

WOLFGANG GRASSMANN, HORST ENDRES,  
WILHELM PAUCKNER und HEINZ MATHES

Über die Gerbstoffe der Fichtenrinde, III<sup>1,2)</sup>

CHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON GERBSTOFFEN AN  
EINER POLYAMIDSÄULE. ISOLIERUNG EINES ZWEITEN  
AGLUCONS AUS DEM FICHENRINDENGERBSTOFF

Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München  
(Eingegangen am 15. Februar 1957)

*Herrn Professor Dr. B. Helferich zum 70. Geburtstag gewidmet*

Das Aglucongemisch des essigesterlöslichen Fichtenrindengerbstoffes wurde an einer Polyamidsäule in 6 Komponenten aufgetrennt. Neben dem bereits früher erhaltenen kristallisierten Aglucon  $C_{16}H_{16}-_{18}O_5$  konnte ein weiteres kristallisiertes Aglucon gewonnen werden.

Der Gerbstoff der Fichtenrinde liegt, wie wir gezeigt haben<sup>1)</sup>, im frischen Bast der Rinde in niedermolekularer und völlig farbloser Form vor; durch postmortale Veränderungen, wie sie unter anderem bei der Borkenbildung vor sich gehen, geht er in höhermolekulare Verbindungen über, die den Hauptteil der technisch verwendeten Fichtenrindenextrakte ausmachen. Aus dem entharzten Bast können etwa 30% des Gesamtgerbstoffes durch Extraktion mittels Essigesters mit Anteilzahlen von 80–89, also nahezu frei von Nichtgerbstoffen, erhalten werden<sup>3)</sup>. Der so gewonnene Gerbstoff ist ein Glucosidgemisch; es ließ sich an einer Kieselgel-Cellulose-Säule mit dem Lösungsmittel Wasser-Methanol-*n*-Butanol-Petroläther in 5 Komponenten auftrennen<sup>2)</sup>. Die mengenmäßig stärkste Fraktion „E“ (35%) konnte in kristalliner Form gewonnen und daraus durch Abspaltung von 2 Glucoseresten mittels des Enzymgemisches aus *Aspergillus oryzae*<sup>4)</sup> das gleichfalls kristallisierte Aglucon  $C_{18}H_{16}-_{18}O_5$  erhalten werden<sup>2)</sup>. Die noch nicht abgeschlossene Untersuchung der übrigen Glucoside zeigte, daß sie sich nicht durchwegs vom gleichen Aglucon ableiten.

Das durch enzymatische Spaltung aus dem Gemisch der Gesamtglucoside erhaltene Aglucongemisch konnte durch Säulenchromatographie an dem schon für die Trennung der Glucoside verwendeten System nur unvollkommen zerlegt werden. Zwar zeigte das erhaltene Auslaufchromatogramm die Anwesenheit von zwei sehr nahe beieinander wandernden Hauptfraktionen und mindestens einer weiteren Fraktion an, und es gelang, aus der langsamer wandernden Komponente das gleiche  $C_{18}$ -Aglu-

1) I. Mittel.: W. GRASSMANN, Colloquiumsber. Inst. Gerbereichem. Techn. Hochschule Darmstadt, Heft 3, 59 [1948].

2) II. Mittel.: W. GRASSMANN, G. DEFFNER, E. SCHUSTER und W. PAUCKNER, Chem. Ber. 89, 2523 [1956].

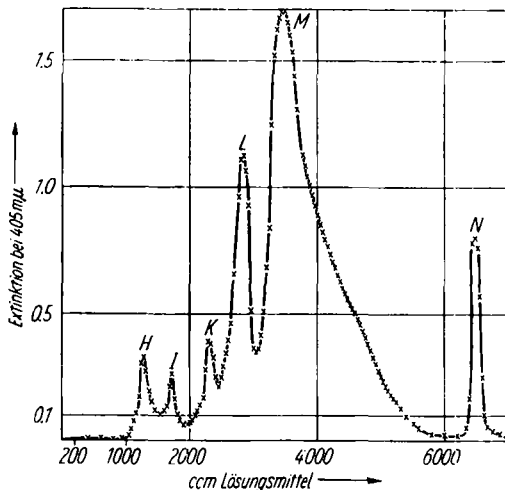
3) E. SCHUSTER, Dissertat. Univ. München 1951.

4) W. GRASSMANN und H. RUBENBAUER, Münchener med. Wschr. 78, 1817 [1931]; W. GRASSMANN, K. MAYER und E. WALDSCHMIDT-LEITZ, Aertzl. Forsch. 4, 1/17 [1950].

con, wie es schon durch Spaltung des Glucosids „E“ erhalten worden war, zu gewinnen. Aber der Versuch, weitere Aglucone auf diesem Wege zu isolieren, schlug fehl.

Dies hat uns veranlaßt, eine Zerlegung des Aglucongemesches an Polyamidpulver zu versuchen, das bereits vor einigen Jahren für die quantitative Gerbstoffbestimmung an Stelle von Hautpulver vorgeschlagen<sup>5)</sup> und dessen Eignung für die chromatographische Trennung von Phenolen vor kurzem beschrieben worden war<sup>6,7)</sup>. Die Einwirkung von Phenol auf Polyamid kann als eine reversible Gerbung betrachtet werden; denn die Bindung von Phenol ist durch die gleichen Nebervalenzkräfte, nämlich Wasserstoffbrückenbindung zwischen der phenolischen Hydroxylgruppe und der Amidgruppe, bedingt, wie sie für die Gerbung diskutiert werden<sup>8)</sup>.

Die chromatographische Trennung an der Polyamidsäule hat sich an unserem Aglucongemisch ebenso wie an einigen weiteren Beispielen, über die in Kürze berichtet werden soll, als unerwartet leistungsfähig erwiesen. Bei der Auftrennung von 6 g Aglucongemisch mit einer Säule von 36 cm Füllhöhe und 6 cm Durchmesser (220 g Perlonpulver) konnten 5 Fraktionen erhalten werden (Abbild.), wobei die Gesamtausbeute 4.28 g, also 71.0% beträgt. Die Ausbeute, auf die einzelnen Fraktionen verteilt, ergibt folgendes Bild: Fraktion H 4.1%; I 10%; K 4.5%; L 11.3%; M 41.1%. Eine weitere braun gefärbte Fraktion N mit 11.3%, die sich nur wenig von der Auftragsstelle entfernt, konnte mit 0.1*n* NaOH herausgespült werden.



Chromatographische Auftrennung des Aglucongemesches an einer Perlonpulver-Säule. Lösungsmittel: Wasser-Methanol (1:1), (3:7), (1:4), Methanol und *n*/10 NaOH. Kolorimetrische Bestimmung nach VORSATZ-BATZER<sup>9)</sup> (Schichtdicke 1 cm)

5) H. BATZER, Chemiker-Ztg. 76, 397 [1952].

6) V. CARELLI, A. M. LIQUORI und A. MELE, Nature [London] 176, 70 [1955].

7) W. GRASSMANN, H. HÖRMANN und A. HARTL, Makromolekulare Chem. 21, 37 [1956].

8) A. KÜNTZEL, Angew. Chem. 50, 308 [1937]; S. G. SHUTTLEWORTH und G. E. CUNNINGHAM, J. Soc. Leather Trades' Chemists 32, 183 [1948]; SHU TUNG TU und R. M. LOLLAR, J. Amer. Leather Chemists Assoc. 45, 324 [1950]; A. KÜNTZEL, Leder 3, 137 [1952].

9) Collegium [Darmstadt] 1942, 424; vgl. auch H. BATZER, Leder 2, 169 [1951].

Die mengenmäßig stärkste Fraktion M fiel beim Eindampfen sofort kristallin aus und konnte durch Misch-Schmelzpunkt mit dem früher bereits erhaltenen C<sub>18</sub>-Aglucon identifiziert werden. Neben der scharfen Auftrennung stellt die erhaltene Ausbeute von 40% gegenüber der durch die Trennung an der Kieselgel-Cellulose-Säule erhaltenen Ausbeute von 28% einen wesentlichen Fortschritt dar.

Aus der Fraktion L konnten wir ein weiteres kristallisiertes Aglucon erhalten, welches sich bei 229° unter Verkohlung zersetzt. Durch Umsetzung mit Fluordinitrobenzol haben wir die Dinitrophenylverbindung hergestellt, die in langen hellgelben Nadeln vom Schmp. 160° auskristallisiert. Aus ihrer Analyse kann man die Formel des zugrunde liegenden Aglucons zu C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub> berechnen. Die Dinitrophenylverbindung entfärbt Kaliumpermanganat und Bromwasser nicht, sie enthält also im Gegensatz zum C<sub>18</sub>-Aglucon keine Doppelbindung. Über weitere Untersuchungen an dem isolierten zweiten Aglucon hoffen wir in Kürze berichten zu können.

Eine Auftrennung des Glucosidgemisches an der Perlonsäule gelang nicht. Sämtliche Glucoside haften nur wenig am Perlonpulver und können bereits mit Wasser verdrängt werden.

Die scharfen chromatographischen Trennungen, die in geeigneten Fällen an Polyamidsäulen erzielt werden, beruhen auf der unterschiedlichen Affinität der einzelnen Gerbstoffe zu den Amidbindungen, die ihrerseits der auch technisch wichtigen Affinität zum Eiweiß der Haut parallel gehen dürfte, wobei allerdings, wie schon Ergebnisse von BATZER<sup>5)</sup> andeuten, die Affinität der Polyamide geringer zu sein scheint als diejenige der Hautsubstanz. Der besondere Vorteil dieses chromatographischen Systems zur Trennung von Gerbstoffen und darüber hinaus von phenolischen Substanzen überhaupt liegt aber in der Möglichkeit, auf einfache Weise präparative Trennungen relativ großer Substanzmengen auszuführen. Die Chromatographie an Polyamid beruht nicht auf einer Oberflächenadsorption. Sie erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen auch im Inneren des Polymeren, wobei die Verteilung zwischen der wäßrigen Lösung und der polymeren Phase eher derjenigen zwischen zwei flüssigen Phasen an die Seite gestellt werden kann. Nach unseren Ergebnissen an einfachen Phenolen<sup>7)</sup> kann bis zu ein Mol. Phenol je Amidbindung angelagert werden, ohne die Eigenschaften der Säulenfüllung entscheidend zu verändern. Wollte man die beschriebene chromatographische Trennung von 6 g Aglucongemisch in der üblichen verteilungschromatographischen Anordnung an einer Kieselgel-Cellulose-Säule durchführen, so würde dafür etwa eine Säule von 100 cm Länge und 6 cm Durchmesser benötigt, wobei rund 5 kg Füllmasse und 90 l Lösungsmittel eingesetzt werden müßten.

Herrn Dr. MÖLLER von den Farbwerken Hoechst (Werk Bobingen) möchten wir auch an dieser Stelle unseren Dank für die Überlassung des Perlonpulvers aussprechen.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

*Vorbereitung der Säule:* 220 g Perlonpulver „feinst“, Maschenweite 0.2 m $\mu$  (Din 30), der Farbwerke Hoechst (Werk Bobingen) ließ man 2–3 Stdn. in Wasser quellen und schlämmte es dann portionsweise in eine am unteren Ende mit einer Glasfritte abgeschlossene Säule ein. Dabei wurde das Pulver jedesmal mit einem dicken Glasstab leicht gepreßt. Nach der Füllung

wurde das obere Ende der Packung mit einer Glasfritte abgeschlossen. Füllhöhe 35 cm, Durchmesser 6 cm.

*Ausführung der säulenchromatographischen Auftrennung:* 6 g Aglucongemisch wurden in 30 ccm Wasser-Methanol (1:1) gelöst und vorsichtig auf die Säule aufgetragen. Es wurde kontinuierlich mit folgenden Lösungsmitteln eluiert: 900 ccm Wasser-Methanol (1:1), 3000 ccm (3:7), 1500 ccm (1:4) und 500 ccm Methanol. Die noch auf der Säule verbliebene braune Substanz wurde mit 0.1 *n* NaOH herausgespült. Eluiert wurde mit einer Tropfgeschwindigkeit von 160 ccm pro Stunde. Das Eluat wurde in Fraktionen von 40 ccm gesammelt und 0.1 ccm mittels der Nitritreaktion nach F. VORSATZ<sup>9)</sup> getestet. Die Ausbeuten der Fraktionen H bis M wurden gravimetrisch bestimmt. Die Fraktion N wurde angesäuert, ausgeäthert und nach Verdampfen des Lösungsmittels ausgewogen. Die Fraktion M fiel beim Eindampfen kristallin aus. Schmp. 216°. *R<sub>F</sub>*-Wert in Butanol-Eisessig-Wasser 0.70.

*Kristallisation der Komponente L:* Nach Verdampfen des Lösungsmittels verblieb ein amorphes Pulver, welches mit heißer 60-proz. Essigsäure gelöst wurde und beim Abkühlen flockig ausfiel. Über Nacht bildeten sich mikroskopisch kleine, weiße, kristalline Blättchen, die sich nach Umkristallisation aus 60-proz. Essigsäure bei 227–229° unter Verkohlung zersetzen.

Das Aglucon ist sehr leicht löslich in Eisessig und Äthanol, schwer löslich in Wasser, unlöslich in Aceton und Essigester. Olivgrüne Eisenchloridreaktion, die bald in Rotbraun umschlägt. Mit konz. Schwefelsäure orangerote Färbung, die auch nach 24 Stdn. nicht verändert ist. *R<sub>F</sub>*-Wert in Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) 0.85.

*Darstellung der Dinitrophenylverbindung:* 30 mg Aglucon wurden in 1 ccm 90-proz. Alkohol gelöst und mit 30 ccm 1-proz. alkohol. Dinitrofluorbenzol-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 2 ccm gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung fiel ein Niederschlag aus. Das Reaktionsgemisch wurde 2 Stdn. unter mehrmaligem Umschütteln stehen gelassen und dann abfiltriert. Der Niederschlag wurde zur Beseitigung des Natriumhydrogencarbonats mehrmals mit 5-proz. Essigsäure aufgenommen und abfiltriert. Diese Operation wurde dann noch dreimal mit Wasser durchgeführt. Der Niederschlag wurde in Aceton gelöst und mit einigen Tropfen Wasser bis zur beginnenden Trübung versetzt. Nach 10 Min. bildeten sich lange hellgelbe Nadeln vom Schmp. 160°.

Die Dinitrophenylverbindung ist leicht löslich in Aceton, Dioxan und Essigester, unlöslich in Wasser und Petroläther. Die Analyseergebnisse lassen sich mit der Tris-DNP-Verbindung eines Aglucons C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub> in Einklang bringen.

C<sub>34</sub>H<sub>22</sub>O<sub>17</sub>N<sub>6</sub> (786.6) Ber. C 51.91 H 2.82 N 10.68 Gef. C 51.86 H 2.90 N 10.73