

# Über die Elemisäure aus Manila-Elemiharz

(XI. Mitteilung)

## Zur Isolierungsmethodik der Elemiharzsäuren

Von

K. BALENOVIĆ und M. MLADENOVIC

Aus dem Chem. Institut der Universität Zagreb. Vorstand Prof. Dr. G. FLUMIANI

(Eingegangen am 28. 2. 1940. Vorgelegt in der Sitzung vom 7. 3. 1940)

Um verschiedenen Schwierigkeiten bei der Isolierung der Elemiharzsäuren auszuweichen, wurde die allgemein übliche TSCHIRCHSche Methodik von verschiedenen Autoren schon einige Male etwas modifiziert<sup>1</sup>. MLADENOVIC<sup>2</sup> studierte besonders den Einfluß des Lösungsmittels und stellte dabei fest, daß sich Tetrachlorkohlenstoff am besten eignet, da dessen Harzlösungen am wenigsten zur Emulsionsbildung mit dem alkalischen Wasser neigen. Diese Emulsionsbildung war eine der Ursachen, daß die Säuren verunreinigt waren. Aber bei allen bisherigen Untersuchungen wurde der kolloidale Charakter der Salze der Elemiharzsäuren nicht genügend berücksichtigt. Durch die genauere Kenntnis dieses kolloidalen Verhaltens der Salze der Elemisäuren konnten wir aber verschiedene Verbesserungen in der Isolierungsmethodik der Elemiharzsäuren erzielen.

Bei der üblichen Isolierungsmethode konnten wir feststellen, daß beim Mischen des klaren alkalischen Extraktes mit ebenso klarem wäßrigen Extrakte ein halbflüssiger, brauner, harziger Niederschlag entstand. Dieser löst sich in Wasser und anderen polaren Lösungsmitteln, ist aber in Petroläther und Chloroform unlöslich. Aus wäßrigen Lösungen dieses Niederschlages können aber mit Mineralsäuren sehr reine Harzsäuren gefällt werden. Demnach besteht dieser harzige Niederschlag aus Alkalisalzen der Harzsäuren.

Schon die Art und Weise, wie dieser harzige Niederschlag entsteht, macht es wahrscheinlich, daß es sich um das Aussalzen der Elemiharzsäuren mit Alkaliionen handelt. Dies konnte auch

<sup>1</sup> LIEB und SCHWARZL, *Mh. Chem.* **45** (1924) 51; RUZICKA, *Helv. chim. Acta* **14** (1931) 811.

<sup>2</sup> *Bull. Soc. Chim. Young.* **8** (1937) 175.

bestätigt werden. Durch Hinzufügen von reinem Wasser entsteht weder bei dem wäßrigen, noch bei dem alkalischen Extrakte ein Niederschlag. Beide Extrakte geben aber den Niederschlag, wenn man Alkalilauge hinzufügt.

Um annähernd die Konzentration der Alkaliionen zu ermitteln, die notwendig ist, um die Fällung der Salze zu bewirken, wurde eine wäßrige Lösung der Natriumsalze der Elemisäuren bereitet. Diese Lösung, die praktisch keine freie Natronlauge enthielt, außer jener, die durch Hydrolyse des Salzes entstand, wurde mit  $n/10$  NaOH bis zur eben auftretenden Trübung titriert. Die Titration zeigte, daß schon eine 0,2% Natronlauge die Natriumsalze aus ihrer wäßrigen Lösung ausfällt. Es ist dann ganz klar, warum der 1% alkalische Extrakt aus dem wäßrigen Extrakte die Salze ausfällt. Ebenso ist es verständlich, warum man aus der Harzlösung mit Wasser noch beträchtliche Mengen der Säuren isolieren kann. Da die Alkalisalze in Tetrachlormethan unlöslich sind, schwimmen sie auf der Oberfläche der Tetrachlormethanlösung und verhindern eventuell die weitere Extraktion. Diese Salze lösen sich dann erst in wäßrigen Extrakten. Dies beweist auch die Tatsache, daß beim abwechselnden Extrahieren mit Lauge und Wasser aus den wäßrigen Extrakten immer größere Mengen der Harzsäuren gefällt werden als aus den alkalischen.

Daß bei diesem Aussalzen nicht Hydroxylionen wichtig sind, beweist der Umstand, daß die Fällung auch mit Chlor-natrium zu erzielen ist. Schwache Fällungen entstehen auch durch bloßes Erwärmen ohne Elektrolytzusatz. Beim Erkalten verschwinden aber diese Fällungen.

Ähnlich den Alkalisalzen der Elemisäuren verhalten sich auch die Natriumsalze der Oleanolsäure und der rohen Mastixsäure.

Bei allen Fällungen bleiben die Verunreinigungen in den Mutterlauge. Der Niederschlag enthält reine und farblose Elemisäuren. Es ist festgestellt worden, daß aus den Lösungen der Salze der Elemiharzsäuren, die 2—25% NaCl enthalten, etwa 90—95% der gesamten Säuren als ein farbloser Niederschlag gefällt werden. Salzsäure fällt aus braunroten Mutterlauge etwa 5% eines braunen Niederschlages aus.

Die wäßrigen Lösungen der Salze der Elemiharzsäuren lösen Substanzen auf, die sonst in Wasser unlöslich sind. So lösen sie z. B. Amyrin, Cholesterin, Phenanthren, Fettsäuren usw.

Die Elemisäuren verhalten sich also ähnlich wie die Gallensäuren<sup>3</sup> und andere Verbindungen, die die Erscheinung der Hydrotropie<sup>4</sup> zeigen. Bei den Harzsäuren wird die Hydrotropie bei der Abietinsäure erwähnt<sup>5</sup>.

Aus diesem Verhalten der Salze der Elemisäuren ist es ohne weiteres klar, warum MLADENOVIC<sup>6</sup> in den Mutterlaugen nach der Isolierung der Harzsäuren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amyrin fand.

Die kristallisierte Elemisäure wird gewöhnlich durch Lösen der amorphen Säure in kochendem Alkohol und Auskristallisieren aus der erkalteten Lösung gewonnen. Dabei ist aber die Ausbeute nur etwa 30—40%. MLADENOVIC<sup>7</sup> verwendet als Lösungsmittel kaltes Aceton und erhält etwa 70% der kristallinen Säure. Mit demselben Erfolg haben wir mit kalter Essigsäure gearbeitet. Ein großer Vorteil dieses Lösungsmittels besteht darin, daß man nur etwa 80 g Essigsäure braucht, um 100 g der amorphen Säure in kristallinische zu verwandeln. Vorteilhaft ist auch, daß das Lösungsmittel nicht so flüchtig ist wie Aceton und daß man aus der Essigsäurelösung, aus der nichts mehr kristallisiert, durch Chromsäureoxydation weitere Mengen kristallinischer Säuren erhalten kann. Die Ausbeute an kristallinen Säuren ist also tatsächlich größer wie bei MLADENOVIC.

Aus dem Säuregemisch läßt sich die  $\gamma$ -Elemolsäure am schwersten isolieren. Sie ist bisher nur von MLADENOVIC<sup>8</sup> isoliert worden. Sie scheint kein konstanter Bestandteil des Elemiharzes zu sein. Die Isolierung der  $\alpha$ -Elemolsäure und der  $\beta$ -Elemolsäure ist schon leichter. Sie wurden von RUZICKA<sup>9</sup> durch langwierige fraktionierte Kristallisation getrennt. MLADENOVIC scheidet sie entweder durch leichtere Fraktionierung des oximierten Gemisches<sup>8</sup> oder am bequemsten durch Umkristallisation des Oxydationsproduktes der rohen Elemisäure.

Es besteht bis jetzt kein Verfahren zur Trennung der unveränderten Säuren, das rasch auszuführen ist. Wir suchten dies auf *chromatographischem Wege* zu erreichen. Es wurde mit aktiviertem Aluminiumoxyd und aktiviertem Talcum gearbeitet.

<sup>3</sup> OTTO, Ber. dtsh. chem. Ges. 27 (1894) 2131; WIELAND und SORGE, Z. physiol. Chem. 97 (1916) 1.

<sup>4</sup> NEUBERG, Biochem. Z. 76 (1916) 107.

<sup>5</sup> H. MAYER, Analyse und Konstitutionsermittlung org. Ver. IV. A. (1922) 18.

<sup>6</sup> Bull. Soc. Chim. Young. 3 (1932) 5.

<sup>7</sup> Bull. Soc. Chim. Young. 8 (1937) 175.

<sup>8</sup> Mh. Chem. 58 (1931) 69, bzw. S.-B. Akad. Wiss. Wien (IIb) 140 (1931) 69.

<sup>9</sup> Helv. chim. Acta 15 (1932) 472.

Es gelang uns die Trennung der  $\alpha$ -Elemolsäure von der  $\beta$ -Elemonsäure, denn  $\beta$ -Elemonsäure wird stärker als die  $\alpha$ -Elemolsäure adsorbiert. Bei Carotinoiden, einer Gruppe von Verbindungen die chromatographisch am besten untersucht ist, wächst bekanntlich die Adsorption mit der Zahl der Doppelbindungen und der Hydroxylgruppen; Alkohole werden besser wie Ketone adsorbiert. Bei Triterpenen liegen noch keine systematischen Untersuchungen vor. Die bisherigen Resultate sind aber im Einklang mit denen bei Carotinoiden. Dies beweisen auch die Resultate bei den Elemisäuren.

Die  $\beta$ -Elemonsäure hat nach MLADENVIĆ und BERKEŠ<sup>10</sup> drei Doppelbindungen, die  $\alpha$ -Elemolsäure nur zwei. Die Trennung wird also wahrscheinlich auf Grund der ungleichen Zahl der Doppelbindungen bewirkt. Zur Trennung der Komponenten erwies sich das flüssige Chromatogramm und die Fluorescenz im ultraviolettem Licht am geeignetsten. Ganz reine  $\alpha$ -Elemolsäure und  $\beta$ -Elemonsäure fluorescieren im ultraviolettem Licht aus dem Spektralgebiet um  $360 \mu\mu$ . lichtblau. Die Stelle, wo die  $\beta$ -Elemonsäure am Talcum adsorbiert wird, ist hingegen gelbgrün. Diese Fluorescenz kann von der  $\beta$ -Elemonsäure stammen; denn adsorbierte Substanzen fluorescieren oft anders, als wenn sie in fester Form vorliegen. Diese Fluorescenz kann aber eventuell auch von geringen Verunreinigungen stammen, die an dieser Stelle als eine scharf begrenzte Schichte adsorbiert ist.

Die chromatographische Trennung wurde auch so versucht, daß man die  $\beta$ -Elemonsäure als Ketosäure aus dem Säuregemisch mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin in das rot gefärbte Hydrazon verwandelte. Die Trennung ging nur dann, wenn man dem Säuregemisch so viel Reagens zugab, als 10% der  $\beta$ -Elemonsäure im Säuregemisch entsprach. Wenn man größere Mengen Reagens zugibt, so ist das ganze Chromatogramm gefärbt. Farblose Zonen, in denen sich  $\alpha$ -Elemolsäure befinden sollte, fehlen entweder vollständig, oder sie sind in ganz geringer Breite vorhanden. Die Versuche, die Trennung in praktisch verwertbarer Form durchzuführen, werden fortgesetzt.

Es soll noch erwähnt werden, daß von der reinen  $\alpha$ -Elemonsäure ihr 2,4-Dinitrophenylhydrazon dargestellt und chromatographisch gereinigt wurde. Die Substanz kristallisiert in gelben,

<sup>10</sup> Mh. Chem. 72 (1939) 417, bzw. S.-B. Akad. Wiss. Wien (II b) 148 (1939) 115.

plattenförmigen Kristallen und schmilzt unter Zersetzung bei 208°.

### Experimenteller Teil.

Isolierung und Reinigung der amorphen Elemiharzsäuren.

Aus dem Harz wird zuerst durch Wasserdampfdestillation das ätherische Öl entfernt. Der zurückgebliebene Harzkuchen wird dann in Tetrachlorkohlenstoff gelöst und diese Lösung zuerst mit 1% Kalilauge und zum Schluß einige Male mit Wasser extrahiert. Aus den alkalischen Extrakten werden amorphe Säuren mit Salzsäure gefällt. Diese Säuren werden dann durch Wiederauflösen in Lauge und Fällen mit Chlornatrium gereinigt. Die aus wäßrigen Extrakten isolierten Säuren sind genau so rein wie die aus alkalischen Lösungen gewonnenen, die durch Fällung mit Chlornatrium gereinigt sind.

Je 50 g der trockenen rohen Säure löst man in 1½ Liter 0·5% Natronlauge. Nach 12 Stunden wird filtriert und mit einer Lösung, die in 50 cm<sup>3</sup> Wasser 5 g NaOH und 20 g NaCl enthält, unter öfterem Umrühren gefällt. Nach 24 Stunden wird die dunkelrotbraun gefärbte Mutterlauge vom Niederschlag durch Dekantieren getrennt, der Niederschlag nochmals in 5 l Wasser, das 0·5 g NaOH enthält, gelöst und mit Salzsäure gefällt. Die Ausbeute beträgt 90—95%. Auf diese Weise können auch sehr verunreinigte Säuren gereinigt werden. In allen Fällen sind bei der Fällung die ersten Fraktionen reiner als die folgenden.

Bei der Fällung der Säuren mit Chlornatrium, wie auch bei der Auflösung der Niederschläge müssen Hydroxylionen zugegen sein. Im entgegengesetzten Falle werden durch die Einwirkung der Kohlensäure Elemisäuren in Freiheit gesetzt und diese verhindern dann die Reinigung nach dieser Methode.

### Physikalisch-chemische Eigenschaften der K- und Na-Salze der Elemisäuren.

15 g der rohen Säure werden in 100 cm<sup>3</sup> 0·5% Natronlauge gelöst, von Ungelöstem abfiltriert und die Lösung mit 100 cm<sup>3</sup> Wasser verdünnt. Diese Lösung enthält keine freie Natronlauge außer jener, die durch Hydrolyse entstanden ist. Mit dieser Lösung wurden alle Experimente, die sich auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Elemisäuren beziehen, ausgeführt.

Um die annähernde Konzentration der Na' zu ermitteln, bei der sich die Natriumsalze auszuschcheiden beginnen, wurde ein ganz bestimmtes Volumen der oben erwähnten Lösung genommen und dann mit verschiedenen genau gemessenen Mengen Wasser verdünnt. Solche Lösungen wurden dann mit  $n/10$  NaOH bis zur beginnenden Trübung titriert. Je verdünnter die Lösungen waren, um so mehr Lauge wurde verbraucht, um eine beginnende Trübung zu verursachen. In allen Versuchen mußte die Konzentration der Lauge in der Lösung 0'15—0'2% sein.

Dieselbe Lösung wurde auch für die Auflösung von Amyrin, Cholesterin, Phenanthren, Elaidinsäure genommen. Alkoholische Lösung von Amyrin (und anderer Substanzen) gießt man in die wäßrige Lösung der Natriumsalze der Elemisäuren. Die Flüssigkeit bleibt dabei klar und erst beim Zugeben von größeren Mengen der alkoholischen Lösung scheidet sich nach einiger Zeit der Niederschlag (Amyrin). Noch deutlicher wird die Auflösung von Amyrin sichtbar, wenn man eine Suspension von Amyrin durch Verdünnen der alkoholischen Lösung mit Wasser bereitet und zu dieser Suspension die Auflösung der Natriumsalze zugibt.

Auf analoge Weise wurde auch mit anderen oben angeführten Substanzen gearbeitet.

#### Kristallisation der Rohsäure.

100 g der rohen, trockenen und fein gepulverten Säure werden mit etwa 80  $cm^3$  Eisessig übergossen. Die Masse wird 24 Stunden unter öfterem Rühren stehen gelassen. Die auskristallisierte Masse wird abfiltriert und einige Male mit ganz wenig Essigsäure nachgewaschen. Der Schmelzpunkt der so gewonnenen Säure liegt bei 215° und die Ausbeute beträgt etwa 70%. Aus der Mutterlauge kristallisiert nach längerem Stehen noch etwas Säure. Für die weitere Reinigung der Säure wird das Produkt fein gepulvert und am Büchnertrichter noch solange mit kleinen Mengen Essigsäure behandelt, bis das Filtrat farblos ist.

#### Chromatographische Trennung der Säuren.

100  $cm^3$  der 1%-Elemisäurelösung in Chloroform wird durch eine Säule von aktiviertem Aluminiumoxyd<sup>11</sup> (Säuledimension 2 × 20)

<sup>11</sup> Die Aktivierung von  $Al_2O_3$  und Talcum wurde mit Wasserleitungswasser nach Angaben von RUGGLI und JANSEN, Helv. chim. Acta 18 (1935) 624 vorgenommen.

durchgelassen. Die Filtrate nach Abdestillieren des Chloroforms hinterlassen ein gelblich gefärbtes amorphes Produkt, das nach Zugabe von einigen Tropfen Essigsäure kristallisiert. Unter dem Mikroskop erscheinen die Kristalle ganz homogen und schmelzen bei 220°. Es ist die reine  $\alpha$ -Elemolsäure. Wenn man durch die Säule reines Chloroform durchläßt, kristallisiert auf analoge Weise ein Gemisch von  $\alpha$ -Elemolsäure und  $\beta$ -Elemolsäure und zuletzt nur die  $\beta$ -Elemolsäure in langen Nadeln und mit dem Schmp. bei 217°.

Das Elemisäuregemisch wurde auch auf aktiviertem Talcum chromatographiert. Es wurde eine 2% Lösung der Säuren in Benzol verwendet. Die Talcumsäule muß gleichmäßig und nicht zu stark gestampft sein. Die Fluorescenz der adsorbierten Säuren war so stark, daß es nicht notwendig war, die Säule aus dem Rohr auszupressen.

#### Chromatographische Trennung der Säuren über 2, 4-Dinitrophenylhydrazon.

5 g der rohen Säure (Schmp. 215°) wird in 100 cm<sup>3</sup> Alkohol gelöst und zu dieser Lösung 0,2 g 2, 4-Dinitrophenylhydrazin in 20 cm<sup>3</sup> Alkohol gelöst dazugegeben. Diese Lösung wurde 3—4 Minuten am Wasserbade unter Rückfluß erwärmt und nach dieser Zeit in die siedende Lösung 0,5 cm<sup>3</sup> konz. Salzsäure dazugegeben und noch 2 Minuten erwärmt. Die Lösung wird dann in viel Wasser gegossen, filtriert, bis zum farblosen Filtrat gewaschen und an der Luft getrocknet.

250 cm<sup>3</sup> einer 2%igen Benzollösung des Gemisches wird auf aktiviertem Talcum chromatographiert (2,5 × 30). Das Chromatogramm wird noch mit 100 cm<sup>3</sup> Benzol gewaschen. Es besteht aus zwei gelb gefärbten Schichten. Aus dem farblosen Filtrat (etwa 50 cm<sup>3</sup>) wurde die  $\alpha$ -Elemolsäure isoliert.

#### 2, 4-Dinitrophenylhydrazon der $\alpha$ -Elemolsäure.

0,5 g  $\alpha$ -Elemolsäure wurde in 100 cm<sup>3</sup> Alkohol gelöst und 2 Minuten mit einer Lösung von 0,3 g 2, 4-Dinitrophenylhydrazin in 40 cm<sup>3</sup> Alkohol gekocht. Der Lösung wurde dann 0,5 cm<sup>3</sup> konz. Salzsäure zugefügt und nochmals 2 Minuten erwärmt. Die Lösung wurde in viel Wasser gegossen, der abgeschiedene Niederschlag abfiltriert, gewaschen und an der Luft getrocknet. Ohne zu chromatographieren, war das Produkt nicht in kristallinischer Gestalt zu isolieren. Das Rohprodukt wurde deswegen in

Benzin (Sdp. 70—90°) gelöst und auf aktiviertem Aluminiumoxyd ( $2 \times 20$  cm) chromatographiert. Das Chromatogramm enthält zwei Zonen, von welchen die obere intensiv gelb, die untere lichtgelb ist. Die letztere geht beim Eluieren mit Benzin in das Filtrat, in welchem das unveränderte Reagens nachgewiesen wurde. Aus der oberen Zone wird mit Äthylacetat das 2,4-Dinitrophenylhydrazon der  $\alpha$ -Elemmonsäure isoliert. Es kristallisiert aus Äthylacetat in gelben Tafeln und schmilzt bei 208° unter Zersetzung.

Für die Analysen wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

4.770 mg Subst.: 11.95 mg  $\text{CO}_2$ , 3.51 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

3.395 mg Subst.: 0.261  $\text{cm}^3$   $\text{N}_2$  (741 mm, 23.5°).

$\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{O}_6\text{N}_4$  (634.4). Ber. C 68.10, H 7.94, N 8.83.

Gef. „ 68.33, „ 8.24, „ 8.62.