של ליגנין ולכן אפשר להכין את הליגנין מצמחים אלה בניצולת קטנה בלבד. גם הפרדת הליגנין משאר החמרים שבצמחים הירוקים ניתקלת בקשיים גדולים יותר מאשר הכנת הליגנין מחומר עצי, כי הליגנין בצמחים הירוקים מעורב או קשור בקשרים כימיים בהרבה חמרים אחרים, שהפרדתם והרחקתם דרושה לפני שיכולים לגשת להכנה פרפרטיבית של ליגנין נקי. חמרי-הלואי העיקריים של הליגנין בצמחים ירוקים הנם: צלולוזה, פחמימיות אחרות וחלבון. בגלל נוכחותם של חמרי-לואי אלה איננה קיימת האפשרות לעריכת ריאקציות-פירוק של הליגנין בחומר צמחי כמו-שהוא, כנהוג בחקירות של ליגנין העץ שבו מביא הטיפול הישר (בלי הרחקת חמרי-לואי) לתוצאות טובות. סוף-כל-סוף לא היה מוצדק להתחיל בחקירות על הליגנין של הצמחים הירוקים כל עוד שהמבנה של הליגנין בעצים, חומר הנראה יותר פשוט ואחיד, לא היה ידוע די צרכו. ב-20 השנים האחרונות אמנם הונח יסוד טוב לבירור מבנה הליגנין שבעץ ע'י עבודותיהם של Erdtman, Freudenberg, Hibbert (1,2,3).

חקירות הליגנינים בצמחים הירוקים יכולה לספק לנו גם ידיעות בעלות-ערך על תהליך התהוות הליגנינים בעץ, אם אנו מניחים שהליגנין שבעצים הוא תוצאה סופית של תהליכי סינטזה אשר טרם הגיעו להשלמה בצמחים הצעירים. אני מקוה, איפוא, שבירור מבנה הליגנין שבצמחים ירוקים יכול להביא להשקפות יותר מבוססות גם על המבנה של ליגנין העצים.

העבודות המעטות שעסקו עד עכשיו בשאלת הליגנין בצמחים הירוקים נערכו בעיקר לשם קביעת מידת העיכול של הריקמות "העציות" הנמצאות בכמויות ניכרות בגבעולים של ה- Gramineae בפרט בתקופות האחרונות של גידולם. הליגנינים האלה עברו תהליך התפתחות די ארוך ולכן דומים כבר לליגנינים שבעצים. נסיונות עיכול מסוג זה נערכו בדרך כלל במעלי-גירה, כגון: פרות או כבשים, כדי לקבוע את מקדמי העיכול של המרכיבים היותר חשובים של גוף הצמח. הליגנין בקש מהווה 16-20% של כל החומר היבש, ולכן הוא חומר די חשוב, שמידת עיכולו משפיעה במידה ניכרת על ערך המזוני של החמרים הנ'ל. בדרך כלל הביאו נסיונות עיכול שנערכו בקש וחמרים דומים לתוצאה שהליגנין באותם החמרים אינו נעכל למעשה (51, 50, 20, 18). בשנת 1943 פורסמה עבודה ע'י Bondi & Meyer (9), שהתוצאה העיקרית ביחס לליגנין היתה שהליגנין שבצמחי כספוא טריים נעכל במידה נכרת ושמקדמי העיכול של הליגנינים שבצמחים שונים נעים בין 34% ו-65% בעבודה זו נקבע לא רק מקדם-העיכול של הליגנין, כי אם גם חלוקתו בין-התאית =) וחמרי-מצוי מחוסרי חנקן. היות, ותוצאות העבודה הזאת הניעו אותי לערוך את הנסיונות, שידובר עליהן להלן, אתן פה סקירה קצרה על העבודה הנזכרת לעיל (9).

לפי השיטה המקובלת לבדיקת חמרי מזון קובעים את כמות המים, החלבון (N x6.25) השומן (מיצוי אתרי) האפר ואת התאית =). את "חמרי מיצוי חסרי-חנקן" אינם קובעים ע'י בדיקה ישרה, אלא מחשבים את כמותם ע'י ההפרש שבין 100 ובין הסכום (מים + אפר + תאית + שומן + חלבון). ה ת א י ת, הריהי השארית המתקבלת אחרי הרתחת דוגמת המזון בחומצה גפריתנית וב- KOH, בני 1,25% כל אחד; למשך 1/2 שעה ==). לפי השיטה המקובלת הליגנין שבצמחים אינו נקבע במיוחד, אלא הוא מופיע בחלקו בתאית ובחלקו בחמרי מיצוי חסרי-חנקן.

בעבודה של בונדי ומאיר נעשו בדיקות הליגנין, שבצמחי מספוא שונים ובגלילים של כבשים, שקבלו כמזון אך ורק כמות מסויימת של צמח מספוא אחד. נוסף לכך נעשו בדיקות הליגנין שבתאית, שהוכנה באופן פרפרטיבי מדוגמאות צמחים או צואה, שנתקבלה אחרי האכלת הצמחים. נמצא, שהתאית איננה מכילה את כל כמות הליגנין שבצמחים או בצואה. חלק ניכר של הליגנין נמס בשעת קביעת ה"תאית" באלקלי. מן הנתונים הרשומים בטבלה מס' 1 יוצא, שהחלק הגדול ביותר של הליגנין מופיע בחמרי מיצוי חסרי-חנקן.

חלוקת הליגנין בצואה בין תאית וחמרי מיצוי חסרי-חנקן היא אחרת; חלק גדול יותר של הליגנין מן הצואה נכנס לפרקציית התאית. הסבה לכך בזה, שחלק הליגנין שבתאית הוא קשי-תמס ולכן גם נעכל במידה קטנה יותר ומופיע, איפוא, בצואה. הליגנין קל-תמס יותר (אשר בצמחים מופיע ברובו בחמרי מיצוי חסרי-חנקן) נעכל ולכן איננו מופיע כבר בצואה.

=) בעבודה הזאת מסמנת המלה "תאית" את המושג Crudefiber (Rohfaser)

==) כל אחד מן הטיפולים הנ'ל נמשך 1/2 שעה.

במובן המסיסות בבסיסים, שונה הליגנין שבצמחים צעירים מזה שבעציה. כי הלגנין מעצים אינו נמס כלל בבסיסים. (השיטה ששימשה בעבודה זאת להכנת הליבנין היא מבוססת על תכונת המסיסות הנ'ל).

טבלא מס' 1

חלוקת הליגנין בית התאית ובין חמרי מיצוי חסרי-חנקן
(באחוזים של הליגנין הכללי)

חומר	ליגנין בתוך התאית	ליגנין בתוך חמרי מיצוי חסרי-חנקן
תלתן	26.4	74.0
צואה אחרי האכלת תלתן	36.4	63.6
Lathyrus ochrus	34.3	65.7
צואה אחרי האכלתו	66.5	33.5
Vicia narbounensis	30.9	69.1
צואה אחרי האכלתו	53.9	46.1
Eragrostis Teff	17.6	82.3
צואה אחרי האכלתו	15.4	84.6

עלי לציין עוד תוצאה אחרת מהעבודה של בונדי ומאיר (9); מהעבודה הנ'ל יוצא שמידת העיכול של הליגנין נעה תמיד באותו כיוון כמו מידת העיכול של חמרי מיצוי חסרי-חנקן, ז.א. בצמחים המכילים ליגנין נעכל יפה, חמרי מיצוי חסרי-חנקן נעכלים גם הם במידה גדולה. המספרים המראים על הקשר הזה רשומים בטבלא מס' 2.

התנודות במידת העיכול של חמרי מיצוי חסרי חנקן למעשה הן תנודות במידת העיכול של הליגנין, כי לשאר מרכיבי הפרקציה הזאת, בעיקר פנטוזנים והקסוזנים, נודעת בצמחי מספוא השונים מידת עיכול בערך שווה. (ראה תוצאות נוספות בעבודה (9)). כידוע ההקסוזנים והפנטוזנים הם מחוץ לליגנין המרכיבים העיקריים של חמרי המיצוי חסרי-חנקן וניתנים בגוף החי להידרוליזה לסוכרים פשוטים, ולכן - לעיכול שלם יותר.

טבלא מס' 2.

מידת העיכול של הליגנין וחמרי מיצוי חסרי-חנקן
(באחוזים של הכמויות הכלליות)

חומר	מידת העיכול של חמרי מצוי חסרי חנקן	מידת העיכול של הליגנין
טף, Eragrostis teff	63.0	35.1
בקיה נרבוננסיס Vicia narbonensis	73.9	41.1
תלתן קציר 3	71.9	47.5
תורמוס מתוק	78.6	50.2
מרן, (טופח קפריסי Lathyrus ochrus	80.8	52.1
דצמבר, (טופח קפריסי " "	87.5	58.5
תלתן, קציר (5)	85.9	64.0

להסבר ההקבלה במידת העיכול של חמרי המיצוי חסרי החנקן ובין מידת העיכול של הליגנין משמשות שתי ההשערות הבאות:

(א) הליגנין הפחמימיות הנמסות מהוים קומפלקס נמס, אשר ניתן להמסה טובה במיצי העיכול;

(ב) הליגנין בעצמו הוא בעל מבנה הדומה לזה של הפחמימיות. לכן הוא נעכל במידה בה נעכלות הפחמימיות עצמן.

ההנחה האחרונה סומכת על התיאוריה, שהליגנין נוצר בצמח ע'י תהליך של קונדנסציה של הפחמימיות. מצד שני עלינו גם להתחשב בזה שמקדמי העיכול של הליגנין קטנים מאלה של הפחמימיות הפשוטות והמורכבות שבחמרי מיצוי חסרי-חנקן. דבר זה מראה על העובדה, שכבר הליגנין בצמח הצעיר מכיל "גרעין", שאינו בעל אופי פחמימי ולכן אינו ניתן לכל השפעה ע'י אנזימים מפרקי-פחמימיות. העובדה, שבכלל קיימים הבדלים במידת העיכול של הליגנין

ושל הפחמימיות סותרת את התיאוריה של Hilpert (31), אשר מניח, ש-"ליגנין" לא קיים כלל וכלל בצמח אלא מתהוה ע'י תהליך קונדנסציה מפחמימיות בשעת קביעתו האנליטית של הליגנין. אילו השקפתו של הילפרט היתה נכונה, אזי הליגנין היה נעכל כיחר הפחמימיות. (Hilpert בזמנו הניח שהליגנין מתהווה מ- Methylpentose), (ראה 4, 2).

בהתאם לתוצאות הנ"ל (9) ובהתחשב עם התוצאות, שהושגו ע'י המחברים הנזכרי: מעלה (1-5) קבעתי לעבודה שלפנינו את המטרות הבאות:

(1) עובדה שיטה להכנה פרפרטיבית של ליגנינים מצמחים צעירים ומצואה שהתקבלה מכבשים, שניזונו באותם הצמחים. השיטה צריכה למנוע מטימוש בחמצנים דרסטיים, כדי לא לשנות את מבנה הליגנין בשעת הכנתו;

(2) נסיון בירור המבנה הכימי של הליגנינים שבצמחים הירוקים הצעירים, בהתחשב בידיעותינו על הליגנין שבעצים. השואת מבנה הליגנין שבעצים ובצמחים ירוקים;

(3) קביעת השינויים, החלים בליגנין שבצמחים ירוקים בשעת מעבר הצמחים דרך גוף מעלי-הגירה.

(4) הצעה לנוסחה כימית לליגנינים, שמסוגלת לתאר את התנהגותם הכימית והפיסיולוגית של הליגנינים הנ'ל.

=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=

חלק I.

שיטות הכנת הליגנין

קיימות שתי דרכים שונות באופן עקרוני להפרדת הליגנין משאר החמרים שברקמות הצמחים. לפי הדרך הראשונה ממסים את כל שאר החמרים שבצמח והליגנין מתקבל כשאריה בלתי נמסה. לפי הדרך השניה ממיסים רק את הליגנין ומשאירים את כל יתר המרכיבים. השיטות לפי העקרון הראשון שמשו גם להכנה פרפרטיבית וגם לקביעה האנליטית של הליגנין, כל השיטות הנ'ל מבוססות על העובדה, שהליגנין אינו נמס בחומצות מרוכזות אי-אורגניות, אשר ממיסות את כל יתר מרכיבי ריקמת הצמח Willstatter & Zechmeister השתמשו בחומצות מלח מרוכזות מאד בדי לבודד את הליגנין. לפי Kalb (34) מטפלים בצמחים בתערובת של חומצת מלח וחומצה גפריתנית מרוכזת, כדי להשיג את אותה המטרה. שתי השיטות האלה משמשות בעיקר לקביעה אנליטית של הליגנין. Klason (36, 35) משתמש בחומצה גפריתנית 72% להפרדת הליגנין. שיטה זו שימשה בעיקר למטרות פרפרטיביות (ראה גם (37) Koenig & Rump). כושר המסת הצללוזה של חומצה גפריתנית בעלת ריכוז זה ידוע מזמן. לשיטות הכנת הליגנין לפי הדרך הראשונה שייכת גם זו של Frendenberg (21). החוקר הזה מטפל בעץ טחון פעמים אחדות בסירוגין בתמיסה אמוניאקלית של תחמוצת הנחושת וחומצה מהולה. כתוצאה מהטיפול הזה הוא מקבל חומר, שלפי דעתו הנו לגנין נקי. ע'י טיפול בתמיסה אמוניאקלית של תחמוצת הנחושת הוא מרחיק את הצללוזה, למעשה החומר היחידי שנמצא בעץ נוסף לליגנין. ע'י הטיפול בחומצה מהולה הוא מרחיק את הכמויות הקטנות של פנטוזנים שבעץ. שיטה חדישה שהוצעה ע'י Wiechert (59) משתמשת במימן פלואורי נוזל כממיס. בשיטות לפי הדרך השניה ממיסים, כאמור, את הליגנין. Powell (5), Whittaker מטפלים בעצים ב NaOH תחת לחץ, כדי להמיס את הליגנין. Lebmann, Liesche, Beckmann (8) ממיסים את הליגנין שבקש בתמיסת NaOH מימית בחום מהולה.

Phillips (40-47) משתמש בתמיסה של 2% NaOH בתוך כוהל 60% להמסת הליגנין בטמפרטורה נמוכה. את הליגנין, שלפי השיטות הנ'ל מתקבל בתמיסה אלקלית, משקיעים אחר-כך בעזרת חומצות מהולות.

הוצעו גם שיטות, שבהן משתמשים בממיסים אורגניים להמסת הליגנין. Gruess (27) עבד בכוהל, Kalb & Schoeller (34) וכ'כ Fuchs (5) משתמשים ב- Phenol לאותה המטרה.

השיטות לפי הדרך הראשונה - הוצאתן לפועל פשוטה ביותר. אבל בגלל חסרונות מסוימים השיטות הנ'ל אינן באות בחשבון להכנה פרפרטיבית של ליגנין בצמחים ירוקים. אמנם הקביעה האנליטית, לפי השיטות הנ'ל, מביאה לידי תוצאות טובות בתנאי, שנבדקות דוגמאות צמחים קטנות (לא יותר מגרם אחד), כשהצמחים טחונים דק. יש גם לשים לב באופן קפדני לטמפרטורה קבועה ולבחישה טובה מאד. אמנם כשמנסים להכין ליגנין מכמויות גדולות של צמחים באופן פרפרטיבי בעזרת חומצות מרוכזות, מתקבלים לעתים קרובות חמרים שחורים בלתי הומוגנים, שמראים עוד את המבנה של הרקמות שמהם הוכנו, סימן, שפעולת החומצה היתה בלתי שלמה. כמו כן ה"ליגנינים" האלה מזוהמים בכמויות ניכרות של פחמימיות. הסיבה להופעה הבלתי רצויה הזאת יש לחפש בתהליך של "הומיפיקציה", שחלה ברקמות הצמחים תחת השפעת החומצות המרוכזות והופכת את הפחמימיות לתוצרות קונדנסציה בלתי נמסות. (בעצים לא קיימת סכנה כזאת, כי שם אינם נמצאים פחמימיות וחלבון, שעלולים להפריע, אלא רק צלולוזה, אשר מתמוססת היטב בחומצות.

הנסיונות להשתמש בשיטה של Freudenburg להכנת הליגנין מצמחים ירוקים לא הביאו אף הם לתוצאות טובות. השימוש בתמיסה אמוניאקלית של תחמוצת הנחושת גרמה, מצד אחד לתפיחת הרקמות, אשר ביטלה לגמרי את תהליך המסת הצללוזה. מצד שני התמוססו כמויות גדולות של ליגנין בתמיסה האמוניאקלית. כתוצאה מהטיפול הזה נשאר, איפוא, חומר שהכיל עוד כמויות גדולות של צלולוזה ומעט מאד ליגנין.

גם השיטות, שבהן משתמשים במימיסיים אורגניים, נראות לי כבלתי מתאימות להכנת הליגנין מחומר צמחי, ביחוד אלו השיטות, שלפיהן עובדים במימיסים אורגניים בנוכחות חומצות, כי Hibbert (2,3) הראה, שטיפול הצמחים בתמיסת מימן כלורי בכוהל גורם לתהליכי פולימריזציה ובכת אחת גם לפירוק הליגנין. לפי Fuchs גם Phenol מביא אף הוא לידי תהליכי קונדנסציה בליגנין ונוסף לזה מתקשר באופן כימי עם הליגנין.

לכן, השיטות הנ"ל אינן באות כלל בחשבון להכנת ליגנינים. עובדה זו נלקחה בחשבון בשנים האחרונות ע"י חוקרים רבים, שבנסיונותיהם על הליגנין שבעצים ויתרו לגמרי על בידוד הליגנין, אלא השתמשו ישר בעץ טחון לעריכת ויאקציות פירוק. השיטה הזו, אמנם מוצדקת והגיונית ביותר במקרה העצים - לא יכולה לשמש דרך לחקירת הליגנין שבצמחים צעירים, כי נוכחים, כאמור, כמויות גדולות מדי של חמרים מפריעים.

החלטתי, איפוא, להשתמש באלקלי מהול, כדי להוציא את הליגנין מרקמות הצמחים. ראשית, השתמשתי בשיטה, שעובדה ע"י Phillips (40) למיצוי הליגנין מקלחי התירס.

בטבלא מס.3 נמסרים המשפחה וסוג הצמחים, שמהם הכינותי ליגנין. גיל הצמחים בשעת קצירתם נרשם אף הוא באותה הטבלא. מיצוי הליגנין נעשה מן הצמחים המיובשים. אותם הצמחים הוגשו במצב טרי לכבשים. צואתם נאספה והוכן ממנה הליגנין לפי אותה שיטת המיצוי (ראה החלק הנסיוני). הכבשים קבלו את הצמחים הנדונים כאוכל יחיד למשך תקופה של 15 יום. הכבשים הוחזקו בארגזים סגורים, כדי למנוע אותם מלאכול כל מזון אחר בתקופת הנסיון. ב-5 הימים הראשונים לא נאספה הצואה, כדי לאפשר את הרחקתם של כל שאריות מזון אחר מתוך אברי העיכול. עריכת הנסיון הטכנית נעשתה לפי השיטה המקובלת בנסיונות עיכול חקלאיים. השיטה מתוארת בכל פרטיה בעבודה של Bondi & Meyer (10) שקבעו בה את מקדמי העיכול של רוב צמחי מספוא הארצי-ישראליים (1942). הצואה שנאספה-יובשה-והוצא ממנה הליגנין.

טבלא מס' 3

הצמחים שמהם הוצא הליגנין

הצמח	המשפחה		גיל הצמח בשעת קצירתו
תלתן	קטניות	Leguminosae	חודש וחצי
תלתן פהלי	"	"	חדשים וחצי
כסניס (חציר)	"	"	4 חדשים
טופח	"	"	חדשים
פנסילריה	דגנים	Gramineae	חדשים וחצי
סטריה	"	"	חדשים וחצי
טף	"	"	חדשים וחצי
שעורת בר	"	"	3 חדשים וחצי

הצמחים נקצרו לפני שחלה בהם התעצות ניכרת. המבוגרים ביותר, שהוצא מהם הליגנין, היו שעורת-בר וחציר בטנים. הליגנין הוצא מצמחים השייכים לשתי משפחות: קטניות ודגנים. צמחי מספוא, החשובים ביותר שייכים לשתי המשפחות הנ"ל, וחקירת הליגנין שבהם חשובה גם מבחינה חקלאית. נבחרו צמחים משתי המשפחות האלה בגלל זה, שהקטניות עד לתקופות המאוחרות של גידול נשארות רכות. לעומת זה הצמחים, המשתייכים למשפחת הדגנים, מפתחים במשך זמן גידולם גבעולים יותר עציים. עובדה זו מאפשרת השואה בין הליגנינים המתהווים בכמות ובמהירות שונה בתוך הצמחים החד-שנתיים. כפי שתואר נערכו ראשית נסיונות מיצוי הליגנין מהצמחים ומצואה לפי השיטה של Phillips (40-47) (ראה חלק נסיוני). הניצולת בליגנינים, שנתקבלה לפי השיטה הזאת נמסרת בטבלא 4.

(הערה: הבטוי: צואה, אשר מופיע בטבלא מס' 4 ובטבלאות הבאות מסמן שזו צואה שנתקבלה ע"י האכלת אותו הצמח לכבשים, שבטבלא קודם לה).

טבלא מס' 4.

ניצולת הליגנינים שהוכנו לפי שיטת Phillips
וכמות החנקן שבהם

ניצולת הליגנין באחוזים של חמרי המוצא
כמות החנקן באחוזים של הליגנינים

החומר	ניצולת הליגנין	% החנקן
טף	1.31	1,20
צואה ממנו	1.54	1,10
פנסילריה	1.61	1,30
צואה ממנה	1.52	1,25
סטריה	1.31	1,47
צואה ממנה	1.42	1,52
שעורת בר	1.61	1,45
צואה ממנה	1.80	1,53
תלתן	0.81	2,81
צואה ממנו	0.90	2,97
תלתן פהלי	1.01	3,22
צואה ממנו	1,12	3,14
בטנים	1.31	2,91
צואה מהם	1.37	3,05

ניצולת הליגנין, שמתקבלת לפי שיטת Phillips קטנה בהרבה מהערכים שמתקבלים כשקובעים את אחוז הליגנין בצמחים באופן אנליטי ע"י טיפול בחומצה מרוכזת. (לפי השיטות האנליטיות המקובלות מכילים חמרים צמחיים מסוג זה 11 עד 16 אחוז ליגנין, ראה Bondi & Meyer (9)). מלבד זה נמצאו בכל הליגנינים כמויות ניכרות של חנקן (טבלא מס' 4). בשעת עריכת נסיונות המיצוי הראשונים - שיערתי, שנוכחות החנקן בליגנינים נגרמה ע"י זיהום הליגנין בחלבון בשעת המיצוי וייחסתי את ההופעה הזאת לשיטת מיצוי בלתי משוכללת. דעה דומה לזאת הביעו גם Paloheimo & Kalb (5), שאף הם מצאו כמויות חנקן קטנות בליגנינים שהכינום מעץ. Kalb קבע כמות של 0,18% חנקן בליגנין מאורן ו- Paloheimo מצא 0,28% חנקן ב-ליגנין הזה.

שיניתי את תנאי מיצוי הליגנין (ראה את החלק הנסיוני) כדי לקבל את הליגנין בכמות גדולה יותר וכשהוא נקי לכל האפשר מחנקן. לא עלה בידי להקטין את כמות החנקן שבליגנין. החברר שמיצוי בכוהל 96% נתן ליגנין, אשר הכיל אותו האחוז של חנקן כמו הליגנין, שנתקבל ע"י מיצוי בכוהל 60% לפי Phillips . ע"י מיצוי בכוהל מרובז יותר הוקטנה ניצולת הליגנין בהרבה ולכן השיטה הזאת לא באה בחשבון להכנת הליגנין, היות והיא משוגלת להוציא מהצמחים רק חלק קטן מאד של הליגנין הכללי.

אחרי שהתברר, שהמיצוי הכוהולי איננו מביא לתוצאות יותר טובות מהמיצוי המימי - פיתחתי שיטה, שלפיה השתמשתי בתמיסה מימית חמה של NaOH. השיטה הזאת מאפשרת הפקת הליגנין בניצולת טובה יותר מאשר השיטה של Phillips וגם מתכונת החנקן בליגנין, שנתקבל באמצעות בסיס מימי חם אינה עולה על זו שבליגנין, שהוכן לפי שיטת Phillips (דברים אלה יוצאים מתוך השוואת הטבלאות 4 ו-5). ואלה הם העקרונות של השיטה החדשה, שבה השתמשתי:- מטפלים בחומר צ"ח 4 פעמים רצופות בחום בתמיסה מימית של 2% NaOH, כל טיפול נמשך שעות אחדות בטמפרטורה מעולה. משקיעים את הליגנין מתוך התמיסה האלקלית בעזרת חומצה. מסננים מהמשקע ומטפלים בו בכוהל. ע"י זה מפרידים את הליגנין לשתי פרקציות:
(1) הליגנין, שנמס בכוהל - נקרא אותו בשם "ליגנין ב'";
(2) הליגנין, שלא נמס בכוהל - נקרא אותו בשם "ליגנין א'".
(השיטה מתוארת לכל פרטיה בחלק הנסיוני). טבלא מס' 5 מראה את הניצולת בליגנין "א" ו-"ב", שנתקבלו לפי השיטה הזאת.

כאמור לעיל, כמות הליגנין, המתקבלת ע"י מיצוי בבסיס מימי עולה בהרבה על הכמות המתקבלת לפי שיטת Phillips . אמנם ע"י טיפול החומר הצמחי בחומצה מרוכזת (9) מגיעים לניצולת גדולה יותר מאשר באמצעות בסיס מימי. כדי להגדיל את ניצולת הליגנין ע"י טיפול בבסיס מימי המשכתי בטיפול זה עוד יותר מאשר 4 פעמים. אמנם נסיונותי הראו, שע"י מיצויים נוספים ז.א. אחרי הפעם הרביעית, נתקבלו רק כמויות זעירות של ליגנין

בלתי נקי, ולכן חזרתי לא יותר מ-4 פעמים על המיצוי של אותה מנת החומר. כדי לברר, אם הליגנינים שנתקבלו בארבעת המיצויים הראשונים הם אחידים - השקעתי בכמה מקרים את ארבעת המיצויים, כל אחד לחוד, וגם המשקעים עובדו באופן נפרד. בכל פרפרט נבדקו חנקן ומתוקסיל, שהם המרכיבים האופייניים ביותר של הליגנינים. התוצאות של הבדיקות הנ'ל רשומות בטבלא 6.

טבלא מס' 5.

הניצולת בליגנין "א" ו-"ב" וכמות החנקן שבהם
(באחוז הליגנין)

החומר	הניצולת בליגנין ב-% החומר המוצא א	ב	אחוז החנקן בליגנין א'	אחוז החנקן בליגנין ב'
טף	-	5,4	1.10	1,18
צואה ממנו	-	9,0	1.21	1,31
פנסילריה	-	4,6	1.13	1,21
צואה ממנה	-	7,1	1.33	1,40
סטריה	-	5,1	1.27	1,41
צואה ממנה	-	6,8	1,33	1,62
שעורת בר	1,1	4,0	1.47	1,63
צואה ממנה	0,5	6,0	1.51	1,70
תלתן	2,0	3,0	2,69	2,92
צואה ממנו	1,1	3,5	2.88	3,17
טופח	1,1	3,0	3.01	3,30
צואה ממנו	2,0	4,5	3.20	3,41
פהלי	1,3	1,7	3,21	3,36
צואה ממנו	0,4	3,0	3.57	3,91
חציר בטנים	1,2	4,0	2.71	3,24
צואה ממנו	0,9	5,4	2.91	3,45

טבלא מס' 6.

כמויות החנקן והמתאוקסיל בליגנינים, שנתקבלו
ע'י ארבעת המיצויים הראשונים עם אלקלי מימי
והחלק האחוזי, שכל מיצוי מהוה מן הניצולת
הכללית בליגנין (%).

(רק ליגנינים ב')

החומר	% חנקן	מיצוי 1 %	מיצוי 1 CH_3O	מיצוי 2 % חנקן	מיצוי 2 CH_3O	מיצוי 2 %	מיצוי 3 % חנקן	מיצוי 3 CH_3O	מיצוי 3 %	מיצוי 4 % חנקן	מיצוי 4 CH_3O	מיצוי 4 %
שעורת בר	1,65	9,86	60,3	1,59	9,85	30,1	1,58	9,84	7,5	1,60	9,85	2,1
טף	1,21	9,71	59,8	1,17	9,69	31,7	1,13	7,70	7,2	1,08	9,65	7,3
פנסלריה	1,23	9,65	62,0	1,18	9,67	29,4	1,14	9,60	6,8	1,09	9,54	1,8
תלתן פהלי	3,24	5,75	70,1	3,18	5,69	21,6	3,17	5,61	8,0	3,10	5,63	0,3
חציר בטנים	3,28	4,28	72,3	3,14	4,21	17,4	3,01	4,20	8,9	3,06	4,21	1,4
טופח	3,41	4,77	69,3	3,35	4,79	20,3	3,14	4,60	9,1	3,12	4,58	1,3

מתוך תוצאות אלה מתברר, שהחלק הגדול ביותר של הליגנין מוצא מהצמח ע'י שני המיצויים הראשונים. שתי המתכונות: חנקן ומתאוקסיל, במיצויים השונים נעות בגבולות צרים בלבד ומזה נוכל ללמוד, שהליגנינים השונים הם חמרים די אחידים. בהכנה הפרפרטיבית של הליגנינים בקנה מדה גדול היה אפשר לותר על עיבוד נפרד של המיצויים השונים, אלא כל המיצויים צורפו ועובדו יחד.

סגולות הליגנינים

ליגנינים שהוכנו ע"י מיצוי בתמיסות מימיות של NaOH 2% הנם אבקות, שצבען חום בהיר עד חום כהה. ע"י טיפול בכוהל 96% מפרידים את הליגנינים לשתי פרקציות. פרקציה אחת שנמסה בכוהל בקור - היא נקראת הפרקציה "ליגנין ב". הפרקציה השניה אינה נמסה בכוהל גם לא בעזרת חמום (ליגנין "א"). הליגנינים המתקבלים מדגנים נמסים לגמרי בכוהל, ז.א. הם אינם מכילים "ליגנין א". גם בליגנינים שהוכנו מקטניות, פרקצ ת "ליגנין ב", הנמסה בכוהל כמותה עולה בהרבה על כמותה של הפרקציה "א". הליגנינים "ב" ניתנים לניקוי קל ע"י המסה בכוהל והשקעת הליגנין ע"י מיהול במים. כשחוזרים על ההמסה וההשקעה כמה פעמים מקבלים פרפרט של ליגנין "ב", אשר הנו לגמרי חפשי מאפר. בגלל האפשרות הנוחה הזאת לניקוי נעשו רוב הנסיונות המתוארים בעבודה זו בליגנין "ב". במקרים שהשתמשתי בליגנין "א" צוין הדבר במיוחד.

הליגנינים "ב" נמסים היטב בקור בתמיסות מימיות של NaOH לעומת זאת נמסים הליגנינים "א" יותר קשה ורק אחרי חימום עד ל-50-60° באותן הממיס. קיימת האפשרות לנקות גם את הליגנינים "א" ע"י המסתם ב- NaOH מהולה והשקעתם ע"י חומצה מהולה. אולם הדבר נתקל בקשיים, כי הליגנינים בשעת השקעתם בחומצות אינם מתקבלים מיד כמשקעים גסים, הניתנים היטב לסינון, אלא נוטים להוות אמולסיות, שקשה לפרקן ועוברות דרך המסנן. נוסף לכך נספחות כמויות ניכרות של חומצה על הליגנין "א" בשעת השקעתו, שאפשר להרחיקן רק ע"י שטיפה ממושכת במים.

השקעת הליגנינים "ב" מכוהל היא קלה ואפשר לחזור עליה פעמים רבות. אחרי שתי השקעות הראשונות הרכבם של הליגנינים "ב" אינו משתנה יותר. ליגנינים "ב" נמסים לגמרי בחומצת חומץ (97-98%). אמנם יש צרך להשאיר את הליגנינים כמה ימים בקור עם הממיס הזה. חומצת חומץ 97-98% מסוגלת להמיס בערך 10% ליגנין "ב". ליגנין "א" כמעט שלא נמס בחומצת חומץ. אם מוסיפים מים לתמיסה של ליגנין "ב" בחומצת חומץ, כמות פי עשר עד עשרים מנפח התמיסה - הליגנין שוקע באופן כמותי בלי שהרכבו ישתנה. מענין לציין שליגנינים"ב" אינם נמסים כמעט כלל בחומצת חומץ 100% (מחוסרת מים לגמרי) אפילו בשעת חימומם. רק אחרי הוספת 2-3% מים - נמס הליגנין בחומצת חומץ. ליגנינים "ב" נמסים בנקל אן ב- -נפתול עד כ-15% של כמות הממיס, כשמחממים את התערובת עד ל-20° מעל לנקודת-ההיתוך של הממיס. לתמיסת הליגנין "ב" בכוהל יש צבע חום-כהה, התמיסות הן צלולות וניתנות קל לסינון. הליגנינים אינם מתגבשים כלל ואין להם נקודת-היתוך; כשמחממים אותם עד 350° ומעלה הם מתפרקים.

- . -

חלק II

על החנקן בליגנינים

נוסף לתצפיות של Paloheimo & Kalb, שהזכרתי לעיל, מצאתי רק עבודה אחת, בה עוסקים בשאלת החנקן בליגנינים. Waksman (58) דן בשאלת הליגנין בהומוס ועל החנקן שנמצא בו. הוא בא לידי המסקנה, שהחומר הנדון הוא תרכובת יציבה בין הליגנין וחלבון. (Lignoprotein) Kalb&Paloheimo.(5) משערים שהליגנין מעורב באופן מקרי בכמויות שונות של חלבון, אשר נספח אליו ולכן קשה להפרידו מהליגנין ע"י הידרוליזה. תוצאות נסיונותי, אמנם, אינן מתאימות להנחות הללו - בגלל הטעמים הבאים נראה לי שקיימת ת ר כ ו ב ת יציבה בין הליגנין והחומר החנקני שבו:

(1) מטבלא מס' 6 יוצא, שמיצויים שונים של אותו החומר מכילים כמויות שוות של חנקן;

(2) גם כמות החנקן בפרפרטים של ליגנין, שהוכנו לפי שיטות שונות, נמצאה שווה.

(3) נוסף לזה עלינו גם להתחשב בעובדה, שהתנודות במתכונת החנקן של הליגנינים נעות בהתאם לשינויים במתכונת החנקו בחומר המוצא (ראה טבלאות 5 ו-7).

טבלא מס' 7

מתכונת החנקן של החומר הצמחי המשמש למיצוי הליגנין.

החומר	% החנקן
טף	0,86
צואה ממנו	1,15
פנסלריה	1,68
צואה ממנה	1,68
סטריה	1,08
צואה ממנה	1,20
שעורת בר	0,52
צואה ממנה	0,71
תלתן	2,99
צואה ממנו	2,16
טופח	2,48
צואה ממנו	1,94
תלתן פהלי	1,67
צואה ממנו	1,52
חציר בטנים	3,12
צואה ממנו	3,28

אילו הליגנינים היו מכילים את החומר החנקני כאי-נקיון מקרי, אז אחוז החנקן שבליגנין היה נחוץ לתנודות גדולות ולא היה כמעט קבוע כמו בפרפרטים טונים של ליגנינים שהכינותימאותו חומר מוצא. הקביעות של מתכונת החנקן בליגנינים מרשה, איפוא, רק את ההנחה, שקיים קשר כימי קבוע בין הליגנין ובין החומר החנקני שנמצא בו. ההנחה הזאת בלבד לא יכולה לשמש לנו הוכחה, שהליגנינים אינם מכילים חלבון. לכן ערכתי שורת נסיונות, כדי להרחיק את החלק החנקני (חלבון?) מהליגנין. דרך אחת היתה להרחיק עד כמה שאפשר את החלבון מחמרי המוצא ל פ נ י עריכת מיצוי הליגנין, כדי למנוע כל קונדנזציה אפשרית בין ליגנין וחלבון בשעת המיצוי. היות, ורוב החלבון שבצמח הוא נמס במיץ התאים, ומהצד השני, רוב הליגנין הוא בלתי נמס ונמצא בדפנות התא - ניסיתי לשחרר את החומר המוצא ע'י טחינה דקה ולחץ גבוה מרוב החלבון. התברר אמנם, שאפילו ע'י שימוש בלחץ גבוה מאד (150 ק'ג/ס'מ^2) אי אפשר היה להפריד כמויות גדולות של מיץ התאים. גם ע'י שטיפה של החומר המוצא הטרי (טחון) בכמויות גדולות של מים לא עלה בידי להפחית את כמות החנקן במידה ניכרת. הפריעה במקרה זה ההופעה, שהחומר הצמחי שפח ע'י התהוות ג'ל די מוצק, שמנע כל אפשרות סינון. מתכונת החנקן בחומר צמחי לא ירדה למעשה אחרי הטיפול לפי שתי הדרכים הנ'ל. (מתכונת החנקן כמובן, מחושבת על יסוד של חומר יבש). בחנתי עוד את האפשרות להרחיק את החלבון ע'י טיפול של החומר המוצא ב- NaOH מהול מאד (0,2%). מתוך תוצאות הטיפול הזה, הנמסרות בטבלא מס'8, יצא שעל ידי הטיפול הזה יכולים להרחיק את החלק ה א ר י של החלבון, שמנם גם הליגנין נמס בחלקו הגדול. ניצולת הליגנין, שנתקבלה מהצמחים אחרי הטיפול ב- 0,2% NaOH היתה קטנה מאד. הליגנינים שנתקבלו בדרך זו אינם נבדלים ביחס למתכונת החנקן שבהם מה- ליגנינים, שהוכנו מאותם הצמחים, שלא הוכנו לטיפול הקודם עם NaOH מהול. הטיפול הזה נחשב, איפוא, ללא תועלתי ולכן פוסל.

טבלא מס'9

תוצאות הטיפול הקודם של צמחים ב- 0,2% NaOH

החומר	N בחומר גלמי	הפסד ב- N (באחוז (= ה- N)	מתכונת ה- N (באחוז הליגנין)		הפסד בליגנין (באחוז הליגנין שעובד)
			בליגנין א	בליגנין ב	
שעורת בר	0,52	90,2	1,50	1,64	72,1
סטריה	1,08	89,6	1,31	1,36	69,8
תלתן	2,99	79,1	2,71	2,90	71,2
תלתן פהלי	1,67	78,8	3,18	3,20	68,8
חציר בטנים	3,12	81,0	2,71	3,24	68,4

(= באחוז ה- N שבחומר המוצא.

כסוף טיפלתי בצמחים הנועדים למיצוי הליגנין בהמיסת פפסין בחומצת מלח, כדי להקטין ע"י זה את כמות החלבון שבהם (ראה את החלק הנסיוני). הליגנינים שהוכנו מצמחים, שעבר עליהם הטיפול בפפסין, אינם מכילים פחות חנקן מאשר ליגנינים, שנתקבלו מצמחים שלא טפלו בהם בפפסין (ראה טבלא מס'9).

התוצאות בטבלא מס' 9 מראות, שטיפול של החומר המוצא הצמחי בפפסין לא מביא לידי הורדת כמות החנקן. עובדה זו אינה מפתיעה, בהתחשב עם התופעה, שגם מעבר הצמח דרך גוף בעלי-חי אינו משנה את כמות החנקן שב-

טבלא מס' 9.

תוצאות טיפול הצמחים בפפסין-חומצת-מלח

הצמח	הפסד בחנקן ע"י הטפול באחוז החנקן הכללי	כמות החנקן בליגנין שהוכן מהחמר (ב-% הליגנין)	כמות החנקן ב-ליגנין שלא טופלו בפפסין
טף	41,1	1,15	1,18
פנסילריה	69,0	1,18	1,21
סטריה	53,1	1,44	1,41
שעורת בר	61,6	1,53	1,63
חלתן	74,7	2,88	2,92
טופח	75,3	3,20	3,30
חלתן פחלי	71,8	3,18	3,22
חציר בטנים	73,4	3,40	3,45

ליגנין. הנסיונות הנ"ל הראו, שאינה קיימת אפשרות להרחיק את החנקן מחמרי המוצא ולהגיע בדרך זו לליגנינים חפשיים מחנקן.

בחנתי גם את האפשרות להרחיק את החנקן מהליגנינים עצמם לפי שיטות הידרוליזה שונות. ע"י הרתחת הליגנינים בחומצה גפריתנית למשך 24 שעות (ראה חלק נסיוני) התמוסס, אמנם, חלק של ליגנין, אבל אחוז החנקן שבחלק הבלתי נמס עלה באופן יחסי להפסד. דבר זה מראה, שהחנקן הקשור לליגנין אינו חלבוני, כי חלבון היה נמס ע"י הידרוליזה אנרגית כזו לכל הפחות באופן חלקי, ו"תכונת החנקן שבליגנין היתה הולכת ופותחת.

ההדרוליזה בחומצה גפריתנית חזקה גרמה לשינויים ניכרים בסגולות הליגנינים. הליגנינים נעשו שחורים, ולא נמסו יותר בכוהל ובבסיסים צימיים חמיסה, שנתקבלה אחרי הידרוליזה, הכילה פנולים, שהוצאו מהחמיסה ע"י אתר וזוהו ע"י ריאקציות אפיניות, כגון, התהוות אסטרים בלתי נמסים עם 3;5 Dinitrobenzoylchloride.
לכן, ההדרוליזה בחומצה חזקה גרמה, מצד אחד לקונדנסציה של הליגנין (יצירת חמרים שחורים בלתי נמסים באלקלי), ומצד שני - לפירוק חלקי של הליגנינים, ההידרוליזה בחומצה חזקה אינה, איפוא, שיטה יעילה להרחקת החלק החנקני מן הליגנין.

טבלא מס' 10

פעולת ההדרוליזה בחומצה גפריתנית 25% על הליגנינים
(מספרים באחוז הליגנין הכללי)

החומר: ליגנין שהוכן מ:	הפסד בחמר	% החנקן לפני הטיפול	% החנקן אחרי הטיפול נמצא	מחושב=
טף	23,2	1,18	1,48	1,54
צואה ממנו	21,1	1,31	1,63	1,66
פנסילריה	21,8	1,21	1,55	1,55
צואה ממנה	20,7	1,40	1,70	1,77
סטריה	27,2	1,64	2,24	2,25
צואה ממנה	25,3	1,62	2,11	2,16
שעורת בר	27,0	1,65	2,20	2,26
צואה ממנה	26,5	1,70	2,29	2,31
חלתן	30,1	2,92	4,14	4,19
צואה ממנו	29,3	3,17	4,47	4,47
חציר בטנים	26,3	3,24	3,38	4,40
צואה ממנו	24,8	3,45	4,39	4,48

הערה: הערכים הרשומים בטור האחרון חושבו בהנחה, שבליגנינים אינם מפסידים חנקן בשעת עיבודם.-

להלן ערכתי נסיונות להרחקת החלק החנקני מהליגנין ע"י הידרוליזה בחומצות מהולות. לשם כך הוכנעו כמויות קטנות של ליגנין לטיפול בחומצה מהולה (2%) למשך כמה ימים בטמפרטורה של 37^0. תוצאת הנסיון הזה מראות שחלק מן הליגנין נמס גם בחומצה חלשה. אמנם, באף מקרה לא יכלתי לקבוע איזו שהיא המסה של חנקן; אחוז החנקן בליגנין הלך ועלה ביחס להפסד בחומר שנמס. עובדה זו שוב מראה, שלא חלה הידרוליזה של החלק החנקני. אותן המוצאות נתקבלו בנסיונות, שבהם טפלתי בליגנינים באנצימים פרוטי-אוליטיים כדי לטלק את ה"חלבון". הוספה של פפסין לא השפיעה כלל על הליגנינים. נמס רק אותו החלק שנמס גם בחומצה מהולה בלי הוספת האנצים (ראה טבלא מס' 12). לבסוף פעלתי על הליגנינים ב- Pancreatin, מפני שראיתי בטיפול זה סיכוי יותר טוב להצלחה, כי ה- Pancreatin פועל ב- P_H 8. בדרגת P_H זו הליגנינים כבר נמסים מהוים סובסטראט הומוגני (הניגוד לטפול בפפסין, שפועל רק בתמיסה חמוצה, שבהם הליגנינים אינם נמסים). מתוצאות הנסיונות, אמנם, יוצא שגם בעזרת Pancreatin אין להכין ליגנין חפשי מחנקן (ראה טבלא מס' 12).

טבלא מס' 11

הפעולה של חומצת מלח 2% על הליגנינים
הפסד בחומר ושינויים במתכונת החנקן בשעת הטיפול
(באחוזים של הליגנין)

הליגנין שהוכן מ:	הפסד בחומר	%החנקן לפני הטיפול	%החנקן אחרי הטיפול נמצא	%החנקן אחרי הטיפול מחושב
טף	8,6	1,18	1,28	1,29
צואה ממנו	8,9	1,31	1,39	1,45
פנסילריה	10,6	1,21	1,38	1,36
צואה ממנה	8,9	1,40	1,50	1,54
סטריה	10,2	1,41	1,50	1,57
צואה ממנה	9,1	1,62	1,76	1,78
שעורת בר א	17,1	1,45	1,75	1,75
שעורת בר ב	13,2	1,63	1,83	1,81
טופח א	9,8	3,03	3,33	3,35
טופח ב	15,5	2,30	2,67	2,72
תלתן	18,3	2,92	3,61	3,57
צואה ממנו	17,6	3,17	3,74	3,84

טבלא מס' 12

הפסד בחומר ושינויים במתכונת החנקן ע"י הטפול בפפסין ובפנקריאטין
(באחוזים של הליגנין)

הליגנין שהוכן מ:	הפסד בחומר	%החנקן לפני הטיפול	%החנקן אחרי הטיפול נמצא	%החנקן אחרי הטיפול מחושב
טיפול בפפסין				
טף	8;8	1,18	1,34	1,29
פנסילריה	11,2	1,21	1,34	1,36
סטריה	9,8	1,41	1,50	1,56
שעורת בר א	20,1	1,45	1,80	1,81
שעורת בר ב	10,2	1,63	1,81	1,82
טופח א	9,7	3,03	3,35	3,35
טופח ב	14,8	2,30	2,61	2,71
תלתן	19,6	2,92	3,60	3,63
חציר בטנים	15,4	3,24	3,88	3,83
טיפול בפנקריאטין				
טף	11,4	1,18	1,45	1,50
פנסילריה	12,2	1,21	1,34	1,38
סטריה	12,0	1,41	1,55	1,60
שעורת בר א	23,8	1,45	1,91	1,90
שעורת בר ב	12,6	1,36	1,82	1,87
תלתן	22,7	2,92	3,68	3,78
טופח א	19,9	3,03	3,78	3,78
טופח ב	16,3	2,30	2,77	2,77
חציר בטנים	16,9	3,24	3,87	3,90

הערה לטבלאות מס' 11 ו-12:
הערכים בטור האחרון חושבו בהנחה, שהליגנינים אינם מפסידים חנקן בשעת הטיפול.

הליגנינים, שהוכנו מצואה, לא הוכנעו לטיפול אנצימטי בהנחה, ש-
החמרים האלה עברו כבר את השפעתה האנצימתית בגוף החי. לכן לא ראיתי צרך
לחזור על אותו התהליך במבחנה.

(א) היות, ועל סמך הנסיונות, שבוצעו עד כה, נראה, שהחנקן שבליגנינים
אינו חנקן חלבוני, נשאלת השאלה: מה טבעו של החנקן הזה? כדי למצוא תשובה
לשאלה זו נעשו הנסיונות הבאים:-
ראשית זיקקתי את הליגנינים עם NaOH מרוכזת ואספתי את הנוזל העובר בחומצה
נורמלית. נתברר שאמוניאק כלל לא שוחרר מהליגנינין ע'י הזיקוק.

(ב) ערכתי גם הסתכלויות על פעולת ה- $NaNO_2$ על הליגנינים. בשעת פעולת
החומר הזה על הליגנינים לא התפתח חנקן גזי וגם אחוז החנקן שבליגנין לא
השתנה ע'י הטיפול. (בדיקת החנקן בליגנין אחרי הטיפול ב- $NaNO_2$ נעשתה,
כמובן, אחרי שטיפה ממושכת, שהרחיקה את עודף ה- $NaNO_2$ הנספח על הליגנין.
תוצאות הנסיון הזה מוכיחות, שהחנקן שבליגנין אינו חנקן פרימרי (NH_2),
כי במקרה זה היה הטיפול ב- $NaNO_2$ מחליף את קבוצת NH_2 ל- OH תוך התפתחות
של חנקן גזי. החנקן גם לא יכול להיות חנקן סקונדרי, כי אז היו מתהווים
ניטרוזאמינים, מה שהיה גורם להעלאת כמות החנקן הכללי. קימת עוד האפשרות,
שהחנקן שבליגנינים הוא חנקן טרטיארי (N=) אפשר שהחנקן הטרטיארי ב-
ליגנינים נוצר בדרך הבאה: הפחמימיות המשמשות, כנראה, חומר מוצא לקונדנ-
סציית הליגנין, מכילות קבוצות אלדיהידיות חפשיות. האלדיהידים הנ'ל מסוגלים
ליצור תרכובות עם NH_3 או עם אמינים פרימריים (Schiff's Bases).
אין לשער, שתרכובות מסוג זה הן אליפטיות, כי בסיסי-שיף אליפטיות הן
תרכובות בלתי יציבות, דבר שבניגוד לסגולות החנקן שבליגנין. ההשערה,
שהחנקן בליגנין קשור קשר ציקלי ומהווה שם "Ammonoaldehyd" מסוג הפיריידין
- יותר מתאימה לתכונות חנקן הליגנין. השערתי זאת נתמכת גם ע'י העובדה,
שתולדות של פיריידין נמצאו גם בליגנינים שבהומוס. נוסף לזה, פיריידין
ותולדותיו נמצאים תמיד בתוצרת זיקוק יבש של העצים (6).

ערכתי נסיונות שונים, כדי לבחון את נכונות ההשערה, שהחנקן שבליגנינ-
שייך לטבעת מסוג הפיריידין. Shaw (53, 54) הראה בעבודותיו, שפעולת ה-
נתרן המסכתי בתוך כוהל אבסולוטי גורמת לפירוק הפיריידין ל- NH_3 ול-
Glutardialdehyde, לכן נערכו גם על ידי נסיונות חיזור עם הליגנינים
באמצעות נתרן מתכתי בכוהל ובאמצעות אבק האבץ באלקלי מימי. (ראה חלק
נסיוני). שתי השיטות הנ'ל הביאו לפירוק שלם של החנקן מהליגנין. יחד עם
הפרדת החנקן - חלה התפרקות גמורה של הליגנינים. בשעת חיזור הליגנינים
נתקבלו חמרי פירוק בעלי משקל מולוקולרי נמוך בלבד, אבל לא נמצאו ליגנינים
בלתי מפורקים מחוסרי חנקן. מהתוצאות הנ'ל עלינו ללמוד, שהחנקן קשור
באופן כזה ליגנין, שאין לפרקו מן הליגנין מבלי לפרק את כל מולקולת-
הליגנין לחלוטין. כשמעפילים אבק-האבץ בתמיסה מימית אלקלית לזמן ממושך
על הליגנין משתחרר כל החנקן שבו בצורת אמוניאק. ע'י תוספת חומצה לתמיסה
אי-אפשר כבר להשקיע עוד ליגנין, אמנם אפשר להוציא ממנה ע'י אחר תוצרות
פירוק בעלי משקל מולקולרי נמוך, וביניהם נמצאים אלדהידים, כי עם
Dinitrophenylhydrazin מתקבל משקע.

בחיזור הליגנין עם נתרן מתכת בכוהל נתקבלו כמויות זעירות של
אמינים ונוסף לזה גם חמרי פירוק חפשיים חנקן, שעליהם ידובר להלן.
האמוניאק והאמינים הועברו בשעת החיזור לחומצה, אבל האחרונים לו זוהו בגלל
כמותם הזעירה. רוב החנקן נתקבל בצורת NH_3 ה- NH_3, שהשתחרר בזמן
החיזור, נקבע גם באופן כמותי ע'י טיטרציה. התברר, שגם החיזור בנתרן
שחרר את כל החנקן שהיה בליגנין. נוסף לאמוניאק ולכמות זעירה של אמינים
נוצרו גם איסו-ניטרילים, שיכולתי לגלותם ע'י הריח האפיני, אמנם, בגלל
חוסר שיטה מתאימה לקביעתם האנליטית לא עלה עד עתה כידי לזהותם. מתוצאות
הנסיונות האלה יוצא, שהחנקן בליגנינים קשור לכל הפחות לשני אטומים פחמן
ש ו נ י ם (R.C = N - C.R) כי ע'י הפרדת המולקולה במקומות המתאימים
(R.C ⋮ N ⋮ C.R) המסומנים ע'י : ⋮ יכולים להתהוות גם אמינים וגם
איסונילטרילים.

לשתי שיטות החיזור דרוש זמן ממושך; חיזור הליגנין בנתרן או באבק-
האבץ נשלם רק אחרי כ-100 שעות.

בנסיונות פרלימינריים נמצא מחימצון הליגנין ב- $KMnO_4$ בתמיסה אלקלית
הביא גם הוא ליצירת NH_3. חזרתי על הנסיונות האלה בתנאים המאפשרים
קביעה כמותית של האמוניאק המשתחרר. עבדתי לפי מודיפיקצי של השיטה, שבה
השתמשו Charmbury ועוזריו (16), כדי לברר את טבעו של החנקן שבחומצות
ההומוס (Hum. acid). נסיונותי הראו, ש-75-80% של החנקן שבליגנין
משתחררים בשעת חימצון ב- $KMnO_4$ בצורת NH_3.

Charnbury ועוזריו רואים בעובדה, שבזמן חימצון בתמיסת KMn04 אלקלית משתחרר NH3 , הוכחה לקיום הקבוצה C = N-C = . לשם השואה פעלתי באותה התמיסה של KMn04 על חומצה ניקוטינית וקבלתי תוצאות דומות. (תוצאות הנסיונות נמסרות בטבלא מס' 13), ז.א. גם בחומצה ניקוטינית השתחרר בין 75-80% של חנקן בשעת החימצון. תופעה זאת סומכת גם היא על ההנחה, שהליגנינים מכילים את החנקן שלהם בקשר ציקלי, ז.א. במערכת טבעת Pyridin או דומה.

טבלא מס. 13.

שחרור החנקן בליגנין (NH3) ע'י חימצון ב- KMn04

ליגנין הוכן מ:	% החנקן לפני החימצון	הפסד בחנקן (ב-% החנקן הכללי)
טף	1,18	76,2
פנסילריה	1,21	75,9
שעורת בר	1,63	77,8
צואה ממנה	1,70	78,1
תלתן פהלי	3,60	74,6
צואה ממנו	3,91	75,9
חומצה ניקוטינית	9,44	78,4

על סמך תוצאות נסיונותי באתי למסקנה, שהחנקן בליגנין אינו חנקן חלבוני, אלא שהליגנין מכיל את הקבוצה C = N - C . הקבוצה הזאת מהווה חלק אפיני של מולקולת-הליגנין ואין להפרידה ממנה בלי פירוק יסודי של כל בנינה

חלק III

הליגנין והפחמימיות הפולימריות

לפי דעתם של חוקרים שונים, הליגנין קשור עם פחמימיות, כמו צלולוזה או המיצלולוזה. מחברים אחדים הביעו גם דעות על אופן הקשר בין ליגנין ובין הפחמימיות. Phillips (47, 40, 4) למד מנסיונות בליגנין שבקלתי-התירס, שהליגנין קשור בחלקו ע'י קשר אסתרי ובחלקו ע'י קשר אתרי-לפחמימיות. כ'כ נמסר בספרות, שבשעת זיקוק הליגנינים עם חומצת מלח(12%) נתקבל פורפורול, טימן, שהליגנין הכיל פנטוזות או פנטוזנים. בחנתי את הליגנינים שהכינותי מצמחים ירוקים על נוכחות של פחמימיות. לשם כך נבחנו התמיסות שנתקבלו אחרי הידרולוזה בתמיסת Fehling; התוצאות היו שליליות בכל המקרים. נעשתה גם הידרוליזה של הליגנינים לפי השיטה הידועה של Waksman (57) לקביעת המיצלולוזה והצלולוזה. לא שוחררו סוכרים לא ע'י הידרוליזה בחומצת מלח 2% ב- 100° למשך 6 שעות (שיטת קביעת המיצלולוזה) ולא אחרי טיפול בחומצה גפריתנית 72% במשך 24 שעות (שיטת קביעת צלולוזה). ערכתי בליגנינים שהכינותי גם קביעת פנטוזנים (פנטוזות) לפי ע'י זיקוק בחומצת-מלח (12%). ע'י הוספת 2,4 Dinitrophelhydrazin 2,4 לא נתקבל משקע. מזה יוצא שהליגנינים אינם מכילים פנטוזנים או פנטוזות. ע'י התוצאות הליליות של נסיונות הידרוליזה הוכח גם שהליגנינים אינם מכילים הקסוזות או הקסוזנים.

אם בכלל קיים איזה קשר שהוא בין ליגנין ופחמימיות, הוא כנראה מתפרק כבר בשעת מיצוי הליגנין מהצמחים. לכן, לפי תוצאות נסיונותי, אינני יכול להסכים להנחה, שקיים קשר בין ליגנין ופחמימיות, לכל הפחות לא בליגנין המבודד.

חלק IV

הקבוצות הפונקציונליות בליגנין.

(א) הידרוקסיל ומתאוקסיל.

קבוצת המתאוקסיל הריהי החלק האפיני ביותר של מולקולת הליגנין. נוכחותה של קבוצת - CH30 בליגנין העצים נקבעה כבר ע'י החוקרים הראשונים שעסקו בליגנין. בעבודות חדישות יותר נמצא, שהליגנינים, שהוצאו מעצים, מכילים גם OCH_3 פנולי וגם אנולי או כוהלי. מתכונת המתאוקסיל בליגנינים מעצים ומצמחים שונים אינה שוה, אלא נעה בגבולות די רחבים. ביחוד משפחה וזן העצים משפיעים על מתכונת המתאוקסיל. מתכונת המתאוקסיל בליגנינים שבעצי המחט קטנה מזו של הליגנין שבעצים נשירים. גם שיטות הכנת הליגנין

מן העץ משפיעות על מתכונת המתאוקסיל. בטבלא מס' 14 שבה נמסר סיכום על כמות המתאוקסיל בסוגי ליגנין שונים, נמסרת גם השיטה, שלפיה הוכן הליגנין.

טבלא מס' 14

ליגנין הוכן מ:	שיטת ההכנה		המחבר	%מתאוקסיל
דולב	חומצה	גפריתנית	Sheward,Harris	21,0
אשוח	חומצת	מלח מעשנת	Brauns & Hibbert	15,5
קלחי תירס	NaOH	בכוהל	Phillips	14,3
קש שבולת שועל	"	"	"	14,86
קש שיפון	NaOH	מימי	Beckman	14,34

כמות המתאוקסיל בליגנינים מצמחים ירוקים, וביחוד בצמחים צעירים, קטנה מזו, שבליגנין העצים, ונתונה לתנודות ניכרות. Phillips (4) מצא, שאחוז המתאוקסיל בלידנין השעורה עולה במרוצת גידולה מ-3% עד 16%. גיל הצמח, ז.א. מצב הבשלתו, משפיעים על כמות המתאוקסיל שבליגנין. העליה בכמות המתאוקסיל של הליגנין במשך גידול הצמחים וגם ההבדלים במתכונת הליגנין בצמחים שונים ובאותם הצמחים בתקופות שונות של גידולם - מראות, שכנראה התהוות הליגנין והמתילציה שלו הם תהליכים הדרגתיים מקבילים זה לזה.

לא כל הקבוצות OH הפנוליות והכוהליות שבליגנין מוחלפות ע"י CH_3. לכן קיימת האפשרות לקבוע את מהותן ע"י מתילציה באמצעות Dimethylsulphate ו- Diazomethane. בעזרת Dimethylsulphate מחליפים את כל הקבוצות OH C לקבוצות OCH_3 ואילו Diazomethane פועל רק על הקבוצות הפנוליות או אנוליות חפשיות. לכן יכולים לקבוע לכל ליגנין 3 ערכי מתאוקסיל:

(1) מתכונת המתאוקסיל, שקיימת בליגנין;
(2) עלית המתאוקסיל אחרי מתילציה ב- Dimethylsulphate ;
(3) עלית המתאוקסיל אחרי מתילציה ב- Diazomethane ;

3 הערכים האלה מאפשרים להוציא מסקנות על כמותן ויחסן של הקבוצות OH השונות שבליגנינים.

המתילציה של הליגנינים ב- Diazomethane נעשתה בתמיסה אתרית; המתילציה ב- DImethylsulphate נערכה בתמיסה אלקלית לפי שיטות ידועות (ראה חלק נסיונו). הקביעה הכמותית של הקבוצה המתאוקסילית נעשתה לפי שיטת Zeisel - במודיפיקציה לפי Vieboeck & Brecher (56). טבלא מס' 15 מוסרת את ערכי המתאוקסיל השונים, שמצאתי בליגנינים שהכינותי.

טבלא מס' 15

כמות המתאוקסיל בליגנינים השונים. (באחוז הליגנין)

ליגנין הוכן מ-	(1) מתאוקסיל בליגנין כמו שהוא	(2) מתאוקסיל אחרי מתילציה עם Diazomethan	(3) מתאוקסיל אחרי מתילציה עם Dimethyl-sulphate	היחס של שלשת הערכים (מספרים שלמים)
טף	9,71	19,00	23,48	2:2:1
צואה ממנו	9,70	19,02	19,34	2:2:0
פנסילריה	9,65	18,77	22,75	2:2:0.8
צואה ממנה	9,65	19,03	19,10	2:2:0
סטריה	9,60	18,94	23,04	2:2:0.85
צואה ממנה	9,70	18,81	18,92	2:2:0
שעורת בר ב" =)	9,85	19,21	21,33	2:2:1
צואה ממנה	9,77	18,48	18,59	2:2:0
שעורת בר א" =)	5,44	10,52	19,10	2:2:4
תלתן	5,10	15,29	18,08	2:4:1
צואה ממנו	5,22	15,01	15,10	2:4:0
תלתן פהלי	5,75	15,31	16,70	2:4:0,6
צואה ממנו	6,67	15,42	15,51	2:4:0
חציר בטנים	4,28	13,40	16,20	2:4:1
צואה ממנו	4,40	14,10	14,09	2:4:0

=) א" ו-ב" מציינים את הליגנינים א" ו-ב", שהוכנו מאותו הצמח.

הערה: בטור האחרון מחושב היחס בין שלשת ערכי מתאוקסיל, שעליהם מדובר קודם. לפי המספרים בראש הטבלא - הערך הראשון, ז.א. מתכונת המתאוקסיל ה- מקורית = 1; הערך השני, תוספת המתאוקסיל ע"י מתילציה ב- Diazomethane = (1-2). הערך השלישי - תוספת המתאוקסיל אחרי מתילציה ב- Dimethylsuphate =(2-3). יחס המספרים בטור האחרון מבטא, איפוא, את הקשר (2-3) : (1-2):1.

מהשוואת כמויות המתאוקסיל שבליגנינים כמו שהם, בולט ההבדל בין מתכונת המתאוקסיל בליגנינים שהוצאו מגבעולי התבואות (9-10%) מצד אחד ובין כמות המתאוקסיל בליגנינים, שהוכנו מקטניות מצד שני; הליגנינים שבקטניות מכילין בערך מחצית כמות המתאוקסיל (4,3-6,7%) שבליגנינים מן התבואות. הליגנינים שהוצאו מצואה, אינם נבדלים למעשה ביחס לכמות המתאוקסיל שבהם מן הליגנינים של הצמחים שאחרי האכלתם הופרשה הצואה הנדונה. בגוף החי לא חל, איפוא, ניתוק הקשר האתרי. מן הראוי לציין, שהליגנין, שהוכן מחציר בטנים, מכיל אותה כמות של מתאוקסיל כמו הליגנינים משאר הקטניות, אף-על-פי, שחציר בטנים נראה כעצי יותר מגבעולי הדגנים. מזה יוצא, שהשתייכות למשפחה צמחים מסוימת משפיעה השפעה גדולה על אחוז המתאוקסיל בליגנין מאשר גיל או דרגת התעצות הצמח.

ליגנינים, שהוכנו מקטניות, אינם נבדלים רק ביחס לכמות המתאוקסיל המקורית מאלה שהוכנו מדגנים. 2 סוגי הליגנין נבדלים זה מזה גם ביחס כמו- יות המתאוקסיל, שהם מסוגלים לקבל ע"י מתילציה ב- Dimethylsulphate ו- Diazomethane . ליגנינים מדגנים מקבלים ע"י טיפול ב- Dimethylsulphate קבוצות מתיליות נוספות בכמות של 100 עד 150% של כמות המתאוקסיל המקורית; לעומת זאת מקבלים הליגנינים מן הקטניות, ע"י אותו הטיפול, תוספת מתאוקסיל של 200-300% מכמות נמתאוקסיל המקורית, כפי שצוין כבר, מתכונת המתאוקסיל בליגנינים, שתוכנו מדגנים, עולה במידה ניכרת על כמות המתאוקסיל המקורית שבליגנינים של הקטניות. דבר זה וכ"כ התנהגות שני סוגי הליגנין בשעת המתי- לציה, מראה על זה, שתהליך מתילצית-הליגנין בצמח מתקדם בקטניות בקצב איטי יותר מאשר בדגנים, בסוף תהליך גידול הקטניות, הליגנינים שבהם, מכילים יותר קבוצות -OH חפשיות מאשר הליגנינים מהדגנים, שקבוצותיהם ההידרוקסי- ליות לרוב מוחלפות ע"י מתיל.

תוצאות המתילציה ב- Dimethylsulphate בצד אחד וב- Diazomethane בצד שני מראות, שכמות קבוצות -OH האליפטיות (לא אנוליות) קטנה בהשואה לכמות -OH הפנולי. מכלל זה יוצא רק הליגנין "א" של שעורה, שבו כמות ה- OH האליפטי ע לה על כמות ה- OH הפנולי. מענין הדבר, שליגנינים, שהוכנו מצואה אינם מכילים כלל קבוצות -OH לאפנוליות. למרות ההבדלים הגדולים, שקיימים במתכונת המתאוקסיל של הליגנינים משתי המשפחות - קטניות ודגנים -, לא נראות תנודות גדולות של ערכי המתאוקסיל בליגנינים מצמחים השייכים לאותה המשפחה. מתוך קביעות הקבוצות המתאוקסיליות וההידרוקסיליות בליגנינים מה- קטניות מצד אחד והדגנים מצד שני, עלינו ללמוד, שמולקולת הליגנין בנויה בשתי הקבוצות הבוטניות לפי אותה התכנית. מאידך גיסא, ההבדלים בערכי המתאו- קסיל השונים של הליגנינים משתי הקבוצות מראים על זה, שהתהוות הליגנין והמתילציה שלו הנם שני תהליכים נפרדים, שמהירות התקדמותם היחסית שונה בשתי קבוצות הצמחים השונות. אין להניח, שליגנינים התהוו ע"י קונדנסציה של איזה שהוא חומר מוצא פשוט, המכיל כבר מתאוקסיל, כי במקרה זה היינו מוצאים ערכי מתאוקסיל קבועים בכל ליגנין וליגנין, דבר שבניגוד למציאות. עלינו, איפוא, להניח, שהמתילציה של הליגנין היא תהליך, אשר מקביל ולא קודם להתהוותו.

(ב) קבוצות אלדהיד וקטו.

תמיסת הליגנינים באלקלי אינה מחזירה כלל את תמיסת Fehling. דבר המראה על העדרן של קבוצות אלדהיד חפשיות. נסיונות לזהות קבוצות אלדהיד או קטו ע"י הוספת Hydroxylamine 2,4-Dinitrophenylhydrazin או Semicarbazide לתמיסת הליגנינים נכוהל לא הביאו לשום תוצאה חיובית; משקעים, שנתקבלו בכמות קטנה מאד, לא התגבשו ולא היו הרכב קבוע. עלי לציין שלא עלה גם בידי מחברים אחרים להוכיח את מציאות הקבוצות הנ"ל בליגנין העצים. Brauns (11) מניח, שהליגנין מכיל קבוצות -CO על סמך ההס- תכלות הבאה:- ליגנין שהוכן מעץ האורן מקבל, ע"י חימום בתמיסה של HCL בכוהל מתילי, 2 קבוצות OCH_3 , הנפרקות ע"י טיפול בחומצה גפריתנית (72%); את העובדה הזאת מתאר Brauns כאצטליזציה של קבוצת CO אחת. Wright & Hibbert (4) טפלו בליגנין, שהוכן מעצים ע"י מיצוי בחומצת הנמלים, תרכובת Gringard(=) אמנם יש להביא בחשבון את האפשרות, שקבוצות CO התהוו ע"י השפעת חומצת ה- נמלים.

על סמך כל התוצאות הנ"ל אפשר לסכם שאין לשלול את נוכחות קבוצות אלדהידיות או קטניות בליגנינים, אמנם אין גם לראות את תוצאות הנסיונות כהוכחה מספיקה לנוכחות קבוצות כאלה. הדבר טעון בירור נוסף.

=) וקבלו תוצאות חיוביות.

חלק IV

על הפירוק של הליגנינים

לפני תיאור נסיונותי על פירוק הליגנינים הנני למסור סקירה על תוצאות נסיונות פירוק, שנערכו עד עתה ע"י מחברים אחרים. הם עבדו בדרך-כלל בליגנין מעצים.

ליגנין נבדל משאר החמרים הצמחיים הפולימריים בזה שבפירוקו מתקבלים חמרים ארומטיים שונים כמו אלדהידים, קטונים, חומצות ופנולים, בדרך כלל בעלי טבעת בנזולית אחת. ליגנין יציב לגבי פעולות הידרוליזה ע"י חומצות; ביחוד איננה קיימת האפשרות לפרק את הליגנין להרכובת מונומרית אחת ו-יחידה, כמו למשל גלוקוזה מתהוה מעמיל. את המספר הגדול של תוצרות פירוק של הליגנין אפשר למיין כדלקמן:

(1) טבעות בנצול המוחלפות ע"י OH ו/או OCH_3 בשני מקומות שונים;
(2) טבעות בנצול המוחלפות ב-2 פחמנים בעמדת para; (CH , COOH ו/או OCH_3);
(3) טבעות בנצול המוחלפות בפחמנים 1, 3, ו-4 (כאותן הקבוצות);
(4) טבעות בנצול, המוחלפות בפחמנים 1, 3, 4 ו-5 (כאותן הקבוצות);
(5) גופים לפי (2) ו-(3), המכילים שרשרת צדדית בעלת 2 פחמנים;
(6) גופים לפי (1-4), המכילים שרשרת צדדית בעלת 3 פחמנים;
(7) תולדות ה- Dyphenyl .

הערה: הגופים הנזכרים להלן מסומנים במספרים, נרשמותיהם לפי המספרים נרשמות בטבלא הכללית המצורפת לעבודה זו.

קבוצה 1. Catechol (I) ו- Guajacol (II) הנם החמרים הנפוצים ביותר בין אלה השייכים לקבוצה (1). שני החמרים הנ"ל מתקבלים ע"י זיקוק יבש של העץ ושל ליגנינים, שהוכנו מעץ (6, 4), שניהם נוצרים גם בשעת התכת הליגנין עם KOH לפי (1) Freudenberg . המרים נוספים, השייכים לקבוצה הזאת, הנם Creosol (III), O-Cresol (IV); שני החמרים הנ"ל נתקבלו בזיקוק יבש של ליגנין, שהוכן מקלחי-התירס בזרם של CO_2 ע"י Phillips & Gross (45).

קבוצה 2. p-Oxybenzaldehyde (V) נתקבל ע"י Hibbert (29) בשעת חימצון ליגנין, שהוכן מקלחי-התירס. החומר הזה לא בודד מליגנין העצים.

קבוצה 3. לקבוצה זו שייכים חמרים רבים. החשוב ביניהם הוא ה- Vanillin(VI). Vanillin נתקבל ראשית ע"י Grafe (26), אחרי זה ע"י Hoenig & Ruziczka (32) המחברים הנ"ל קבלו את ה- Vanilin ע"י ריאקציה של ליגנין עם NaOH בנוכחו של $NaHSO_3$. Freudenberg מצא בעבודותיו המרישום יותר (4, 3, 1) ש-Vanillin מתקבל ע"י חימצון הליגנין ב- [illegible] בתמיסה אלקלית בניצו-לת עד 25%. חמרים אחרים השייכים לקבוצה הזאת הנם ה- Veratric acid (VII) ו-Protoca techuic acid (VIII) . שתי החומצות הנ"ל נתקבלו ע"י Freudenberg בהתכת הליגנין ב- KOH אחרי זה נעשתה מחילציה וחימצון ב- $KMnO_4$.

קבוצה 4. החמרים השייכים לקבוצה זו, הנם: Isohemipinic axid (IX) , Trimethylgallic acid (X) . גם שתי החומצות האלו נתקבלו ע"י הו-ר- KOH , מחילציה וחימצון ב- $KMnO_4$. בשעת החימצון של הליגנין בעצים נשי-רים לפי Hibbert מתקבל ה- Syrignic aldehyde (XI) בניצולת עד כ-20%. קבוצות (6) ו-(5) חמרים מוחלפים בשרשרת צדדית בעלת 2 או 3 אטומי פחמן נוצרים ע"י בישול הליגנינים עם חמיסת HCL 3% בכוהל אבסולוטי במשך 100 שעו-ת. השיטה הזאת לפירוק הליגנינים נקראה ע"י Hibbert Ethanolysis (3, 2) לפיה מתקבל, למשל, Freudenberg Acetovanillon (XII) קבל ע"י טיפול של ליגנין עצים עם NaOH תחת לחץ את ה- Acetosyrignon (XIII) . הביאה לגילוי של הגופים בעלי שרשרת צדדית עם 3 אטומי פחמן מהבאים: שיטת ה-

(XIV) -hydroxy- - (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)- -propanone
(XV) -hydroxy- - (4-methoxy-3-hydroxyphenyl)- -propanone
(XVI) (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)- - -propanedione
(XVII) (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)- -propanone.

עלי לציין ש- Phillips קבל, ע"י זיקוק הליגנין מקלחי-תירס עם אבק-האבץ, את ה- 1-(n-Propyl)-3-methoxy-4-hydroxybenzene (XVIII) לקבוצה (7) שייכות ה- Dehydrodoveratric acid (XIX) . גם התרכובת הזאת מתהווה ע"י התכת KOH של ליגנין. עד עתה לא הוכח, אם החמר הזה נוצר ישר בשעת פירוק הליגנין או אם הוא מתהווה כתוצאת ריאקציות-לואי מה- Veratric acid .

הריאקציות לפירוק הליגנין, שבהם השתמשתי בעבודה זאת הן:

1) חימצון ב- Nitrobenzene בתמיסה אלקלית;
2) הידרוליזה של הליגנין בכוהל חמוץ תחת לחץ;
3) התכה ב- KOH ;
4) חידור הליגנין בנתרן מתכת וכוהל.

כל הריאקציות לפירוק הליגנין הוצאו לפועל עם ליגנינים "ב".
המטרות, שקויתי להשיג ע"י ביצוע הריאקציות האלה היו הבאות:
(1) לקבוע, אם הפירוק של הליגנינים, שהוכנו מצמחים ירוקים צעירים ומצואה מביא להתהוות חמרי פירוק ארומטיים, הדומים לחמרי פירוק, המתקבלים ע"י פירוק הליגנין מעצים;
(2) לחקור את ההבדלים במבנה הליגנינים מעצים ומצמחים ירוקים;
(3) להשוות את חמרי הפירוק, המתקבלים בליגנין הצמחים עם אלה, שמתקבלים ע"י פירוק הצואה, הנפרשת ע"י כבשים שהאכילו אותם בצמחים.
השואה זו יכולה לספק ידיעות על השינויים החלים בליגנין בשעת עברו את הגוף החי.
(4) להסביר את התנהגותם הכימית והפיסיולוגית של הליגנינים מצמחים ירוקים במידה האפשרית ע"י נוסחת-מבנה. ____

החימצון ב- Nitrobenzene

השיטה הזאת עובדה, כפי שהוזכר לעיל, ע"י Freudenberg, שהשתמש בה לפירוק ליגנינים, שהוכנו מעצים שונים. לפי השיטה הזאת מחממים ליגנין בתמיסה אלקלית ממית בנוכחות ה- Nitrobenzene במשך שעות מספר ל-160-200°. אחרי זה מזקקים את התמיסה באדי מים, כדי להרחיק את עודף ה- Nitrobenzene ותולדותיו כמו Azobenzene, Hydrazobenzene ו- Anilin. מחמיצים את התמיסה ומנערים אותה באתר, שכל חמרי הפירוק עוברים לתוכו. מהתמיסה האתרית מוציאים את האלדהידים ע"י ניעור בתמיסת $NaHSO_3$, את החומצות - ע"י ניעור בתמיסת $NaHCO_3$ ולבסוף את הפנולים ע"י ניעור בתמיסת NaOH. (כל הפרטים של הטיפול הזה נמסרים בחלק הנסיוני). לחימצון ב- Nitrobenzene הכנעתי את כל הליגנינים שהוכנו. (ראה טבלא 16). את שלשת הפרקציות שנתקבלו בדקתי לפי שיטות מתאימות.

(1) הפרקציה האלדהידית.
הפרקציה הזאת הכילה בכל המקרים שני אלדהידים בלבד:
Vanillin (VI), p-Oxybenzaldehyde (XX)
תערובת האלדהידים עברה בשעת זיקוקה בואקום גבוה (0,1 מ"מ), כולה בטמפרטורה עד 160°, סימן שהיא לא הכילה Syringaaldehyde שלפי ההסתכלויות של Freudenberg עובר רק בטמפרטורה גבוהה יותר (260° בערך). העדרו של ה- Syringaaldehyde מהווה הבדל חשוב בין הליגנין מצמחים ומעצים, כי הוא נתקבל ע"י Freudenberg בחימצון כל הליגנינים, שהוכנו מעצים. את שני האלדהידים Vanillin ו- p-Oxybenzaldehyde הפרדתי ע"י מסיסותם השונה בבנזול, זיהוים נעשה ע"י נקודת ההיתוך ונקודת-ההיתוך-המעורבת (mixed melting point) (ראה חלק נסיוני).

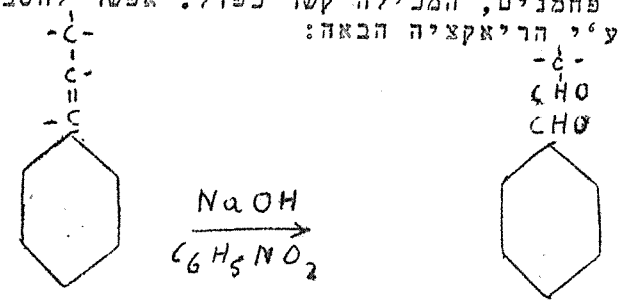
בריאקציה בין הליגנין מעצי ממ"ט ו- Nitrobenzene נוצר Vanillin בלבד, ומליגנינים מעצים נוצרים Vanillin, Suringaaldehyde, p-Oxybenxaldehyde. נתקבל עד עתה רק בריאקציה בין Nitrobenzene והליגנין ההוכן מקלחי התירס, אשר דומים יותר לצמחים ירוקים מאשר לעצים (Hibbert, 28). p-Oxybenzaldehyde נראה, איפוא, כחומר פירוק אפיני לליגנינים מצמחים ירוקים.

בטבלא מס' 16 רשומה ניצולת האלדהידים, שנתקבלה מהליגנינים השונים וכ"כ רשומות בטבלא זו הכמויות היחסיות של שני האלדהידים, המרכיבים את הפרקציה האלדהידית.

טבלא מס' 16
התהוות אלדהידים מליגנינים ע"י פעולת

ליגנין הוכן מ:	אלדהידים: כמות כללית (באחוז החמר המוצא)	כמות ה- ב-% של כמות ה- אלדהידים הכללי	כמות ה- ב-% של כמות האלדהידים הכללית
טף	19,2	64,3	35,7
צואה ממנו	-	-	-
פנסילריה	16,3	63,8	36,2
צואה ממנה	0,31	-	-
סטריה	16,1	66,1	33,9
צואה ממנה	0,26	-	-
שעורת בר	21,6	66,6	33,4
צואה ממנה	0,25	-	-
תלתן	4,2	65,4	34,6
צואה ממנה	-	-	-
טופח	6,3	62,6	37,4
צואה ממנו	0,04	-	-
תלתן פהלי	4,6	66,6	34,0
צואה ממנו	0,15	-	-
חציר בטנים	8,3	64,7	35,3
צואה ממנו	0,10	-	-
סוכר ענבים	לא נתנו פרקציות אלדהידיות.		
סוכר חלב			

אחוזי ה- Vanillin וה- p-Oxybenzaldehyde בכמות האלדהידים הכללית חושבו מכמות המתאוקסיל, שנקבעה בתערובת של ה- 2,4 Dinitrophenylhydrazones (ראה חלק נסיוני). על סמך נסיונותי יש לראות את ה- Vanillin וה- p-Oxybenzaldehyde כחמרי פירוק אפיניים, המתקבלים ע"י הריאקציה בין Nitrobenzene והליגנינים השונים שהכינו אותם מצמחים; לעומת זאת לא נתקבלו בכלל אלדהידים ע"י אותה הריאקציה מליגנינים, שהוכנו מדוגמאות צואה. כמות האלדהידים, שנתקבלה מהליגנינים השונים, נעה בגבולות רחבים מאד. אמנם יש להבדיל בין שתי הקבוצות: ליגנינים מדגנים, שמהם מתקבלת ניצולת גבוהה של אלדהידים, וליגנינים מקטניות, שמהם מתקבלים אלדהידים רק בניצולת קטנה. כמות האלדהידים היא, כמו מתכונת המתאוקסיל בליגנינים, תלויה בשייכות הצמח (שממנו הוכן הליגנין) למשפחה מסוימת ולא במצב התעצות הצמח. הדבר יוצא ביתר בהירות מתוצאות החימצון במקרה של חציר בטנים. החומר הזה הוא לפי צורתו החיצונית "עצי" מאד אבל לפי ניצולת האלדהידים - יותר קרוב לקטניות ה"רכות" מאשר לדגנים ה"עציים". למרות התנודות הגדולות בין כמות האלדהידים הכללית בליגנינים השונים היחס בין כמות ה- Vanillin וכמות ה- p-Oxybenzaldehyde הוא כמעט קבוע בכל הליגנינים. היחס הזה הוא תמיד 2/3 Vanillin ו- 1/3 p-Oxybenzaldehyde בכל המקרים ללא שום השפעה של משפחה או גיל הצמחים, שמהם הכינו את הליגנינים. העובדה הזאת מרשה להוציא את המסקנה, ש כ ל הליגנינים, לכל הפחות חלק מהמולקולה, אשר מספק את שני האלדהידים, בנוי בכל הצמחים לפי אותה התכנית. ואפשר להוציא את המסקנה היותר מוחלטת, ששלד הליגנין מכיל 3 טבעות ארומטיות; 2 מהן מוחלפות במקומות 4, 3, 1, והן שמספקות את ה- Vanillin; השלישית מוחלפת במקומות 4, 1 בלבד, והיא, שמספקת את ה- p-Oxybenzaldehyde. רק ע"י המסקנה הזאת אפשר להסביר את קביעות היחס בין שני האלדהידים בכל ליגנין וליגנין. מן הראוי לציין כאן גם את העובדה המעניינת, שליגנינים, שהוכנו מצואה, אינם מספקים את הפרקציה האלדהידית בשעת פירוקם. הסתכלות זו מראה ראשית שהליגנין משתנה בגוף החי. משתנה אותו חלק המולקולה, שממנו מתקבלים האלדהידים בליגנין שבצמחים. היות, והליגנינים המקוריים אינם מכילים קבוצות אלדהידיות חפשיות, יש להניח, שהקוצות הנ"ל מתהוות במשך הריאקציה עם Nitrobenzene ע"י חמצון שרשרת צדדית בעלת 2 או 3 פחמנים, המכילה קשר כפול. אפשר להסביר את המנגנון של החימצון הזה ע"י הריאקציה הבאה:



Anethole (XXI) לפי מנגנון כזה נהפך, למשל, ה- Anisaldehyde (XXII) ל- Iseeugenol (XXIII) וה- Vanillin (VI). כנראה קיים קשר כפול, שחימצונו מביא להתהוות הקבוצה האלדהידית כבר בליגנין המקורי ולא נוצר ע"י פעולת ה- Nitrobenzene. Von Wacek (65) פרסם לא מכבר עבודה מענינת, שבה הוא מחמצן חמרים ארומטיים שונים בעזרת Nitrobenzene. חמרים בעלי שרשרת צדדית, המכילה קשר כפול נותנים לו יבול גדול (עד ל-60% של Vanillin), כגון:

3-Methoxy-4-Hydroxy cinnamic acid (XXIV)

לעומת זאת לא מתקבל מחמרים כמו:-

$3,4-(MeO)_2C_6H_3CH_2COCH_3$ (XXV)

שבשרשרת צדדית אינן מכילים קשר כפול.

בטבלא מס' 16 נמסרות רק כמויות האלדהידים, שנוצרו ע"י פעולת NItrobenzene על הליגנינים. הערכים לניצולת פנולים וחומצות, שנתקבלו ע"י אותה הריאקציה, לא נרשמו מתוך הטעמים הבאים: הפרקציה שהכילה את החומצות היתה מזוהמת בכמויות גדולות של תוצאת חיזור של ה- Nitrobenzene ולא עלה בידי עד עתה להפריד מהם חומצות (מלבד כמויות קטנות של Benzoic acid (XXVI). הפרקציה הפנולית הכילה רק פנול בעצמו. היות, וקיימת האפשרות, שגם הפנול וגם ה- Benzoic acid (טבעות בניצוליות המוחל- פות בפחמן אחד בלבד) יכולים להווצר בשעת הריאקציה מה- Nitrobenzene, אין הם יכולים להיחשב כחמרי פירוק של הליגנין. כדי לבדוק את הדבר הזה חימצנתי בעזרת Nitrobenzene גם שלשת הסכרים: סוכר ענבים, סוכר חלב וסוכרוזה. לא נתקבלה כל פרקציה אלדהידית מהם; לעומת זאת קבלתי ניצולת גדולה של פנול וגם פרקציית חומצות ניכרת. לכן החלטתי לא להשתמש בפרקציית החומצות ובפרקציית הפנולים בכלל.

פירוק הליגנינים ע'י התכה ב- KOH

לפי השיטה הזאת מתיכים את הליגנינים ב- KOH מוצק בנוכחות של כמות מים קטנה ומחממים את ההתכה ל-300° עד 250 במשך חצי שעה. אחרי זה משאירים את התערובת להתקרר ומוהלים אותה במים. מחמיצים את התמיסה ואחרי שהיא התקררה - מוציאים ע'י אתר את תוצרות הפירוק. לפי השיטה הזאת מתקבלות רק כמויות זעירות מאד של חמרי פירוק, לכן מן הרצוי לעבד בכמויות גדולות של ליגנין (כ-200 ג'ק ליגנין). השיטה הזאת מאפשרת רק פירוק חלקי של הליגנין. בכל המקרים מתקבלת שארית שחורה בכמויות ניכרות אי-אפשר להגדיל את ניצולת חמרי הפירוק ע'י טיפול נוסף ב- KOH של השארית המתקבלת אחרי הטיפול הראשון. במיצוי האתרי של התכת KOH יכלתי, ראשית, לזהות (I) Catechol ו- Proto-catechuic acid (VIII) שני החמרים הנ'ל בודדו גם בצורה הנקיה וכמותית. התוצאות נמסרות בטבלה מס' 17.

טבלא מס' 17.

התכת הליגנינים ב- KOH
ניצולת כללית בחמרי פירוק
ב- Catechol וב- Protocatechuic acid
באחוז של החומר המוצא

ליגנין שהוכן מ:	הניצולת הכללית	ניצולת ה- Catechol	ניצולת ה- Catechuic acid
טף	2,61	0,25	1,36
צואה ממנו	2,35	0,20	1,40
פנסילריה	2,83	0,31	1,57
צואה ממנה	2,75	0,20	1,49
סטריה	2,44	0,21	1,40
צואה ממנה	2,56	0,25	1,49
שעורת בר	3,18	0,31	1,25
צואה ממנה	3,22	0,42	2,00
תלתן	1,55	0,43	0,61
צואה ממנו	1,27	0,28	0,50
תלתן פהלי	1,00	0,38	0,22
צואה ממנו	0,88	0,39	0,16
חציר בטנים	1,88	0,57	0,97
צואה ממנו	2,02	0,56	1,01

מהטבלא יוצא, כאמור, שהניצולת הכללית בחמרי פירוק קטנה מאד. יש לציין, שהתכת KOH בניגוד לטיפול ב- Nitrobenzene איננה מביאה לתוצרות פירוק המכילים מתאוקסיל; לא בטוח, אמנם, אם הטיפול ב- בטמפרטורה מעולה לא מביא לניתוק הקשר המתאוקסילי. ההבדלים בין הניצולת של החמרים השונים בליגנינים השונים אינם גדולים. הליגנינים, שהוכנו מדגנים, מספקים יותר Protocatechuic acid מאשר הליגנינים, שהוכנו מהקטניות. לא נתגלו הבדלים ניכרים בין היבול בתוצרות הפירוק של הליג-נינים מצמחים ומצואה.

פירוק הליגנינים בכוהל חמוץ.

Hibbert (4, 3, 2) השתמש בשיטה הזאת בהצלחה רבה לפירוק ליגנינים-העצים לסוגיהם. השיטה נקראת לפי Hibbert - "Ethanolysis"

בנסיונותי על הליגנינים מצמחים צעירים ומצואה עבדתי, ראשית, לפי השיטה הזאת בצורתה המקורית. ז.א. בישלתי את הליגנינים במשך 40 עד 100 שעות בכוהל אבסולוטי, שהכיל 3% HCL. מצאתי בנסיונותי מוקדמים, שהשיטה הזאת גורמת לתהליכי קונדנסציה, לכן ליריד הניצולת בתוצרות פירוק, ביחוד שהטיפול נמשך יותר מ-50 שעות. רוב הליגנין נהפך לחמרי שרף (resinous matter) שלא ניתן לפירוק.

השיטה הזאת, שהביאה בידי Hibbert לתוצאות טובות כל כך במקרה של ליגנינים מעצים - איננה מתאימה לטיפול בליגנינים מצמחים צעירים ומצואה.

את סיבת התופעה הזאת אני רואה בזה, שהליגנינים מעצים איננם מכילים כבר קבוצות OH חפשיות, קבוצות OH חפשיות נמצאות במספר גדול בליגנינים, שהוכנו מצמחים ומצואה, דבר היוצא גם מתוצאות המתילציות. יש, איפוא, להניח שהליגנינים הנ'ל, בניגוד לאלה מעצים, ניתנים יותר לתהליכי קונדנסציה ופולימריזציה (ע'י קבוצותיהם OH החפשיות), ביחוד בשעת ריאקציה בתוך ממיסים חפשיים ממים.

בגלל הסיבה הזאת נאלצתי לשנות את שיטת Hibbert ולהתאימה לתנאים הניתנים ע'י חמרי המוצא שבהם השתמשתי. במקום בכוהל אבסולוטי השתמשתי בכוהל 80%, כדי למנוע תהליכי קונדנסציה ע'י פעולת ה- Dehydration של הכוהל האבסולוטי. מתוך אותו הנימוק קיצרתי את זמן הריאקציה, לעומת זה עבדתי בטמפרטורה גבוהה יותר תחת לחץ. (ראה חלק נסיוני). הודות לשינויים האלה השיטה איפשרה את קבלתם ובידודם של חמרי פירוק שונים בכמויות ניכרות. את תוצרות הפירוק, אשר נמסו באתר הפרדתי לשלש פרקציות. לפי השיטה המתוארת בטיפול הליגנינים ב- Nitrobenzene בודדו גם כמשיו פרקציות, הפנולים והאלדהידים.

הכמויות של שלשת הפרקציות, שנתקבלו, רשומות בטבלא מס' 18.

טבלא מס' 18.

כמויות תוצרות הפירוק שנתקבלו ע'י ה- Ethanolysis
של הליגנינים
(באחוזים של חמרי המוצא)

ליגנין שהוכן מ:	אלדהידים	פנולים	חומצות נאוטרלית	הניצולת הכללית
טף	2,34	6,40	4,28	12,99
צואה ממנו	0,22	5,77	5,22	11,20
סטריה	1,98	6,24	2,32	10,54
צואה ממנה	0,22	4,00	3,45	7.67
שעורת בר	2,56	7,83	3,22	13,61
צואה ממנה	0,18	2,20	3,18	5,56
תלתן	0,61	1,28	0,42	2,31
צואה ממנה	-	0,96	1,75	2,71
תלתן פהלי	0,84	2,65	0,33	3,82
צואה ממנו	0,04	1,21	2,02	3,27
חציר בטנים	0,98	4,50	2,07	6,55
צואה ממנו	0,26	1,80	3,74	5,80

מטבלא מס.18 בולטת ביותר העובדה, שגם לפי השיטה הזאת מת לות כמויות גדולות יותר בהרבה של חמרי פירוק מהליגנינים בדגנים מאשר מליגנין הקטניות. התוצאות האלו דומות להוצאות החימצון בעזרת Nitrobenzene. הניצולת בחמרי ירוק גדולה יותר מאשר במקרה ההתכה ב- KOH אבל באף מקרה אינה עוברת על 15% של חומר המוצא. ז.א. שיטת הפירוק בכוהל חמוץ עלולה לפרק רק חלק של כל הליגנין והחלק הגדול נשאר וסובל קונדנסציה.

התוצאות ה- Ethanolysis, שבהם מתבלט ביותר ההבדל בין הליגנינים, שהוכנו מצמחים ומהצואה הן ערכי הפרקציה האלדהידית. פירוק הליגנינים, שהוכנו מצמחים, גורם להתרוות כמויות ניכרות של אלדהידים; לעומת זאת מופיעות רק כמויות קטנות מאד - כמוצאה מפירוק הליגנינים מן הצואה. כאן, כמו במקרה של החימצון ע'י Nitrobenzene מקור הפרקציה האלדהידית זהו חלק של מולקולת-הליגנין בעל טבעת בנזולית, המחלפת בשרשרת צדדית, המכילה 3 אטומי-פחמן. השרשרת הזאת נעדרת בליגנינים שהוכנו מהצואה; לכל הפחות היא נעשית ע'יעיכול הליגנין בגוף החי לבלתי מסוגלת להוות אלדהידים בשעת פירוק הליגנין - הרכב הפרקציה האלדהידית, המתקבלת ע'י פירוק בכוהל חמוץ הוא שונה מהרכב הפרקציה האלדהידית, המתקבלת ע'י חימצון ב- Nitrobenzene. כאמור, נתקבלו ע'י שיטת Nitrobenzene שני אלדהידים פשוטים: p-Oxybenzaldehyde (XX) & Vanillin (VI) כמרכיבים יחידים של הפרקציה האלדוהידית. בשעת ה- Ethanolysis לא מתקבל כלל ה- p-Oxybenzaldehyde וה- Vanillin התהווה רק בעקבות כמויות Vanillin, שהספיקו לזיהוי ע'י נקודת ההיתוך קבלתי רק בפירוק הליגנינין של פנסילריה ושעורה. ע'י סובלימציה זהירה של הפרקציה ה- אלדהידית בואקום גבוה בכל יתר המקרים נתגלתה נוכחות ה- Vanillin ע'י הריח בלבד ולא נתקבלו אפילו כמויות של מיליגרמים אחדים. (כידוע, אפשר להרגיש ע'י הריח כמויות Vanillin בסדר הגודל של אלפית המיליגרם).

המרכיב האופיני של הפרקציה האלדהידית ע'י ה- Ethanolysis היה ה- (XXVII) Vanilloyl methyl diketon (1,2). זיהוי החומר הזה נעשה ע'י הכנת מלח ה- Nickel של ה- Dioxime שלו. (ראה חלק נסיוני). זהו החומר האורגמטי היחידי מכל תוצרות פירוק הליגנין שקיבלתי, המכיל שרשרת צדדית בת 3 אטומי פחמן. לבידוד לזיהוי החומר הזה יש ליחס חשיבות מיוחדת, כי נוכחותו בתוצרות הפירוק משמשת שוב הוכחה, שהליגנינים שבצמחים הירוקים מכילים קבוצות דומות לאלו הנמצאות בליגנין העצים שממנו בידד Hibbert שורה שלמה של חמרים מסוג - $C_6 - C_3$.

יש לציין שהימצאו של ה- Vanilloyl methyl diketon כתוצרת פירוק הוא גם הוכחה מכרעת שטבעות ארומטיות הן מרכיבים קבועים של הליגנין המקורי, כי לפירוק לא נוסף כל חומר ארומטי לראקציה מבחוץ. (כמו בחימצון ע'י Nitrobenzene). בידוד ה- Vanilloyl methyl diketon מבסס כמו כן את ההנחה שהקבוצות האלדהידיות מתהוות משרשרת צדדית בת 3 אטומי פחמן. את דעתי זאת הבעתי כבר במקרה החמצון ב- Nitrobenzene. במקרה ה- Ethanolysis אמנם לא הגיע החימצון עד לפירוק השרשרת ה- צדדית, כי אם רק עד להתהוות שתי הקבוצות הקטוניות.

כמרכיב עיקרי של הפרקציה הפנולית נמצא ה- Guajacol (II) נוכחות החומר הזה אינה מפתיעה, כי ה- Guajacol נתקבל תמיד בשעת הזיקוק היבש של הליגנינים מעצים וגם מהעצים עצמם, וכ'כ בשעת זיקוק ליגנינים מקלחת תירס וקש (Phillips ,4). מן הראוי לציין רק את העובדה שה- Guajacol הריהו צאצא של Benzene המוחלף בעמדת - Ortho בלבד ולא בעמדת - para . צאצא של Benzene שמוחלף בצורה זו נמצא גם בתוך תוצרות פירוק שנתקבלו ע'י התכה ב- KOH . נראית לי כמוצדקת ההשערה ששתי קבוצות OH ב- Catecol (I) וכ'כ קבוצות OH ו- OCH_3 ב- Guajacol מקבילות לאותן הקבוצות בצאצאי ה- Benzene שבהם הוחלפו המקומות: 4, 3, 1. לכן השרשרת הצדדית שבה היה מוחלף המקום 1 נעלמה בגלל ניתוקה המלא או בגלל חימצונה לקבוצת COOH והפרדת CO_2 מהקבוצה הזאת בתנאי הפירוק. ההנחה הזאת נתמכת ע'י התנהגויות של Hibbert. הוא קבל ניצולות גדולות של חמרי פירוק בעלי שרשרת של 3 אטומי פחמן רק אז כשהוא ערך את ההידרוליזה בעזרת כוהל חמוץ בהעדרו המוחלט של חמצן, ז.א. בזרם של CO_2 . Guajacol נמצא על ידי רק כשההידרוליזה נערכה בנוכחות אויר.

כמויות הפרקציה, שהכילה את החומצות, היו קטנות מדי כדי לברר חמרים מוגדרים ממנה. כמויות ניכרות של חמרי פירוק אמנם נמצאו בפרקציה הנאטרלית, ז.א. ב מיסה שממנה הוצאו קודם האלדיהידים, הפנולים והחומצות עלה בידי לברר מהפרקציה הזאת חמרים מסוימים רק אחרי חמצון נוסף בעזרת $KMnO_4$ זיהיתי את ה- Vanillic acid (XXVIII) ואת ה- p-hydroxybenzoic acid (XXIX) התיפול ב- $KMnO_4$ הביא במקרה זה לחמצון שרשרת צדדית לקבוצת COOH .

מן הרצוי להניח שמקור שתי החומצות ותן הטבעות שפירוקן ע'י חימצון ב- Nitrobenzene הביא להופעה של p-Hydroxybenzaldehyde ו- Vanillin .

מידוד החמרים שמהם התהוו שתי החומצות יעשה בעתיד. ודאי שהחמרים הנ'ל דומים לאלה ש- Hibbert קבל ב- Ethanolysis ראה החמרים: XIV, XV, XVI , XVII). בחיזור הקטליטי של ליגנינים שונים נתקבלו גם כן גופי $C_6 - C_3$ (4).

פירוק הליגנינים ע'י חיזור.

חיזור הליגנינים בעזרת נתרן מתכתי שתואר כבר בפרק "החנקן שב- ליגנינים" שישש כ'כ להפקת חמרי פירוק (ראה את החלק הנסיוני). נתקבלה תמיסה אתרית של תולדות הפירוק שחולקה ע'י ניעור עם תמיסות של: $NaHSO_3$, $NaHCO_3$ ו- NaOH לפרקצית האלדהידים, חומצות ופנולים. כל שלשת הפרקציות הנ'ל היוו בכל המקרים ב-15% עד 17% של חמרי המוצא. פרקצית האלדהידים הופיעה גם בחיזור אך ורק כתוצרת פירוק הליגנינים מצמחים ולא נתקבלה כמעט כלל מהליגנינים מהצואה. היה אפשר לזקק בואקום גבוה את כל שלשת הפרקציות. הפרקציה האלדהידית לא הכילה Vanillin או p-Oxybenzaldehyde וגם לא Vanilloyl methyl diketon ; אחרי הזיקוק נתקבלו כמויות זעירות מאד של גבישים מהפרקציה האלדהידית אמנם לא בצורה נקיה. לכן לא עלה בידי לזהות חומר מסוים. ע'י השקעת כל הפרקציה האלדהידית ב- 2,4-Dinitro phenylhydrazine נתקבלה תערובת של 2,4-Dinitrophenylhydrazones. לפי כמות החנקן שבהם יוצא שמשקל מולקולרי הממוצע של האלדהידים הוא בקרבת 200. פרקצית הפנולים והחומצות הכילו גם הם תערובות, שלא עלה בידי להפרידן למרכיביהן; גם ריאקציות צבע אפיניות לא נתקבלו. מיטיטרציה של פרקצית החומצות משקל מולקולרי קרוב ל-200. יש איפוא להניח שהחיזור גופים שהם מכילים טבעת Benzene מוחלפת בשרשרת צדדית לפחות 3 אטומי פחמן או מערכות של 2 טבעות ארומטיות.

נסיונות לקביעת המשקל המולקולרי של הליגנינים.

תוצאות קביעת המשקל המולקולרי של ליגנינים שנמסרות בספרות נעות בגבולות רחבים מאד. (7) Beckmann קבע את המשקל המולקולרי של ליגנין שהוכן מקש ע"י מדידות קריאוסקופיות במנול ומצא את הערכים 762 ו-784. Fuchs (25) קבל באמצעות שיטה דומה ערכים של 900 בערך. במחקר חדיש יותר הגיע W. P. Conner (17) ע"י מדידות דיאלקטריות לידי המספר 3900. הערכים הנ"ל הנם באופן יחסי נמוכים בהשואה למשקל המולקולרי של פולימרים-גבוהים סימטריים, כגון צלולוזה וכו'. המספרים הנמוכים הנ"ל מתקבלים על הדעת בהתחשב עם העובדה שליגנין נבדל בסגולותיו החימיות והפיסיקליות באופן יסודי מן המרים הפולימריים הגבוהים האחרים שבטבע. למשל: אף ליגנין, הן בעץ והן בצמח הצעיר, מראה מבנה טיבי, מקדמי הגמישות של הליגנינים הם נמוכים מאד וגם הסמיכות (viscosity) של תמיסות הליגנינים היא נמוכה מאד.

תמיסות הליגנין בכוהל שהכינותי ושהכילו 15% ויותר ליגנין לא הראו כל העלאה ניכרת בסמיכות והיו בהירות בהחלט וניפנות לסינון קל.
Freudenberg (1) מניח שהמולקולה של הליגנין בנויה מ-2 עד 10 מולקולות של ה- Coniferylalcohol (XXX), ההנחה הזאת גוררת אחריה את ההנחה הסניה, שהליגנין הוא חומר בעל משקל מולקולרי גמוך מאד באופן יחסי. ראוי לציין כאן את העובדה שה- Lignanes, המרים קרובים לליגנין למי מבניהם, הם המקים בעלי משקל מולקולרי עוד יותר גמוך כגון: ה- Lariciresinol (XXXI) וה- Magnalol (XXXII) שעליהם עוד ידובר להלן.

ההבדלים בין ערכי המשקל המולקולרי שנקבעו ע"י מדידות קריאוסקופיות ובין אלה שנמצאו בעזרת שיטות פיסיקליות אחרות (72,3,17) נגרמו כנראה ע"י Depolymerisation שחלה תחת השפעת הממיסים השונים שבהם נמשו הליגנינים לקביעה קריאוסקופית של המשקל המולקולרי. לכן לא נקבע המשקל של מולקולת הליגנין השלמה, אלא של יחידת-מבנה (structural unit) קטנה יותר. מקרה דומה נמצא בקביעת המשקל המולקולרי של ה- Pectin. ע"י Ehrlich (65). חוקר זה קבע על סמך מדידות קריאוסקופיות שהפקטין מורכב ממולקולות מונומריות ה- Tetragalacturonic acid; אמנם ע"י חקירות חדישות יותר הוכח, שמולקולת פקטין גדולה יותר ושהיא מורכבת לכל הפחות מ-3 עד 5 יחידות כאלה.

כמי שהוזכר לעיל מתמוססים הליגנינים בחומצת חומץ ובפנול. נסיתי איפוא לערוך קביעות קריאוסקופיות של המשקל המלוקולרי של הליגנינים בעזרת שני הממיסים האלה. התברר שהליגנינים מתמוססים אמנם בקלות בחומצת חומץ 99%, אבל כלל לא בחומצת חומץ 100% שהוכנה באופן מיוחד לקביעות המשקל המולקולרי ע"י זיקוק עם Acetic anhydride והתגבשויות אחדות. השמוש בפנול כממיס לא הניא כלל לערכים שווים, כי לא עלה בידו למנוע ספיגת מיים ע"י הפנול בשעת הבדיקה. בגלל השפעתן הגדולה של עיקבות המיים על תוצאות הבדיקות הנ"ל פנול לא נראה כממיס מתאים למטרה זו.

לבסוף מצאתי שה- B-Naphtol הוא הממיס המתאים ביותר לעריכת בדיקות קריאוסקופיות של המשקל המולקולרי. הליגנינים נמסים בו בנקל, הוא לא היגרוסקופי וה- Molecular depression constant שלו היא די גבוהה. Bruni (14) קבע אותה ל-11,25. לכן ההנמכות נקודת הקפיאה שקבלתי הן די גבוהות (ראה טבלה 19).

בטבלה מס' 19 רשומות תוצאות קביעות המשקל המולקולרי של ליגנינים שהוכנו מצמחים. וכ"כ מצואה. בכל המקרים נמצאו ערכים בקרבת 600. סוג הצמח ומעברו דרך גוף החי אינם משפיעים על סדר הגודל של המשקל המולקולרי של הליגנינים. אבל מניח איפוא שהמסת הליגנין ב- B-Naphtol גרמה ל- Depolymerisation ולכן אני רואה בערכים בטבלה 19 לא את משקלם המולקולרי המוחלט של הליגנינים, אלא משקלה המולקולרי של "יחידת המבנה" בלבד. על השאלה הזאת ידובר להלן.

טבלה מס. 19.

תוצאות קביעות קריאוסקופיות של המשקל המולקולרי של ליגנינים שונים.

החומר:	משקל הליגנין.	משקל ה-B-Naphtol		המשקל המולקולרי.
שעורת-בר	0,1661	1.9470	1.500	640
צואה ממנה	0.1388	1.8696	1.000	629
תלתן מהלי	0.2076	1.7250	2.220	615
צואה ממנו	0.1240	2.2095	1.000	634
חציר בוטנים	0.1002	0.8228	2.200	621
צואה ממנו	0.1228	1.5180	1.500	608

נסיונותי הראו שמסיסות הליגנינים ב-Camphor היתה קטנה מידי כדי לאפשר את קביעת המשקל המולקולרי שלהם בעזרת שיטת Rast.

פרק VII

פירוק של חומרים נסיונות

חלק א': לשאלת התהוות הליגנין בצמח.

מציאותם של חמרי פירוק ארומטיים והאמירות של הלוגנציה וניטרציה של הליגנין (3,4) משמשים הוכחה לאופי הארומטי של הליגנין או לכל המחות של חלק המולקולה. (דעתו של Hilpert (31)), שהליגנין הוא תוצר של קונ-דנסציה של פחמימות, המתהוו רק בשעת מיצוי הליגנין אינו מתאים לתוצאות רוב הנסיונות בשדה זה ויש איפוא לדחותה) - חוקרים אחרים הביעו דעות שו-נות על התהוות הליגנין בצמח. הדעות האלו מבוססות על שני עקרונות. לפי העקרון הראשון מניחים, שמתהווה ראשית חומר יסודי (יחידת מבנה) ארומטי, שממנו מתהווה הליגנין האמתי ע"י פולימריזציה. תאוריה המבוססת על עקרון זה הוצעה ראשית ע"י Klason (35). לפי הנחתו של Klason נוצרו כל הליגנינים מ- Coniferylalcohol(XXX).

Klason הגיע להנחתו זו על סמך העובדה ש- Coniferylalcohol נמצא במיץ התאים של האורן הצעיר ע"י Tiemann & Haarmann (67) וגם בכמה צמחים אחרים; כ"כ אפשר לתאר את רוב תולדות פירוק הליגנין כצאצאי החומר הנ"ל. חוקרים חדשים, ביניהם Hibbert & Freudenberg קבלו את התיאוריה הזאת, אמנם, בשנויים קלים, ביחוד על סמך תוצאות פירוק הליגנין שבודדו על ידיהם לפי הנחתם משמשים נוסף ל- Coniferylalcohol גם החמרים הבאים כחומרי מוצא ליצירת הליגנין Eugenol(XXIIIa)& Isoeugenol (XXIII), Hydroxyconiferl-γ-alcohol (XXXIII). לפי דעתי קיימים הנימוקים הבאים נגד התיאוריה הזאת רק במקרים בודדים יכלו לבודד מריקמות הצמחים חמרים ארומטיים מטוג C_6-C_3 לגבי מספר הצמחים, שברקמותיהם מופיע ליגנין - מספר המקרים הנ"ל קטן מאד, לדוגמא: ה- Coniferylalcohol הצליחו לבודדו מ-5 צמחים בלבד, ביניהם עץ אחד (לפי: (5) Klein, Handbuch d.Pflanzenanalyse).

Czapek כתב בספרו, שפורסם ראשית ב-1905 "DieBiochemie derPflanze" שה- Coniferylalcohol מהווה מרכיב קבוע של מיץ התא ברוב הצמחים הצעירים בלי להוכיח את הנחתו זאת. באם אנו מניחים שה- Eugenol הוא חומר המוצא להתהוות הליגנין - ההנחה הזאת אינה נראת יותר מבוססת מאשר זו של Coniferylalcohol. Eugenol נמצא רק במספר קטן מאד של צמחים ושם הוא מופיע בכמויות גדולות כחומר מונומרי ללא כל נטיה לפולימריזציה. מתכונת המתאוקסיל בטלוטת החמרים הנ"ל היא קבועה לכן גם אחוז המתאוקסיל בליגנין היה צריך להיות קבוע מראשית התהוותו. דבר זה אינו מתאים כלל לתוצאות קביעת המתאוקסיל. כידוע משתנה אחוז המתאוקסיל שבליגנין, במשך התהוותו, באופן ניכר. הנימוק הזה הובע גם ע"י Phillips(4).

לפי התיאוריה השניה מניחים, שהליגנין נוצר בצמח מפחמימצות שונות, הן באופן ישיר והן ע"י התהוות Coniferylalcohol וכו' כחמרי ביניים. Klason(36) מביע את הדעה, שפנטוזות מהוות את חומר המוצא ליצירת הליגנין; לפי Rassow & Zsschenderlein (49) הליגנין נוצר ממנטוזנים. המחברים האלהמבססים את השקפתם זו על התצפית, שצמחים עשירים במנטוזנים מכילים רק כמות קטנה של ליגנין, ולהיפך קטנה היא מתכונת הפנטוזנים בצמחים, המכילים אחוז גדול של ליגנין.

Jonas (4) מניח שגלוקוזה הרי היא חומר מוצא ליצירת הליגנין; לפי Wislicenus (62) הליגנין נוצר מפרוקטוזה. דעות מעניינות פיתח Hibbert (2) לפי החוקר הזה הליגנין לא נוצר מפחמימות יציבות (כמו הקסוזות או פנטוזות) אלא מתרכבות המכילות 2 או 3 אטומי פחמן, הוא מתאר את התהוותם של גופי $C_6 - C_3$ ע"י קונדנסציה של 3 מולקולות Methylglyoxal (XXXIV) לפי דעתו יכולים להגיע להתהוות של גופי $C_6 - C_3$ ע"י קונדנסציה של רדיקלים חפשיים, כגון: $HCOOH \rightleftharpoons C(OH)_2$ או $CH_2OH-CHO \rightleftharpoons OH-CH-CH-OH$ אפשר כמובן להסביר את התהוותם של גופי $C_6 - C_3$ מגופים המכילים 2 אד 3 אטומי פחמן ע"י כמה דרכים אחרות, אמנם מן הרצוי לציין, שסוג תהליך מסוג זה לא הוצא אל הפועל in vitro. התיאוריות הנ"ל מבהירות את התהוותם של הליגנין רק עד לשלב של התהוות גופי C_6-C_3; הן עלולות להסביר את התהוותו של ליגנין לא יותר מאשר תיאוריה של התהוות הגלוקוזה יכולה להסביר את תהליך התהוות הצלולוזה. נוסף לזה כל התיאוריות הנזכרות לא בתמכות ע"י תוצאות נסיוניות.

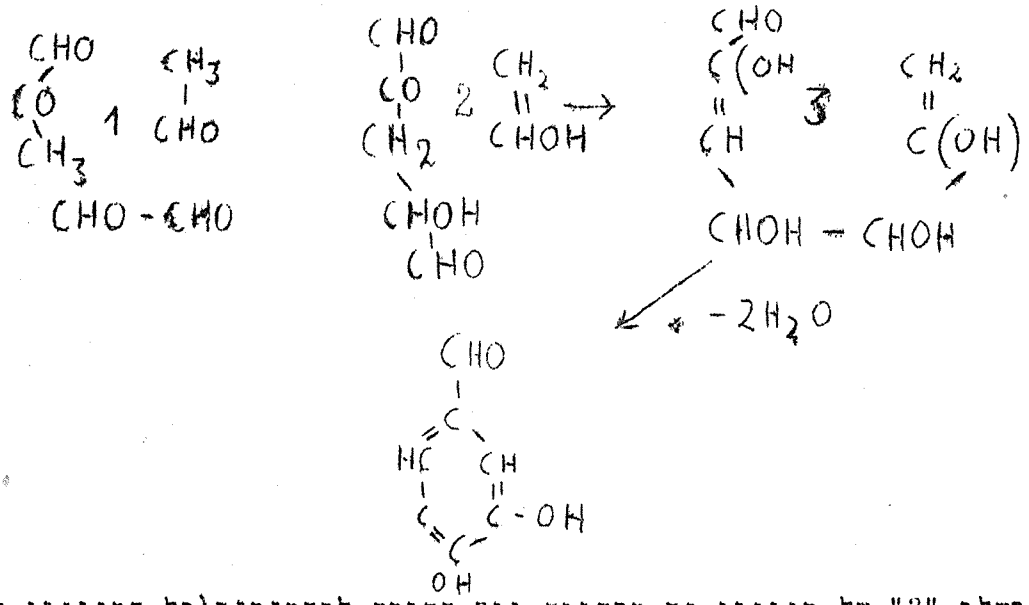
הנני להציע בתור תיאוריה ליצירת הליגנין את המנגנון הבא:

(1) פולימריזציה לינארית של פחמימות פשוטות, ע"י יצירת קשרים פחמן-פחמן.

(2) התהוות קשרים כפולים וטגירת טבעת ע"י הוצאת מים;

(3) מתילציה, שחלה בבת אחת עם הארומטיזציה, אמנם בקצב שונה.

ל-(1):- ההנחה ליצירת הליגנין מפחמימיות פשוטות מסתמכת על העובדה, שליגנין בצמחים ירוקים נמס ונעכל יחד עם שאר מרכיבי הפרקציה; חמרי מיצוי חסרי-חנקן. הדבר הזה מראה על קשר ניגוטי בין הפחמימיות הנמסות והליגנין המופיעים יחד בפרקציה הנ"ל (בקשר לזה ראה את העבודה של Bondi & Meyer (9) ואת המבוא לעבודה זאת ביחוד טבלאות 1, 2). פרקצית "חמרי מיצוי חסרי-חנקן" מכילה הקסוזות והקסוזנים ופנטוזות ופנטוזנים ולכן אין להכריע בודאות מאיזו פחמימיות נוצר הליגנין. גם אין לראות חשיבות יתרה בהחלטת השאלה אם הליגנין נוצר מהקסוזות או פנטוזות או יטר מחמרים בעלי 2 או 3 אטומי פחמן, כי ע"י קונדנסציה כלשהיא של החמרים הנ"ל נוצרות תמיד תרכובות, הדומות לפחמימיות. זה מתברר מתאור המנגנון הבא, אשר מניח קונדנסציה של: Glyoxal, Acetaldehyde & Methylglyoxal



בשלב "2" של מנגנון זה מתהווה גוף הדומה לפחמימיה (כל המנגנון הוא משוער ומשמש רק להדגמה בלבד).

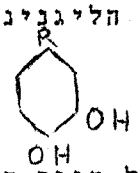
את השלב הראשון של התהוות הליגנין יש לראות לפי דעתי ב- Aldol-Condensation של הקבוצה הסופית CH_2OH של מולקולת סוכר אחת עם הקבוצה האלדהידית של מולקולת סוכר שניה והנם הנמוקים להנחה זאת. הליגנין המושלם אינו מכיל קבוצות אלדהידיות חפשיות. דבר זה יוצא מתוצאות הנסיונות (ראה חלק III) ולכן כל הקבוצות האלדהידיות שבסוכרים נכנסו לריאקציות קונדנסציה. ריאקציות הקונדנסציה לא יכולות להיות מסוג התהוות קשר Acetal או Glycosid, כי שני הקשרים הנ"ל ניתנים לניתוק קל ע"י הידרוליזה בחומצות. תוצאות הנסיונות של ההידרוליזה של הליגנינים מראות ש ל א משתחררת כל קבוצה אלדהידית ע"י הידרליזה (ראה חלק II) מהיציבות היתרה של הליגנינים לגבי הידרוליזה בעזרת חומצות ובסיסים וכן לגבי מעולת אנזימים הידרוליטיים עלינו ללמוד, שבמולקולת הליגנין לא יכולים להיות נוכחים קשרים מסוג C-O-C או C - COO אלא קשרי C - C שהתהוו באופן המתואר לעיל. ההנחה, שקונדנסציה אלדולית בין במולקולות של סוכר היא שלב ראשון להתהוות הליגנין דורשת כמסקנה התהוות של שרשרות בלתי מסועפות של 12 פחמנים לפחות. המסקנה הזאת נתמכת ע"י תוצאות הנסיונות, שנתקבלו ע"י Phillips (4), וע"י Kalb & Willstaetter (61). האחרונים קבלו ע"י חיזור הליגנין בעזרת סימן יודי (hydriodic acid) תערובת של פחמימנים שונים שמשקלם המולקולרי נע בין 167 עד 842, ז.א. התהוו שרשרות בנות 12 עד 60 אטומי פחמן. הפחמימנים האלה לא היו ארומטיים. לא נתקבל Hexyliodide שהיה מתהווה ע"י פירוק קשרי-אתר בין הקסוזות וחיזור. יש איפוא צורך להניח, שמקור הפחמימנים בעלי משקל מולקולרי גבוה הוא שרשרת ארוכה, שמכילה קשרי C-C-C בלבד. להוכחת יתר מסמכת גם התוצאה שקבל אותה Phillips (4). בשעת הזיקוק היבש של ליגנין-קלחי-התירס הוא קבל את הפחמימן n-Nonacosan, $C_{29}H_{60}$. עלי גם לציין במיוחד את העובדה הזאת, כי ליגנין מקלחי התירס דומים לליגנינים שנחקרו על ידי Bugge (6) קבל ע"י זיקוק יבש של ליגנין מעצים שורה של פחמימנים אליפטיים מ- C_{18} עד C_{40}.

ל-(2) עלינו לשער, שבשרשרת פחמימנים, הנוצרת ע"י הקונדנסציה המתוארת לעיל, כל אטום פחמן קשור עם קבוצת OH אחת:

$$-\underset{OH}{C}-\underset{OH}{C}-\underset{OH}{C}-\underset{OH}{C}-\underset{OH}{C}-\underset{OH}{C}-$$

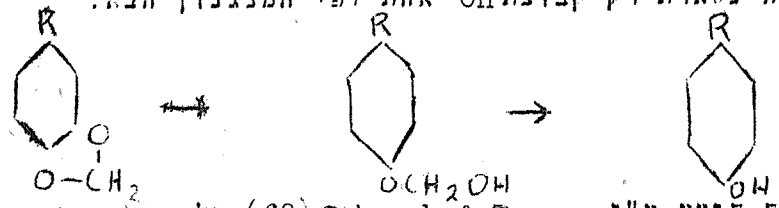
(הנוסחה מתארת את העקרון בלבד ללא התחשבות במצב הסטרי).

מקום מציאותם ואופים הכימי של כל חמרי הפירוק, המתקבלים מסוגי הליגנינים השונים, מאיר את הנחתי, שתהליכי התהוות טבעות ארומטיות והמתי-לציה הם 2 תהליכים נפרדים. כנראה הגרעין הארומטי של הליגנינים בצמחים ובעצים הרכים מראה את המבנה הבא:



R = שרשרת צדדית עם 3 פחמנים

התהוותו קודמת למתילציה. תהליכי קונדנסציה של הגוף הזה למולקולות ליגנין והמתלציה מתקדמים בעת ובעונה אחת; מהירות המתילציה קובעת את הכמות של המתאוקסיל בליגנין ואת טבעם של הפירוק. (ראה גם תיאור מנגנון התהוות טבעות ארומטיות בדף 24). מציאותם של חמרים כמו Vanillin ו-Protocatechuic acid כו' מובנת מאליו לפי האמור; אמנם התהוות החמרים כמו p-Oxybenzaldehyde ו-p-Oxybenzoic acid טעונה הסבר נוסף. במקרים כאלה עלינו להניח, שתי הקבוצות OH משתתפות במתילציה ביחד ומהוות קבוצת Dioxymethylene אחת, במשך הפירוק, ואולי גם לפני זה, הקבוצה הזאת סובלת שינוי. כתוצאה מזה נשארת רק קבוצת OH אחת לפי המנגנון הבא:



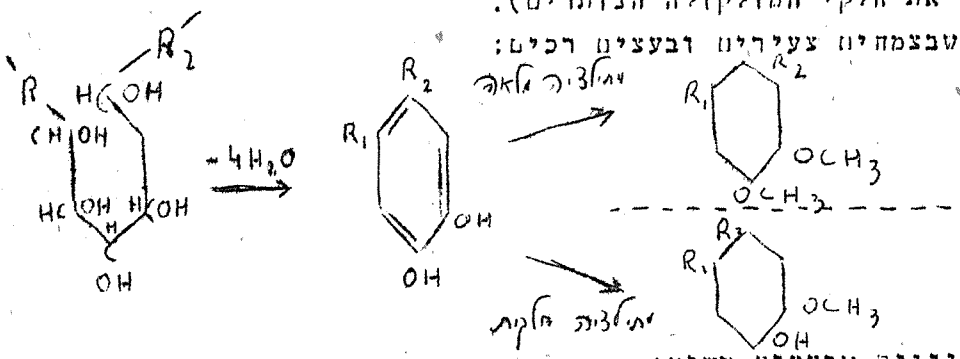
המנגנון הזה הוצע ע"י Schwenk & Papa (68) על סמך נסיונותיהם.-

בעצים רכים מתקדם תהליך המתילציה ביתר עצמה ומהירות, ולכן יותר קבוצות OH סובלות מתילציה. כתוצאה מזה רוב חמרי הפירוק של הליגנינים שבעצים הרכים אינם מכילים כבר קבוצות OH חפשיות אלא רק קבוצות OCH_3.

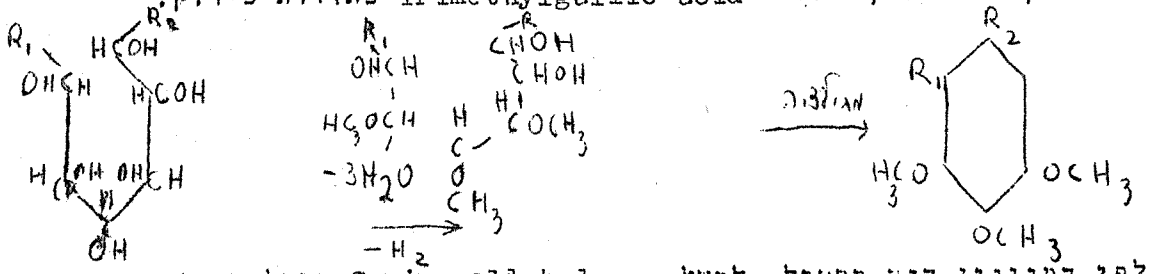
אחרים במקצת הם התנאים, שבהם מתהווים הליגנינים שבעצים הקשים. כנראה מתחיל בעץ הקשה תהליך המתילציה לפני שמתהווים הקשרים הכפולים שבטבעות הארומטיות. הארומטיזציה נעשית איפוא, בטבעות, שקבוצותיהן ה-OH כבר מוחלפות ב-CH_3. לכן התהוות הקשרים הכפולים במקרה זה ל א נעשית ע"י הפרשת מים אלא ע"י Dehydrogenation נוסף ליציאת מים.

מנגנון תהליך סגירת טבעות הארומטיזציה המשוער הוא דלקמן:
(R ו-R_1 מציינים את חלקי המולקולה הנותרים).

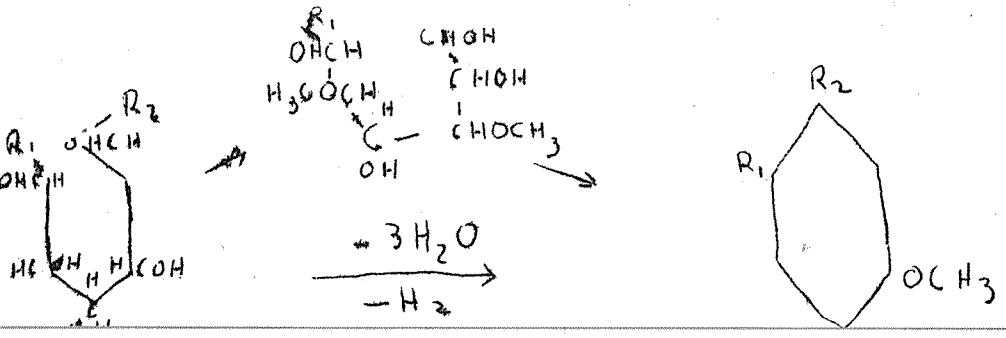
(1) בליגנינים שבצמחים צעירים ובעצים רכים:



(2) במקרה הליגנינים שבעצים קשים:
המנגנון הזה נותן למשל Trimethylgallic acid כתולדת פירוק.



לפי המנגנון הזה מתקבל, למשל, Syringaaldehyde כתולדת פירוק.



המנגנון המוצע מסביר, איפוא, לא רק את התהוותם של הטבעות הארומטיות שבליגנין, אלא גם אופן החלפתן בקבוצות OH ו- CH_3O וכ"כ מתאר יפה את מציאותם של כל חמרי הפירוק הנזכרים בטיפרות וגם של אלה שנמצאו על ידי.

חלק ב'. מה ההבדלים בין הליגניגים שבצמחים הצעירים ובין ליגניני העצים?

בשעת הדיון על אפטרויות דרכי התהוות האפטריות של הליגניגים (פרק א) הנחנו שקיימים הבדלים במהירות ההתהוותה של המערכת הארומטית וכ"כ במהירות תהליך המתילציה, שקובעים את ההבדלים במבנה טולקולות הליגניגים השונים

הליגניגים מהצמחים השונים נבדלים מאלה מהעצים במסיסותם הקלה באלקלי את הסבה לכך יש למצוא בעובדה, שליגניני הצמחים מכילים עוד מספר די גדול של קבוצות OH פנוליות חפשיות, המאפשרות המסה קלה באלקלי; לעומת זאת ליגניני העצים הם כמעט מחוסרים קבוצות OH חפשיות הנ"ל ולכן אינם נמסים באלקלי(3).-

בולט ביותר ההבדל במתכונת החנקן שבשני סוגי הליגנין. ליגניגים, שהוכנו מצמחים צעירים ירוקים, מכילים כמות חנקן די ניכרת (ראה טבלה מס.5, דף 11). בספרות המקיפה על ליגנין העצים לא מצאתי דבר על מציאותו של החנקן; חוץ מהסתכלויות של Kalb & Paloheimo (ראה חלק II בעבודה זאת: "החנקן שבליגנין") שמצאו כמויות קטנות של חנקן בליגניגים שהכינום מעץ. כמויות גדולות יותר של חנקן נקבעו ע"י Waksman (58) בליגנין ההומוס.

החוקר הזה מניח, שההומוס מכיל תרכובת ציבה בין הליגנין והחלבון (Lignoprotein) אולם בגלל תוצאות נסיונותי (חלק II) שהגיעו אותי לבטא דעות מסוימות על תפקידו של החנקן בליגנין -- איני יכול להסכים לדעתו של Waksman. בחלק II של העבודה הזאת ציינתי את כל העובדות, המוכיחות לפי דעתי, שהחנקן בליגנין הצעירים הוא חלק אפיני ובלתי נפרד של מולקו-לת הליגנין. לכן אצטמצם במקום זה לקביעת מהות ההבדלים הקיימים בין הליגניגים השונים ביחס לחנקן שבהם. אני מציע לערוך את סוגי הליגניגים לפי מתכונת החנקן שבהם בצורה הבאה:-

(1) ליגנין הקטניות (2.88 -- 3.40% N);
(2) ליגנין הדגנים (1.53 -- 1.15% N);
(3) ליגנין מעצים רכים (0.25% N -- בערך);
(4) ליגנין מעצים קשים (כפי הנראה חפשיים מחנקן)

כמות החנקן בצמחים, שמהם הוכנו הליגניגים, הולך ומשתנה לפי אותו הסדר. כפי הנראה השינויים בכמות החנקן נגרמו ע"י כמות החומר החנקני שבא במגע עם הליגנין בשעת התהוותו ועמד לרשותו לריאקציות קונדנסציה. הקטניות מהוות במשך תקופה גידולן כמויות גדולות של הלבון ביחס ליתר הצמחים, ולכן גם הליגנין שלהם מכיל את הכמויות הגדולות ביותר של חנקן. מתכונת החנקן אינה נקבעת ע"י השייכות לקבוצה בוטנית מסוימת אלא היא תלויה בכמות החמרים החנקניים שבקרקעה אותו הצמח ובמהירות התהוותם. דבר זה מסביר את העובדה, שהליגניגים מהדגנים, שהם שייכים ל- Monocotyledoneae קרובים יותר ביחס לחנקן שבהם לליגניגים מעצים, שכולם שייכים ל- Diotyledoneae; לעומת זאת הקטניות, שגם הן שייכות ל- Diotyledoneae אינן דומות ביחס לחנקן שבליגניגים שלהן לעצים מאותה הקבוצה הבוטנית. כנראה משתיע כאן גם המבנה האנטומי של הצמחים השונים והתהליכים פיסיולוגיים שונים הגם גורמים המשפיעים על כמות החנקן שבליגניגים. במקרה העצים, למשל, נפרד ה- Phloem המוביל את רוב החמרים החנקניים ע"י ה- Cambium מה- Xylem שהוא מקום התהוות הליגנין. אפשר לשער, איפוא, שבמקרה זה הליגנין המתהווה, אינה בא במגע עם כמויות ניכרות של חומר חנקני, כי ה- Xylem הוא למעשה חתכי מחנקן. בצמחים הצעירים שאינם מראים גידול לעובי, ושבהם ה- Phloem לא נפרד לגמרי מה- Xylem, ניתנת לליגנין המתהווה אפשרות יותר גדולה למגע עם חמרים חנקניים. במקרים של מחסור בחומר חנקני במשך התהוות הליגנין -- מתקשרות הקבוצות המוכשרות לריאקציות עם חנקן, עם קבוצות לא הנקניות ומונעות ע"י כך את האפשרות של התהוות ליגנין עשיר בחנקן. את המקרה הקיצוני יש לראות בליגנין העצים הקשים, שכלל אינו מכיל חנקן ובצד השני בליגנין הקטניות, שהוא עשיר מאד בחנקן. התהליך הזה דומה במידת מה לתהליך המתילציה. גם שם תלויה דרגת המתילציה ביכולת מנגנון המתילציה לספק קבוצות מתיליות במספר מתאים פחות או יותר לקבוצות OH החפשיות.

על סמך הדיון הזה על ההבדלים שבין הליגניגים מעצים ובין ליגניני הצמחים הצעירים הגעתי להסקפות המשות:-

כפי הנראה נוצרים הליגניגים בצמחים הצעירים ובעצים מחמרי מוצא דומים מאד וכ"כ כל הליגניגים כנויים לפי עיקרון אחד (חמרי פירוק דומים)!. אמנם תהליכי התהוות הליגנין, הקונדנסציה שלו עם חנקן והמתילציה חלים בצמחים צעירים ובעצים במהירויות והטיות שונות לגמרי. ז.א. ההבדלים בין הליגניגים נגרמים ע"י הבדלים קינטיים במנגנון התהוותם. מיום שגם אין אנו יכולים לראות את הליגנין בצמחים הצעירים ב"שלב ראשון בהתהוות ליגנין העצים"

(precursor) אלא גם הליגנין שבצמחים הירוקים הרי הוא תוצר מושלם שהתהווה לפי תנאים אחרים מאשר ליגנין שבעצים.

חלק ג'. על מבנה הליגנין.

(1) נוסחאות המבנה של הליגנין שהוצעו עד עכשיו.

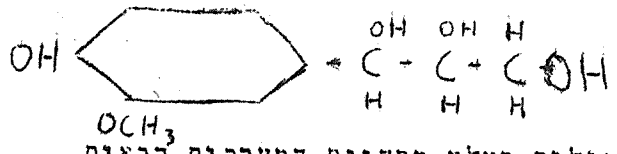
במשך חקירותיהם של ליגניני-העץ הטובים הציעו מספר חוקרים נוסחאות מבנה מפורטות פחות או יותר לחומר הזה. ברצוני לתת כאן רק את ההצעות החשובות ביותר. (סקירה מצוינת על כל שאלת הליגנין ניתנה ע"י Phillips(4))

שני החוקרים החשובים ביותר בשטח הליגנין Freudenberg ו- Hibbert, שעל תוצאות בסיונותיהם למעשה מבוסס כל מחקר הליגנין המודרני, אינם מגיעים לנוסחה מוחלטת בטביל החומר, כי הם מצטמצמים להביע את דעתם, שהליגנין נבנה ע"י פולימריזציה של יחידות יסודיות, שעליהם מתנהל ויכוח ביניהם.

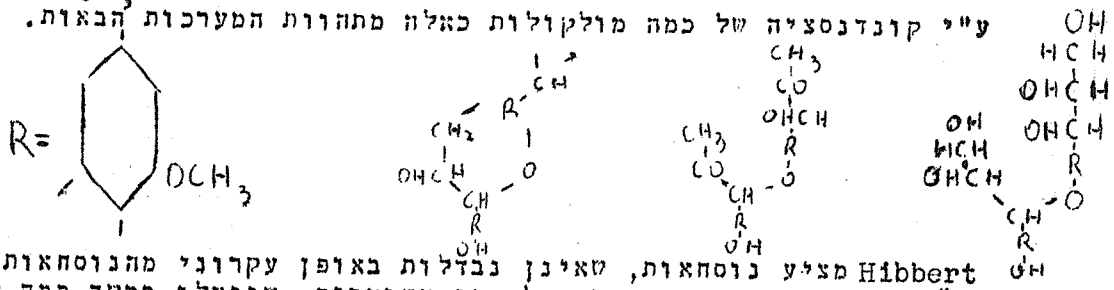
Freudenberg מוציא כמסקנה מכל נסיונותיו, שהיחידה היסודית של מולקולת הליגנין הרי הוא גוף $C_6 - C_3$ שמוחלף במני מקומות נוספים. לפי דעתו השרשרת הפרופיליית של גוף זה יכולה להביא קבוצות או נוספות וע"י זה להכנס לכל מיני ריאקציות קונדנסציה. כהוכחה לכך משמעת העובדה, שהוא הצליח לקבל, כחמרי פירוק מליגנינים שונים, את הגופים: XIV, XV, XVI, XVII.

Freudenberg מניח את ההנחה הנוסכת ש-3 עד 12 יחידות מסוג זה מהוות את מולקולת הליגנין והמולקולה הזאת הי תלת-ממדית. הנוסחאות הבאות לקוחות מעבודותיו של Freudenberg ומתארות את הטקפותיו על מבנה הליגנין:

יחידת הבנין של מולקולת הליגנין היא
1-propyl-3-methoxy-4-hydroxy benzene (XVIII)
ששרשרתו הפרופיליית, במקרה זה, מכילה עוד 3 קבוצות OH :



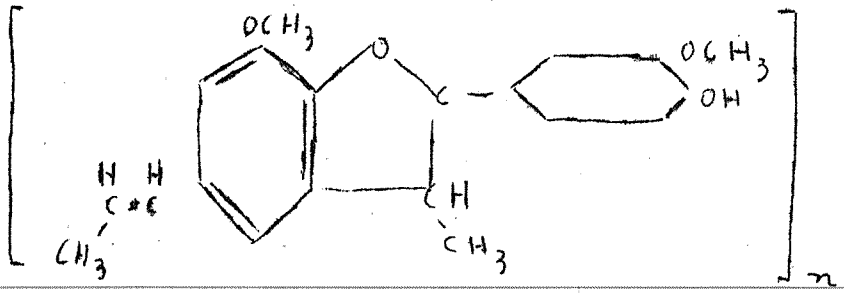
ע"י קונדנסציה של כמה מולקולות כאלה מתהוות המערכות הבאות.



Hibbert מציע נוסחאות, שאינן נבדלות באופן עקרוני מהנוסחאות המוצעות ע"י Freudenberg, הויכוח של שני החוקרים, שניהלו במשך כמה שנים, היה מבוסס על פרטים בבנין המולקולה. למשל Freudenberg הניח, שהליגנינים מכילים קבוצות Methylenedioxy והסתמך על נסיונותיו שלפיהם נוצר Formal-dehyde ע"י פירוקו של הליגנין בעזרת חומצת-מלח. Hibbert התנגד לדעה הזאת, מפני שאף שיטת פירוק הליגנין לא איפשרה בידוד של חמרים, המכילים קבוצות Dioxymethylene. אפילו פירוק הליגנין שבעץ Sassafras שעשיר ב-Safrol לא הביא לקבלת חמרי פירוק, שהכילו קבוצות Methylenedioxy. Hibbert טוען, שהכמויות הקטנות של Formaldehyde שנתקבלו ע"י Freudenberg מקורם בזיהום הליגנים בסוכריה שונים. חוץ מחלוקי הדעות הקטנים באופן יחסי Freudenberg ו- Hibbert מסכימים ביחס לעקרון מבנה הליגנין.

Haworth ו- Erdtman (3) פיתחו תיאוריות אחרות על מבנה הליגנין. הם בררו בהצלחה את מבנה החמרים שנמצאים בשרף העצים ושנקראים Lignanes. אלה הם חמרים בעלי משקל מולקולרי נמוך, כמו ה-Magnalol&(XXXI) Lariciresinol (XXXII) וגם ה- Conidendrin (XXXVI).

שני החוקרים הנ"ל מניחים שה-Lignanes הם דימרים מ-2 מולקולות של Isoeugenol (XXIII) או Hydroxyconiferylalcohol(XXXIII) ע"י פולימרזציה נוספת מתהווה הליגנין ממספר יותר גדול של מולקולות הגופים הנ"ל. Haworth ו-Erdtman מגיעים לנוסחאות מטוערות לליגנין שיש להם הצורה הבאה:



Brauns (12) מצא בעבודתו היתר חדשה את ה-Conidendrin בליגנין האורן. הדבר משמש, איפוא, תוכחה לתיאוריות של Haworth & Erdtman.

החיסרון של הניסוחים האלה הוא בזה, שכל הנוסחאות יוצאות מההנחה, שנמצא ברקמות הצמחים, גוף ארומטי C_6-C_3 כאמור לעיל נמצאו גופים כאלה רק במקרים בודדים מאד בצורה מונומרית בגוף הצמח. ברוב המקרים מסבירות הנוסחאות רק את מציאותם של חמרי פירוק מסוימים, לרוב אותם החמרים, שנמצאו ע"י החוקר הנידון.

על סמך תוצאות נסיונותי הגעתי למסקנה, שהנוסחאות שהוצעו ע"י החוקרים הנ"ל אינן מתאימות לניסוח הליגנינים שבצמחים הצעירים, מתוך הסיבות הבאות:

(1) אף נוסחה לא מתאימה לערכי המתאוקסיל השונים שמצאתי; הנוסחאות דורשות קביעות מתכונת המתאוקסיל ואינן מסוגלות להסביר את השנויים, אשר חלים במתכונת מרכיב זה במשך תקופת גידול הצמח;

(2) הנוסחאות לא לוקחות בחשבון את מציאותו של החנקן בליגנין ולכן לא מתאימות לתוצאות נסיונותי;

(3) אינה קיימת האפשרות להסביר את ההבדלים בתולדות הפירוק המתקבלות מליגנינים-הצמחים בצד אחד ומליגנינים-תצואה בצד השני ע"י הנוסחאות הנ"ל, כגון העדרה של הפרקציה האלדהידית מבין תוצרי פירוק הליגנינים שהוכנו מצואה.

לכן אנסה בפרקים הבאים להציע נוסחת מבנה למולקולת הליגנין המבוססת על נסיונותי.

ע"י הקמת הנוסחה החדשה אנסה להשלים את תמונת מבנה הליגנין הקיימת עד עכשיו. התחשבתי בנוסחה הזאת בתוצאות נסיונותי והשתמשתי גם בתוצאות שנתקבלו ע"י מחברים אחרים. הנוסחה מיועדת להסביר את העובדות הבאות:-

(1) כל הליגנינים הן מצמחים והן מצואה מכילים מערכות ארומטיות;

(2) כל הליגנינים מצמחים ירוקים מכילים חנקן, שאיננו חנקן חלבוני;

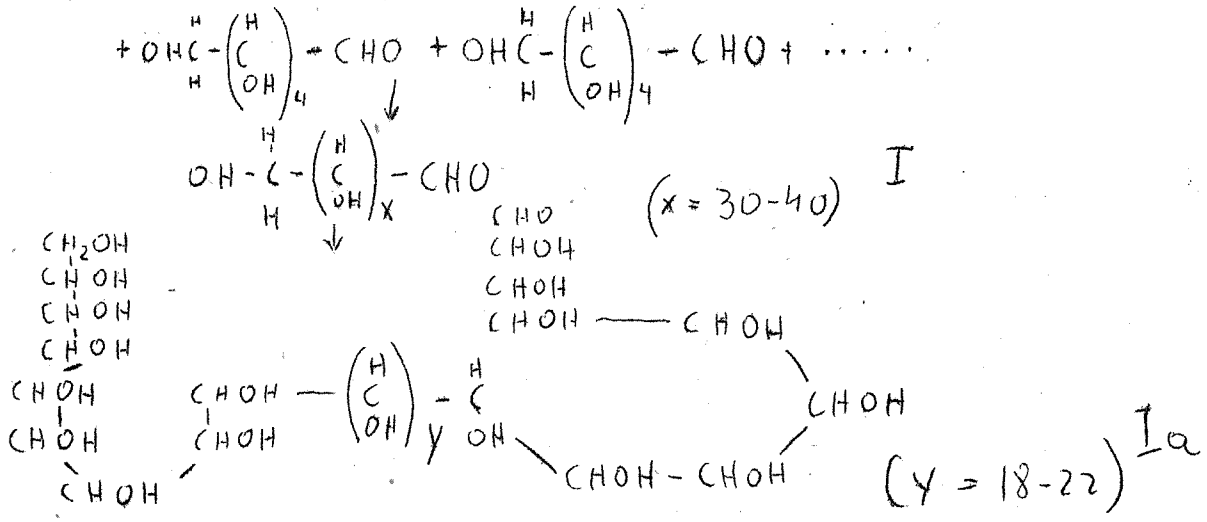
(3) קיימים הבדלים בין הליגנינים של הקסניות והדגנים ביחס למתכונת החנקן והמתאוקסיל.

(4) העיכול של ליגנין בגוף מעלה-גרה גורם להיעדרם של אלדהידים כחמרי פירוק.

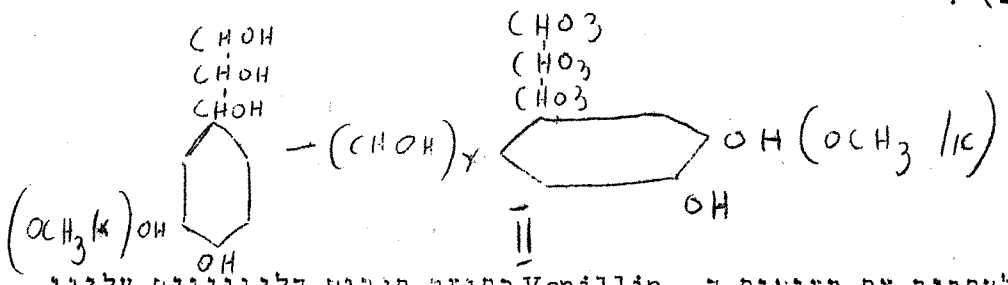
איננו רואה, כמובן את הנוסחה המוצעת כטופית אלא רק כאפשרות א ח ת להסברת סגולות הליגנין. להלן אתן את השלבים השונים המטוערים להתהוות מולקולת הליגנין, את הנוסחה ואת הנמקתה.

כפי שכבר צויין בדף 24 אני רואה את השלב הראשון של יצירת הליגנין בפולימריזציה של מולקולות סוכר ע"י התהוות קשרי C-C חדשים. לכן קיים צורך להוכיח שמולקולת הליגנין נבנית מתרכבות מטוגן C_6-C_3 בעלי מתכונת מתאוקסיל קבועה. ההנחה של שרשרות C-C-C ארוכות כשלב ראשון בהתהוות מולקולת הליגנין נתמכת ע"י תוצאות הנסיונות של Kalb & Wilstätter ו-Phillips שקבלו פחמימנים בעלי שרשרת ארוכה כחמרי פירוק הליגנין (ראה דף 24). השרשרות האלו צריכות להכיל כ-20 עד 40 אטומי-פחמן. בשלב שני צריכה השרשרת הזאת להיהפך באופן חלקי למערכות ארומטיות. שני השלבים הראשונים מתוארים בנוסחאות הבאות:

מספר מולקולות של Hexose מתחברות ע"י קונדנסציה אלדולית ומהוות שרשרת:

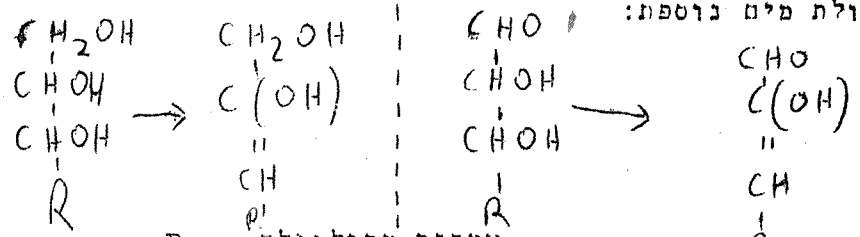


בטלב הבא אני מניח את התהוותם של שתי טבעות ארומטיות בקצוות השרשרת:- הנוסחה מקבלת, איפוא, את הצורה הבאה, ע"י הפסד של 8 מולקולות מים) :-



II

כדי להסביר את מציאות ה- Vanillin כתוצר פירוק הליגנינים עלינו להניח, שקבוצת OH אחת בטבעות הארומטיות מוחלפת ב- CH_3 ז.א. כל טבעת ארומטית, או לפחות אחת מהן, מכילה עכשיו קבוצת מתאוקסיל אחת. כ"כ מכילה נוסחה שרשרות צדדיות בנות 3 אטומי-פחמן כל אחת. השרשרות האלו נחוצות כדי להסביר את מציאותם של האלדהידים וחומצות מבין חמרי הפירוק. כאמור לעיל (ראה דף 17) צריכות השרשרות האלו להכיל קשר כפול אחד, הנוצר ע"י הפסד של מולקולת מים נוספת:



R = שארית המולקולה

עד כה מטוגלת הנוסחה להסביר את מציאותם של תולדות הפירוק הבאים:-

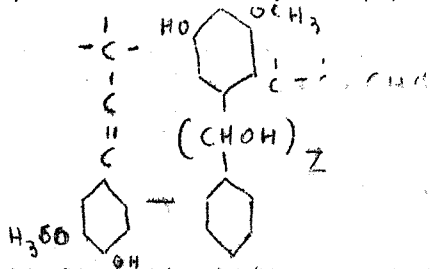
Vanillin - חימצון וניתוק הקשר הכפול בשרשרת הצדדית (ראה דף 17)

Protocatechuic acid - חימצון השרשרת לקבוצת -

Catechol - חימצון השרשרת הצדדית והמסד

Vanilloyl methyl diketon - חימצון חלקי של השרשרת הצדדית.

להלן נוסחת הליגנין צריכה להסביר את מציאות ה- p-Oxybenzaldehyde וה- p-oxybenzoic acid בין תולדות הפירוק. נוסף לזה הנוסחה צריכה להתאים לעובדה, שפירוק הליגנין ע"י Nitrobenzene נותן תמיד Vanillin ו- p-Oxy-benzaldehyde ביחס 2:1 (ראה טבלה מס.16). אינני רוצה לטער, שחימצון טבעת ארומטית, שבה המקומות 4, 3, 1 כבר מוחלפים בשרשרת צדדית ובקבוצות OH או OCH_3 גורם להפרדת קבוצת OH או CH_3O אחת מתוך הטבעת, כי אין תקדים לתהליך כזה. נראית לי, איפוא, מוצדקת ההנחה, שמולקולת הליגנין מכילה עוד טבעת ארומטית שהיא מוחלפת רק במקומות 1 ו-4. הזנחה הזאת מטבירה יפה את היחס של Vanillin 2 ל- Oxybenzaldehyde 1, שמצאתי בנסיונות פירוק. את התהוותה של הטבעת המוחלפת בעמדת para לשרשרת צדדית ע"י OH אפשר להסביר ע"י המנגנון המוצע ע"י Papa & Schwenk (68), שדובר עליו (דף 25). נוסחת הליגנין מקבלת, איפוא, את הצורה הבאה:



III

(z = 12 ÷ 15)

תוצאות קביעת המתאוקסיל מראות, שברוב המקרים היחס בין הקבוצות OCH_3 הפנוליות וקבוצות OH הפנוליות החפשיות הוא 1:1. דבר זה מתבטא יפה בנוסחה III ולפיכך נוכל להניח, שכל קבוצות-המתאוקסיל הנוכחות בליגנין כמושהוא הכן ארומטיות. ההנחה הזאת מתאימה לתוצאות נסיונותיו של Wilstatter (4). חוקר זה קבע, שקבוצות CH_3O בליגנין משתחררות תחת השפעת מימן יודי באותה מהירות שבה נעשה סיבון הקבוצות הנ"ל ב- Vanillin נקי ע"י אותו הטיפול. קבוצת OH בטבעת B בנוסחה III משתתפת בריאקציות עם יחידות שכנות ולכן אינה ניתנת למתילציה. נוסף לקבוצות OH פנוליות ישנה בליגנין גם קבוצת OH בלתי פנולית, הניתנת למתילציה ע"י Dimethylsulphate. על עמדת הקבוצה הזאת ידובר להלן.

אינני מניח, ששלושת הטבעות הארומטיות, שהוזכרו לעיל, מהוות את מולקולת הליגנין כולה מתוך הנימוקים הבאים:-

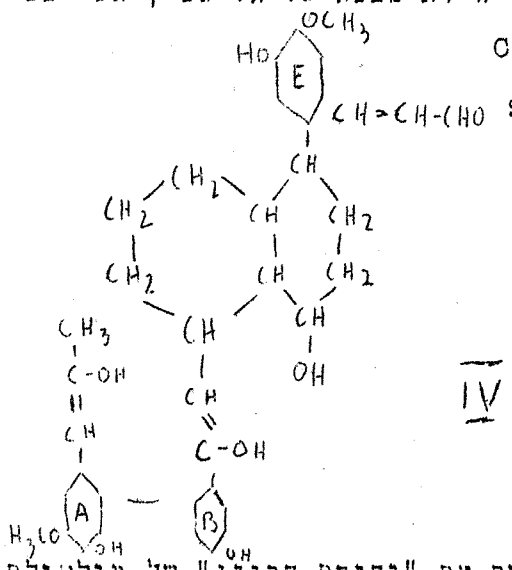
מולקולה שהיא מכילה מערכת של 3 טבעות ארומטיות בלבד היא קטנה. היא דומה לחמרים מסוג ה- Conidendrin(XXXVI) שבודדו בצורה מונומרית.

אי-אפשר להסביר את התנהגותם הכימית של הליגנינים בהנחה, שהם מכילים מולקולות המורכבות מ-3 טבעות בלבד. במקרה זה היה פירוק הליגנין נותן ניצולת גדולה יותר של חמרי פירוק ארומטיים. בהתחשב בתוצאות של Phillips, שקבל ע"י פירוק הליגנין מקלחי-התירס פחמימנים בעלי שרשרות ארוכות (ראה דף 24) ועל סמך קביעות המשקל המולקולרי של יחידת המבנה של הליגנין הוא קרוב ל-600 - אני מגיע לידי המסקנות הבאות:

יחידת הבנין של הליגנין מכילה כ-40 אטומי פחמן ומספר זה כולל גם את אטומי-הפחמן של שלושת הטבעות הארומטיות. לכן עלי להציע ניסוח מתאים לאטומי-פחמן שאינם שייכים לטבעות הנ"ל. (22 לערך) ההנחה, שהטבעות הארומטיות מחוברות ביניהן ע"י שרשרת פחמנית ישרה (6-10 אטומי-פחמן) אינה מתאימה לתוצאות ניסיונותי, כי למעשי ע"י פירוק הליגנינים לא נתקבלו תרכובות ציקליות המכילות שרשרות צדדיות המורכבות מיותר מאשר 3 אטומי-פחמן. לכן אני בא לידי ההנחה, שגם אטומי-הפחמן הנותרים מסודרים בצורת טבעות.

כנוסחה שלימה של יחידת מבנה של הליגנין אני מציע, איפוא, את הנוסחה הבאה:-

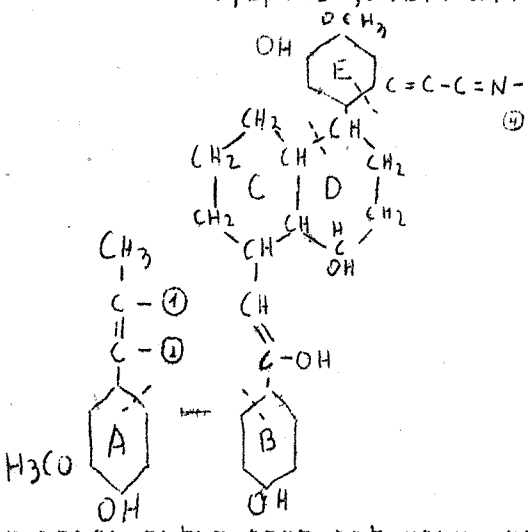
נוסחת ברוטו: $C_{38}H_{42}O_9$
משקל מולקולרי: 642;
מתכונת המתאוקסיל: 9.87%



IV

הנוסחה הזאת מתארת את "יחידת-הבנין" של מולקולת הליגנין. אין להניח את מציאותה של יחידה אחת מבודדת, אלא לפי השקפתי תמיד יחידות אחדות מסוג זה מחוברות ביניהן ע"י אטום אחד של חנקן. בהתחשב עם זה ניסחתי את יחידת המבנה, כמו שהיא מופיעה מחוברת עם יחידות דומות, כדלקמן:

נוסחת ברוטו $C_{38}H_{38}O_7N$
משקל מולקולרי: 621
מתכונת המתאוקסיל 9.94

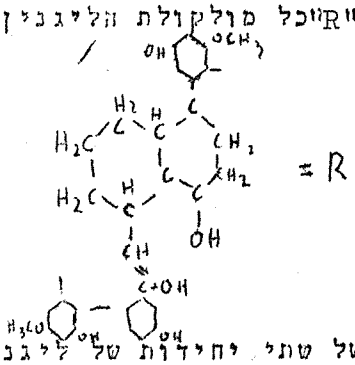


V

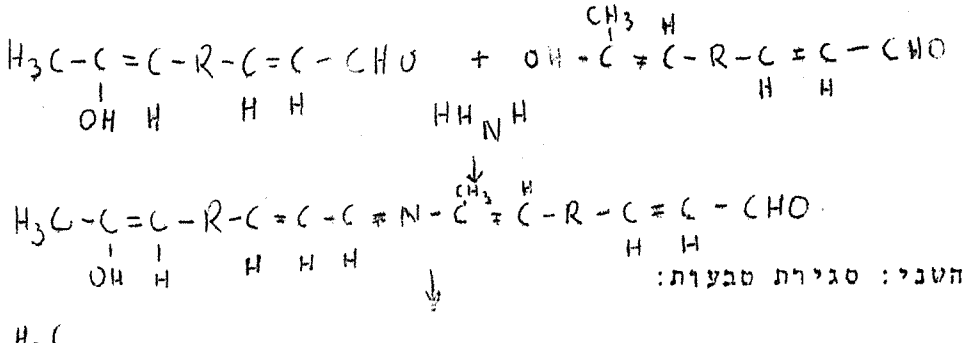
בהמשך העבודה אשתמש בנוסחה הזאת, שהיא לפי דעתי הולמת ביותר את תוצאות הניסיונות; (ביחס לקבוצות OH וכו'). הנוסחה מכילה 3 טבעות ארומטיות הדרושות. מסתרת ומקומם של שני המחליפים העיקריים OCH_3 ו-OH נערכו במטרה להסביר את כל תוצרי פירוק שנתקבלו. המשקל המולקולרי של היחידה הזו שווה בערך לזו שנקבע ע"י מדידות קריאוסקופיות, כפי שתואר לעיל מתהווה המולקולה הזאת ע"י קונדנסציה ליניארית של סוכריו. (במקרה זה 6 מולקולות של Hexose) במקומות הקונדנסציה האלה נעשה גם הפירוק, המביא לפחמימנים בעלי שרשרת ארוכה. מקומות אלה מסומנים בנוסחה V ע"י קוקווירים. מערכת הטבעות C, D, E נמצאה ב- Lignanes שדובר עליהם לעיל. למשל Conidendrin (XXXVI) בנקודה זו מתקרבות השערותי ביותר לאלו של Erdtman & Haworth (3, 4). ניסוח השרשרות הצדדיות הותאם להנחה, שהקבוצות האלדהידיות נוצרות משרשרות צדדיות ר ק במקרה שהשרשרות מכילות קשר כפול בין הפחמנים 1 ו-2.

הנוסחה (IV) נבדלת מהנוסחה V בזה, שהאחרונה איננה מכילה קבוצת OH בשרשרת הצדדית של טבעת A וגם לא את הקבוצה האלדהידית כקבוצה סופית של השרשרת הצדדית של טבעת E. לעומת זאת בנוסף אטום חנקן. את הטבעי הזה אני מתאר כדלקמן: במקומות המסומנים בנוסחה במספרים 1, 2, 3, 4 נעשה הקשר בין יחידה אחת לשניה. לפי הערתי הקשר הזה נקשר ע"י התהוות טבעת משתי שרשרות צדדיות לפי המנגנון הבא:

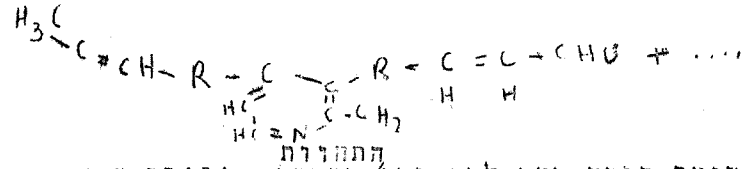
בנוסחאות הבאות מסומן ב-"R" כל מולקולת הליגנין בלי השרשרות הצדדיו



הצעד הראשון: קונדנסציה של שתי יחידות של ליגנין:



הצעד השני: סגירת טבעות:



מנגנון הקונדנסציה הזאת דומה מאד למנגנון/ צאצאי Collidine ו- Pyridine הידוע, שנחקר ע"י Hantzsch, מ- NH_3, אלדהידים ו- Ketoesters.

מולקולת הליגנין מורכבת, איפוא, לפי התכנית:

---- R - Py - R - Py - R ----

(Py מסמן את הטבעת ההטרוציקלית המופיעה בנוסחה VI)

לפי התנהגותם הפיסיקלית של הליגנינים (ראה חלק I סגולות הליגנינים) אין להניח, שרשרות מסוג זה תהיינה ארוכות. שרשרות ליגנין קצרות יכולו להבנות לפי שלשה טיפוסים.

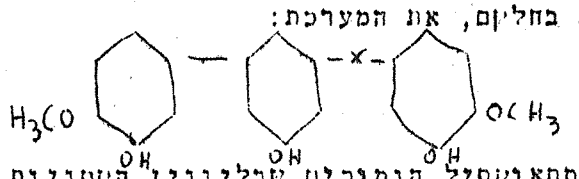
R - Py - מכיל 2.24% חנקן
Py- R - Py - מכיל 1.23% "
Py- R - Py - מכיל 3.74% "

כמויות חנקן, שנמצאו בליגנינים שהכינותי, נעות בין אותם הגבולות (ראה טבלה מס.5). קביעות החנקן, איפוא, מאשרת את ההנחת קיומן של היחידות הנ"ל.

קבוצות המתאוקסיל בליגנינים

תוצאות קביעת המתאוקסיל בליגנינים שהוכנו מהצמחים: טף, פנסילריה, סטריה ושעורה וכ"כ מהצואה שנתקבלה אחרי האכלת הצמחים הנ"ל מתאימות יפה לאחוז המתאוקסיל, שחושב לפי הנוסחה V (9.94%). על סמך התוצאות האלו עלינו לשער, שבליגנינים הנ"ל כל אחת מהטבעות A & E מכילה קבוצת מתאוקסיל אחת. לעומת זאת, מתכונת המתאוקסיל בליגנינים מחקסניות ומצואתן וכ"כ כמות המתאוקסיל בליגנין "א" מטעורה - קטנה בהרבה יותר מ-9.94%. כפי הנראה, כל יחידת הליגנינים הנ"ל מכילה רק קבוצת מתאוקסיל אחת. מתכונת המתאוקסיל המחושבת לפי הנוסחה V בהנחה, שרק קבוצת OH אחת מוחלפת ב- CH_3, היא 5.08%. כפי שיוצא מטבלה מס.15, ערכי המתאוקסיל בליגנין הקסניות מתקרבים לעספר המחושב. אמנם הערכים הנ"ל נוטים יותר מהערך התאורתי של 5.08%, מאשר ערכי המתאוקסיל בליגנין הדגנים נוטים מהערך המחושב. ההבדל בערכי המתאוקסיל שנקבעו לבין הערך התיאורתי בליגנינ הקסניות מסתבר אם נניח, שהליגנינים הנ"ל איננו חמרים אחידים בהחלט, אלא מורכבים מגופים בעלי דרגת-מתילציה שונה; ז.א. כל ליגנין הוא תערובת של יחידות, שבהן חלה מתילציה של 0 עד 4 קבוצות- OH פנוליות.

p-hydroxybenzaldehyde & Vanillin מתקבלים ע"י חמצון ב- Nitro-benzene של כל הליגנינים מצמחים. יחסם ההדדי הוא 1:2 בכל המקרים (ראה טבלה מס.16) אמנם הניצולת הכללית נעה בגבולות רחבים מאד. עובדה זו מוכיחה שכל הליגנינים מכילים, לפחות בחלקם, את המערכת:



כדי להסביר את ערכי המתאוקסיל הנמוכים שבליגנין הקטניות (פחות מקבוצת OCH_3 אחת ליחידה) עלינו להניח, שכל ליגנין מורכב משני גופים: (א) יחידה, המכילה 2 קבוצות מתאוקסיל; (ב) יחידה, שכלל לא מכילה מתאוקסיל.

ההנחה הזאת מרשה לחשב את יחסם של שני הליגנינים: הליגנין, המכיל 2 קבוצות מתאוקסיל ליחידה והליגנין מחוסר-המתאוקסיל, מההפרש שקיים בין ערך המתאוקסיל המצוי לבין המספר המחושב. תוצאות החישוב הזה נמסרות בטבלה מס.20.

טבלה מס.20.

היחס בין ליגנין המכיל 2 קבוצות - OCH_3 (a)
לבין הליגנין מחוסר ה- OCH_3 (b) בליגנינים שונים.

(באחוז הליגנין הכללי)

ליגנין שהוכן מ:	% הליגנין (a)	% הליגנין (b)
בליגנין הדגנים:		
טף	98.2	1.8
צואה ממנו	98.0	2.0
פנסילריה	97.7	2.3
צואה ממנה	97.7	2.3
סטריה	98.0	2.0
צואה ממנה	98.2	1.8
בליגנין הקטניות:		
תלתן	51.7	48.3
צואה ממנה	52.9	47.1
תלתן פהלי	52.8	47.2
צואה ממנו	67.8	32.2
חציר בטנים	43.2	56.8
צואה ממנו	44.2	55.8

הטבלה הזאת מראה, שכל הליגנינים מהדגנים בנויים לפי נוסחה V ז.א. שתי טבעות ארומטיות במולקולה מכילות כל אחת קבוצת מתאוקסיל. בליגנינים מהקטניות לא חל תהליך המתילציה כה מושלם, כי רק מחצית יחידות המבנה של ליגנין זה מכילה שתי קבוצות מתאוקסיל. עובדה זו תומכת בהנחה, שהתהוות מולקולות הליגנין והמתילציה שלה הם שני תהליכים נ פ ר ד י ם . לכן ליגנין לא יכול להיווצר מחומר מוצא, שעבר כבר את תהליך המתילציה. במקרה זה כמות המתאוקסיל בליגנינים היתה קבועה.

קבוצות ה- OH הפנוליות, החפשיות כמובן, ניתנות למתילציה עם Diazomethane ליגנינים הקטניות מכילים יותר קבוצות OH פנוליות חפשיות מאשר הליגנינים מהדגנים. אפשר, איפוא, לצפות לכך, שהליגנינים מהקטניות יקבלו יותר מתאוקסיל ע"י מתילציה בעזרת Diazomethane מאשר ליגנינים הדגנים. עובדה זו מתאשרת לפי מתוצאות המתילציה עם Diazomethane שקבלתי (ראה טבלה מס.15). מתברר, שליגנינים הקטניות מקבלים בערך כפלים יותר מתאוקסיל מאשר ליגנינים הדגנים, ליגנינים הקטניות מקבלים בערך 10% מתאוקסיל נוסף; לעומת זאת, ליגנינים הדגנים מקבלים רק 5% מתאוקסיל ע"י מתילציה ב- Diazomethane עובדה זו מוכיחה באופן כ מ ו ת י את ההנחות המתוארות לעיל

כשאנו מחשבים את הכמות ה כ ל ל י ת של המתאוקסיל, אשר צריכה להתקבל ע"י מתילציה ב- Diazomethane ביחידת הליגנין, המתוארת בנוסחה מס. V, מגיעים אנחנו לערך של 23.23% מתאוקסיל (2 קבוצות מתאוקסיל ו-3 קבוצות מתאוקסיל, אשר התהוו ע"י מתילציה של קבוצות OH הפנוליות בטבעות E,B, A). הטואת הערך המחושב עם הערכתם שנתקבלו (טבלה מס.15, עמוד 13) מראה שאף ליגנין שטופל ב- Diazomethane אינו מתקרב למתכונת של 23.23% מתאוקסיל אחרי מתילציה עם Diazomethane, איפוא, לטעמי, שאחת או יותר קבוצות OH פנוליות לא ניתנות למתילציה. אני מניח, שקבוצת OH של טבעת B

מוחלפת בצורה כזאת, שעושה אותה לבלתי מסוגלת למתילציה. הנחה זאת ניתמכת ע"י העובדה, שכתוצר פירוק בטבעת B אנו מוצאים תמיד רק - p-Oxybenzaldehyde אבל אף פעם לא - p-Methoxybenzaldehyde עובדה זאת מראה, שהקבוצה הנידונה מראש לא ניתנת למתילציה; בשעת פירוק, אמנם, הקשר הזה ניתק ומביא להתהוות p-Oxybenzaldehyde. יש לחשוב ששתי קבוצות כאלה מהוות קשר בין שתי יחידות מבנה ע"י התהוות קשרי C - O - C.

כשלא נביא בחשבון את הקבוצה הנ"ל, מגיעים אנו לערך תיאורתי של 19.0% מתאוקסיל אחרי מתילציה ב-Diazomethane (לפי נוסחה V) אנו לומדים מטבלה 15 שמתכונת המתאוקסיל אחרי המתילציה ב-Diazomethane בליגנינים הדגנים מגיע לערך זה, אולם ליגנינים הקטניות מגיעים לערכי מתאוקסיל קטנים יותר אחרי אותו הטיפול. תופעה זו לא שיערתי מראש, כי לפי טבלה מס.20, מכילים ליגנינים הקטניות חלק ניכר של יחידות עם 4 קבוצות OH פנוליות חפשיות. אם נניח, לפי טבלה מס.20, שליגנינים הקטניות מכילות כ-50% יחידות מוחלפות ב-2 קבוצות מתאוקסיל ו-50% . של יחידות מחוברות מתאוקסיל לגמרי - אזי מתחשב היחס: מתאוקסיל פנולי להידרוקסיל פנולי (נוסחה V) - 2:6. למעשה היחס הזה מגיע רק ל-2:4; חלק קבוצות ה-OH הפנוליות איננו מגיב עם Diazomethane וודאי, איפוא, שמתקשרות יחידות שכנות בעזרת קבוצות OH חדשות. העובדות הנ"ל מוצאות את הסברתן בהשערה של המנגנון הבא: רוב קבוצות OH הפנוליות, שבליגנינים הדגנים סובלות מתילציה בתקופה מוקדמת של התהוות המולקולה. לעומת זאת המתילציה של אותן הקבוצות בליגנינים שבקטניות היא איטית יותר. וכ"כ לא עומדת כמות CH_3 מספיקה לרשות הקבוצות OH לכן הן נשארות חפשיות וניתנות לכל מיני קונדנסציות.

תוצאות המתילציה ב- Dimethylsulphate מראות, שבכל המקרים (מלבד הליגנין "א" שבשעורה) חלה מתילציה של קבוצת- OH בלתי פנולית אחת. יש להניח שזאת קבוצת OH שבטבעת D . אין לשער, שקבוצת OH שבשרשרת בין טבעות C & B ניתנות למתילציה; כי קבוצות OH טרשיאריות בדרך כלל לא ניתנות למתילציה. (יתכן גם בשרשרת זו חל שווי משקל קטו-אינולי). מן הראוי לציין כאן, שלא קיים הבדל בין ערכי המתילציה עם Diazomethane ו-Dimethylsulphate בליגנינים מהצואה. בליגנינים האלה נ ע ד ר ת , איפוא קבוצת OH הבלתי פנולית. על התופעה המעניינת הזאת ידובר בחלק הבא של עבודה זו.

הליגנין היחידי, שחורג מהמסגרת של הליגנינים הרגילים, הריהו ליגנין "א" של השעורה. לפי כמות המתאוקסיל שבו הוא דומה יותר לליגנינים הקטניות מאשר לאלה של הדגנים. הוא מכיל גם כמות יותר גדולה של קבוצות OH בלתי פנוליות מאשר כל הליגנינים האחרים. שתי העובדות הנ"ל מראות, שהליגנין הזה נמצא עוד בתקופת התפתחות מוקדמת. כתוצאה לא חלה עוד סגירת טבעות או ארומטיזציה שלהם; הדבר הזה גורם לכך, שהרבה קבוצות OH עוד לא שייכות לטבעות ארומטיות ולכן ל א ניתנות למתילציה עם Diazomethane אלא רק למתילציה עם Dimethylsulphate. בהתאם לכך מתמוטטים הליגנינים "א" רע מאד באלקלי (מסיסות הליגנינים באלקלי נגרמת, כאמור לעיל, ע"י קבוצות OH פנוליות).

חלק ד'. עיכולי הליגנינים בגוף החי.

כפי שנמצא בעבודות של Mc.Annally (38), Juon (69), Bondi, Meyer(9) Crampton (18) וכו' . וכפי שתואר במבוא לעבודה זו, ליגנין שבצמחים צעירים ניתן במידה ניכרת לעיכול ע"י מעלי-גרה, בניגוד לליגנין שבקש ובקלחי-תירס שלמעשה אינו נעכל. Ferguson (20), Dietrich i Koenig (4) Rogozinski (51) (Murdfield (4), Thomann (55)

בעבודה הזאת עיכבתי אחרי שינויים החלים במבנה בשעת עיכולו ע"י מעלי-גרה ומצאתי את ההבדלים הבאים בין הליגנינים שבצמחים ובין אלה שעברו את גוף החי:

(1) הליגנינים, שבצואה, אינם נותנים פרקצית-אלדהידים ע"י שיטות פירוק כלשהן;

(2) בליגנין הצואה נעדרות קבוצות ה- OH הניתנות למתילציה ע"י Dimethyl-sulphate- לעומת זאת אינן נשתנות ע"י העיכול סגולות הליגנינים האופיניות הבאות:

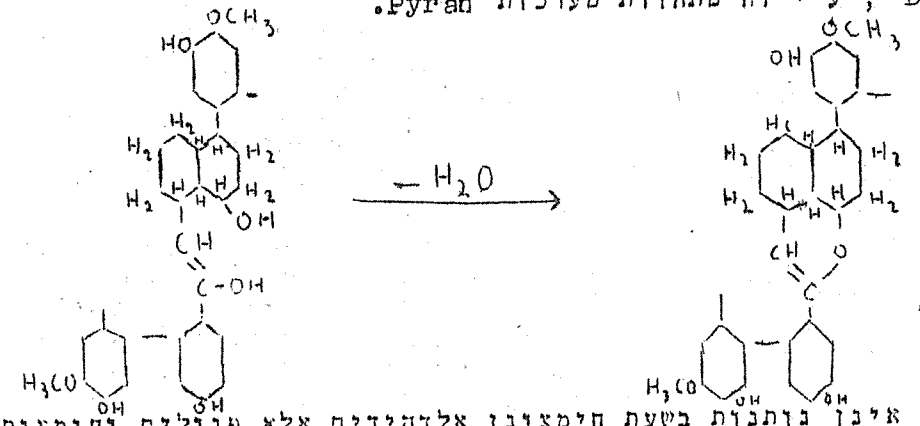
(א) המשקלות המולקולריים של יחידות הליגנין מצמחים ומצואה שווים בערך.

(ב) מתכונת החנקן והמתאוקסיל שבליגנינים אינה מושפעת כמעט ע"י עיכולם;

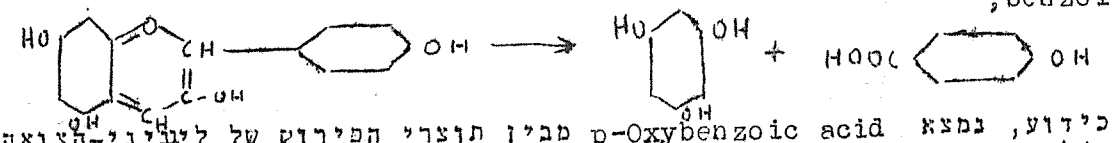
(ג) ע"י העיכול לא נגרם שינוי במסיסות הליגנינים באלקלי ובכוהל.

מתוצאות הבדיקות של המשקל המולקולרי יוצא, שב"שלד" הליגנין למעשה אינו חל כל שינוי בשעת העיכול, המולקולה איננה מתפרקת בגוף החי; כ"כ גם מתכונת החנקן לא משתנית. התוצאה האחרונה לא מפליאה לאור העובדה, שהחנקן אינו חנקן חלבוני (ראה חלק II) ולכן לא ניתן להפרדה ע"י הידרוליזה. לרשות הגוף כנראה אינו עומד שום מנגנון, המאפשר ניתוק קשרים אתריים, כי גם כמות המתאוקסיל בליגנינים שבצואה שווה למתכונת המתאוקסיל בליגנינים שבצמחים.

כדי להסביר את השנויים, החלים במולקולת הליגנין בשעת העיכול, אנו ניעזר שוב בנוסחאות IV ו- V (דף 30). השינויים במולקולת הליגנין חלים כנראה רק על השרשרות הצדדיות בטבעות A & E ועל השרשרת המקשרת טבעת C עם B. שם נעלמים הקשרים הכפולים שע"י חימצונם נוצרת הפרקציה האלדהידית, המתקבלת בשעת פירוק הליגנינים. מתקבלת על הדעת ההנחה, שמערכת העיכול מטוגלת ל- Hydrogenation של קשרים כפולים אליפטיים. כי תהליכי ה- Hydrogenation מהווים, כידוע, חלק חשוב בכל הפעולות המצון-חיזור המוצאות לפועל ע"י הגוף. בפרקים קודמים של עבודה זאת (דף 10, 31) העמדתי, אמנם, את ההיפותיזה שרוב השרשרות הצדדיות בליגנין אינן חפשיות אלא מהוות (באמצעות חנקן) טבעות מסוג הפירידין. נשאלת, איפוא, השאלה: מדוע מופיעים אלדהידים בין תוצרי פירוק הליגנינים מצמחים ולא בין תוצרי פירוק הליגנינים מצואה? (לפי קביעות ערכי החנקן בטני סוגי הליגנינים נאלצים אנו להניח, שהטבעות הנ"ל לא נפתחות בשעת העיכול). אפשר להסביר גם את העובדה הזאת, שטבעות ה- Pyridine שבליגנינים סובלות Hydrogenation בשעת העיכול. כשנפתחת הטבעת בשעת פירוק הליגנינים מחצואה מתהוות שרשרות מחוטרות קשרים כפולים שע"י חימצונם נותנים רק חומצות וגופי $C_6 - C_3$ אבל לא אלדהידים. בפירוק ליגנינים הצמחים, כמובן, נפתחת טבעת Pyridine רגילה ומתהוות 2 שרשרות צדדיות (כמתואר בנוסחה IV) שחימצונם מביא, כאמור, להופעת אלדהידים. השרשרת המקשרת את הטבעות B & C מושמעת לפי דעתי ע"י העיכול. אמנם אני טוען כאן מנגנון שונה. אני מניח, שחלה קונדנסציה בין קבוצת OH שבשרשרת ובין קבוצת OH שבטבעת D, ע"י זה מתהוות מערכות Pyran.



טבעות כאלה אינן נותנות בשעת חימצונן אלדהידים אלא פנולים וחומצות. פירוק המערכת ה- Pyran דומה מאד לפירוק של Flavones (70) ו- Anthocyanins. למשל, Pelargonidin מתפרק ע"י התכה באלקלי ל- Phloro glucinol ו- p-Oxy-benzoic acid;



כידוע, נמצא p-Oxybenzoic acid מבין תוצרי הפירוק של ליגנינ-הצואה מציאותם של מערכות Pyran בליגנין נדרשה כבר ע"י Freudenberg (1-4) וכ"כ מצא Glading (3) בחקירותיו על ספקטרום הבליעה האולטרא-סגול של הליגנינים, שמופיעים קווים, המתאימים לאלה הנגרמים ע"י מערכות Pyran.

הנחת התהוות טבעת Pyran מתאימה לא רק להעדרה של הפרקציה האלדהידית בין תוצרי הפירוק של ליגנינ-הצואה, כי התהוות טבעת זו מסבירה את העלם הקבוצה ההידרוקסילית הבלתי-פנולית באותם הליגנינים.

אנו משערים שעיכול הליגנין נעשה במעיים, כי ליגנינ-הצמחים נמסים יפה בבסיסים ואינם נמסים בחומצות. עליהו איפוא להניח, שהליגנינים בסביבה אלקלית (במעי) נתונים יותר למעולה כימית ואנציימתית מאשר בסביבה חמוצה של הקיבה. יש לשער שהחיידקים שבמערכת העיכול של מעלה הגרה לוקחים חלק פעיל בעיכול הליגנינים, כי בעלי-חי אחרים כמו עופות (Tschernjak 71) אינם מסוגלים כלל לעכל את הליגנין שבמספוא. העובדה, שחיידקים מסוגלים לגרום לשנויים מסוימים במבנה הליגנינים, נודעת מחקירותיו של Waksman (54) על פעולתם של חיידקי הקרקע על ליגנינ- הומוס.

חלק נסיוני.

(1) מיצוי הליגנינים לפי Phillips.

ממצים 100.0 ג"ר חומר צמחי מיובש באויר ומחון דק בכוהל 96% קר לשם הרחקת הכלורופיל, עד שעות צבע ירוק לא עובר יותר לכוהל. מיבשים את הצמחים וממצים אותם ב- Petroleumether (60-90°) בקור, כדי להרחיק שומנים. מיבשים את הצמחים באויר וממצים אותם ב-2 ליטרים של כוהל 60%, אשר מכיל 20 ג"ר NaOH לכל ליטר למשך 24 שעות תוך כדי בחישה חזקה מכנית. חוזרים 3 פעמים על המיצוי באותם התנאים. מנדפים את הכוהל משלושת המיצויים בואקום (20 מ"מ).

מוזגים את תמיסות הליגנין לתוך 5 ליטר חומצה גפריתנית 2% ובוחשים היטב. הליגנין שוקע בצורת פתיתים חומים, אחרי שקיעת הליגנין שופתים (×) את הנוזל העליון מהמשקע ומוסיפים 3 ליטר מים. בוחשים וטוב שופתים מהמשקע. חוזרים על הטיפול הזה עד שהנוזל העליון חפשי מחומצה. מסננים מהמשקע וממיסים אותו בכמות קטנה של כוהל 96%. את התמיסה הכוהלית מוזגים לתוך ליטר אחד של מי קרח. מסננים מהליגנין המושקע ומיבשים אותו בואקום בטמפרטורת החדר.

ניסיתי את המודיפיקציות הבאות של שיטת Phillips.

(א) מיצוי בכוהל של 60% אשר מכיל 4, 8, 1-10% NaOH;
(ב) " " " 75% " 2, 1-4% NaOH;
(ג) " " " 96% " 2, 1-4% NaOH;

הגדלת ריכוז ה-NaOH מגדילה את ניצולת הליגנין; לעומת זאת הגדלת ריכוז הכוהל מנמיכה אותה. כמות החנקן של כל הליגנינים, שהוכנו לפי המודיפיקציות משונות היתה כמעט שווה. בטבלה מס.21 נמסרות תוצאות המיצוי של 2 צמחים וצואתם לפי שיטת Phillips:

טבלה מס.21.

כמות החנקן בליגנינים אשר הוכנו לפי המודיפיקציות השונות של שיטת Phillips.

חומר המוצא:	אופן המיצוי:	הניצולת (באחוז החומר המוצא)	מתכונת החנקן בליגנין (ב-% הליגנין)
שעורת-בר:	כוהל 60%: NaOH 4%	2.1	1.56
	NaOH 8%	2.4	1.60
	כוהל 75%: NaOH 4%	1.40	1.44
	כוהל 96%: NaOH 4%	1.10	1.45
צואה משעורת-בר:	כוהל 60%: NaOH 4%	2.2	1.71
	כוהל 60%: NaOH 8%	2.4	1.75
	כוהל 75%: NaOH 4%	1.70	1.55
	כוהל 96%: NaOH 4%	1.50	1.45
חציר בטנים:	כוהל 60%: NaOH 4%	1.50	2.95
	כוהל 60%: NaOH 8%	1.75	3.04
	כוהל 75%: NaOH 4%	1.40	2.90
	כוהל 96%: NaOH 4%	1.30	2.87
צואה מחזיר:	כוהל 60%: NaOH 4%	1.65	3.15
	כוהל 60%: NaOH 8%	1.80	3.20
	כוהל 75%: NaOH 4%	1.40	2.90
	כוהל 96%: NaOH 4%	1.20	2.80

(2) מצוי הליגנין מצמחים וצואת ע"י 2% NaOH וחלוקת הליגנין לפרקציה בלתי נמסה בכוהל (ליגנין "א") ולפרקציה נמסה בכוהל (ליגנין "ב").

שיטת המיצוי הזאת, שלפיה הוכנו כל הליגנינים ששימשו לנסיונות בעבודה זו, עובדה בהתחיב עם הדרישות הבאות:-

(× to decant

(א) ניצולת טובה של הליגנין;
(ב) מניעת טיפול קודם למיצוי, שעלול להקטין את ניצולת הליגנין או לשנות את מבנהו;
(ג) מניעת טימוט בריכוזי אלקלי גבוהים או בטמפרטורה גבוהה מדי;
(ד) מניעת סינון מרחפי הליגנין או תמיסות ליגנין אלקליות דרך ניר (בגלל הסתבנותם האטית מדי).

מיצוי הליגנין בערך כדלקמן:

הכנת ליגנין "ב": מיבשים את חמרי המוצא באויר וטוחנים אותם טחינה גסה. טחינה דקה מדי אינה מגדילה את הניצולת ומקשה על הסינון. ממצים את החמרים הטחונים ב-(60-90° Petroleumether) עד שצבע לא עובר יותר למפיס. מסננים ומגרשים את שארית הממיס ע"י חימום קל בואקום. מערבבים קילוגרם אחד של צמח או צואה עם 12 ליטר של תמיסת NaOH מימית 2%. מחממים את התערובת ל-80° במשך 8 שעות תוך כדי בחישה טובה (80-90 סיבובים לדקה). יש למלא את הכלי שבו נעשה המיצוי, רק ל-2/3 נפחו, כי תערובת המיצוי מעלה קצף רב. אחר 8 שעות מסננים את התערובת החמה דרך בד כותנה דק. רצוי לערוך את המיצוי במשך שעות היום ולהשאיר את התערובת לסינון במשך הלילה. רוחצים את השארית ב-5-6 ליטר מים ומוסיפים את מי הרחיצה לתסנין הראשון. ממצים את השארית עוד 3 פעמים באותם התנאים. אוספים את כל התסניניה ומרכזים אותם בואקום (20 מ"מ) ל-1/3 נפחם הקודם. סותרים את תמיסת הליגנין האלקלית בחומצה גפריתנית ומוסיפים חומצה עד שהתמיסה מגיבה הגבה חמוצה לגבי לקמוס. אחרי שקיעת הליגנין טופתים את הנוזל העליון מהמשקע מוסיפים כ-5 ליטר מים ובוחשים. אחרי שפתיתי הליגנין שקעו מחדש, טופתים עוד הפעם ומוסיפים שוב מים. חוזרים על הרחיצה הזאת 4 פעמים. אחרי השפיתה האחרונה מפרידים את הליגנין מהנוזל העליון ע"י צנטריפוגציה (15 דקות ב-2800 סיבובים לדקה). מורחים את המשקע בטכבה דקה על פלטות זכוכית גדולות לשם ייבוש באויר. הליגנין הגלמי המתקבל מכיל עוד כמויות קטנות של תאי-צמחים, חול, כלורופיל וחמרים שומניים. כדי להרחיק את הכלורופיל ממצים את הליגנין באתר לפי שיטת Soxlet במשך יום אחד. יש לכתוש את הליגנין היטב, כדי להבטיח את הצלחת המיצוי באתר. ממיסים את הליגנין בכוהל (בקור) ומשתמשים בליטר אחד של כוהל להמסת 50 ג"ר ליגנין. מסננים את התמיסה הכוהלית ומרכזים אותה בואקום עד ל-1/3 נפחה הקודם. שארית הסינון (1) מכילה את הליגנין "א". מוזגים את תמיסת הליגנין הזאת לתוך 20 פעם נפחה של מי-קרח. הליגנין "ב" שוקע. מפרידים את המשקע מהנוזל העליון ע"י שפיתה, ממיסים אותו מחדש בכמות קטנה של כוהל ומשקיעים ע"י מיהול במי-קרח. את המשקע מפרידים מהמים ע"י צנטריפוגציה (ראה למעלה) ומיבשים אותו בואקום בטמפרטורת החדר. פרפרטים שנתקבלו ע"י השיטה הזו היו מחוסרי-אפר.

הכנת ליגנין "א": ממיסים את השארית (1) ב-100 פעמים כמותה של תמיסה מימית 4% NaOH תוך כדי חימום ל-60° ובחישה. מפרידים את התמיסה מחול ותאי-צמחים ע"י צנטרופוגציה (15 דקה, 2800 סיבובים לדקה) ומשקיעים ממנה את הליגנין ע"י הוספת חומצה גפריתנית. מטחררים את הליגנין "א" המושקע מעודף החומצה ע"י שפיתות אחדות ומיבשים אותו כפי שתואר בפרק על הכנת הליגנין "ב".

(3) טיפול בצמחים טריים לשם מיצוי מיץ התאים.

טוחנים את הצמחים הטריים במקצצת בשר. עוטפים את הצמחים הטחונים בשק ובולשים אותם במכבש הידראולי בלחץ של 150 ק"ג ל-ס"מ², כדי להוציא את מיץ התאים. ממצים את השארית 4 פעמים רצופות ב-10 פעמים כמותה של 2% NaOH מימי. משארית הטיפול הזה ממצים את הליגנין לפי (2).

(4) טיפול בליגנינים בפפסין.

ממיסים 1 ג"ר ליגנין ב-10 ס"מ³ NaOH 5%, מוהלים את התמיסה ל-200 ס"מ³ ומשקיעים את הליגנין ע"י הוספת 4 ס"מ³ חומצת מלח מרוכזת. (המסת הליגנין והשקעתו נעשות כדי להביא את הליגנין לצורת פתיתים דקים, הניתנים להשפעת הפפסין). מוסיפים 0.5 ג"ר פפסין ומחזיקים את התערובת 7 ימים ב-37° ובוחשים אותה לעיתים קרובות. מסננים מהמשקע, רוחצים אותו כדי לשחרר מעודף החומצה והפפסין ומיבשים אותו לפי (2).

(5) טיפול בליגנינים בפנקריאטין.

ממיסים 1 ג"ר ליגנין באלקלי לפי (4) אבל לא משקיעים בחומצה, אלא מביאים את ה-Ph של התמיסה ל-8 ע"י הוספה של Phosphate buffer. הנפח הכללי הוא 100 ס"מ³. מוסיפים 0.2 ג"ר פנקריאטין (Parke-Davis) ומחזיקים את התמיסה 4 ימים ב-37°. משקיעים את הליגנין ע"י הוספת עודף חומצה ומטפלים בו הלאה לפי (4) ו-(2).
הערה: קביעת כמות החנקן הבליגנינים נעשתה לפי שיטת Kjeldal (מקרו), כקטליזטור לטרימה שימש פלן אלמנטרי שחור בכמות של 50 מ"ג לכל טריפה.

(6) הידרוליזה של הליגנינים לשם מיצוי המיצלולוזה וצלולוזה.

מרתיחים 2.0 ג"ר ליגנין עם 100 ס"מ³ חומצה מלח 2% 5 שעות תחת

מקרר זקוף, מסננים מהליגנין הנותר, רוחצים את המשקע במים ומיבשים, את התסנין יחד עם מי הרחיצה ממלאים עד 250 ס"מ^3. מתמיסה זו מודדים 20 ס"מ^3 ומרתיחים אותם עם 50 ס"מ^3 תמיסת Fehling במשך 3 דקות (אך מקרה לא חל חיזור תמיסת Fehling). את שארית הליגנין המיובשת מערבבים עם 20 ס"מ^3 חומצה גפריתנית 72% ומחזיקים את התערובת במשך 24 שעות ב-37°. אחרי זה מוזגים את התערובת לתוך 100 ס"מ^3 מים ומרתיחים את כל הנוזל במשך 1/2 שעה. מסננים מהשארית, ממלאים את התסנין ל-250 ס"מ^3 ובוחנים אותו עם תמיסת Fehling כפי שתואר לעיל. בכל המקרים נתקבלו תוצאות שליליות; כל הליגנינים היו חפשיים מצלולוזה.

(7) <u>הידרוליזה של הליגנינים בחומצה מרוכזת.</u>

מרתיחים 10.0 ג"ר ליגנין עם 400 ס"מ^3 חומצה גפריתנית 25% במשך 24 שעות תחת מקרר זקוף. מסננים מהשארית, אשר רוחצים ומיבשים אותה. ממלאים את התסנין יחד עם מי הרחיצה ל-500 ס"מ^3 ובוחנים אותו בעזרת תמיסת Fehling לפי (6).

(8) <u>חימצון הליגנינים בתמיסה אלקלית בעזרת $KMnO_4$.</u>

ממיסים 5.0 ג"ר ליגנין ו-20 ג"ר NaOH ב-100 ס"מ^3 מים בתוך גולה, שנפחה 3 ליטר ומוסיפים 5.0 ג"ר $KMnO_4$ מוצק. סוגרים את הבקבוק בפקק גומי, שדרכו עובר משפך מטפטף ו-דפלגמטור, הקשור עם מקרר יורד. קצהו התחתון של המקרר היורד נכנס (דרך פקק) לתמיסת HCl 10% בתוך בקבוק יניקה, שפתחה הצדדי קשור במשאבת ואקום. סידור זה מאפשר למנוע את החומצה לחזור דרך המקרר משך הטיפול ע"י יצירת ואקום קל. מזקקים את התמיסה ומוסיפים דרך המשפך המטפטף בסיקום כל 30 ס"מ^3 שעוברים, אותה כמות של תמיסה שמכילה 2% $KMnO_4$ ו-10% NaOH ע"י נטילונות קודמים נקבע, זיקוק של 300 ס"מ^3, מבטיח את ההעברה הכמותית של כל ה-NH_3. קובעים את כמות ה-NH_3 ע"י טיטרצי עודף החומצה.

הערה: יש צורך להשתמש בכלי גדול בגלל כמויות קצף הגדולות, שהתמיסה מעלה בזמן הריאקציה.

(9) <u>מתילציה של הליגנינים.</u>

(א) <u>בעזרת Dimethylsulphate.</u>

המתילציה נעשתה לפי ההוראות של Phillips (J.Bio.Chem. 125, 244) ממיסים 1.5 ג"ר ליגנין ב-50 ס"מ^3 מים בעזרת 4 ס"מ^3 תמיסת NaOH 4%. מטפטפים לתוך התמיסה 8 ס"מ^3 Dimethylsulphate בקצב איטי תוך כדי בחישה חזקה, מחממים את התערובת חצי שעה על אמבט מים רותחים. במשך הטיפול נעשית התמיסה חמוצה והליגנין זוקע. מסננים מהליגנין ומכניעים אותו עוד פעמים למתילציה באותם התנאים. אחרי המתילציה האחרונה רוחצים את הליגנין היטב במים ומיבשים אותו בואקום בטמפרטורת החדר.

(ב) <u>בעזרת Diazomethane.</u>

מכינים תמיסה של 1,8 ג"ר Diazomethane ב-50 ס"מ^3 אתר לפי השיטה של Arndt בעזרת Nitrosomethylurea. מיבשים את התמיסה האתרית ומכניסים 1,5 ג"ר ליגנין. כדי לאפשר את יציאת החנקן ולמנוע חדירת רטיבות, סוגרים את הבקבוק בפקק, שדרכו עובר צינור $CaCl_2$ מטאירים את התערובת למשך 48 שעות, מסננים וחוזרים עוד פעמיים על המתילציה. אחרי המתילציה האחרונה מיבשים את הליגנין בואקום.

הערה: כל קביעות מתכונת המתאוקסיל נעשו לפי השיטה של Zeisel במודיפיקציה של Brecher & Vieboeck (56).

(10) <u>התכת הליגנינים עם KOH.</u>

מערבבים 4.0 ג"ר ליגנין עם 7.0 ג"ר מים ו-30.0 ג"ר KOH מוצק בתוך כור-ניקל ומחממים את התערובת במשך 15 דקות ל-270°, מחזיקים את ההתכה עוד חצי שעה בטמפרטורה זו תוך כדי בחישה טובה. אחרי זה מוזגים את התערובת לתוך 300 ס"מ מים ומחממים ע"י הוספת חומצה גפריתנית 25%. מסננים ממשקע הליגנין הבלתי מפורק ומיבשים את המשקע. מכל ליגנין נעשו 20 התכות; כל המשקעים והתסנינים נאספו ועובדו יחד. ממצים את המשקעים לפי שיטת Soxlet במשך 48 שעות באתר. גם את התסנינים ממצים באתר במשך אותה התקופה באקסטרקטור המתואר בציור 1. מרכזים את כל המיצוים האתריים יחד ל-300 ס"מ. מיבשים את התמיסה האתרית ב-Na_2SO_4 ומאדים אותה עד יובש. שארית זו (1) מכילה, איפוא, את כל תוצרי הפירוק הנמסים באתר. ממצים את השארית בבנזול ומאדים את התמיסה הבנזולית עד יובש. מתקבלים גבישים שזוהו כ- Catechol ע"י הריאקציות הבאות: תמיסת הגבישים המימית החזירה תמיסת חנקת-הכסף וכ"כ נתקבל צבע ירוק ע"י הוספת תמיסת FeCl - ניקיתי את הגבישים ע"י גיבושים אחדים ממים. נתקבלו עלעלים כמעט מחוסרי צבע שנקודת ההיתוך שלהם נקבעה ל-104,5° עד 105°. נקודת ההיתוך המעוררת עם Catechol נקי לא הונמכה. (נקודת ההיתוך של Catechol נקי - 105) לזיהוי נוסף מעבירים את ה-Catechol באמצעות Dimethylsulphate (לפי (9)) ל- Veratrol, מנקים אותו ע"י זיקוק בואקום או ע"י גיבוש מ- Petroleumether.

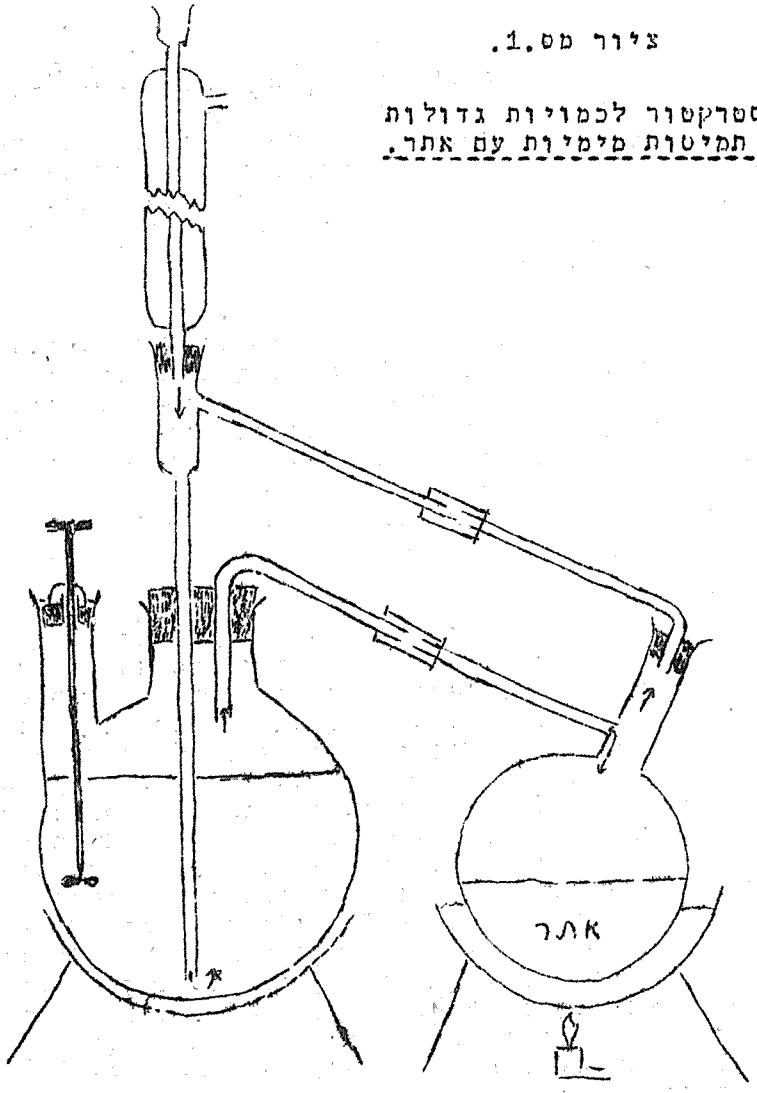
מזהים את ה- Veratrol ע"י קביעת ה- CH_3O שבו. בכל המקרים נתקבלו ערכים שהתאימו יפה לערך המחושב (44.9%).

את שארית המיצוי בבנזול המסתי במים. התמיסה הזאת נותנת צבע שחור עם תמיסת חנקת-הכסף אמוניאקלית, צבע ירוק נתקבל עם תמיסת $FeCl_3$; הצבע הירוק נשתנה לאדום ע"י הוספת תמיסת Na_2CO_3. שתי ריאקציות צבע הנ"ל הן אופייניות ל- Protocatechuic acid. לזיהוי נוסף יבשתי את התמיסה המימית וגיבשתי את השארית כמה פעמים ממים. נתקבלו גבישים מחוסרי צבע, שנקודת היתוכם נקבעה אחרי ההתגבשות השניה ממים. בכל המקרים - הגבישים ניתכו ב-192-200° תוך התפרקות (נקודת ההיתוך של Protocatechuic acid נקיה - 195-199° תוך התפרקות). החומר לא הכיל מתאוקסיל. ערכתי גם מתילציה בעזרת Dimethylsulphate לפי (9). התהווה ה- Methylester שלVeratric acid. מסבנים את האסטר בתמיסת KOH 10%, בכוהל מתילי, ממיצים את התמיסה עם H_2SO_4 ומגרשים את הכוהל. את השארית ממיסים באתר, מסננים את התמיסה האתרית, מיבשים אותה ב- Na_2SO_4 ומאדים את כל האתר. את השארית מזקקים בואקום גבוה (0.05 מ"מ). מתברר, שהחומר מתקבל בצורה נקיה ע"י סובלימציה. קובעים את כמות המתאוקסיל שבחומר ומשוים את הערכים עם הכמות של המתאוקסיל המחושבת ל- Veratric acid (34.10%).

בכל המקרים נתקבלו ערכים מתאימים.

(11) <u>חימצון הליגנינים ב- Nitrobenzene בתמיסת אלקלית.</u>

ממיסים 30.0 ליגנין ב-650 ס"מ^3 מים, שמכילים 60.0 ג"ר NaOH מוסיפים לתמיסה 60 ס"מ^3 Nitrobenzene, מחממים את תערובת בתוך אוטקלב-בחישה ל-175° במשך 3 שעות תוך כדי בחישה בלתי פוסקת. אחר התקררות התמיסה מפרידים מעודף ה-Nitrobenzene, מסננים את התמיסה ומזקקים באידי מים כדי להרחיק את ה- Azobenzol ו- Anilin שהתהוו בזמן הריאקציה. ממיצים את התמיסה ומסננים מהמשקע (1) (של ליגנין בלתי-מפורק). ממצים את התמיסה החמוצה (2) עם אתר במשך 48 שעות (ראה ציור מס.1). מיבשים את המשקע (1) וממצים גם אותו באתר לפי שיטת Soxlet. לטיפול נוסף מצרפים את המיצויים האתריים המתקבלים מ-4 מנות ליגנין מעובדות (=120.0 ג"ר ליגנין).



ציור מס.1.

אקסטרקטור לכמויות גדולות
של תמיסות מימיות עם אתר.

את המצויים האתריים (ממשקע 1 ומתמיסה 2) המצורפים, מרכזים לנפח של 500 ס"מ^3 (3), מנערים את התמיסה הזאת עם תמיסת $NaHSO_3$ 15% - 50 ס"מ^3 שש פעמים כדי להוציא את האלדהידים. מחמיצים את תמיסת ה- $NaHSO_3$ שמכילה עכשיו את האלדהידים, בחומצה גפריתנית 25% ומחממים אותה בואקום, כדי לגרש את כל ה- SO_2. מנערים את התמיסה החמוצה שש פעמים עם אתר ומחלקים את התמיסה (4) לשלוש מנות. מאדים את המנה הראשונה של התמיסה האתרית (4) עד יובש ומזקקים את השארית בואקום גבוה. הזיקוק הזה נעשה כדי לברר אם Syringaaldehyde נמצא בפרקציה האלדהידית. מתברר, שכל הפרקציה עוברת (תוך סובלימציה) ב- 130-150° ב- 0.1 מ"מ. לא עברה שום פרקציה בטמפרטורה יותר גבוהה. הדבר הזה מוכיח את העדרו של Syringaaldehyde שעובר רק בין 250° ו- 270° (0.1 מ"מ).

מאדים מנה שניה של תמיסה (4) עד יובש וממיסים את השארית בכמות קטנה של כוהל. מוסיפים עודף גדול של תמיסת Dinitrophenylhydrazine 2-4 2% בתוך חומצת מלח דו-נורמלית. שוקע משקע אדום. מסננים, רוחצים את המשקע בחומצת מלח 2%, מיבשים אותו ב- 105° ושוקלים אותו. קובעים בו את המתאוקסיל. מאדים עד יובש גם את המנה השלישית של התמיסה (4). ממצים את השארית (5) עם בנזול מקורר ל- 10°. בממיס הזה מתמוסס רק ה- Vanillin, אבל לא ה- p-Oxybenzaldehyde שנשאר (5). מאדים את התמיסה הבנזולית עד יובש ועורכים סובלימציה בואקום גבוה. מקבלים גבישים, שמראים את הריח האפיני של ה- Vanillin נקבעה נקודת ההיתוך ונקודת היתוך מעורבת עם Vanillin נקי 81-82° . גם השארית (5) היתה ניתנת בשלימותה לסובלימציה. נתקבלו גבישים ונקבעה נקודת ההיתוך ונקודת ההיתוך המעורבת עם p-Oxybenzaldehyde נקי 116°. נקודות-ההיתוך התאימו בכל המקרים לאלה של החמרים הנקיים.

הערה: הסובלימציה בואקום - היא האמצעי הטוב ביותר לנקוי שני האלדהידים. אולם, אפשר גם לגבשם בקלות ממים. רצוי לערוך את הסובלימציה בואקום גבוה (0.1 מ"מ). בדרך כלל מקבלים את האלדהידים בצורה נקיה ע"י סובלימציה חד-פעמית.

את התמיסה האתרית (3) , המחוסרת אלדהידים, מעבדים הלאה כדלקמן:

מנערים את התמיסה 3 פעמים במים כדי להרחיק את שארית תמיסת- ה- $NaHSO_3$ מהטיפול הקודם. אחרי זה מנערים את התמיסה שש פעמים ב- 50 ס"מ^3 של תמיסת $NaHCO_3$ 8% כל פעם. החומצות עוברות לתמיסה זאת. מחמיצים את תמיסת ה- $NaHCO_3$ ומשחררים ע"י זה את החומצות. מוציאים את החומצות מהתמיסה החמוצה ע"י אתר, מסננים, מיבשים את התמיסה האתרית ומאדים עד יובש. מזקקים את השארית בואקום גבוה. עברו כמויות קטנות של גבישים לבנים יחד עם גוף שמנוני צהוב, שלא עלה בידי לבודד ממנו גופים מוגדרים. רק בשני מקרים יכולתי לבודד ע"י סובלימציה, כמויות זעירות של גבישים מחוסרי צבע. כמותם הספיקה לקביעת נקודת ההיתוך בלבד. (120-123°) - נקודת היתוך קרובה לזאת של Benzoic acid הכמויות שנתקבלו לא איפשרו זיהוי נוסף.

התמיסה האתרית (3) מכילה עוד פנולים, שמוציאים אותם ממנה לפי השיטה הבאה:

מנעריה את התמיסה האתרית שש פעמים עם 50 ס"מ^3 תמיסת NaOH 10% כל פעם. מחמיצים את תמיסת ה- NaOH ומשחררים ממנה ע"י זה את הפנולים. מנערים את התמיסה החמוצה עם אתר, את התמיסה האתרית מנדפים עד יובש ומזקקים את השארית בלחץ רגיל. החלק הגדול ביותר עבר ב- 180-190° . הוא זוקק עוד פעם; עבר פנול ב- 182°, שזוהה ע"י נקודת ההיתוך: נקודת ההיתוך של צאצאו ה- 3-5 Dinitrobenzoyl (146°).

מלבד כל הליגנינים עובדו גם הסוכרים: גלוקוזה, לקטוזה וסוכרוזה לפי אותה השיטה. תערובות הנטיון הכילו בכל מקרה 35.0 ג"ר סוכר, 60.0 ג"ר NaOH, 650 ס"מ^3 מים ו- 60 ס"מ Nitrobenzene.

שיניתי את תנאי הריאקציה, כדי לבחון את השפעתם על תוצרי החימצון. התנאים היו:

הטמפרטורה	160-170°	תקופת הריאקציה -	3 שעות (שוה לטיפול בליגנינים)
"	"	" -	6, 8, 24 שעות.
"	220°	" -	6 "
"	290°	" -	6 %

בכל המקרים נתקבלו בערך אותן התוצאות, ז.א. תנאי הריאקציה כלל לא השפיעו. בין החמרים שהוצאו ע"י אתר מתמיסת הריאקציה <u>לא נמצאה כל פרקציה אלדהידית</u>. מרקצית הפנולים הכילה כמויות גדולות של פנול, שנקבע כפי שתואר לעיל. נתקבלה גם פרקצית החומצות שהכילה תערובת של כמויות קטנות של גבישים וטמן צהוב-אדום. התוצאות הנ"ל הניעו אותי, כאמור, לא להשתמש בתוצאות המקבילות של חמצון הליגניגים, היות ומקורן של פרקציות החומצות ופרקצית הפנוליה אינו בטוח. יש לציין כאן שבשעת חמצון הסוכרים ב- Nitrobenzene נתקבלו כמויות לא גדולות של Quinoline. בידודו וזיהויו נעשו כדלקמן: מזקקים את התמיסה האלקלית אחר החמצון באידי מים. מהתזקיק

נפרש שמן בלתי נמס במים. מפרידים אותו מהתזקיק המימי במשפך מפריד וממיסים אותו במים ע"י הוספת כמות מספיקה של חומצה. מוסיפים לתמיסת החומצה תמיסת $NaNO_2$ בעודף ומרתיחים את התמיסה. במקרה הליגנינים התהווה רק פנול - סימן, שהשמן היה רק Aniline. במקרה הסוכרים אפשר היה לזקק מהתמיסה (אחר הטיפול ב- $NaNO_2$ והוספת אלקלי) בעזרת אידי מים בסיס נוסף בלתי נמס במים וקל-תמס באתר. מפרידים את הבסיס מהתזקיק המימי במשפך ומזקקים אותו פעמיים. הבסיס, שהיה לו הריח האפיני של Quinoline עבר בזיקוק השני ב- 237-239°. (נקודת רתיחה של Quinoline נקי - 238°). לטם זיהוי נוסף ממיסים את הבסיס בחומצה ומוסיפים תמיסת $K_2Cr_2O_7$ חמוצה. התהווה משקע, שהתגבש טוב וניתך, אחרי גיבוש נוסף ממים, ב- 165° (נקודת היתוך של תרכובת ה- Quinoline - $H_2Cr_2O_7$: 165°). Quinoline נתקבל בשעת חימצון כל הסוכרים.

מהסוכרים נתקבל עוד תוצר חימצון, שלא הומיע בשעת חימצון הליגנינים. מבודדים אותו לפי השיטה הבאה:- אחרי הוצאת תוצרי החימצון ע"י אתר - סותרים את התמיסה המימית הנותרת בדיוק ומנדפים אותה עד שהמלחים שבה מתחילים להתגבש מוסיפים לתמיסה פעמיים בפחות כוהל 85% ומסננים מהמלחים השוקעים. מנדפים עוד פעם ושוב מוסיפים לתמיסה פעמיים בפחות כוהל 85%. חוזרים שלוש פעמים על הטיפול הזה ומנדפים את התמיסה עד יובש. נשאר סירופ, המפריש גבישים, כשמחזיקים אותו כחדשיים מעל חומצה גפריתנית ב- Desiccator. החומר הזה אינו ניתן לזיקוק בואקום גבוה. הוא נמס טוב במים, אבל הוא בלתי נמס בכוהל 100%, באתר ובאציטון. הוא אינו מכיל קבוצות - COOH ואינו מחזיר תמיסת Fehling אני מניח, שהחומר הוא פחמימה (Carbohydrate).

(12) <u>טיפול בליגנינים בכוהל חמוץ תחת לחץ.</u>

ממיסים 10.0 ג"ר ליגנין ב- 40 ס"מ^3 תמיסת NaOH 10%. מערבבים את התמיסה הזאת עם 350 ס"מ כוהל 85%, המכיל 10 ס"מ^3 חומצה גפריתנית מרוכזת. (המסת הליגנין והשקעתו - מטרתן היא להשקיע את הליגנין בצורת פתיתים דקים המהווים מרחף ומגיבים טוב יותר. אם מערבבים את הליגנין היבש עם כוהל חמוץ - שוקע חלקו הגדול ביותר מיד ואינו נתקף כלל) - מכניסים את כל התערובת (בכלי זכוכית) לתוך אוטוקלב ומחממים אותה ל- 180-190° במשך 6-7 שעות. ע"י הטיפול הזה מתקבלת תמיסה, המכילה חלק מתוצרי הפירוק. חלק גדול של הליגנין אינו נמס (1), מסננים (2), מיבשים את שארית הליגנין וממצים אותה היטב באתר (3), כי רוב תוצרי הפירוק תמיס נספח על המשקע. אוספים את השאריות (1) הממוצות של כמה טיפולים ומעבדים אותו בכוהל חמוץ, עד שאחר שלוש חזרות נשארות רק כמויות זעירות של ליגנין בלתי מפורק. מאחדים את כל התסנינים (2) מוסיפים רבע כמותם מים ומגרשים את הכוהל בואקום תוך כדי חימום קל. ממצים את התמיסה המימית הנשארת היטב באתר במשך 48 שעות (ראה ציור מס.1), מערבבים את המיצוי האתרי עם המיצוי (3) של השאריות ומנדפים אותם לנפח של 400 ס"מ^3. מנערים את התמיסה הזאת עם תמיסת $NaHSO_3$, $NaHCO_3$ ו- NaOH, כפי שתואר בסעיף (11): נתקבלו ע"י טיפול זה פרקציות האלדהידים, הפנולים והחומצות.

אפשר היה לזקק את הפרקציה האלדהידית בואקום גבוה בטלימותה. ל א חלה כל סובלימציה, פרט לעיקבות של Vanillin. (גם זה רק ב-2 מקרים). דבר זה מוכיח, שהפרקציה הזאת לא הכילה p-Oxybenzaldehyde Veratrumaldehyde או Syringaaldehyde, כי כל החמרים האלה ניתנים לסובלימציה. כל הפרקציה האלדהידית עברה בואקום גבוה (0.05 מ"מ) בין 190° ו- 230° (טמפרטורה של בלוק החימום). יש, איפוא, להניח, שנתקבלו כאן חמרים ארומטיים בעלי שרשרת צדדית עם 3 אטומי-פחמן מסוג אלה שנתקבלו ע"י Freudenberg & Hibbert. היות, והחוקרים הנ"ל קבלו את ה- Vanilloylmethyldiketon (1, 2) ברוב המקרים - החלטתי גם אני לבחון על נוכחותו של החומר הזה. הכינותי את ה- Oxime בעזרת Hydroxylamine והשקעתי את מלח ה- Ni שלו לפי השיטה הבאה:-

מחממים 0.2 - 0.5 ג"ר של תזקיק פרקצית האלדהידים בואקום גבוה עם 2.0 ג"ר Sodium acetate, 0.5 ג"ר Hydroxylamine-chlorhydrate ו- 5 ס"מ של תמיסת $NiCl_2$ 5% במשך 24 שעות תחת מקרר זקוף. מסננים מהמשקע החום, רוחצים ומיבשים אותו. מפרקים את המשקע בעזרת חומצה גפריתנית וקובעים בו את כמות ה- Ni. (בצורת Ni-Diacetyldioxime).

בכל המקרים קבלתי ערכים שהתאימו יפה לכמות ה-Ni, שמחושבת בשביל Ni-Vanilloylmethyldiketondioxime (11,63%).

הפרקציה הנאוטרלית עברה גם היא בטלימותה בואקום גבוה בטמפרטורה של 230-250°. אמנם נתקבלה תערובת של גופים מוצקים-גבישיים ושמן, שלא עלה בידי להפרידם. לכן, נערך חימצון בעזרת $KMnO_4$, כדי להגיע ע"י חימצון השרשרת הצדדית לקבוצת COOH לגופים פשוטים יותר. חימצנתי את הפרקציה הזאת לפי השיטה הבאה:-

ממיסים את הפרקציה הנאוטרלית בכמות קטנה של כוהל, מוהלים את התמיסה הכוהלית עם מים ל- 50 ס"מ^3, מחממים אותה על אמבט-מים רותחים ומוסיפים לה תמיסת $KMnO_4$ בעודף. ממשיכים לחמם את כל התערובת במשך שעה אחת, מסננים המשקע של ה- MnO_2 וממצים את התמיסה המימית באתר. אחר אידוי האתר זיקקתי בואקום גבוה את כל החמרים, שנתקבלו, ע"י חימצון הפרקציה הנאוטרלית. חלה

סובלימציה של שני גופים. אחד עבר בטמפרטורה של 70° בערך(1) והשני בטמפ-רטורה של 140° (2). שני הגופים היו מגובשים יפה. נבדקה כמות המתאוקסיל בפרקציה (1) העוברת ב-70° ונמצאו ערכים מ-0.7 עד 2.6%. מהתוצאות האלו אפשר להוציא את המסקנה, שהגוף הנ"ל אינו מכיל מתאוקסיל כלל, כי כל הגופים הארומטיים, שבאים כאן בחשבון, מכילים כמויות הרבה יותר גדולות של CH_3O ; כמות המתאוקסיל הקטנה שמצאתי בפרקציה הזאת היא כנראה תוצאה של זיהום בכמות קטנה של גוף אחר שמכיל CH_3O. בטיטרציות שערכתי עם החומצה הנ"ל קבלתי ערכים שלא היו רחוקים, באופן יחסי, מאלה המחושבים ל-p-Oxybenzoic acid. החלטתי, איפוא, בהנחה שהפרקציה הנמוכה (1) היא p-Oxybenzoic acid לנקות את החומר, בהשתמש במסיסותה הקטנה של החומצה הנ"ל בבנזול קר. (0.05 ג"ר p-Oxybenzoic acid נמסים ב-100 ס"מ^3 בנזול ב-25°).

נקוי הפרקציה (1) נערך כדלקמן:-

את הגבישים רוחצים כמה פעמים בבנזול קר (10°), מסננים ומזקקים את השארית בואקום גבוה, תוך סובלימציה עוברים גבישים יפים מחוסרי צבע, שאינם מכילים מתאוקסיל ושניתכים בכל המקרים ב-$212-215^{o}$. (נקודת ההיתוך של ה-p-Oxybenzoic acid הנקיה היא 215°). גם נקודת ההיתוך המעורבת לא הונמכה. הנחתי מתוך אנלוגיה לחימצון ע"י Nitrobenzene (p-Oxybenzaldehyde נתקבל ע"י חימצון ב-Nitrobenzene לעומת p-Oxybenzoic acid ע"י טיפול בכוהל חמוץ), שהחומצה המהווה את החלק העובר ב-140° היא Vanillic acid. (מקביל ל-Vanillin המתקבל ע"י חימצון ב-Nitrobenzene).

בהתאם לתכונות ה-Vanillic acid נערך עיבוד הפרקציה הזאת (הפרקציה הגבוהה (2) אחרי זיקוק). בדרך כלל אפשר לקבל את החומצה בצורה די נקיה ע"י סובלימציה איטית בואקום גבוה. דרך שניה - היא גיבוש החומצה ממים, לפי שתי שיטות הניקוי הנ"ל נתקבלו גבישים, שהראו נקודת היתוך של $203-205^{o}$. נקודת היתוך זו מתאימה טוב לנקודת ההיתוך של Vanillic acid נקיה (207°). בערכה בכל המקרים קביעת כמות המתאוקסיל ונתקבלו ערכים של 17.6% - 18.5, שגם הם מתאימים למתכונת המתאוקסיל המחושבת ל-Vanillic acid נקיה של 18.5% תוצאות קביעות המתאוקסיל הן נמוכות במקצת, אבל אין להניח, שנוכח כאן גוף אחר מאשר Vanillic acid , כי כל החומצות האחרות, המכילות CH_3O, הן בעלות מתכונת מתאוקסיל גבוהה בהרבה (למשל Veratric acid מכילה 34% מתאוקסיל). יש להניח שה-Vanillic acid מכילה עיקבות של p-Oxybenzoic acid.

- - - - - - - - - -

את פרקצית התנולים זיקקתי במקוטעין בלחץ רגיל. רוב החומר התרכז בפרקציות $180-190^{o}$ (1) ו-$200-210^{o}$ (2). זיקקתי את שתי הפרקציות עוד הפעם ומצאתי שרוב הפרקציה (1) עבר ב-182° ורוב הפרקציה (2) - ב-$205-207^{o}$. פרקציה (1) מכילה, איתוא, פנול, שזוהה ע"י התהוות צבע סגול עם תמיסת $FeCl_3$ וע"י ריחו האפיני וביחוד ע"י התהוות צאצאו ה-3,5 - Dinitrobenzoyl (נקודת ההיתוך - 146°). קבלתי בכל המקרים נקודות היתוך מ-145° עד 147°.

הפרקציה (2) נתנה צבע ירוק ע"י תוספת $FeCl_3$. הוכן גם מפנול זה צאצא ה- 3-5 - Dinitrobenzyl. לפי נקודת ההיתוך של צאצא זה הפנול הנידון הוא Guajacol (נקודת ההיתוך של 3-5 Dinitrobenzoylguajacol נקי 141°). קבלתי נקודות היתוך מ-140 עד 142. ההכנה של צאצאי 3-5 Dinitrobenzoyl נעשתה לפי (Phillips & Keenan - J.Am.Ch.Soc.53 (1931) , 1925)

- - - - - - - - - -

(13) <u>חיזור הליגנינים בעזרת אבץ האבץ בתמיסה אלקלית מימית.</u>

מערב:ים 30.0 ג"ר ליגנין עם 100.0 ג"ר אבץ האבץ, 200 ג"ר NaOH ו-750 ס"מ^3 מים בתוך גולה תלת-צוארית, הקשורה עם משפך טטפטף, מקרר יורד ועם בוחש מכני. מרתיחים את התערובת באמבט-שמן תוך כדי בחישה חזקה. מקבלים את התזקיק בתוך חומצה גפריתנית, לפי השיטה המתוארת בטעיף מס.8. חימצון הליגנינים ב- $KMnO_4$. במקום הנוזל המזקק מוסיפים, אחרי עברם של כל 50 ס"מ^3, את אותה כמות מים, המכילים 10% כוהל. הוספת כוהל נעשית כדי להפחית עד כמה שאפשר את העלאת היקף הבלתי רצויה. ע"י נסיונות קודמים נקבע, שהפרשת כל החנקן שבליגנין נמשכת 30 עד 90 שעות. לכן נערכו כל הנסיונות הכמותיים במשך 100 שעות, כדי להבטיח את העברתו השלימה של החנקן.

- - - - - - - - - -

(14) <u>חיזור הליגנינים בעזרת נתרן מתכתי בכוהל.</u>

החיזור נערך במתכן שסודר לפי הציור הבא:

(2) בבקבוק נפח 1 ליטר הוסף 0.5 גרם NaOH (2%) ו-0.5 גרם חומצה פיקרית (2%) ו-1 גרם אבקת אבן (1%). הוסף מים עד לסימן ה-1 ליטר. הוסף 25% מים. הוסף 0.5 גרם אבקת אבן (1%) ו-1 גרם חומצה פיקרית (2

חיזור ע"י סודיום וכוהל או ע"י אבקת-אבץ ואלקלי או חימצון ב-$KMnO_4$ בתמיסה אלקלית - אפשרו את שחרור החנקן מן הליגנינים בתור NH_3, בו בשעה שהריאקציות הנ"ל גרמו לפירוק הליגנינים. על סמך התוצאות הנ"ל נוכחות החנקן בליגנינים אינה נגרמת בגלל הזדהמות הליגנינים ע"י חלבון, החנקן הריהוא כמרכיב אפיני של הליגנין כנראה בצורת = N - (במערכת פיריידינת).

(3) הליגנינים שהוכנו מצמחים ומצואת כבשים א י נ ם מכילים פחמימיות.

(4) לפי מתכונת ה- OCH_3 יש לחלק את הליגנינים שנבדקו לשתי קבוצות:
ליגנינים שהוכנו מקטניות מכילים 4.3% - 5.7% OCH_3 וליגנינים הדגנים עם 9.6% - 9.8% OCH_3. כמות ה-OCH_3 שבליגנין הצואה שוה בערך לזו שבליגנינים שהוכנו מהצמחים שנאכלו.
ליגנינים הדגנים מקבלים ע"י מתילציה ב-$(CH_3)_2SO_4$ עוד כ-150% של כמות ה- OCH_3 שבליגנין המקורי וליגנינים הקטניות אפילו כ-200% מכמות זו שבליגנין המוצא, כי ליגנינים הקטניות מכילים כמות גדולה של קבוצות OH חפשיות מאשר ליגנינים הדגנים.
קבוצות -OH שבליגנין צמחי הגן בחלקן אליפטיות, כי ליגנין צמחי מקבל בשעת טפולו ב- Dimethylsulphate כמות גדולה יותר של OCH_3 - מאשר ע"י הטפול ב-Diazomethane. בניגוד לזה קבוצות -OH אליפטיות נעדרות בליגנין שהוכן מצואה, כי לליגנינים הצואה נכנסות ע"י שתי שיטות המתילציה כמויות - OCH_3 שוות למעשה.
בידוד של 4,2-Dinitrophenylhydrazone מראה על נוכחות של קבוצת - CO - בליגנין.

(5) <u>ריאקציות פירוק של הליגנינים.</u>

(א) ע"י החימצון של ליגנין צמחי ב-Nitrobenzene בתמיסה אלקלית בלחץ גבוה מתקבלים אלדהידים; כמות האלדהידים הנוצרים ע"י חימצון של ליגנין הדגנים (16,1%-21,6% מכמות הליגנין) עולה על כמות האלדהידים המתהווה בשעת החימצון של ליגנין הקטניות (4,2%-8,3%). בכל המקרים פרקצית האלדהידים היא מורכבת מ-Vanillin ומ- p-Oxy-benzaldehyde ביחס 2:1. ע"י פעולת Nitrobenzene על ליגנין הצואה אלדהידים אינם מתקבלים כלל.

(ב) בהתכה עם KOH של ליגנין צמחי או בזו של ליגנין שהוכן מצואה מתקבלו כמויות זעירות של Catechol ושל Protocatechuic acid מליגנין צמחי וכ"כ מליגנין שהוכן מצואה.

(ג) ע"י הידרוליזה של ליגנין צמחי בכוהל חמוץ תחת לחץ גבוה מתהווים החומרים הבאים: Phenol, Vanilloyl-methyldiketon, p-Hydroxybenzoic -acid, Guajacol & Vanillic acid.
ע"י טיפול זה בליגנין שהוכן מצואה מתקבלים אותם תוצרי פירוק חוץ מ- Vanilloyl-methyl-diketon.
אלדהידים וקטונים חסרים כלל בין תוצרי טיפול זה בליגנין הצואה.
למציאות ה- Vanilloyl-methyl-diketone בין תוצרי פירוק ליגנין צמח יש ליחס חשיבות מיוחדת, כי זהו החומר היחיד המכיל שרשרת צדדית עם 3 אטומי-פחמן הבודד אחרי הפירוק של ליגנין צמחי.

(ד) חיזור של ליגנין צמחי בסודיום וכוהל מביא כ"כ ליצירת אלדהידים, פנולים וחומצות; בין תוצרי החיזור הזה המתקבלים מליגנין הצואה חסרים אלדהידים.

(6) נעשו קביעות המשקל המולקולרי של ליגנינים שהוכנו מצמחים ומצואה למי השיטה הקריאוסקופית ובשימוש ב- B-Naphtol בתור ממיס; בכל המקרים נתקבלו ערכים קרובים ל-600.

- - - - - - - - -

<u>(ב) מסקנות עיוניות.</u>

(1) הוצעה ההיפותזה הבאה לביאור-גניזה של הליגנין בצמחים ירוקים לפי שלושה שלבים כדלקמן:-

(א) פולימריזציה ליניארית של פחמימיות פשוטות והתהוות קשרים- C - C - ולא - C - O - C - או- COO.

(ב) סגירה לטבעות וארומטיזציה של הטבעות ע"י הפרשת מים.

(ג) מתילציה חלה יחד עם הארומטיזציה או אחריה.

קצב שונה של המתילציה מביא לידי יצירת הליגנינים השונים, הנבדלים בדרגת המתילציה כמו ליגנינים שבעצים רכים, עצים קשים, צמחים ירוקים וכו'.

(2) ההבדלים בין המבנה לליגנין בצמחים ירוקים לזה שבעצים.
שני סוגי הליגנין נבדלים במתכונת שונה של חנקן ו- OCH_3 ליגנינים העצים למעשה חפשיים מחנקן ומכילים כמות גדולה יותר של OCH_3 מאשר ליגנין

בצמחים ירוקים. אינו קיים הבדל יסודי בסטרוקטורה היסודית של יגנין בצמחים ובעצים.

3) על סמך תוצאות נסיונותי ובהתחשב בתוצאות של מחברים קודמים אני ציע את הנוסחה הבאה ליחידת-מבנה שבליגנין: $C_{38}H_{38}O_7N$
ראה את נוסחת המבנה בדף 62 ובתוספת מס.2).
יחידה הזאת מכילה שלש טבעות ארומטיות, ששתים מהן בקבוצת OCH_3 אחת, קבוצת אחת ובשרשרת צדדית שבה נמצאים 3 אטומי-פחמן וקשר כפול אחד; תי הטבעות הנ'ל מוחלפות בעמדות 1, 3, 4. הטבעת הארומטית השלישית וחלפת רק בעמדות 1, 4 ועי' קבוצת OH ועי' שרשרת צדדית. על האנלוגיה - Lignanes מבוססת ההנחה ששאר אטומי-הפחמן שביחידת הליגנין מסודרות מערכת - Naphtalin מחוזרת.

שרשרות הצדדיות של שתי יחידות ליגנין כאלו נסגרות בהשתתפות של אטום נקן אחד לטבעת Pyridine . בליגנין הקטניות יחידות מבנה הנ'ל הן חלקן מכילות טבעות ארומטיות A ו- E שאינן מוחלפות בקבוצות OCH_3

4) בשעת מעבר צמחי המטפוא דרך גוף מעלי-גרה לא חלים שינויים עק- ונייים בשלד הליגניניים שבהם. גודל מולקולת יחידת המבנה של הליגניניים שתמר וכ'כ לא משתנית מתכונת החנקן והמתאוקסיל. אולם מעבר הליגנין רך גוף החי משפיע עליו, ואלה הם השינויים במולקולת יחידת המבנה:

ל השרשרות הצדדיות וכ'כ מערכות Pyridine מפסידות את קשריהן הכפולים ', Hydrogenation(דבר זה גורם להעדרה של הפרקציה האלדהידית מבין וצרי הפירוק של ליגניני-הצואה). ע'י הפסד של H_2O מתהוות מערכת Pyran איננה קיימת בליגנין המקורי בצמח. ע'י זה נעדרות קבוצות OH הלא- נוליות בליגנין הצואה. מקום עיקול הליגנין הוא המעי.

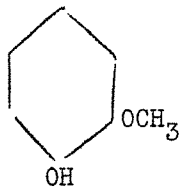
מקורות

1. Freudenberg, K. Ann.Rev.Biochem. 1939, 8, 88 ff.
2. Hibbert, H. Ann.Rev. Biochem. 1942, 11, 183 ff.
3. Percival, E.G.V., Annual Reports, Chem.Soc.Lond.Vol39, 142 ff.
4. Phillips, M., in: Wise, Wood Chemistry,p.272 ff. (Reinhold Publishing Corp., New-York, 1944).
5. Kalb, L. in: Klein Handbuch der Pflanzenanalyse, Vol.III/1, p.156 ff. (Springer, Vienna, 1931).
6. Bugge, Industrie der Holdzdestillationsprodukte (Theodor Steinke Dresden,1927) cited by Hawley, L.F. in "Wood Chemistry", p.679 ff. (See Reference No.4).
7. Beckmann, Biochem. Z.121, 297.
8. Beckmann, Liesche and Lehmann, Z.angew.Ch.34, 285 (1921).
9. Bondi, A. and Meyer, H.,J.Agr.Sci. Vol.33 part III, p.123-128.
10. Bondi, A. and Meyer, H., Bull.Agr.Res.Sta., Rehovot, Palestine No.27,1942 (in English).
11. Brauns, F.E., J.Am.Ch.Soc. 61, 2120 (1939).
12. Brauns, F.E., J.Org.Chem. 10, 216, (1945).
13. Brigel, P. and Pfaehler, A. Tierernaehrung 1, 30 (1929).
14. Bruni, Gazz.Chim. 286, 322 (1898).
15. Buckland, J.H. Tomlinson, G.H. and Hibbert, H.J. Am.Ch.Soc. 59, 597 (1932).
16. Charnbury, H.B. Eckert, J.W. La Torre, J.S., Kinney, C.R. J.Am.Ch.Soc. 67, 625 (1945).
17. Konner. W.P. J.Chem.Physics, 9, 591 (1941).
18. Crampton, E.W. Sci.Agric. 19, 345 (1939).
19. Erdtman, Bioch.Z.238, 172 (1936).
20. Ferguson, W.S. Biochem. J.36.
21. Freudenberg, et al.Ber. 62, 1844 (1929).
22. Freudenberg, et al.Ber.61, 1760 (1928).
23. Freudenberg,K. Lautsch,W. and Engler, K. Ber.73, 167 (1940)
24. Freudenberg,K. Engler,K., Flickinger, E. Sobeck, E. Kling, F. Ber. 71, 1810 (1938).
25. Fuchs, J.Am.Soc. 58, 2659 (1936).
26. Grafe, Monatshefte, 25, 987 (1904).
27. Gruess, Ber.Deut.Bot.Ges.38, 361 (1921).
28. Hibbert, H. Can.Journ.Res.16B, 69 (1938).
29. Hibbert, H. Journ.Am.Ch.Soc. 61, 868 (1939).
30. Hibbert, H. Address to Cellulose Division A.Ch.Soc.(Cincinnati,1
31. Hilpert,R.S. Zellulose Chemie, 17, 25 (1936).

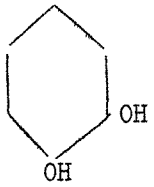
32. Hoenig, M. and Ruziczka, W. Z. angew. Chem. 44, 245 (1931).
33. Hottenroth, J. D.R.P. 306818 (1917)
34. Kalb, and Schoeller, Zellulosechemie, 4, 38 (1923).
35. Klason, P. Svensk. Kim. Tidskr. 9, 135 (1897).
36. Klason, P. Arkiv. kemi. Mineral. Geol. 6, No.15, 21 (1917).
37. Koenig and Rump, Ztschr. Unterst. Nahr. Genussm. 28, 177 (1914).
38. Mac Annally, R.A., Bioch. J. Vol. 36, 392 (1942)
39. Paloheimo, Biochem. Z. 165, 463 (1925).
40. Phillips, M.J. Am. Chem. Soc. 50, 1986 (1928).
41. Phillips, M.J. Biol. Ch. 85, 65 (1929)
42. Phillips, M.J. Am.Ch. Soc. 53, 768 (1931).
43. Phillips, M. Science, 73, 568 (1931).
44. Phillips, M.J. Am. Ch. Soc. 54, 1518 (1932).
45. Phillips, M. and G[illegible], [illegible] J. Indn. Eng. Chem, 24, 1936 (1932)
46. Phillips, M. at al. J. Agr. Res. 51, 301 (1925).
47. Phillips, M.J. Biol. Ch. 85, 65 (1929).
48. Powell and Whittaker, J. Chem. Soc. London 127, 132 (1925).
49. Rassow, B. and Zschenderlein, A.Z. ang. Ch. 34, 204 (1921).
50. Rogozinski, F. and Starzewska, M. Bull.Ind.Acad.Polen.B, 1243-52 (1927).
51. Rogozinski, F. and Starzewska, M. Act. Biol. Exp. Warsaw, 1, No.3, p. 1-9 (Chemical Abstracts, 23,3012)
52. Shaw, B.D. J. Chem. Soc. London, 125, 1930-34 (1924)
53. Shaw, B.D. J. Chem. Soc. London, 127, 215-16 (1925).
54. Shaw, B.D. J. Chem. Soc. London, 1937, 300-302.
55. Thomann, W. Dissertation E.T.H. Zuerich, No.273.
56. Vieboeck, and Brecher, Ber. 63, 3267 (1930)
57. Waksman, S. and Stevens, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 2, 167 (1930)
58. Waksman S. "Humus" (1936, Bailliere, London).
59. Wichert, Zellulosechemie, 18, 57 (1940).
60. Willstaetter, R. and Zechmeister, A55, B46, 2403 (1913)
61. Willstaetter, R. and Kalb, L. Ber. 55, 2637 (1922).
62. Wislicenus, H. Kolloid, Z. 24, 209 (1920)
63. Wright, G.F. and Hibbert, H. J. Am. Chem. Soc. 59, 125 (1937).
64. Von Wacek, A. Ber. 63, 282-96 (1930).
65. Von Wacek, A. and Kratzl, K. Ber. 77, 516-19 (1944) Che.Abstr.40, 5034.
66. Ehrlich, F. in: Abderhalden, Handb. Biol.Arbeitsmeth. Abt. I, Teil 11, II, p.1509.
67. Tiemann and Haarmann, Ber. 7, 608, (1874).
68. Schwenk and Papa, J. org. Chem. (1945.) 10, 232.
69. [illegible]on, Dissert, Eidg. Techn. Hochsch. Zurich.
70. Karrer, P. Organic Chemistry p. 519 (Elsevier, New York 1938).
71. Tscherniak, Biedermann's Zentralbl. 8, 408 (1936).

תוספת מס' 1.

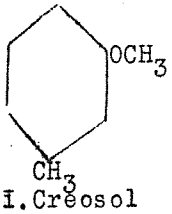
SUPPLEMENTARY TABLE No. 1.



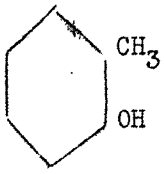
I. Guaicol



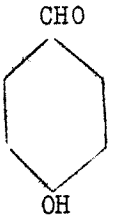
II. Catechol



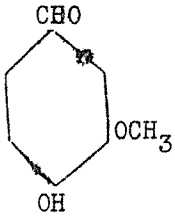
III. Creosol



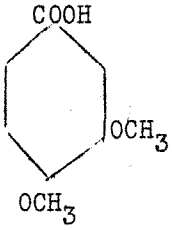
IV. o-Cresol



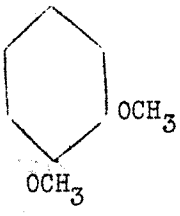
V. p-Hydroxybenzaldehyde.



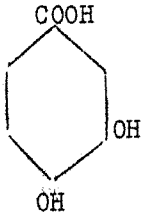
VI. Vanillin



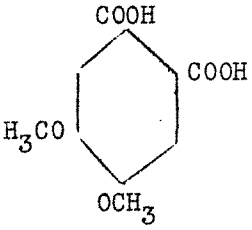
VII. Veratric acid



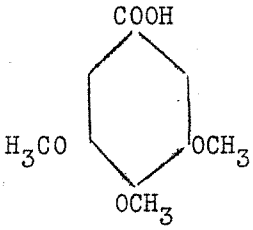
VIIa. Veratrol



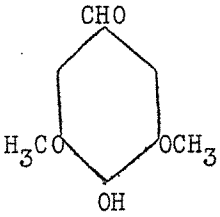
VIII. Protocatechuic acid



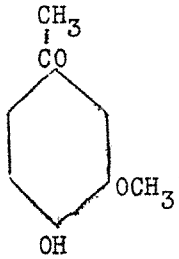
IX. Isohemipinic acid



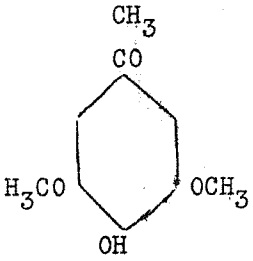
X. Trimethyl gallic acid



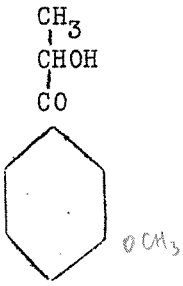
XI. Syringaaldehyde



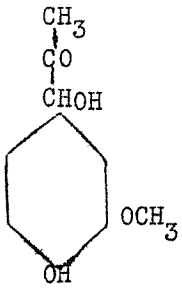
XII. Acetovanillone



XIII. Acetosyringone



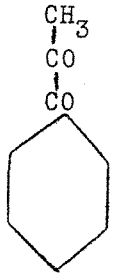
XIV. β-hydroxy-α(4-hydroxy-3-methoxy phenyl)-α-propanone



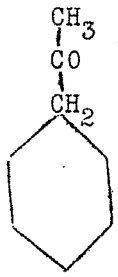
XV. α-hydroxy-α(4-hydroxy-3-methixy phenyl)-β propanone.

תוספת מס' 1. (המשך)

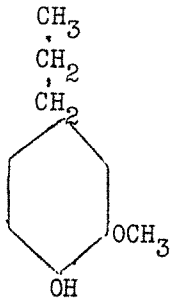
SUPPLEMENTARY TABLE No.I. (Continued)



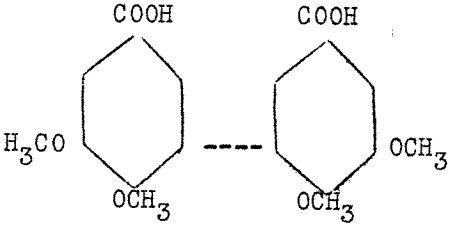
XVI. α (-4-hydroxy-3-methoxyphenyl-)-α - β -propanedione



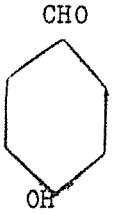
XVII. α (4-hydroxy-3-methoxyphenyl) β -propanone



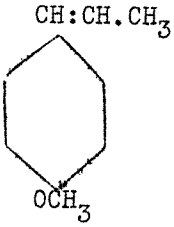
XVIII. 1(n-propyl)-3-methoxy-4-hydroxybenzene



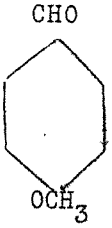
XIX. Dehydrodiveratric acid



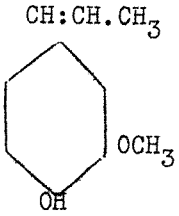
XX. p-Hydroxybenzaldehyd



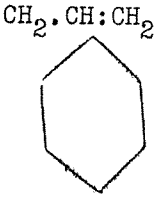
XXI. Anethole



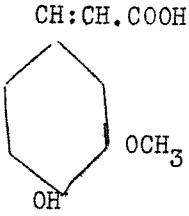
XXII. Anisaldehyde



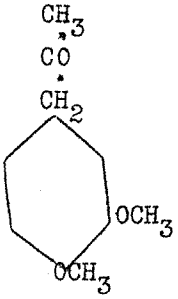
XXIII. Isceugenol



XXIIIa. Eugenol



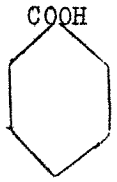
XXIV. 3-methoxy-4-hydroxy-cinnamic acid



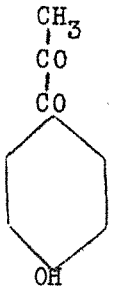
XXV. (3,4-Dimethoxy)benzyl-methyl keton.

תוספת מס' 1. (המשך).

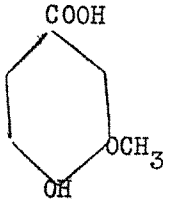
SUPPLEMENTARY TABLE No.1. (Continued)



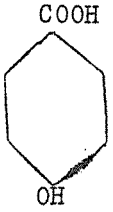
XXVI.
Benzeic acid



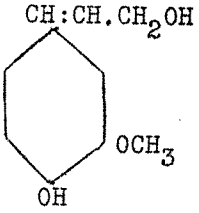
XXII. Vanilloyl-methyl diketone (1,2)



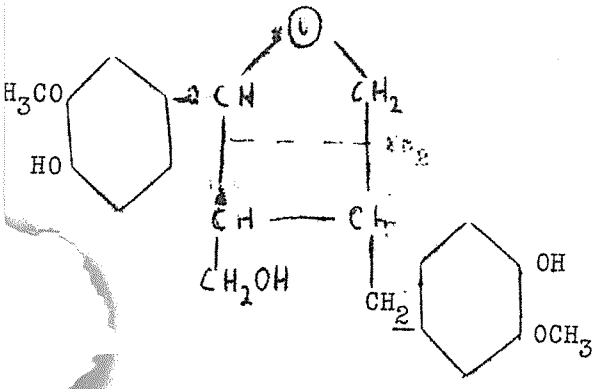
XXVIII.
Vanillic acid



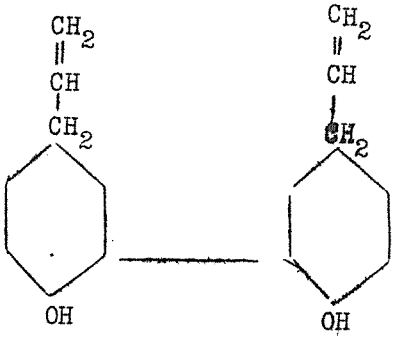
XXIX. p-hydroxybenzeic acid



XXX. Coniferylalcohol



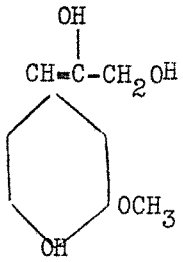
XXXI. Lariciresinol



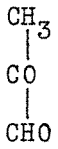
XXXII. Magnalol

תוספת מס' 1. (המשך).

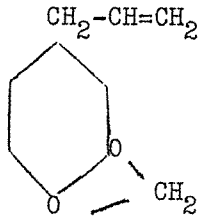
SUPPLEMENTARY TABLE No.1. (Centinued)



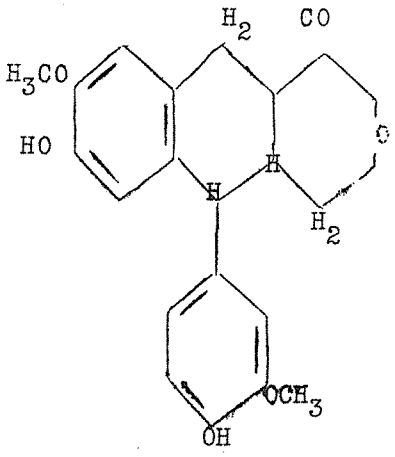
XXXIII. Hydroxyconiferyl-alcohol



XXXIV. Methylglyoxal



XXXV. Safrole



XXXVI. COnidendrin

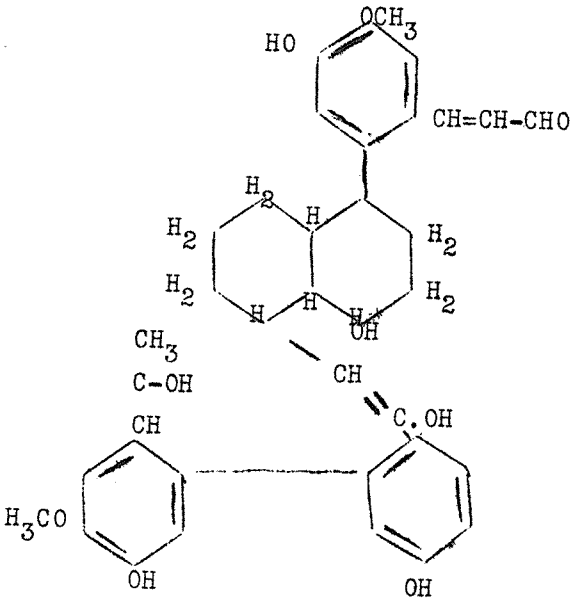
SUPPLEMENTARY TABLE No. 2.

הנוסחאות המוצעות ליחידת המבנה של מולקולת הליגנין

The formula proposed for the structural unit of the lignin-molecule.

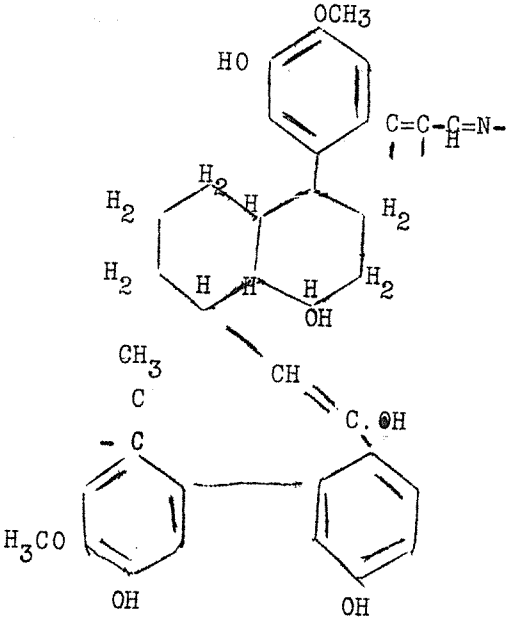
א) יחידת הבנין המונומרית (נוסחא משוערת, יחידה כזאת אינה קיימת במציאות)

The monomeric structural unit (does not occur actually)



ב) היחידה כמו שהיא קיימת במולקולה (מכילה חנקן)

The same unit (containing nitrogen) as forming part of a larger molecule

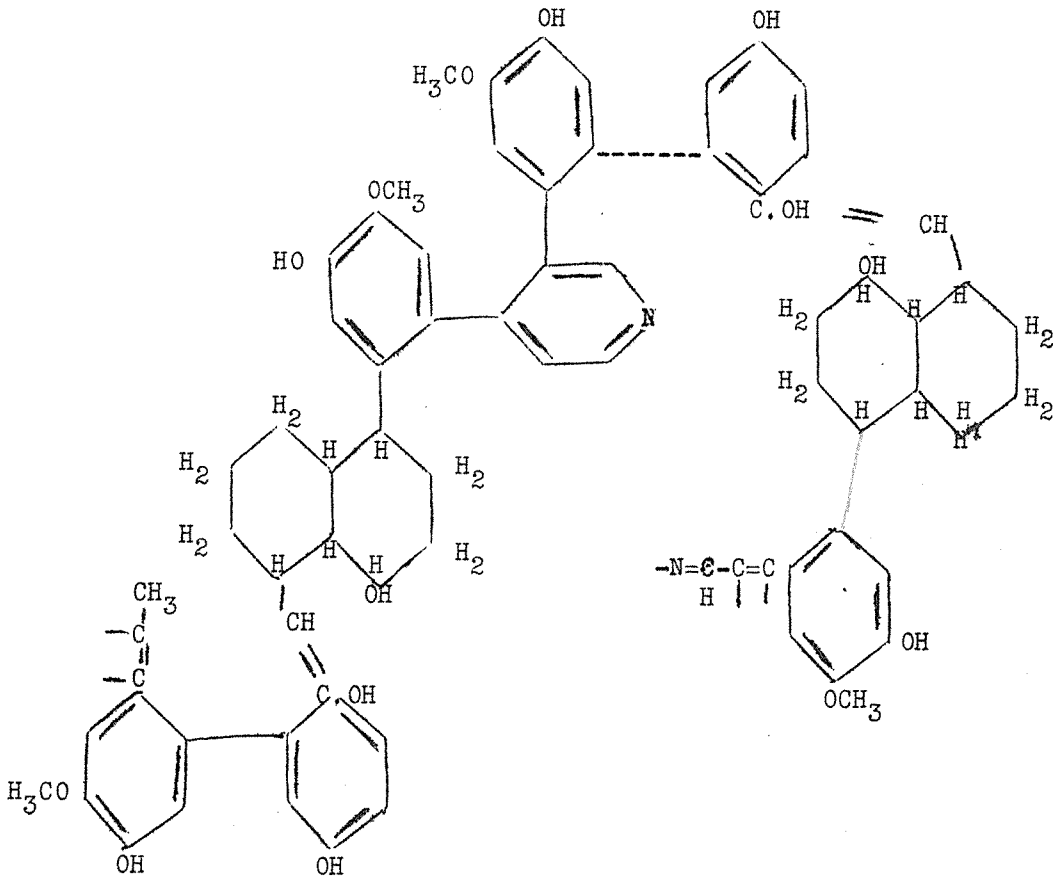


תוספת מס׳ 2. (המשך)

SUPPLEMENTARY TABLE No.2. (Continued)

ג) נוסחא המראה קשר בין 2 יחידות בנין ע״י התהוות טבעת פיריידין.

This formula shows the union of 2 structural units by a pyriding ring.

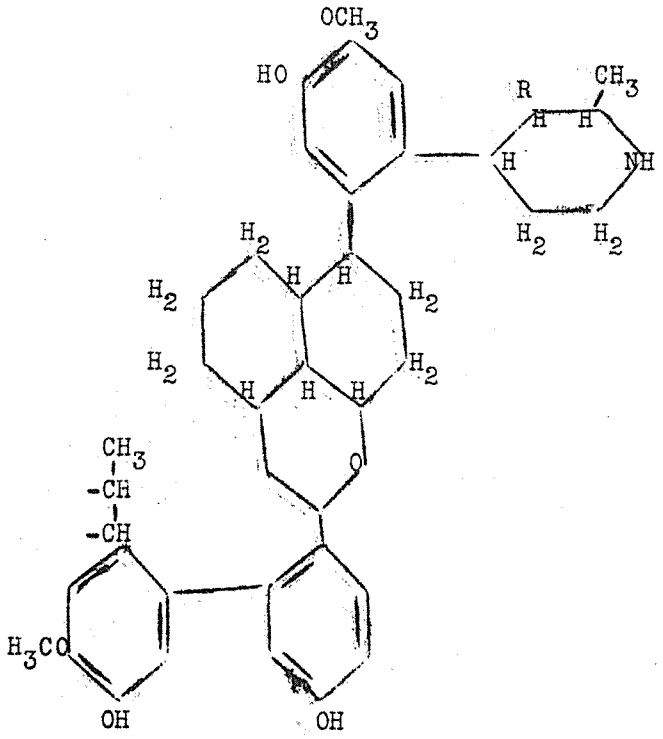


תוספת מס' 2. (המשך)

Supplementary Table No. 2. (Continued)

ד) הנוסחא הזאת מתארת את השנויים החלים במולקולת הליגנין בשעת עיכולה ע"י מעלי-גירה.

A structural unit changed by digestion by ruminants.



R = יחידת מבנה טגיה.

INVESTIGATIONS ON THE CONSTITUTION OF THE GREEN PLANT LIGNINS AND THE CHANGES UNDER-GONE BY THEM IN THE RUMINANT BODY.

THESIS FOR THE Ph. D. DEGREE

by

HANS (CHANAN) MEYER

SUBMITTED TO THE SENATE OF THE HEBREW UNIVERSITY
JERUSALEM, NOVEMBER 1947

This research was carried out under the guidance of Professor A. FODOR of the Hebrew University at the Agricultural Research Station at Rehovot.

CONTENTS

Page

PREFACE..... 1

PART I.
1. Extraction methods for lignins.....3
2. Properties of the lignins..... 7

PART II.
The nitrogen content in lignin..... 7

PART III.
Lignin and the polymer carbohydrates..... 12

PART IV.
The functional groups in lignin:
1. Hydroxyl and methoxyl groups..... 12
2. Aldehyde and keto groups..... 14

PART V.
The degradation of the lignins.....15
1. Oxydation with nitrobenzene..... 16
2. Fusion with potassium hydroxide..... 18
3. Ethanolysis..... 18
4. REduction methods..... 20

PART VI.
The molecular weight of the lignins.....21

PART VII.
Discussion of the results of the experiments:
1. Lignin formation in plant tissues..... 22
2. The difference between wood and young plant lignins.... 26
3. The structure of plant and feces lignins..... 27
4. Lignin digestion in the ruminant body..... 33

EXPERIMENTAL PART..... 34

SUMMARY (in Hebrew)..... 42

REFFERENCES 45

SUPPLEMENTARY TABLE No.1.

SUPPLEMENTARY TABLE No.2.

SUMMARY (in English).

SUMMARY.

Investigations were instituted with the purpose of obtaining better insight into the properties and chemical structure of the lignins contained in young plants before and after their digestion by ruminants.

EXPERIMENTAL RESULTS:

(1) Lignins were extracted from the following plants:- Eragrostis teff, Setaria, Pencillaria, wild growing barley, Alexandrinian clover, Clover (Fahli Var.), Lathyrus ochrus (Tophach) and peanut-vine hay.

The same plants were given to sheep kept in closed cages as their sole food. The feces were collected and the lignins extracted from these also.

The lignins were extracted by heating the plant or feces 4 times with an aqueous 2% sodium hydroxide solution at 80o for 8 hours.

The lignins extracted were partly soluble in 96% alcohol (lignin B) and partly insoluble in it (lignin A).

(2) The lignins contained nitrogen, the amount of it varied from 1,6 to 3,6 %. The nitrogen content could not be removed from the lignins by acid or enzymatic hydrolysis, but was quantitatively removed by reduction with zinc dust or sodium ethylate, both methods leaving to complete disruption of the lignin molecule. The liberated nitrogen appeared for the greater part as NH_3 but small quantities of primary amines and iso nitriles were also observed.

On oxidation with $KMnO_4$ in alkaline solution, 60-70% of the total nitrogen content was liberated as NH_3; similar results were obtained when simple pyridine derivatives were oxidized by the same method.

It was therefore, concluded that the nitrogen in the lignins is not proteinic in nature, but is an intrinsic part of the lignin molecule, probably forming cyclic Schiff's bases.

(3) No lignin preparation contained any cellulose or hemicellulose.

(4) The methoxyl content of all lignins was determined. It ranges from about 5% in Leguminosae lignins to about 10% in Gramineae lignins. On methylation with diazomethane the Leguminosae lignins gain about twice as much methoxyl (10%) as the Gramineae lignins (5%). A further addition of Methoxyl by methylation with Dimethyl-sulphate was observed only in plant lignins, pointing to the presence of non-phenolic OH-groups. In fecal lignins no additional methylation could be attained with Dimethylsulphate.

Cryoscopic molecular-weight determinations in B-Naphtol showed values of about 600 both for plant and fecal lignins. This value is to be regarded as the molecular weight of a "building unit" rather that of the lignin molecule "in situ".

(5) Oxidation of the lignins with nitrobenzene in alkali yielded Vanillin and p-Hydroxybenzaldehyde, Phenol and various acids. Fecal lignins did not give any aldehydes. Simple sugars, oxidized by the same method yielded no aldehydes, but phenol and acids in considerable quantities. Therefore, only the aldehydes were supposed to be genuine degradation products of the lignins. vanillin and p-hydroxybenzaldehyde appeared in various yields, but always in the same proportion (2:1).

(6) On fusion with potassium hydroxide at 270° all lignins yielded catechol and protocatechuic acids.

(7) All lignins were heated with alcohol containing 3% sulfuric acid at 170-180° under pressure. The degradation products obtained were separated into an aldehyde and ketone fraction, an acid fraction and a phenol fraction, by extraction of the ether solution with aqueous $NaHCO_3$, $NaHCO_3$ and NaOH, respectively. The aldehyde and ketone fraction fraction was given by plant lignins only and consisted almost wholly of Vanilloyl-methyldiketone (1, 2). The acid fraction both plant and fecal lignins yielded (after an additional oxidation with $KMnO_4$) p-hydroxybenzoic and vanillic acids. The phenol fractions of all lignins were composed of phenol and guajacol.

(8) Reduction of the lignins with sodium in absolute alcohol yielded an aldehyde fraction, whereas phenols and acids were obtained from all lignins. Although no definite substances were obtained, certain evidence is presented which points to the fact that benzene derivatives containing a side chain were formed.

(9) THEORETICAL PART.

(a) Based on the experimental data obtained, a mechanism for the formation of lignin is proposed. It is assumed that at first a linear polymerization of monoses by formation of C-C bonds takes place, followed by ring closure and loss of water (or hydrogen). Aromatic-hydroaromatic systems are thus formed, which contain a number of free phenolic OH-groups. These are partly methylated during the entire process of lignin formation.

(b) These systems possess a free aldehyde group as one end-group and an aliphatic or enolic OH-group as the second. These groups both link with nitrogen and thus, after an additional ring closure, form pyridine systems.

(c) The lignins in young plants differ from those in woods by their nitrogen, methoxyl and phenolic - OH - content. These differences are explained by the assumption that entrance of nitrogen into the lignin molecule depends mainly on the amounts of nitrogenous material present during liginin production, i.e. on the rate of protein formation in the respective plants. This lignins prepared from leguminosae with a high rate of protein formation contain more nitrogen than those of the gramineae. Wood lignins contain only traces of nitrogen or none at all. This fact is explained by the almost complete absence of nitrogenous matter in the xylem cells in which lignin is formed. The wood lignins, pyran rather than pyridine systems are assumed to link the lignin structural units.

(d) A structural formula for the lignin structural unit is proposed which explains the appearance of the degradation products obtained and fits the analytical data for N and Methoxyl before and after methylation (see supplementary table No. II).

(e) The appearance of vanillin and p-hydroxybenzaldehyde on oxidation with nitrobenzene is presumed to be due to the oxidative rupture of the double bonds of the two-side chains in ring A and E and of these in the 3 carbon chain linking ~~ea~~ rings B and C. Pyridine rings are also reduced.

(f) No disruption of the lignin molecule is brought about by digestion; the disappearance of the aldehyde fraction from among the degradation products of fecal lignins is caused by the saturation of all side-chain and pyridine-ring double bonds and by the formation of one Pyran nucleus which cause the disappearance of the non-phenolic OH in feces lignins.

A. Bondi and H. Meyer,

On the constitution of the green plant lignins and the change undergone by them in the ruminant body

Lignins were prepared by extraction with dilute alkali from forage plants and from faeces collected from sheep fed exclusively with the same plants. The plant and faeces lignins differ by their higher N, lower methoxyl - and lower phenolic - OH content from the lignins of wood. By oxidation of plant lignins with nitrobenzene and alkali, vanillin and p-hydroxybenzaldehyde (in the ratio 2:1) were obtained, while vanillin and syringa-aldehyde were isolated from hardwood lignins and vanillin exclusively from soft wood lignins. The sole changes undergone by lignins in the ruminant body appear to be the loss of non-phenolic OH groups and the inability to yield aldehydes on oxidation with nitrobenzene. It is notworthy, that the nitrogen content and the cyclic structre of the lignin-indecule remain unchanged by digestion. The OH-substituted side chains in the plant lignins can be removed in vitro by heating with per-iodate with the production of a CO - containing lignin.-

An intermediate position between plant and wood lignins is taken by the lignin isolated from cottonseed-hulls; this later product yields by oxidation with nitrobenzene vanillin only, similar to the lignin of soft woods. The OCH_3 - content of cottonseed hull lignin is low. After methylation with dimethylsulphate its OCH_3 content does not rise more than that of methylated forage plantlignin. Cottonseed-hull lignin contains 0.8% N. intermediate between wood and plant lignins.

Experiment has shown that heating with water under pressure has different effects on isolated lignins from those on lignins in the original plant material:

1) The nonphenolic OH-group disappear by heating of the plant material under pressure of 20 atm. i.e. the lignins isolated from the vapour treated plant material show the same increase in OCH_3 content, if they are methylated by dimethylsulphate or by diazomethane. Vapour pressure treatment of isolated lignins however does not influence their non-phenolic groups.

2) The content of phenolic OH groups of plant lignins is diminished by heating of the isolated lignins, probably due to the closure of rings. However these phenolic OH-groups are protected, if the whole plant material is treated with water under pressure.

The N-content of plant, faeces and cottonseed-hull lignins is influenced neither by heating of the whole plant material nor by heating of the isolated lignins under pressure even in presence of acid or of alkali: These properties support our view, that the nitrogen is not a contamination, but an intrensic part of the lignin molecule, probably forming cyclic bases.

PALESTINE & EGYPT LLOYD LTD.
TEL AVIV