

## DIE GERBSTOFFE DER *ACACIA ARABICA* II. MITT. ISOLIERUNG VERSCHIEDENER POLYHYDROXYPHENOLE AUS DEN FRUCHTSCHOTEN

H. ENDRES und M. HILAL

Max-Planck-Institut für Eiweiss- und Lederforschung, München und aus dem  
National Research Center, Dokki-Cairo

(Received 22 June 1962)

**Zusammenfassung**—Frisch gewonnene Fruchtschoten der *Acacia arabica* wurden aufeinanderfolgend mit Äther, Essigester, Äthanol und Wasser extrahiert. Aus dem Äthanolextrakt, der papierchromatographisch 24 mit Phenolreagentien anfärbbare Substanzen erkennen lässt, konnten durch säulenchromatographische Trennungen an Polyamidpulver und Cellulosepulver Gallussäure, *m*-Digallussäure und Chlorogensäure isoliert werden. Im Wasserextrakt, der drei phenolische Substanzen enthält, wurde Robidandiol (7,3',4',5'-Tetrahydroxy-flavan-3,4-diol) identifiziert.

**Abstract**—Freshly harvested *Acacia arabica* pods are successively extracted with ether, ethyl-acetate, ethanol and water. The ethanol extract, which contained 24 compounds reacting with phenol reagents separable by paper chromatography, was chromatographed on polyamide and cellulose columns and gallic acid, *m*-digallic acid and chlorogenic acid isolated. The aqueous extract contains three phenolic compounds and one of these was identified as robidandiol (7,3',4',5'-tetrahydroxy-flavan-3,4-diol).

Die Früchte der *Acacia arabica* zählen in den afrikanischen Ländern zu den ältesten vegetabilischen Gerbstoffen.<sup>1</sup> Auch in Indien und Pakistan wird die *Acacia arabica*, dort unter dem Namen "babul" bekannt, seit langem zur Herstellung von Leder verwendet. Interessanterweise enthält die afrikanische Pflanze in der Frucht mehr Gerbstoffe als in der Rinde, während es bei der indischen gerade umgekehrt ist. Diese Tatsache dürfte die schon längst vermutete botanische Verschiedenheit der afrikanischen und indischen Acazienarten stützen und für die erstere den Namen *Acacia nilotica* rechtfertigen (vgl. hierzu auch H. El Sissi und A. El Sissi<sup>2</sup>). In einer vorhergehenden Arbeit<sup>3</sup> haben wir im Mai in Oberägypten geerntete Fruchtschoten, die 33 Prozent an Hautpulver adsorbierbare Substanzen enthielten, aufeinanderfolgend mit Äther, Essigester, Äthanol und Wasser extrahiert. Durch zweidimensionale Papierchromatographie konnte gezeigt werden, dass insgesamt 30–35 phenolische Substanzen mit den vier Lösungsmitteln extrahiert wurden. In der Hauptsache handelt es sich bei diesen um kondensierbare Polyhydroxyphenole und kondensierte Gerbstoffe. In der vorliegenden Arbeit haben wir den Alkohol- und Wasserextrakt näher untersucht.

Der Alkoholextrakt enthält 11,2 Prozent an Hautpulver adsorbierbare Substanzen, bezogen auf die Fruchtschoten, also etwa  $\frac{1}{3}$  der gesamtadsorbierbaren Substanzen.<sup>3</sup> Mit den Lösungsmittelgemischen Butanol : Eisessig : Wasser 4 : 1 : 2,5 in der ersten und 2 prozentige Essigsäure in der zweiten Laufrichtung konnte der Extrakt papierchromatographisch in 30 Flecken aufgetrennt werden, von denen 24 mit Phenolreagentien anfärbbar sind. Unter u.v.-Licht zeigten acht Flecken eine schwache Fluoreszenz. Nachdem das Chromatogramm kurze Zeit einer Ammoniakatmosphäre ausgesetzt war, wurden sieben teils rotbraune, teils gelbgrüne Flecken bereits ohne u.v.-Bestrahlung sichtbar. Beim

<sup>1</sup> A. GAMSER, *Ciba Rev.* **81**, 2938 (1950).

<sup>2</sup> H. EL SISSI und A. EL SISSI, *Egypt. J. Chem.* im Druck.

<sup>3</sup> H. ENDRES, H. EL SISSI und M. HILAL, *Egypt. J. Chem.* **2**, 375 (1959).

anschliessenden Bestrahlen mit u.v.-Licht fluoreszierten 17 Flecken gelb, blau oder violett. Beim Besprühen des Chromatogramms mit dem Reagenz nach Folin und Denis<sup>4</sup> färbten sich 20 Flecken blau an. Weitere Chromatogramme wurden mit Bis-diazotiertem Benzidin, mit Eisen (III)—chlorid, mit Vanillin/Salzsäure oder mit *p*-Toluolsulfonsäure besprüht. Mit  $\text{FeCl}_3$  wurden die meisten Substanzen blau angefärbt, lediglich vier zeigten eine grüne Anfärbung. Mit Vanillin/Salzsäure wurden fünf rote Flecken mit *p*-Toluolsulfonsäure, nach Roux und Evelyn<sup>5</sup> typisch für den Nachweis von Flavandiolen, ein roter Fleck sichtbar.

Zur Isolierung einzelner Substanzen haben wir den Alkoholextrakt an einer Polyamidsäule, wie sie von uns<sup>6,7</sup> zur Auftrennung der Polyhydroxyphenole des Fichtenbastes benützt wurde, chromatographiert. Eluiert wurde mit Wasser-Methanol-Gemischen, wobei der Anteil an Methanol kontinuierlich gesteigert wurde. Wir erhielten wie Abb. 1 veranschaulicht, insgesamt 13 Fraktionen, die zusammen 83 Prozent des auf die Säule

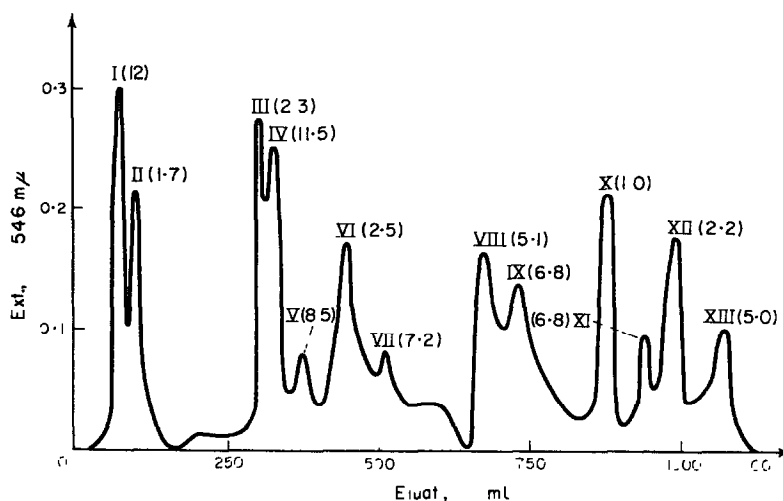


ABB. 1. CHROMATOGRAPHIE DES ÄTHANOLEXTRAKTES AN EINER POLYAMIDSÄULE  
Photometrische Bestimmung nach Folin-Denis; Gradientenelution mit Wasser-Methanol. Die in Klammern angegebenen Zahlen bedeuten die Ausbeuten der einzelnen Fraktionen, bezogen auf die aufgetragene Menge.

gebrachten Materials ausmachten. Weitere 11 Prozent, bei denen es sich jedoch vorwiegend um höher kondensierte Produkte handelte, konnten mit Aceton und Dimethylformamid eluiert werden. Die Ausbeuten der einzelnen Fraktionen sind in Abb. 1 angegeben.

**Fraktion I und II.** Die papierchromatographisch weitgehend identisch waren, enthielten neben der Hauptmenge nicht phenolischer Verbindungen, zwei Substanzen, die mit Eisen (III) chlorid blau anfärbten. Eine Trennung dieser beiden Substanzen voneinander ist bisher noch nicht gelungen. **Fraktion III** liess sich durch zweidimensionale Papierchromatographie in drei phenolische Verbindungen auftrennen, die ebenfalls noch nicht einzeln isoliert werden konnten. **Fraktion IV**, die 11,5 prozent des Alkoholextraktes ausmacht, zeigte papierchromatographisch 4 Flecken. Wir haben diese Fraktion zur weiteren Trennung auf einer Cellulosesäule, wie sie von Vuataz und Mitarb.<sup>8</sup> zur Auftrennung der Polyhy-

<sup>4</sup> O. FOLIN und W. DENIS, *J. Biol. Chem.* **22**, 305 (1915).

<sup>5</sup> D. G. ROUX und S. R. EVELYN, *J. Chromatog.* **1**, 537 (1958).

<sup>6</sup> W. GRASSMANN, H. ENDRES, W. PAUCKNER und H. MATHES, *Chem. Ber.* **90**, 1125 (1957).

<sup>7</sup> H. ENDRES und K. MERKLE, *Chem. Ber.* **94**, 431 (1961).

<sup>8</sup> L. VUATAZ, H. BRANDERBERGER und R. H. EGLI, *J. Chromatog.* **2**, 173 (1959).

dro xyphenole des Tees verwendet wurde, chromatographiert und erhielten vier Fraktionen (Abb. 2), deren Ausbeuten und Farbreaktionen in Tabelle 1 zusammengestellt sind. *Fraktion IV/A* zeigte nur eine sehr schwache phenolische Reaktion und wurde nicht weiter untersucht. Beim Eindampfen der *Fraktion IV/B* fielen feine farblose Nadeln an, die aus Wasser umkristallisiert wurden und bei 238° schmolzen. Die  $R_f$ -Werte der Substanz in mehreren Lösungsmitteln waren mit Gallussäure vergleichbar. Der Mischschmp. von Gallussäure mit *Fraktion IV/B* zeigte keine Depression. Die Ausbeute an Gallussäure bezogen auf *Fraktion IV* betrug 4,5 Prozent, bezogen auf den Alkoholextrakt 0,45 Prozent.

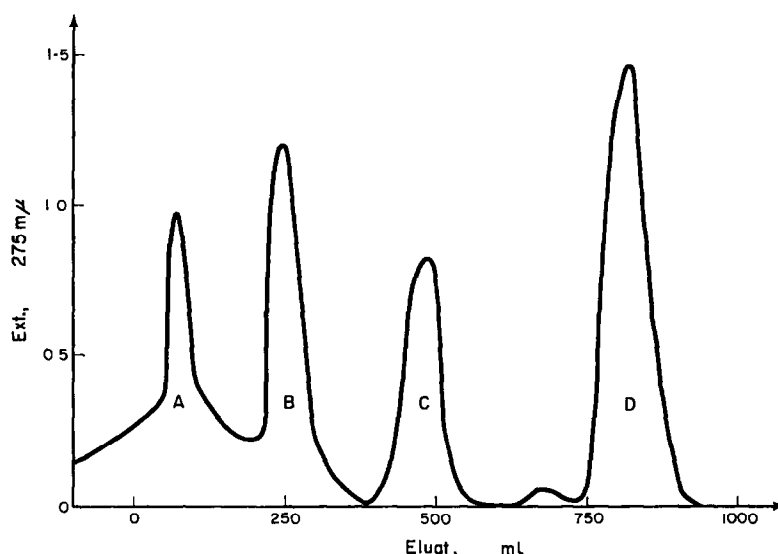


ABB. 2. VERTEILUNGSCROMATOGRAPHIE DER VON DER POLYAMIDSÄULE ERHALTENEN FRAKTION IV AN CELLULOSEPULVER

Eluiert wurde mit den Lösungsmitteln: (I) Propionsäure-äthylester-Petroleumäther (9 : 1) gesättigt mit Wasser. (II) Propionsäure-äthylester gesättigt mit Wasser. (III) Essigsäure-äthylester gesättigt mit Wasser. (IV) Wassergesättigtes Butanol.

Auch *Fraktion IV/C* kristallisierte beim Eindampfen in farblosen Nadeln, die nach Umkristallisation aus einem Wasser-Alkoholgemisch einen Schmp. von 269° zeigten. Die Eisen (III)-chlorid-Reaktion war blau, die  $R_f$ -Werte in mehreren Lösungsmitteln deuteten auf *m*-Digallussäure. Der Mischschmp. von synthetischer *m*-Digallussäure und IV/C ergab keine Depression. Die Ausbeute bezogen auf *Fraktion IV* betrug 6,5 Prozent, bezogen auf den Alkoholextrakt 0,65 Prozent (Tabelle 1).

Die letzte *Fraktion IV/D*, die mit wassergesättigtem Butanol von der Säule eluiert wurde, war hellbraun gefärbt. Nach Reinigung des Eluats mit Kohle wurde eine hellgelbe, amorphe, phenolische Substanz mit einer Ausbeute von 10 Prozent, bezogen auf *Fraktion IV*, erhalten, deren Identifizierung noch nicht abgeschlossen ist. *Fraktion V* der Polyamidsäule (Abb. 1), mit einer Ausbeute von 2,3 Prozent, bezogen auf den Alkoholextrakt, liess sich papierchromatographisch in zwei Substanzen auftrennen, von denen V/A mit Eisen (III) chlorid blau, die andere, V/B, grün angefärbt wird. Eine Trennung der beiden Substanzen an einer Cellulose-Säule blieb ohne Erfolg. Da die Papierchromatographie jedoch eine gute Trennung ergab, wurde sie im präparativen Massstab, wie von Roux und Maihs<sup>9</sup>

<sup>9</sup> D. G. ROUX und E. A. MAIHS, *Biochem. J.* 74, 44 (1960).

beschrieben, durchgeführt. Die Verbindung V/A erwies sich als *m*-Digallussäure, die an der Polyamidsäule schon teilweise mit *Fraktion IV* eluiert wurde. Zur Identifizierung wurden wieder verschiedene Vergleichschromatogramme sowie die Mischschmp.-Bestimmung durchgeführt. Die Ausbeute, bezogen auf den Alkoholextrakt, betrug 0,5 Prozent, so dass insgesamt etwas mehr als 1 Prozent des Alkoholextraktes als *m*-Digallussäure identifiziert werden konnte.

TABELLE 1. AUSBEUTEN UND FARBREAKTIONEN DER AN DER CELLULOSE-SÄULE ERHALTENEN FRAKTIONEN (ABB. 2)

Fraktion No.	Identifiziert als	Ausbeute in %		$R_f$ -Werte i. Lösg.		Farbreaktionen			
		+	++	I	II	Unter u.v.-licht	Nach Ammoniakbehandlg. b. Tageslicht	b. u.v.-licht	1% FeCl <sub>3</sub> Lösg.
A	—	2,5	0,25	—	—	schwach violett	—	blau	grau-blau
B	Gallussäure <i>m</i> -Digallussäure	4,5	0,45	0,56	0,42	—	—	—	blau
C		6,5	0,65	0,60	0,23	schwach violett	—	violett	blau
D	—	10,0	1,00	0,30	0,71	—	—	blau violett	dunkelblau violett

+ Bezogen auf die Auftragsmenge.  
 ++ Bezogen auf den Alkoholextrakt.  
 I 2 prozentige Essigsäure.  
 II Butanol : Eisessig : Wasser 4 : 1 : 2,5.

Die mit Eisen (III) chlorid grün anfärbende Substanz V/B bildete Kristalle, die bei 209° schmolzen. Das u.v.-Spektrum in Äthanol zeigte ein starkes Maximum bei 330 m $\mu$  und wurde durch Zugabe von AlCl<sub>3</sub> und Na-Acetat um 5 m $\mu$  bathochrom verschoben. Spektrum, Schmelzpunkt und  $R_f$ -Werte in verschiedenen Lösungsmitteln waren dieselben wie von Chlorogensäure, dem Ester der Kaffeesäure und Chinasäure. Der Mischschmp. mit authentischem Vergleichsmaterial gab keine Depression. Die weiteren Untersuchungen der durch die Polyamidsäule erhaltenen Fraktionen des Alkoholextraktes sind noch nicht abgeschlossen.

Der Wasserextrakt der *A. arabica* enthält etwa 25 Prozent der in den Fruchtschoten enthaltenen, an Hautpulver adsorbierbaren Substanzen.<sup>3</sup> In der vorhergehenden Mitt.<sup>3</sup> haben wir den Extrakt papierchromatographisch in zwei phenolische Substanzen getrennt. Bei Verwendung der in dieser Arbeit für den Alkoholextrakt benutzten Lösungsmittel wurden drei mit Phenolreagentien anfärbare Flecken sichtbar (Tabelle 2). Die Chromatographie an einer Cellulose-Säule ergab keine Auftrennung. Bei Verwendung der Polyamidsäule konnte lediglich eine der drei Substanzen, allerdings nur in geringen Mengen isoliert werden. Nach dem Papierchromatogramm handelt es sich um die Substanz A der Tabelle 2, färbt also mit Eisen (III) chlorid blau, mit bisdiazotiertem Benzidin rotbraun, mit Vanillin/HCl rot und mit *p*-Toluolsulfonsäure rot an. Der zuletzt genannte Farbttest liess vermuten, dass es sich um ein Flavandiol handeln könnte. Vergleichschromatogramme in mehreren Lösungsmitteln mit verschiedenen Flavandiolen\* ergaben, dass es sich bei A um Robidandiol† (7,3', 4', 5'-Tetrahydroxy-flavan-3,4-diol, "Leuko-robinetinidin"), handeln könnte. Die untersuchte Substanz zeigte wie Robidandiol bei 281 m $\mu$

\* Herrn Prof. Dr. K. FREUDENBERG, Univ. Heidelberg und Herrn Dr. D. G. ROUX, Leather Ind. Res. Inst. Grahamstown, Süd-Afrika, danken wir für die Überlassung der Vergleichssubstanzen.

† Bezüglich der Nomenklatur vgl. K. FREUDENBERG und K. WEINGES, *Tetrahedron* 8, 336 (1960).

ein scharfes Maximum. Zur weiteren Identifizierung haben wir deshalb b und Robidandiol nach einer von Pigman und Mitarb.<sup>10</sup> beschriebenen Methode durch Erhitzen mit Salzsäure in das entsprechende Anthocyanidin übergeführt. Sowohl papierchromatographisch wie u.v.-spektroskopisch waren beide Reaktionspartner gleich.

TABELLE 2. ZWEIDIMENSIONALE PAPIERCHROMATOGRAPHIE DES WASSEREXTRAKTES

	R <sub>F</sub> -Werte i. Lösung*		Farbreaktionen in				
	I	II	1	2	3	4	5
A	0,42	0,58	—	grünblau	rotviolett	rotbraun	rotviolett
a	0,52	0,58	—	blau	violett	violett	violett
B	0,53	0,83	—	blau	—	—	—
C	0,80	0,90	dunkelblau violett	—	—	—	—
D	0,94	0,90	blauviolett	—	—	—	—

\* Lösungsmitteln (I) Eisessig : Ameisensäure : Wasser 6 : 2 : 92; (II) Butanol : Eisessig : Wasser 14 : 1 : 5.

1. Unter u.v.-licht nach der Behandlung mit NH<sub>3</sub>.

2. Mit 1% Eisen (III)-chlorid-Lösung.

3. Mit Vanillin/Salzsäure im sichtbaren Licht und unter u.v.-Licht.

4. Mit *p*-Toluolsulfonsäure.

5. Mit *p*-Toluolsulfonsäure unter u.v.-licht.

Keine Verbindung fluoresziert unter u.v.-Licht. Die Substanzen A, a und B werden mit den Reagens nach Folin und Denis blau, mit diazotiertem Benzidin rotbraun angefärbt.

Die isolierten Substanzen sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Von den bekannteren gerbstoffhaltigen Pflanzen enthalten nach King und White<sup>11</sup> Quebracho (*Schinopsis lorentzii*) und nach D. G. Roux<sup>12</sup> Mimosa (*Acacia mollissima*) freie Gallussäure. *m*-Digallussäure wurde von Cartwright und Roberts<sup>13</sup> im Tee und Chlorogensäure von Roberts<sup>14</sup> ebenfalls im Tee und von King und White<sup>11</sup> in Quebracho nachgewiesen.

Flavandiole, Verbindungen, die dem Catechin nahestehen, sind in den letzten Jahren als Gerbstoffvorstufen immer mehr in den Vordergrund getreten und von Bate-Smith<sup>15</sup> in vielen Pflanzen, die als Gerbstofflieferanten bekannt sind, nachgewiesen worden. Robidandiol, in der angelsächsischen Literatur als Leuco-robinetinidin bekannt, wurde von Roux<sup>16</sup> aus *Acacia mollissima* und Weinges<sup>17</sup> aus *Robinia pseudacacia* isoliert.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Fruchtschoten wurden im Mai 1958 in Quena und Assuan/Oberägypten geerntet und wie in unserer 1. Mitt.<sup>3</sup> beschrieben, aufgearbeitet. Alle Papierchromatogramme wurden aufsteigend auf Schleicher und Schüll-Papier 2043b ausgeführt; die verwendeten Lösungsmittel sind in den Tabellen angegeben. Die Polyamidsäule wurde wie mehrfach beschrieben hergestellt. Verwendet wurde eine Säule von 60 cm Länge und 2 cm Durchmesser, in die 100 g Polyamidpulver (K 288 BM 2, der BASF Ludwigshafen) eingeschlämmt

<sup>10</sup> W. PIGMAN, E. ANDERSON, R. FISCHER, M. A. BUCHANAN und B. L. BROWNING, *Tappi* 36, 4 (1953).

<sup>11</sup> H. G. C. KING und Th. WHITE, *J. Soc. Leather Trades' Chemists* 41, 368 (1957).

<sup>12</sup> D. G. ROUX, *J. Soc. Leather Trades' Chemists* 36, 274 (1952).

<sup>13</sup> R. A. CARTWRIGHT und E. A. H. ROBERTS, *J. Sci. Food Agr.* 5, 593 (1954), vgl. auch *Chem. and Ind.* 1389 (1954).

<sup>14</sup> E. A. H. ROBERTS, *Chemistry of Vegetable Tannins*, Symposium, Croyden, Soc. Leather Trades Chemists (1956).

<sup>15</sup> E. C. BATE-SMITH, *J. Exp. Bot.* 4, 1 (1952).

<sup>16</sup> D. G. ROUX, *Nature* 180, 973 (1957); *J. Soc. Leather Trades' Chemists* 41, 275 (1957); vgl. auch D. G. ROUX und S. R. EVELYN, *Biochem. J.* 69, 530 (1958).

<sup>17</sup> K. WEINGES, *Liebigs Ann.* 615, 203 (1958).

wurden. Aufgetragen wurden 2 g des Äthanolextraktes, gelöst in Wasser. Eluiert wurde mit den in der Abb. 1 angegebenen Lösungsmitteln. Die einzelnen Fraktionen wurden in einem Fraktionssammler aufgefangen und mit dem Reagenz nach Folin und Denis<sup>4</sup> getestet.

Die Chromatographie an der Cellulose-Säule wurde wie von Vuataz und Mitarb.<sup>8</sup> beschrieben, durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel, sowie der Test auf die einzelnen Fraktionen sind in Abb. 2 angegeben.

Für die präparative papierchromatographische Trennung der *Fraktion V* wurde die von Roux und Maihs<sup>9</sup> beschriebene Technik angewendet.