

## 67. Wolfgang Graßmann, Gundolf Stiefenhofer<sup>1)</sup> und Horst Endres: Über Sumachtannin, einen neuen Typus der Tanningerbstoffe

[Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, Regensburg]

(Eingegangen am 18. November 1955)

Herrn Professor Dr. K. Freudenberg zum 70. Geburtstag gewidmet

Der acetontlösliche Anteil des Gerbstoffes aus sizilianischem Sumach und Hirschkolbensumach läßt sich elektrophoretisch sowie durch Ausschütteln mit Essigester bei neutraler und saurer Reaktion in eine saure Komponente (Gerbstoffsäure) und eine neutrale Komponente (Gerbstoffphenol) zerlegen. Beide Komponenten liefern bei der Säurehydrolyse neben Gallussäure als Zuckerkomponenten Glucose, Arabinose und Rhamnose; als Zwischenprodukt kann *m*-Digallussäure chromatographisch nachgewiesen werden. Bei der alkalischen Spaltung des Methylotannins kann die Zuckerkomponente in Form eines Tetrasaccharids aus 2 Moll. Glucose, 1 Mol. Rhamnose und 1 Mol. Arabinose isoliert werden. Das molekulare Verhältnis zwischen Gallussäure und Digallussäure in Methylotannin wurde gleich 2:1 bestimmt.

Der Gerbstoff der Sumachpflanze gilt seit langem als eines der edelsten pflanzlichen Gerbmittel. Er liefert bei der Hydrolyse Gallussäure und Zucker und gehört demnach zu den Tanninen<sup>2)</sup>.

Praktische Bedeutung hat bisher vorwiegend der sizilianische Sumach (*rhus coriaria*) gefunden. Sein Anbau ist der ausgesprochenen Frostempfindlichkeit wegen auf Mittelmeerklima, derjenige des etwas frosthärteren *rhus cotinus* (Perückenbaum) auf Kastanien- und Weinbauklima beschränkt. Dagegen können der sogenannte weiße Sumach (*rhus glabra*) und der Hirschkolbensumach (*rhus typhina*, auch *rhus hirta* genannt), von denen der letztere seit langem in unseren Gärten als Zierpflanze gedeiht, unter den Klimaverhältnissen der nördlichen gemäßigten Zone als fast vollkommen winterhart gelten. Anbauversuche, die in der Vorkriegszeit und während des letzten Kriegs in Rußland<sup>3)</sup>, der Tschechoslowakei<sup>4)</sup>, in den Vereinigten Staaten<sup>5)</sup> und in Deutschland<sup>6)</sup> durchgeführt wurden, verliefen über Erwarten positiv. In umfangreichen Anbau- und Ausleseversuchen, die von unserem Institut gemeinsam mit dem Forstbotanischen Institut in Tharandt (Prof. Dr. B. Huber) durchgeführt wurden, waren Gerbstoffgehalte der Blätter bis zu 40% häufig, wobei eine bestimmte Herkunft mit 48% Gerbstoffgehalt den weitaus höchsten, bisher in der gemäßigten Zone bekannten Gerbstoffgehalt lieferte<sup>6)</sup>.

<sup>1)</sup> Dissertat., Universität München, 1956.

<sup>2)</sup> Stenhouse, J. chem. Soc. [London] 11, 401 [1861]; Liebig's Ann. Chem. 45, 11 [1843]; Löwe, Z. analyt. Chem. 12, 128 [1873]; E. Strauß u. B. Gschwendner, Z. angew. Chem. 19, 1124 [1906].

<sup>3)</sup> J. Ja. Lokschin, Westnik Koshewnoi, Promyschlenosti i Torgowli 1930, 254 bis 259; 1930, 110–114; E. Botschek, Westnik Koshewnoi Promyschlenosti i Torgowli 1931, 91–95. <sup>4)</sup> V. Němec, Collegium [Darmstadt] 1937, 152.

<sup>5)</sup> R. W. Frey u. A. F. Sievers, J. Amer. Leather Chemists Assoc. 35, 647 [1940]; A. F. Sievers u. J. D. Clarke, ebenda 39, 293 [1944]; J. D. Clarke u. H. Hopp, ebenda 40, 363 [1945].

<sup>6)</sup> W. Graßmann, B. Huber, W. Kuntara u. O. E. Endisch, Leder 1950, 214; vergl. auch W. Graßmann, Ber. d. Reichsamtes f. Wirtschaftsausbau 1942, 779; B. Huber, Forstwiss. Cbl. Tharandt forstl. Jb. (Kriegsgemeinschaftsausgabe) 1944, 40; W. Graßmann, B. Huber, W. Kuntara u. O. Endisch, Der Deutsche Forstwirt 71/72 v. 8. 9. 1944. W. Graßmann u. B. Huber, Allg. Forstzeitschr. 13/14 [1948]; W. Graßmann, Colloquiumsber. Inst. Gerbereichem. Techn. Hochschule Darmstadt, Heft 3, S. 59 [1948]; W. Graßmann u. J. Trupke, Leder 1950, 222.

Über die chemische Natur des Gerbstoffes von *Rhus coriaria* war bisher wenig, über diejenige des Hirschkolbensumachs nichts bekannt geworden. Erst in jüngerer Zeit haben sich W. Münz<sup>7)</sup> sowie G. N. Catravas und K. S. Kirby<sup>8)</sup> mit der Untersuchung des aus dem sizilianischen Sumach erhaltenen Gerbstoffes befaßt. Nach Spaltung mit Mineralsäuren und mit Tannase wurden Glucose und Gallussäure, in den Versuchen von Münz auch *m*-Digallussäure als Spaltstücke sichergestellt und quantitativ bestimmt. In Anlehnung an Catravas und Kirby<sup>8)</sup> haben wir das Blattmaterial einer Vorextraktion mit Chloroform (zur Entfernung des Chlorophylls) sowie mit Äther unterworfen. Durch darauffolgende Extraktion mit Aceton wird ein erheblicher Teil des Gerbstoffes in Lösung gebracht. Der in dem Blattmaterial zurückbleibende acetonunlösliche Teil ist von uns zunächst nicht untersucht worden. Das acetonlösliche Rohprodukt, dessen Reingerbstoffgehalt bei etwa 70 % gelegen ist (Anteilzahl 71.1), erweist sich bei elektrophoretischer Untersuchung als Mischung einer anionischen und einer neutralen Komponente. Wir haben deshalb den Acetonextrakt durch aufeinanderfolgendes Ausschütteln mit Essigester bei  $p_H$  7 und  $p_H$  3.5 in die beiden Komponenten zerlegt, die wir als Gerbstoffphenol und Gerbstoffsäure bezeichnen wollen. Bei erneuter elektrophoretischer Untersuchung erwies sich das Gerbstoffphenol als frei von der anionisch wandernden Komponente, während die Gerbstoffsäure sich wiederum in beide Komponenten aufteilen ließ. Dieses Ergebnis überrascht, nachdem die Ausschüttelung bei  $p_H$  7 zu einem scharfen Endpunkt geführt hatte. Die Beziehung zwischen Gerbstoffphenol und Gerbstoffsäure, die sich in ihrer Zusammensetzung außerordentlich nahestehen, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Eine analoge Auftrennung in Gerbstoffphenol und Gerbstoffsäure kann auch bei den Gerbstoffen des sizilianischen Sumachs und beim chinesischen Tannin durchgeführt werden. Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen sind am Gerbstoff des Hirschkolben-Sumachs, und zwar hauptsächlich am Gerbstoffphenol durchgeführt.

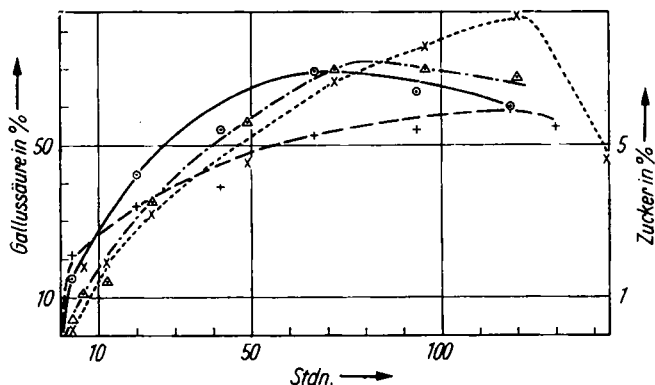
Gerbstoffphenol und Gerbstoffsäure erweisen sich mit Anteilzahlen von 96.2 und 91.5 als weitgehend frei von Nichtgerbstoffen. Nach weiterer Reinigung mit Bleiacetat stiegen die Anteilzahlen auf 96.8 bzw. 94.6 an. Die papierchromatographische Prüfung von Rohgerbstoffphenol und Rohgerbstoffsäure zeigt, daß beide Stoffe mit annähernd gleichem  $R_F$ -Wert wandern, wobei der Fleck des Rohgerbstoffphenols weitgehend einheitlich erscheint, während derjenige der Rohgerbstoffsäure stark in die Länge gezogen ist. Freier Zucker ist in den so gereinigten Präparaten nicht enthalten.

Bei der Hydrolyse mit 2.5-proz. Schwefelsäure beträgt die Ausbeute an Gallussäure beim Gerbstoffphenol im Maximum etwa 70 %, bei der Gerbstoffsäure im Maximum etwa 60 %, diejenige an Zucker 7.3 bzw. 8.3 %. Bei längerer Hydrolysendauer fallen sowohl die Werte für Gallussäure wie für Zucker

<sup>7)</sup> Collegium [Darmstadt] 1929, 506.

<sup>8)</sup> J. Amer. Leather Chemists Assoc. 32, 155 [1948].

wieder ab<sup>9)</sup> (Abbild. 1). Als Zwischenprodukte bei der Säurehydrolyse zeigt die chromatographische Untersuchung *m*-Digallussäure, die mit etwas höherem  $R_F$ -Wert als Gallussäure wandert, sowie eine Anzahl von Flecken mit wesentlich geringerem  $R_F$ -Wert, bei denen es sich um verschiedene unvollständige galloylierte Zucker handeln dürfte.



Abbild. 1. Hydrolyse von Gerbstoffphenol und Gerbstoffsäure mit 2.5-proz. Schwefelsäure bei 100°. Bestimmung von Zucker und Gallussäure nach verschiedenen Zeiten. Gerbstoffphenol:  $\Delta$ — $\Delta$  Zucker,  $\circ$ — $\circ$  Gallussäure; Gerbstoffsäure: +—+—+ Zucker, +—+—+ Gallussäure

Die chromatographische Trennung der bei der Säurehydrolyse von Gerbstoffphenol und Gerbstoffsäure freigesetzten Zucker führte überraschenderweise neben Glucose auch zu Rhamnose und Arabinose, die durch chromatographischen Vergleich in mehreren Lösungsmittelsystemen identifiziert wurden.

Das gleiche Ergebnis wurde mit sizilianischem Sumach erhalten, während die Hydrolyse des chinesischen Tannins in Übereinstimmung mit den Befunden von Emil Fischer nur Glucose lieferte.

Nach den bisher mitgeteilten Ergebnissen könnte es sich im Sumachtannin um ein Gemisch eines Glucose-, Rhamnose- und Arabinose-Tannins handeln. Da Arabinose und Rhamnose sich von der Glucose durch einen Mindergehalt von einer, im Tannin vermutlich mit Gallussäure veresterten Hydroxygruppe unterscheiden, ist diese Annahme im Hinblick auf die festgestellte weitgehend chromatographische Einheitlichkeit des Gerbstoffphenols nicht sehr wahrscheinlich. Eine andere Möglichkeit ist die, daß die genannten Zucker schon im Tannin in Form eines Oligosaccharids vorliegen. Die folgenden Versuche entscheiden zu Gunsten der letzteren Möglichkeit.

Da bei der erforderlichen langen Dauer der Säurehydrolyse weder die Kohlenhydratkomponenten<sup>10)</sup> noch die Gallussäure quantitativ erfaßt werden

<sup>9)</sup> Vergl. dazu K. Freudenberg, *Chemie d. natürl. Gerbstoffe*, Verlag Julius Springer (Berlin) 1920, S. 40.

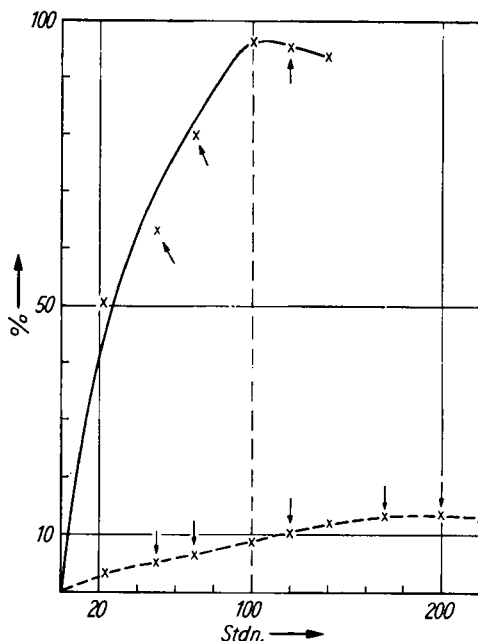
<sup>10)</sup> Vergl. dazu u. a. auch O. Th. Schmidt u. R. Lademann, *Liebigs Ann. Chem.* **569**, 149 [1950]; E. Fischer u. K. Freudenberg, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **45**, 925 [1912]; E. Fischer u. M. Bergmann, *ebenda* **51**, 316 [1918]; K. Freudenberg, *ebenda* **52**, 1242 [1919].

können<sup>9)</sup>), haben wir die enzymatische Spaltung mit Tannase, die nach einer Vorschrift von K. Freudenberg und E. Vollbrecht<sup>11)</sup> hergestellt wurde, herangezogen. Nach Tannasespaltung des Gerbstoffphenols konnten mittels der quantitativen Bestimmungsmethoden nach D. G. Roux<sup>12)</sup> 94.8 % Gallussäure sowie nach der Methode von H. C. Hagedorn und B. N. Jensen<sup>13)</sup> 13.6 % Kohlenhydrate, berechnet auf Glucose, bestimmt werden. Die Abspaltung der Gallussäure erfolgt dabei wesentlich rascher als die Freisetzung des reduzierenden Zuckers (Abbild. 2). Nach vollständiger Abspaltung der Gallussäure entspricht das Reduktionsvermögen erst 8.5 % Zucker (in Übereinstimmung mit den Angaben von Münz<sup>7)</sup> sowie Catravas und Kirby<sup>8)</sup>), steigt aber nach einer weiteren Hydrolysendauer von 3–4 Tagen auf den oben erwähnten Endwert. Eine im Zeitpunkt der beendigten Gallussäureabspaltung vorgenommene chromatographische Untersuchung läßt neben Gallussäure, Glucose und Rhamnose einen weiteren Zucker erkennen, der wegen seines geringen  $R_F$ -Wertes als Di- oder Trisaccharid anzusprechen ist (Abbild. 3).

Einen gleichen Versuch haben wir wieder mit sizilianischem Sumach durchgeführt.

Auch hier finden wir nach Einwirkung von Tannase einen Fleck, dessen  $R_F$ -Wert geringer als der der Glucose ist. Daß trotzdem bei weiterer Einwirkung von Tannase auch die von uns vermuteten Glykosidbindungen gespalten werden, beruht auf dem Gehalt von Glucosidase im Tannasepräparat<sup>11)</sup>; ferner ist nach den Beobachtungen von K. Noak<sup>14)</sup> noch mit einem Rhamnoside spaltenden Enzym zu rechnen.

Die Vermutung, daß im Sumachtannin ein Oligosaccharid vorliegt, konnte durch alkalische Hydrolyse des methylierten Tannins bestätigt werden. Die



Abbild. 2. Spaltung des Gerbstoffphenols mit Tannase; ——— abgespaltene Gallussäure, ---- abgespaltener Zucker. Die Abbildung veranschaulicht den Zuckergehalt beim Höchstwert an abgespaltener Gallussäure. Die Pfeile bedeuten neuer Zusatz von Tannase

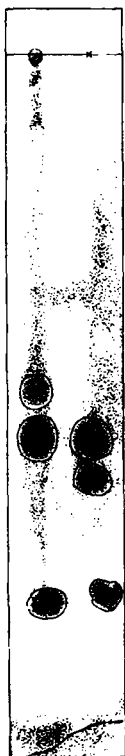
<sup>11)</sup> Collegium [Darmstadt] 1921, 468 u. 1927, 398.

<sup>12)</sup> J. Soc. Leather Trades' Chemists 35, 322 [1951].

<sup>13)</sup> Biochem. Z. 135, 46 [1922]; 137, 92 [1923]; vergl. P. Rona, Prakt. d. physiol. Chem., 1. Teil, S. 153, Verlag Julius Springer (Berlin) (1926).

<sup>14)</sup> Z. Bot. 13, 179 [1921].

Umsetzung des Gerbstoffphenols mit Diazomethan<sup>15)</sup> erfolgt ziemlich schwer und führt bei der ersten Methylierung zu einem Methoxylgehalt von 15 %. Erst nach viermaligem Nachmethylieren wird ein Methoxylgehalt von 37,7 % erreicht, der bei weiterer Methylierung nicht mehr zunimmt. Aus diesem Grund



Abbild. 3. Chromatographische Untersuchung des beim Höchstwert an Gallussäure abgebrochenen Tannasehydrolysats. Links Vergleichssubstanzen (Glucose, Arabinose, Rhamnose), rechts Hydrolysat



Abbild. 4. Chromatographische Untersuchung des Oligosaccharids, das durch alkalischen Abbau des Methylotannins gewonnen wird. Rechts Vergleichssubstanzen (Glucose, Arabinose, Rhamnose), links Abbauprodukt



Abbild. 5. Totalhydrolyse des aus Methylotannin gewonnenen Oligosaccharids. Links Vergleichssubstanzen (Glucose, Arabinose, Rhamnose), rechts Hydrolysat

sind die Angaben von Münz<sup>7)</sup> sowie Catravas und Kirby<sup>8)</sup> über das Vorliegen freier Zuckerhydroxyle mit Vorsicht aufzunehmen. Eine Zerewitinoff-Bestimmung unseres vollständig methylierten Produkts verlief negativ.

Nach Verseifung des Methylotannins mit methanolischer Kalilauge bei Zimmertemperatur und Abtrennung der methylierten Gallussäuren läßt sich die Zuckerkomponente chromatographisch in Form einer Substanz mit dem sehr niedrigen  $R_F$ -Wert von 0,07 isolieren (Abbild. 4). Die Säurehydrolyse dieser Substanz liefert Glucose, Rhamnose und Arabinose (Abbild. 5).

<sup>15)</sup> Vergl. K. Freudenberg, *Chemie d. natürl. Gerbstoffe* 1920, S. 58.

Durch quantitative Bestimmung der drei Zucker mit Triphenyltetrazoliumchlorid<sup>16)</sup> nach papierchromatographischer Trennung und Elution wurden in zwei Versuchen das molekulare Verhältnis Glucose:Arabinose:Rhamnose zu 1.97:1.11 bzw. 1.86:1:1.07 gefunden. Es handelt sich also um ein Tetrasaccharid aus 2 Moll. Glucose, 1 Mol. Arabinose und 1 Mol. Rhamnose, dessen genauere Konstitution in weiteren Untersuchungen festgestellt werden soll.

Die alkalische Hydrolyse des methylierten Tannins bietet gleichzeitig einen gangbaren Weg zur quantitativen Bestimmung der Spaltprodukte Trimethylgallussäure und Dimethylgallussäure und damit zur Ermittlung des Verhältnisses Gallussäure zu *m*-Digallussäure im ursprünglichen Tannin. Das Gemisch aus Trimethyl- und Dimethylgallussäure, welches aus dem Hydrolysat durch Ansäuern und Ausäthern gewonnen wird, hat Münz<sup>7)</sup> in Anlehnung an entsprechende Versuche von E. Fischer und K. Freudenberg<sup>17)</sup> durch Ausschütteln mit einer Mischung von Tetrachlorkohlenstoff und Chloroform präparativ getrennt. Für den Zweck einer quantitativen Bestimmung mit kleinen Mengen haben wir eine andere Methode ausgearbeitet, bei der die Summe der Säuren alkalimetrisch, die vorhandene Dimethylgallussäure photometrisch mit dem Phosphormolybdänsäurereagens von O. Folin, W. Denis<sup>18a)</sup> und F. F. Tisdall<sup>18b)</sup> bestimmt wird. In Testanalysen konnten auf diese Weise sehr genaue Werte erhalten werden.

Wie aus Tafel 1 ersichtlich, kommt auf 3.3 Moll. Trimethylgallussäure 1 Mol. Dimethylgallussäure. Das molare Verhältnis zwischen Gallussäure und Digallussäure im Gerbstoffphenol des Hirschkolbensumachs ergibt sich demnach zu 2:1.

Tafel 1. Quantitative Bestimmung von Trimethyl- und Dimethylgallussäure im Methylotannin

Einwaage an Methylotannin (g)	Ausbeute in % an		a + b (%)	a:b (Mol.-Verh.)
	a) Trimethylgallussäure	b) Dimethylgallussäure		
1.0	67.2	19.6	86.8	3.2:1
0.1	69.87	19.1	88.97	3.4:1

Ein Tetrasaccharid aus 2 Moll. Glucose, 1 Mol. Rhamnose und 1 Mol. Arabinose besitzt 12 freie Hydroxygruppen. Wenn davon, entsprechend dem ermittelten Zahlenverhältnis, 8 mit Gallussäure und 4 mit Digallussäure verestert sind, dann errechnen sich für das vollständig methylierte Tannin (C<sub>179</sub>H<sub>191</sub>O<sub>83</sub>; 44 Methoxygruppen) folgende Analysenzahlen, die den experimentell gefundenen Werten gegenübergestellt sind.

<sup>16)</sup> Vergl. E. G. Fischer u. H. Dörfel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **297**, 164 [1954]; K. Wallenfels, Naturwissenschaften **37**, 491 [1950].

<sup>17)</sup> E. Fischer u. K. Freudenberg, Ber. dtsh. chem. Ges. **47**, 2498 [1914]; E. Fischer, Untersuchungen über Depside u. Gerbstoffe (Julius Springer Verlag, Berlin 1919), S. 343.

<sup>18)</sup> a) J. biol. Chemistry **22**, 305, 309 [1915]; b) **44**, 409 [1920].

	Ber. %	Gef. %
C .....	58.72	58.69
H .....	5.16	5.46
OCH <sub>3</sub> .....	37.09	37.80
Trimethylgallussäure .	69.1	68.5
Dimethylgallussäure .	21.5	19.4

### Beschreibung der Versuche

1. Gewinnung des acetonlöslichen Rohgerbstoffphenols: (Da die Arbeit von Catravas und Kirby<sup>8</sup>) keine experimentellen Angaben enthält, sei der Gang der Gewinnung kurz umrissen.) 45 g in der Schlagkreuzmühle fein zermahlene Sumachblätter wurden im Soxhlet mit wasserfreiem Chloroform extrahiert. Im UV-Licht ließ sich die restlose Entfernung des Chlorophylls leicht erkennen. Extraktionsrückstand 86%. Der Extraktionsrückstand wurde weitere 2 Tage mit absol. Äther extrahiert. Im Ätherextrakt setzte sich eine braune zähflüssige Masse ab, die getrocknet ein gelblichgrünes Pulver ergab. Das so vorextrahierte Material (36 g) wurde anschließend 2 Tage mit heißem Aceton ausgezogen, das Aceton i. Vak. verjagt und der Rückstand (3.8 g, Anteilzahl 71.1) pulverisiert. Der Extraktionsrückstand (31.9 g) wurde noch mit Wasser extrahiert. Es konnten nochmals 3.8 g (11.5%) acetonunlöslicher Gerbstoff nachgewiesen werden.

Um eine mögliche sekundäre Veränderung der Gerbstoffe auszuschließen, wurden sämtliche Extraktionen in einer Kohlendioxyd-Atmosphäre, welche etwas Schwefeldioxyd enthielt, durchgeführt.

2. Elektrophoretische Untersuchungen: Die Elektrophoresen wurden ausgeführt in der kontinuierlich arbeitenden Apparatur „Elphor V“ von W. Graßmann und K. Hannig<sup>19</sup>). Verwendet wurde eine 0.5-proz. wäßrige Lösung des Acetonextraktes, als Puffer diente eine 0.1 m Natriumacetat-Essigsäurelösung ( $p_H$  4.5). Die Elektrophorese wurde auf Schleicher & Schüll-Papier 2043b durchgeführt. Die angelegte Spannung betrug 150 V Gleichstrom, die Stromstärke ca. 100 mA. Besprüht wurde das Pherogramm mit 1-proz. Eisenalaunlösung. Auf gleiche Art wurde die Elektrophorese des Rohgerbstoffphenols und der Rohgerbstoffsäure ausgeführt.

3. Trennung des Acetonextraktes in Rohgerbstoffphenol und Rohgerbstoffsäure: Eine konz. wäßrige Lösung des Acetonextrakts wurde zentrifugiert und solange mit festem Natriumhydrogencarbonat versetzt, bis ein Tropfen, mit Wasser verdünnt, bei der Tüpfelprobe nur noch ganz schwach sauer ( $p_H$  6.8) reagierte. Es wurde mit Essigester solange ausgeschüttelt, bis das Lösungsmittel keine Substanz mehr aus der wässrigen Phase aufnahm. Der Essigester wurde i. Vak. bei 50° Wasserbadtemperatur bis zur Trockene abdestilliert. Als Rückstand verblieb eine gelbe Substanz (Rohgerbstoffphenol, Anteilzahl 96.2). Die vom Essigester abgetrennte wässrige Lösung wurde mit verd. Salzsäure auf  $p_H$  3.5 gebracht und wiederum mit Essigester erschöpfend ausgeschüttelt. Durch Abdampfen des Essigesters wurde eine braune Substanz (sog. Rohgerbstoffsäure, Anteilzahl 92.7) erhalten.

In Tafel 2 sind die in verschiedenen Versuchen aus Sumachtannin und chinesischem Tannin erhaltenen Ausbeuten an Gerbstoffphenol und Gerbstoffsäure wiedergegeben.

4. Nach Reinigung der beiden Gerbstoffkomponenten über die Bleiverbindung<sup>10,20</sup>) wurden Gerbstoffphenol (Anteilzahl 96.8) als gelbliches Pulver, Gerbstoffsäure (Anteilzahl 94.26) als braunes Pulver in 70-proz. Ausbeute erhalten.

Die Gerbstoffanalysen wurden nach der Halbmikromethode von W. Graßmann und Mitarbb.<sup>21</sup>) durchgeführt.

<sup>19</sup>) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 292, 32 [1953].

<sup>20</sup>) A. Küntzel, Gerbereicheim. Taschenbuch, Verlag Th. Steinkopf, 5. Aufl., S. 176.

<sup>21</sup>) W. Graßmann, O. Endisch u. W. Kuntara, Leder 1951, 202.

Tafel 2. Aus Sumachtannin und chinesischem Tannin erhaltene Ausbeuten an Gerbstoffphenol und Gerbstoffsäure

	Eingewogene Menge an Acetonextrakt	Ausb. an Rohgerbstoff- phenol (a)	Ausb. an Rohgerbstoff- säure (b)	a + b in % d. Ein- waage
Hirschkolben- sumach 1. Aufarb.	8.9 g	5.0 g	1.0 g	67.4%
2. Aufarb.	9.5 g	4.4 g	1.7 g	64.2%
3. Aufarb.	18.4 g	10.6 g	2.0 g	68.5%
Sizilianischer Sumach	12.4 g	7.0 g	1.65 g	62.3%
Chinesisches Gallotannin	43.0 g <sup>*)</sup>	19.5 g	8.8 g	65.8%

<sup>\*)</sup> Firma Merck Darmstadt.

Die papierchromatographische Untersuchung des Rohgerbstoffphenols und der Rohgerbstoffsäure wurde aufsteigend auf Schleicher & Schüll-Papier 2043b in *n*-Butanol, Eisessig, Wasser (4:1:5) ausgeführt. Entwickelt wurde mit 1-proz. Eisenalaunlösung.

5. Abspaltung und Bestimmung von Zucker und Gallussäure nach Hydrolyse mit 2.5-proz. Schwefelsäure: 500 mg Gerbstoffphenol (bzw. Gerbstoffsäure) wurden in 100 ccm 2.5-proz. Schwefelsäure am kochenden Wasserbad hydrolysiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben mit Bleiacetat<sup>22)</sup> entgerbt und in der Restlösung der abgespaltene Zucker nach der Methode von Hagedorn-Jensen<sup>13)</sup> bestimmt.

Die quantitative Bestimmung der Gallussäure wurde kolorimetrisch mit dem Leitz-Photometer „Leifo“ und Farbfilter 445 m $\mu$  nach der von Roux<sup>12)</sup> beschriebenen Methode durchgeführt. Aus dem schwefelsauren Hydrolysat wurden jeweils nach verschiedenen Zeiten 5 ccm Lösung entnommen und die Schwefelsäure mit der ber. Menge Bariumhydroxyd genau neutralisiert. Das Bariumsulfat wurde durch ein trockenes Filter abfiltriert und eine gemessene Menge des Filtrates aufgefangen. Zu dieser Lösung wurden zur Entfernung des unveränderten Tannins 1 ccm 0.5-proz. Gelatinelösung zugegeben und 15 Min. stehengelassen. Der Gerbstoff fiel aus, während Gallussäure in Lösung blieb. Es wurde wieder abfiltriert und eine abgemessene Menge an Filtrat aufgefangen. Von dieser so erhaltenen klaren Lösung wurden jeweils 0.5 ccm für die kolorimetrische Bestimmung verwendet (Abbild. 1).

6. Enzymatische Spaltung des Gerbstoffphenols mit Tannase: Bei der Herstellung der Tannase, die nach Freudenberg und Vollbrecht<sup>14)</sup> hergestellt wurde, ist darauf zu achten, daß Luft ungehindert zu den Kulturen des *Asparagillus niger* Zutreten kann, ferner, daß das Einengen der enzymhaltigen Lösung im Kohlendioxyd-Strom stattfindet.

166.6 mg Gerbstoffphenol (über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei 60° getrocknet) wurden in Wasser gelöst, 0.17 ccm Toluol und 22 mg Tannase vom Spaltwert 47 zugegeben und auf 50 ccm mit Wasser aufgefüllt. (Die angewandte Tannasemenge richtet sich jeweils nach dem Spaltwert des Präparates.) Die Hydrolyse erfolgte bei 33°, die Bestimmung von Gallussäure und Zucker ist die gleiche wie schon oben beschrieben (Abbild. 2).

<sup>22)</sup> A. Küntzel, Gerbereicheim. Taschenbuch, Verlag Th. Steinkopf, 5. Aufl. S. 177.



7. Darstellung von Methylotannin aus Gerbstoffphenol: 5 g Tannin wurden nach der von Freudenberg<sup>15)</sup> angegebenen Vorschrift mit Diazomethan methyliert. Die erste Methylierung führte zu einem Methoxylgehalt von 15%. Die Methylierung wurde viermal wiederholt und so ein Methoxylgehalt von 37.8% erreicht. Bei einer fünften Methylierung wurde dieser Prozentsatz nicht gesteigert.

Analyse des Methylotannins: C 58.69%; H 5.46%.

8. Alkalische Hydrolyse des Methylotannins mit Abtrennung von Trimethyl- und Dimethylgallussäure: 1 g Methylotannin wurde nach Fischer und Freudenberg<sup>17)</sup> mit 12-proz. methanol. Kalilauge bei Zimmertemperatur hydrolysiert. Durch verd. Schwefelsäure wurde der größte Teil der Dimethyl- und Trimethylgallussäure ausgefällt. Der Rest wurde durch 6stdg. Ausäthern der Mutterlauge in einem Schacherl-Perkolator gewonnen. Der Äther wurde verjagt und der Rückstand mit der Hauptmasse vereinigt.

9. Bestimmung der Trimethyl- und Dimethylgallussäure im Gemisch: Das aus 1 g Methylotannin durch alkalische Spaltung erhaltene Gemisch von Trimethyl- und Dimethylgallussäure wurde in 100 ccm Alkohol gelöst. 0.25 ccm dieser Lösung wurden mit den von Folin und Mitarbb.<sup>18a)</sup> angegebenen Reagenzien versetzt und mit Wasser auf 50 ccm aufgefüllt. Die kolorimetrische Bestimmung mit einem Filter von Hg 546 m $\mu$  ergab unter Verwendung einer mit reiner Dimethylgallussäure erhaltenen Eichkurve 0.49 mg, das sind umgerechnet auf die Einwaage 196.0 mg = 0.9898 mMol Dimethylgallussäure (19.6% bezogen auf Methylotannin).

Zur Titration der Gesamtsäure wurden 5 ccm der alkohol. Lösung verwendet. Verbrauch an  $n/100$  NaOH 21.3 ccm, umgerechnet auf Einwaage 426 ccm, entspr. 4.26 mMol. Aus der Differenz der Molzahlen (unter Berücksichtigung des aus Testanalysen gefundenen Fehlbetrages von 10% an Dimethylgallussäure) ergibt sich 3.172 mMol, entspr. 672.4 mg Trimethylgallussäure (67.2%).

In einer Parallelbestimmung wurden 100 mg Methylotannin alkalisch gespalten und der Prozentsatz an Dimethyl- und Trimethylgallussäure bestimmt.

Ausbeuten: 69.87 mg Trimethylgallussäure = 69.87% d. Einwaage

19.06 mg Dimethylgallussäure = 19.1 % d. Einwaage

10. Isolierung und Hydrolyse der Zuckerkomponenten aus dem alkalischen Abbau des methylierten Tannins: In einem 2. Versuch mit 480.9 mg Methylotannin wurde wie oben alkalisch gespalten, ausgeäthert und die saure, zuckerhaltige Lösung auf ca. 2 ccm eingeeengt, abfiltriert und zur weiteren Reinigung von eingeschleppten anorganischen Salzen die im elektrischen Felde nicht wandernden Zucker durch Elektrophorese gereinigt<sup>23)</sup>. Als Pufferlösung diente hierbei 1 *n* Essigsäure, als Papier wurde Schleicher & Schüll 2043 b verwendet.

Die abgetrennte, gereinigte, zuckerhaltige Lösung wurde zur Entfernung der Essigsäure gefriergetrocknet, der Rückstand in 2 ccm Wasser gelöst und 0.01 ccm chromatographiert (Abbild. 4).

Nach Entwickeln mit Anilinthalat wird ein einziger Fleck (Abbild. 4) mit einem  $R_F$ -Wert von 0.081 erhalten.

Von dieser Lösung wurden 0.02 bzw. 0.03 ccm in *n*-Butanol-Pyridin-Wasser auf Schleicher & Schüll-Papier chromatographiert, die Zucker nach Fischer und Dörfel<sup>16)</sup> mit TTC besprüht und quantitativ bestimmt.

Ausbeute: Glucose 85  $\gamma$  (bzw. 124); Arabinose 36  $\gamma$  (bzw. 55); Rhamnose 43.5  $\gamma$  (bzw. 64); bezogen auf die Einwaage ergeben sich Glucose 4.4%; Arabinose 1.9%; Rhamnose 2.27%, bezogen auf Methylotannin.

<sup>23)</sup> Vergl. dazu W. Graßmann, K. Hannig u. M. Plöckl, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 299, 258 [1955].