

2.4.6-Trimethyl-D-galaktose: Die wäßrige, mit Chloroform ausgeschüttelte Perjodat-Oxydationslösung wurde mit 300 mg Bariumacetat (in wenig Wasser gelöst) versetzt. Der entstehende Niederschlag wurde abzentrifugiert, zweimal mit Wasser gewaschen und verworfen. Sodann brachte man mit NaHCO_3 auf p_{H} 7.0 und trennte den hierbei ausfallenden Niederschlag ebenso ab. Nun entfernten wir die anwesenden Na^+ -Ionen (sowie noch Spuren Ba^{2+}) mit Amberlite IR-120, die restlichen JO_3^- - und JO_4^- -Ionen mit fein gemahlenem Amberlite IR-45. Das p_{H} betrug danach 4.5. Nach gutem Auswaschen des Austauschers wurde die wäßrige Lösung i.Vak. bei niedriger Temperatur zum Sirup eingengt und dieser zweimal mit Butanol niedergedampft. Hierbei bildeten sich bereits die ersten Kristalle. Nun wurde aus Äther + etwas Methanol (5 Tropfen auf 2 ccm) kristallisiert und noch zweimal umkristallisiert. Der Schmp. der farblosen Stäbchen stieg hierbei von anfänglich 85–90° auf 102°. Misch-Schmp. 101° mit der Trimethylgalaktose aus Lacto-N-tetraose. Die Debye-Scherrer-Aufnahmen sind identisch und deutlich verschieden von denjenigen der 3.4.6-Trimethyl-galaktose. Das gleiche gilt für die IR-Spektren. OCH_3 ber. 41.89; gef. 42.58.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: + 129° ($t = 0$) \rightarrow + 125° (4 Min.) \rightarrow + 110° (15 Min.) \rightarrow + 93° (45 Min.) \rightarrow + 89° (3 und 5 Stdn.; $c = 0.5$, in Wasser).

Schmelzpunkt und Drehung stimmen mit den Angaben der Literatur überein²²).

365. Wolfgang Graßmann, Gottfried Deffner*), Emmy Schuster und Wilhelm Pauckner: Über den Gerbstoff der Fichtenrinde

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

(Eingegangen am 22. Mai 1956)

Aus dem Bast der Fichtenrinde wurde eine Gerbstoffkomponente in Form eines kristallisierten Glucosids und des dazugehörigen Aglucons von der Formel $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_5$ oder $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_5$ isoliert und durch einige Derivate gekennzeichnet. Die Verbindung ist kein Catechin und enthält eine Doppelbindung. Beim oxydativen Abbau des Dinitrobenzoylderivates wird Dinitrobenzoyl-protocatechusäure abgespalten.

Der Gerbstoff der Fichtenrinde ist wohl der wirtschaftlich wichtigste, sicher aber der mengenmäßig bedeutsamste unserer einheimischen Pflanzengerbstoffe. Während der Kriegszeit hat er das Rückgrat der Gerbstoffversorgung gebildet, aber auch heute ist seine praktische Bedeutung beträchtlich.

Der Fichtenrindengerbstoff wird auf Grund verschiedener, meist nicht sehr eindeutiger qualitativer Reaktionen zu den Catechingerbstoffen gerechnet¹⁾,

²²⁾ D. J. Bell u. S. Williamson, J. chem. Soc. [London] 1938, 1196; vergl. auch Fußnote⁵).

*) Neue Adresse: Massachusetts Institute of Technology, Department of Biology bei Prof. F. O. Schmitt, Cambridge 39, Mass.

¹⁾ H. Gnam, „Die Gerbstoffe und Gerbmittel“, 3. Aufl. Stuttgart 1949; H. Gnam, in W. Graßmann, „Handbuch der Gerbereichemie und Lederfabrikation“ Bd. 2/1; M. Nierenstein, „The natural organic tannins“, J. & A. Churchill Ltd., London 1934, S. 244ff.; E. H. W. Rottsieper, „Vegetable tannins“ (Printing for private circulation), W. Cartmel & Sons, Printers, St. Albans, London 1946, S. 57ff.; L. Reichel, Naturwissenschaften 18, 952 [1930]; Angew. Chem. 44, 590 [1931]; 52, 174, 512 [1939]; Collegium [Darmstadt] 1938, 655; Ber. Reichsamt f. Wirtschaftsausbau, Arbeitstg. Leder 1942, 776; O. Th. Schmidt, Angew. Chem. 68, 103 [1956], und zwar S. 114.

eine Zuordnung, die K. Freudenberg²⁾ wohl mit Recht für zweifelhaft hält. Von den viel gebrauchten typischen Catechingerbstoffen, wie z. B. dem des Quebrachoholzes oder der Mimosarinde, ist der Gerbstoff der Fichtenrinde in seinen technologischen Eigenschaften recht verschieden, vor allem durch seine geringe Adstringenz und vergleichsweise „milde“ Gerbwirkung. Nach K. Freudenberg³⁾ enthält die Fichtenrinde (+)-Catechin, Dihydroquercetin (Taxifolin) „sowie ein hydroxylreicheres Phenol“, das kein Gallocatechin (Delphinidol) ist⁴⁾. Darüber hinaus scheinen, wenn man von experimentell nicht näher belegten Angaben von L. Reichel⁵⁾ absieht, einheitliche und kristallisierte gerbstoffartige Stoffe aus Fichtenrinde bisher nicht isoliert worden zu sein.

Untersuchungen, die in unserem Institut während des Krieges mit rein praktischen Zielsetzungen ausgeführt wurden⁶⁻⁸⁾, hatten gezeigt, daß im lebenden Bast der Fichtenrinde der Gerbstoff in vollkommen wasserlöslicher, farbloser und niedrigmolekularer, in der Borke dagegen vorwiegend in dunkler, höhermolekularer und nur noch teilweise wasserlöslicher Form vorliegt. Die Borke enthält also, ebenso wie alle handelsüblichen Fichtenrindenextrakte, alle Stufen einer fortschreitenden Kondensation bis hinauf zu den eigentlichen Phlobaphenen, die nur noch durch Erhitzen mit Sulfiten, also durch die technisch übliche „Sulfitierung“, wasserlöslich gemacht werden können. Die Umwandlung des ursprünglich niedrigmolekularen, farblosen und wasserlöslichen Gerbstoffes in höhere Kondensationsprodukte und schließlich in Phlobaphene ist ein postmortaler Vorgang, der an der lebenden Pflanze bei der Borkenbildung, aber auch bei der Trocknung und Lagerung der Rinde mehr oder weniger rasch abläuft. Daß er durch Enzyme der Rinde selbst herbeigeführt wird, ergibt sich daraus, daß er unterbunden werden kann, wenn man die Wirkung der Enzyme durch Erhitzen oder durch Enzymgifte (Blausäure, Schwefelwasserstoff, Schwefeldioxyd) ausschaltet; daß er, mindestens der Hauptsache nach, oxydativer Art sein muß⁹⁾, folgt daraus, daß er bei Abwesenheit von Sauerstoff völlig oder so gut wie völlig unterbleibt^{7,10)}.

Der Versuch einer Isolierung und konstitutionschemischen Aufklärung des Fichtenrindengerbstoffes muß also beim unveränderten Gerbstoff der Bastschicht einsetzen.

Während in der ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen getrockneten Gesamtfichtenrinde etwa 9–12% wasserlöslicher und 14–22% sulfittlöslicher

²⁾ K. Freudenberg, Tannin, Cellulose, Lignin, J. Springer Verlag, Berlin 1933.

³⁾ Angew. Chem. 68, 84 [1956], und zwar S. 90.

⁴⁾ Persönliche Mitteilung von Prof. Dr. K. Freudenberg.

⁵⁾ Naturwissenschaften 18, 952 [1930]; Angew. Chem. 44, 590 [1931]; 52, 174, 512 [1939]; Collegium [Darmstadt] 1938, 655.

⁶⁾ W. Graßmann u. W. Kuntara, Collegium [Darmstadt] 1941, 98.

⁷⁾ W. Graßmann u. W. Kuntara, Collegium [Darmstadt] 1941, 187; W. Graßmann, Ber. Reichsamt f. Wirtschaftsausbau, Arbeitstg. Leder 1942, 779.

⁸⁾ W. Graßmann u. W. Kuntara, Lederindustrie, Berlin 86, 21 [1943], Chemie 56, 349 [1943]; W. Kuntara u. W. Graßmann, Collegium [Darmstadt] 1943, 79.

⁹⁾ Vergl. dazu K. Freudenberg u. K. Weinges, Liebigs Ann. Chem. 590, 148 [1954].

¹⁰⁾ W. Graßmann, Colloquiumsber. Inst. Gerbereichem. Techn. Hochschule Darmstadt, Heft 3, 59 [1948].

Gerbstoff gefunden wird, enthält der native Bast etwa 17–21 % seines Trockengewichtes an Gerbstoffen, die fast vollkommen in wasserlöslicher Form vorliegen¹¹⁾. In wäßrigen Auszügen des Bastes sind sie von etwa der gleichen Menge nichtgerbstoffartiger Beimengungen begleitet, so daß die Anteilzahl bei etwa 50 gelegen ist. Wegen des hohen Nichtgerbstoffanteils, aber auch ihrer starken Veränderlichkeit wegen, sind wäßrige Auszüge für eine Gerbstoffisolierung wenig geeignet. Vorzuziehen ist die Extraktion des unter peinlichem Ausschluß oxydativer Veränderungen zerkleinerten und mit Chloroform entarzten Bastes mittels Essigesters, wobei 10–15 % des Basttrockengewichtes und etwa 33–50 % des insgesamt vorhandenen Gerbstoffs gewonnen werden. Dieses „essigesterlösliche Rohprodukt“ ist nach schonender Aufarbeitung fast vollkommen farblos und mit Anteilzahlen von 80–89 nahezu frei von Nichtgerbstoffen. Der nach erschöpfender Extraktion mit Essigester im Bast zurückbleibende Gerbstoff kann durch nacheinanderfolgende Extraktion mit Alkohol und Wasser zusammen mit erheblichen Mengen an Nichtgerbstoffen in Lösung gebracht werden; von dem essigesterlöslichen Anteil ist er durch eine Reihe qualitativer Eigenschaften verschieden. So zeigt der Wassereextrakt mit Eisensalzen die reine Grünfärbung der Brenzcatechingerbstoffe, während für den essigesterlöslichen Anteil und die im folgenden beschriebenen aus ihm gewonnenen Reinsubstanzen eine zunächst bräunliche, dann rasch nach Olivgrün umschlagende Eisenreaktion charakteristisch ist.

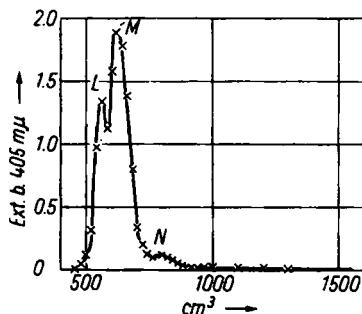
Der so gewonnene Gerbstoff ist ein Glucosidgemisch, das etwa 30 % gebundenen Zucker enthält. Der Zucker kann unter weitgehender Veränderung des Aglucons mit verdünnter Mineralsäure¹²⁾, besser aber enzymatisch, z. B. mit dem Enzymgemisch aus *Aspergillus oryzae*¹³⁾ abgespalten werden. Er besteht ausschließlich aus Glucose. Die Ausbeute an Aglucon, das gleichfalls nicht einheitlich ist, war in gut gelungenen Versuchen ziemlich quantitativ. Aus dem Aglucon konnten wir nach einer groben chromatographischen Reinigung an einer Cellulose-Säule mit Essigester-Wasser als Lösungsmittel (wobei der Hauptanteil mit der Front wanderte) eine krist. 3.5-Dinitrobenzoylverbindung erhalten, worüber schon vor Jahren in vorläufiger Form berichtet wurde¹⁴⁾. Die Dinitrobenzoylverbindung ist aber wegen ihres hohen Molekulargewichtes und vor allem ihres hohen Sauerstoffgehaltes zu einer einwandfreien analytischen Ermittlung der Bruttoformel des Grundkörpers wenig geeignet, weshalb frühere Angaben¹⁵⁾ zu diesem Punkt nur vorläufigen Charakter haben. Ihre Aufspaltung unter Erhaltung des gegen Säure und Alkali äußerst empfindlichen Aglucons gelang damals nicht. Das zugrunde liegende Aglucon selbst haben wir schließlich auf zwei Wegen isolieren können. Bei der Chromatographie des Aglucongemisches an einer Kieselgel-Cellulose-

¹¹⁾ W. Graßmann u. W. Kuntara, Collegium [Darmstadt] 1941, 199, und zwar Tab. VII. ¹²⁾ Vergl. K. Prochal, Diplomarbeit München 1953.

¹³⁾ W. Graßmann u. H. Rubenbauer, Münchener med. Wschr. 78, 1817 [1931]; W. Graßmann, K. Mayer u. E. Waldschmidt-Leitz, Ärztl. Forsch. 4, I/17 [1950].

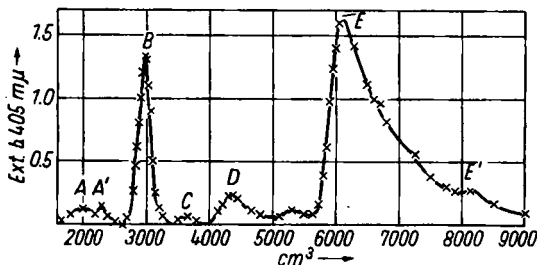
¹⁴⁾ E. Schuster, Dissertat. München 1951 (auszugsweise vorgetragen von W. Graßmann bei der Hauptvers. d. Ver. Gerb. Chem. Techn. Goslar 21. 9. 1951); ref. in Angew. Chem. 63, 537 [1951]. ¹⁵⁾ W. Graßmann, Leder 2, 250 [1951].

Säule mit dem Gemisch aus Wasser-Methanol-*n*-Butanol-Petroläther nach Freudenberg¹⁶⁾ als Lösungsmittel wandern zwei Hauptkomponenten, die zusammen etwa 60 % des eingesetzten Materials repräsentieren, nahe beieinander und nur unvollständig getrennt mit R_F -Werten von etwa 0.8 und 0.7 (Abbild. 1). Aus der langsamer wandernden Komponente kristallisierte das Aglucon nach dem Eindampfen. Die Ausbeute an krist. Aglucon, bezogen auf das rohe Aglucongemisch, entspricht etwa 28 %. Eine Kristallisation der rascher wandernden Komponente gelang vorerst nicht.



Abbild. 1. Verteilungschromatographie des Aglucons. Kieselgel-Cellulose Säule; Lösungsmittel: Wasser-Methanol-*n*-Butanol-Petroläther (8:5:8:6). Kolorimetrische Bestimmung nach Vorsatz-Batzer¹⁷⁾

An Stelle des Aglucongemisches kann man auch das Gemisch der Glucoside unter den gleichen Bedingungen chromatographisch in seine Bestandteile zerlegen. Man erhält dabei fünf Hauptkomponenten (Abbild. 2), die mit R_F -Werten von etwa A:0.70, B:0.47, D:0.32, E:0.23 und E':0.17 wandern. Die Rohausbeuten an den genannten fünf Fraktionen betrugen nach Verwerfen



Abbild. 2. Verteilungschromatographie des Glucosidgemisches (Bedingungen entspr. Abbild. 1)

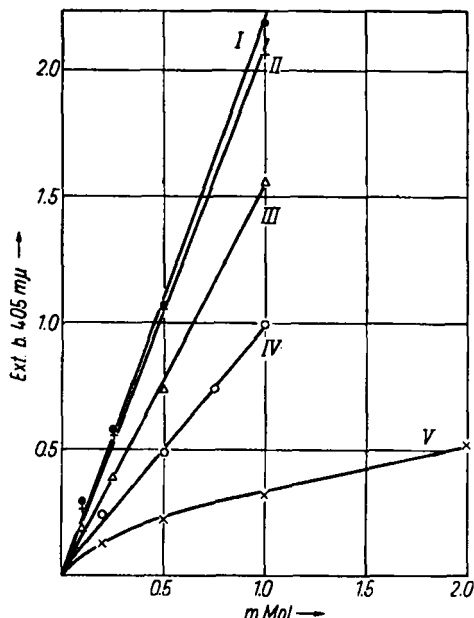
kleinerer Zwischenfraktionen bei A: 2.1 %, bei B: 3.5 %, bei D: 7.5 %, bei E: 35 % und bei E': 7.5 %. Von den chromatographisch aufgetrennten Komponenten konnte die Hauptkomponente E kristallisiert erhalten werden, wobei, bezogen auf das eingesetzte Glucosidgemisch, die Ausbeute an krist. Roh-

¹⁶⁾ Private Mitteilung von Prof. Dr. K. Freudenberg und H. Schlüter an Dr. F. A. von Metzsch, Angew. Chem. **65**, 595 [1953].

¹⁷⁾ Collegium [Darmstadt] **1942**, 424; vergl. auch H. Batzer, Leder **2**, 169 [1951].

produkt 30 %, an umkrist. Produkt 18 % beträgt. Der Gehalt von E an gebundenem Zucker wurde durch enzymatische und Säurespaltung zu 54 % bestimmt. Die übrigen Fraktionen konnten vorerst nicht zur Kristallisation gebracht werden. Von ihnen enthalten die Fraktionen B und D 26 % bzw. 45 % gebundenen Zucker (Abbild. 6). Das durch enzymatische Zuckerabspaltung aus dem krist. Glucosid E erhaltene Aglucon war mit dem oben beschriebenen Aglucon identisch. Aus dem krist. Aglucon konnte die bereits früher erhaltene 3.5-Dinitrobenzoylverbindung sowie eine krist. *p*-Brombenzoylverbindung hergestellt werden. Die Methylierung des krist. Glucosids und des krist. Aglucons mit Diazomethan führte vorerst nur zu amorphen Produkten; von ihnen entsprach das aus dem Glucosid erhaltene in seiner Zusammensetzung den Erwartungen, während die Methylierung des Aglucons offensichtlich unvollständig verlaufen war.

Zur Verfolgung der chromatographischen Trennung bedienten wir uns der Nitritreaktion nach F. Vorsatz¹⁷⁾. Sie spricht wie Abbild. 3 zeigt, auf die Brenzcatechin-gruppierung, mit geringerer Intensität aber auch auf andere phenolische Gruppen an.

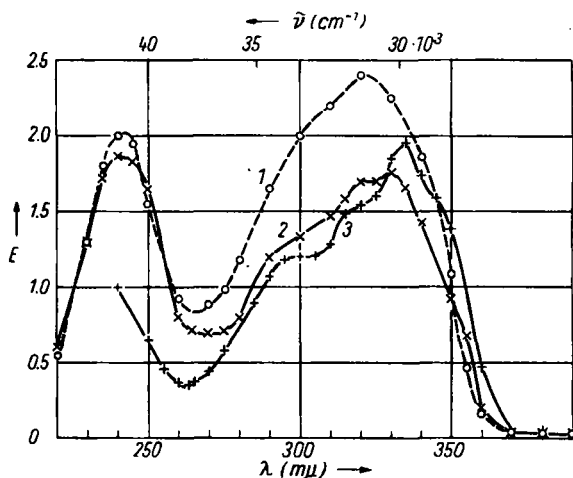


Abbild. 3. Vergleichende Eichkurven der Nitritreaktion nach Vorsatz-Batzer¹⁷⁾. I: krist. Aglucon, II: krist. Glucosid, III: Brenzcatechin, IV: Resorcin, V: Pyrogallol

Auch die Messung der UV-Absorption beispielsweise bei 250 $m\mu$ und 290 $m\mu$ ist für die Verfolgung des Trennungsvorganges geeignet. Dabei gehen jedoch die Extinktionen im UV bei beiden Wellenlängen in den verschiedenen Fraktionen sowohl untereinander wie mit der Vorsatz-Reaktion nicht durchwegs parallel.

Daß es sich bei den isolierten Verbindungen nicht um ein Catechin als Grundkörper handelt, ergibt sich aus den UV-Spektren des Aglucons und des Glucosids, die beide Absorptionsmaxima bei 240 $m\mu$ und 320 $m\mu$ bzw. 330 $m\mu$,

getrennt durch ein Minimum bei etwa 270 m μ , zeigen (Abbild. 4), während für das UV-Spektrum des Catechins ein Maximum bei 280 m μ charakteristisch ist¹⁸⁾. Auf den von den Catechinen charakteristisch verschiedenen Ausfall der grünen Eisenreaktion ist bereits hingewiesen worden. Vor allem zeigt



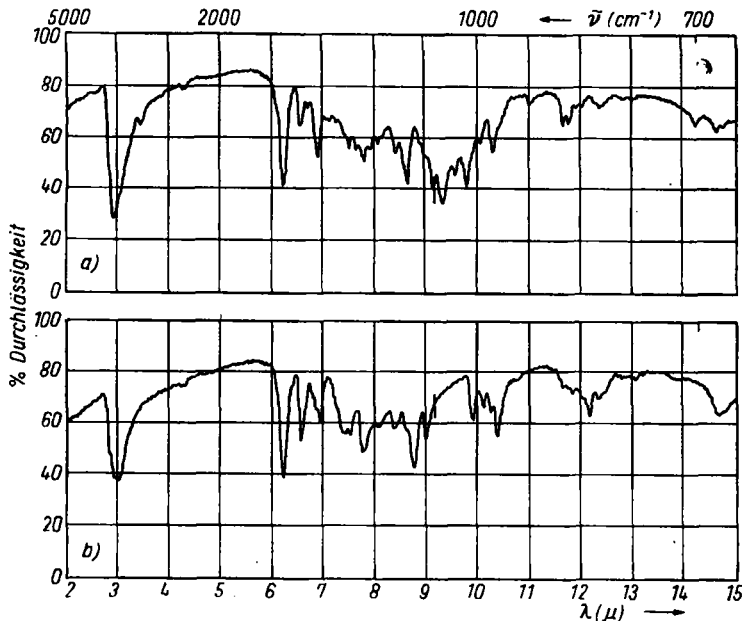
Abbild. 4. UV-Absorptionsspektren des krist. Aglucons (1), des krist. Glucosids (2) in 0.0021-proz. Lösung in Dioxan und des 4.4'-Dihydroxy-3.3'-dimethoxy-stilbens (3) in 0.00192-proz. Lösung in Alkohol

aber die Zusammensetzung der *p*-Brombenzoylverbindung, daß alle Sauerstoffatome veresterbaren Hydroxylgruppen zugehören müssen. Eine Molekulargewichtsbestimmung nach Rast an den erhaltenen vier kristallisierten Verbindungen ist wegen Zersetzung bzw. fehlender Löslichkeit in schmelzendem Campher und anderen geeigneten Lösungsmitteln bisher nicht möglich gewesen. Unter den in Betracht zu ziehenden Bruttoformeln des Aglucons steht die Formel $C_{18}H_{16}O_5$ bzw. $C_{18}H_{18}O_5$ mit der analytisch gefundenen Zusammensetzung des Aglucons und seiner bisher kristallisiert erhaltenen Derivate in Übereinstimmung. Wir müssen dabei allerdings die Annahme machen, daß in der *p*-Brombenzoylverbindung alle fünf, in der 3.5-Dinitrobenzoylverbindung dagegen aus sterischen Gründen nur vier Hydroxylgruppen verestert sind, was im Hinblick auf den sperrigen Charakter des Dinitrobenzoylrestes einigermaßen plausibel sein könnte. Das kristallisierte Glucosid muß seiner Zusammensetzung nach ein Diglucosid des Grundkörpers sein; denkbar wäre es, daß Fraktion B aus dem Versuch Abbild. 2 das Monoglucosid repräsentiert.

Die Elementarzusammensetzung des Aglucons läßt zunächst an eine Beziehung zum Kaffeealkohol denken, dessen Monomethylverbindung, der Coniferylalkohol, nach den Ergebnissen von Freudenberg als Grundkörper des Fichtenlignins anzusehen ist. Eine Wasserabspaltung aus 2 Moll. Kaffeealkohol, möglicherweise verbunden mit einer Dehydrierung, würde nämlich zu

¹⁸⁾ E. C. Bate-Smith u. T. Swain, Chem. and Ind. 1953, 376.

den Bruttoformeln $C_{18}H_{18}O_5$ bzw. $C_{18}H_{16}O_5$ führen. Auf der anderen Seite erinnert das UV-Spektrum des Aglucons und des Glucosids (Abbild. 4) einigermaßen an das des Pinosylvin (3,5-Dihydroxy-stilben)¹⁹⁾ nahestehenden 4,4'-Dihydroxy-3,3'-dimethoxy-stilbens²⁰⁾. Auch das IR-Spektrum (Abbild. 5), dessen Ausmessung wir der Freundlichkeit von Herrn Dr. B. Franck am Institut



Abbild. 5. IR-Spektren von a) Glucosid E und b) Aglucon M. Lösungsmittel KBr;
a) 610 γ/200 mg KBr; b) 380 γ/200 mg KBr

für organische Chemie der Universität Göttingen verdanken, ist mit der Annahme einer Hydroxystilbengruppierung vereinbar. Tatsächlich enthält die Substanz eine Doppelbindung, die auf Grund der Bromaufnahme der *p*-Brombenzoylverbindung sowie der Hydrierung des methylierten Diglucosids festgestellt wurde. Auch Permanganat wird von den genannten Derivaten in der Kälte entfärbt.

Nach Abbau der 3,5-Dinitrobenzoylverbindung mittels alkalischen Permanganats konnte 3,5-Dinitrobenzoyl-protocatechusäure aufgefunden werden.

Beschreibung der Versuche

1. Gewinnung des esterlöslichen Glucosidgemisches

Als Ausgangsmaterial diente der Bast frisch gefällter dreißig- bis fünfzigjähriger Fichten von hoher Vitalität und möglichst geringem Verborkungsgrad. Eine Gewinnung zwischen April und Juli bietet den Vorteil einer leichteren Schälbarkeit der Rinde; doch ist, abgesehen von der Zeit strengen Frostes, bei Einhaltung der unten angegebenen

¹⁹⁾ H. Erdtman, Liebigs Ann. Chem. **539**, 116 [1939].

²⁰⁾ H. Richtzenhain u. C. v. Hofe, Ber. dtsh. chem. Ges. **72**, 1890 [1939]; A. W. Sohn u. H. Munder, Holzforschung **9**, Heft 6, 161 [1955].

Vorsichtsmaßnahmen, die Gewinnung auch zu den übrigen Zeiten des Jahres möglich. Gesicherte Unterschiede bezüglich des Gerbstoffgehaltes, den wir im allgemeinen zwischen 17 und 21% des Basttrockengewichtes fanden, und bezüglich des Ergebnisses der Aufarbeitung von der Gewinnungszeit haben wir bisher nicht angetroffen. Die für die Gewinnung des krist. Glucosids und Aglucons verwendete Rinde war im November gewonnen.

Für das Ergebnis ist sorgfältige Entfernung aller Porkenanteile und möglichst vollkommene Vermeidung oxydativer Veränderungen, die, durch Schwermetallspuren begünstigt, durch geeignete Enzymgifte wie Blausäure, Schwefelwasserstoff und Schwefeldioxyd⁷⁾ unterdrückt werden, wesentlich. Vor dem Schälen wurde der größte Teil des Bastes durch kräftiges Abreiben mittels einer harten Perlonbürste entfernt, die Rinde mit einem Messer aus nichtrostendem Stahl in lange etwa 3–4 cm breiten Streifen unter möglichster Vermeidung von Verletzungen des Bastes entnommen und umgehend in ein Einmachglas gebracht, das am Boden eine frisch bereitete Mischung von Natriumhydrogensulfid und Bernsteinsäure (2:1) enthielt, die mit einem Rundfilter überdeckt war. Vor der Aufarbeitung im Laboratorium wurde der reine Bast mit einem Messer sorgfältig von der Borke abgelöst, wobei zugleich oxydierte Anteile sauber entfernt wurden. Der schichtweise von der Borke abgeschwartete Bast wurde zu Blättchen von etwa 3×3×1.5 mm zerschnitten und sofort in einen mit Kohlendioxyd gefüllten Rundkolben gebracht. Alle diese Manipulationen sind möglichst rasch durchzuführen; der zur Aufarbeitung vorbereitete Bast soll vollkommen farblos sein.

Zur Entfernung harzartiger Bestandteile wurden je 450 g des zerkleinerten Bastes in einem 2-l-Dreihalskolben mit Chloroform überschichtet und 3 Stdn. auf dem Wasserbad gekocht. Bei dieser Operation und möglichst allen weiteren Arbeitsgängen wurde ständig ein langsamer Strom von Kohlendioxyd durchgeleitet, der vorher eine mit gepulvertem und leicht angefeuchtem Natriumhydrogensulfid beschickte Waschflasche passiert hatte und demzufolge Spuren von Schwefeldioxyd enthielt. Die Chloroformlösung wurde abgossen und die Behandlung mit frischem Chloroform noch dreimal wiederholt, worauf der ausgelaugte Bast schließlich auf Filtrierpapier ausgebreitet und mit einem thermoregulierbaren Eindampfgerät²¹⁾ von den Resten des Lösungsmittels befreit wurde. Der getrocknete Bast erschien fast weiß.

Der entharzte Bast wurde sodann unter den gleichen Bedingungen wie oben mit siedendem Essigester extrahiert. Zur vollkommenen Gewinnung des essigesterlöslichen Gerbstoffanteiles war eine drei- bis viermalige Extraktion notwendig. Weitere Extraktionen lieferten zwar noch geringe Mengen an Löslichem, doch bestanden diese fast nur mehr aus Nichtgerbstoffen. Aus dem mit Essigester erschöpften Bast konnten durch aufeinanderfolgende Extraktion mit Alkohol und Wasser neben beträchtlichen Mengen an Nichtgerbstoffen weitere Anteile an Gerbstoffen gewonnen werden, über deren Untersuchung später berichtet werden soll.

Die vereinigten Essigesterextrakte wurden im guten Vakuum zur Trockene gebracht, wobei die Temperatur des Wasserbades 25° und am Schluß 35–40° nicht übersteigen soll. Der Rückstand, der etwa 12.5–15% des Basttrockengewichtes enthielt, soll hellgelb, fast weiß sein und schwammig-voluminös aufdornen. Er wurde durch aufeinanderfolgendes Lösen in Wasser und Essigester von den in diesen Lösungsmitteln unlöslichen (oder beim Aufarbeiten unlöslich gewordenen) Beimengungen befreit. Dazu wurde der Rückstand in etwa der 50fachen Menge gelöst, zur Entfernung fettiger Schmierer (deren Menge nach guter Extraktion mit Chloroform nur sehr gering ist) über ein Papierfilter und anschließend über eine mit wenig Kieselgur bedeckte Glasfritte (G3) filtriert. Die Kieselgur ist vorher durch Waschen mit wenigen ccm einer 0.5-proz. Essigesterlösung von 8-Hydroxy-chinolin vollkommen von Eisenspiuren zu befreien. Die nunmehr fast klare Lösung wurde i. Vak. zur Trockene gebracht, der Rückstand zerrieben, in der 50fachen Menge wasserfreien Essigesters gelöst, erneut über eisenfreies Kieselgur filtriert und i. Vak. zur Trockene verdampft. Diese Operation wurde nochmals wiederholt. Das

²¹⁾ E. Hecker u. P. Karlson, *Chemie-Ing.-Techn.* **25**, 397 [1953].

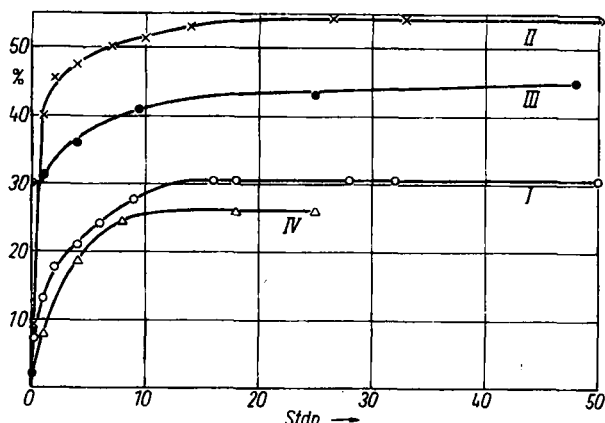
Umlösen aus Wasser und Essigester war mit Verlusten verbunden; die Ausbeute an gereinigtem Produkt, das nach dem Eindampfen hellgelb war und über 80% Gerbstoff enthielt, betrug im allgemeinen etwa 50% des rohen Essigesterextraktes. Bei Zugabe von Eisen(III)-chlorid färbte sich die Substanz zunächst braungrün, später olivgrün. $[\alpha]_D^{25}$: -38.50° .

2. Enzymatische Zuckerabspaltung

Die Bestimmung des gebundenen Zuckers in dem so erhaltenen Glucosidgemisch kann nach Hydrolyse mit verdünnter Mineralsäure unter den für zuckerhaltige Gerbstoffe üblichen Bedingungen²²⁾ erfolgen; dabei wurden etwa 30% gebundener Zucker gefunden. Besser, und für die präparative Gewinnung des Aglucons allein möglich, ist die enzymatische Abspaltung. Wir bedienten uns dazu des an Glucosidase reichen Auszuges aus *Aspergillus oryzae*¹³⁾ (Luitase-Extrakt des Luitpoldwerkes, München), der durch zehntägige Dialyse gegen Leitungs- und schließlich gegen dest. Wasser in einem Naturindarm von Ballaststoffen weitgehend befreit war. Die dialysierten Lösungen sind in Gegenwart von Toluol im Eisschrank längere Zeit haltbar.

Zur Verfolgung der Zuckerabspaltung und zur analytischen Bestimmung des Zuckergehaltes wurden zu 24.9 mg des getrockneten Glucosidgemisches, gelöst in 0.6 ccm n_{20} Acetatgemisch, p_H 5.3, 0.5 ccm Enzymlösung (4.6 mg Trockengewicht) hinzugefügt und mit Wasser auf 25 ccm aufgefüllt. Proben von je 0.2 ccm wurden sofort, sowie nach entsprechenden Zeiten der bei 34° gehaltenen Mischung entnommen und in ein kleines Erlenmeyerkölbchen eingebracht, das zuvor mit 0.5 ccm 5-proz. Bleiacetatlösung beschickt worden war. Durch das Bleiacetat wurden Gerbstoff und Enzyme ausgefällt und damit zugleich die Enzymreaktion unterbrochen. Anschließend verdünnte man mit etwa 5 ccm Wasser, fügte zur Ausfällung der nichtverbrauchten Bleiionen 8–10 Tropfen einer 10-proz. Natriumsulfatlösung hinzu und filtrierte; der Niederschlag wurde dreimal mit Wasser gewaschen und der Zucker im Filtrat nach Hagedorn-Jensen²³⁾ bestimmt.

Den Verlauf der Spaltung zeigt Abbild. 6, Kurve I. Der Gehalt an glucosidisch gebundenem Zucker wurde zu ca. 30% gefunden.



Abbild. 6. Enzymatische Zuckerabspaltung. I: „essigesterlösliches Rohprodukt“, II: krist. Glucosid E, III: Fraktion D, IV: Fraktion B

Zur präparativen Gewinnung des Aglucons wurden 4.25 g Glucosidgemisch in 90 ccm n_{20} Acetattuffer gelöst, mit 70 ccm dialysierter Enzymlösung (395 mg Trockengewicht) versetzt und auf 500 ccm aufgefüllt. Die Lösung wurde luftdicht verschlossen,

²²⁾ Küntzel, Gerbereichem. Taschenbuch, Verlag Th. Steinkopff, Dresden und Leipzig 1955, 6. Aufl.

²³⁾ H. C. Hagedorn u. B. N. Jensen, Biochem. Z. 135, 46 [1923]; 187, 92 [1923].

24 Stdn. bei 34° gehalten, sodann über eisenfreier Kieselgur klar filtriert, i. Vak. auf etwa 40 ccm eingengt und fünfmal mit je 50 ccm Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterlösung wurde i. Vak. zur Trockene gebracht, der Rückstand noch zweimal mit wenig Essigester aufgenommen und erneut abgedampft. Es blieb ein hellgelber sehr voluminöser und schwammiger Rückstand. Ausb. 2.6 g (88% d. Th., bezogen auf einen Zuckergehalt von 30%). Eine 2-proz. methanolische Lösung des Aglucons ergab keine meßbare Drehung. Die Eisenchloridfärbung war zuerst rotbraun, wurde aber beim Schütteln grün.

Der abgespaltene Zucker wurde papierchromatographisch, sowie durch Überführung in das Osazon als Glucose identifiziert¹²).

3. Verteilungschromatographie des Aglucons

Die Auftrennung erfolgte in einer Kieselgel-Cellulose-Säule mit einem Gemisch aus Wasser-Methanol-*n*-Butanol-Petroläther (Sdp. 50–60°) (8:5:8:6); verwendet wurde die obere Phase, in der zur Verhinderung von Oxydation während der Trennung etwa 0.002% Schwefeldioxyd gelöst waren.

Vorbereitung der Säule: Je 800 g Cellulose (Muster II der Zellstoffwerke Mannheim) und Kieselgel (Mallinckrodt) wurden in einem 6-l-Filtrierstutzen zuerst in trockenem Zustand innig gemischt, und dann langsam, unter steter Durchmischung 500-ccm-Portionen des Lösungsmittelgemisches zugegeben. Nach Zusatz von 6 l war eine Suspension entstanden, die im Starmix gerührt werden konnte. Nach der Homogenisierung verdünnte man die in zwei Hälften geteilte Suspension nochmals mit je 1.5 l und ließ nun, zur Entfernung eingeschlossener Luft, mindestens 6 Stdn. unter häufigem Umrühren stehen. Mit dieser Suspension wurde ein etwa 110 cm hohes Chromatographierohr von 3.5 cm Innendurchmesser portionsweise unter Umrühren gleichmäßig so gefüllt, daß die endgültige Füllhöhe etwa 100 cm betrug. Zur Entfernung von Schwermetallverunreinigungen wurde auf die gefüllte Säule eine Lösung von 350 mg 8-Hydroxy-chinolin in 25 ccm der oberen Phase aufgebracht und solange mit dem reinen Lösungsmittel nachgespült, bis das schwarzgrüne Band der Eisenkomplexverbindung die Säule durchwandert hatte.

Nach Auftragen von 2 g des Aglucongemesches in 40 ccm Lösungsmittel wurde mit dem gleichen Gemisch cluiert (Tropfgeschwindigkeit 20 ccm pro Stde.). Das Eluat wurde in Fraktionen von 20 ccm gesammelt, von denen je 0.1 ccm mit Hilfe der Nitritreaktion nach Vorsatz getestet wurde. Wie Abbild. 1 zeigt, wanderte die Hauptmenge der Substanz in Form einer steilen, deutlich aus zwei nur unvollständig getrennten Komponenten bestehenden schwach fluoreszierenden Zone. Aus der zwischen 480 und 560 ccm ausgetretenen Komponente (L) fiel beim Einengen ein flockiger, weißer, nicht kristalliner Niederschlag aus (Rohausbeute 434 mg). Versuche, die Komponente L zur Kristallisation zu bringen, sind bisher ergebnislos geblieben, auch nachdem Impfkristalle von M zur Verfügung standen.

Aus dem zwischen 600 und 700 ccm eluierten Anteil (M) dagegen schied sich nach dem Einengen auf 8–10 ccm ein feinkristalliner Niederschlag aus, und im Verlaufe einer Nacht war die in einen Exsiccator gegebene und bei leichtem Vakuum über Paraffin aufbewahrte Substanz weitgehend durchkristallisiert. Zur Befreiung von öligen Anteilen wurde das Ganze in wenig Äther aufgenommen, auf eine Glasfritte gebracht und mit wenig eiskaltem Äther sorgfältig nachgewaschen. Ausb. 365 mg vom Schmp. 212–214°. Nach einmaliger Umkristallisation aus Wasser Schmp. 214–216°. Aus der Mutterlange des Rohproduktes konnten weitere 199 mg krist. Aglucon erhalten werden, so daß die Gesamtausbeute 564 mg oder 28% des eingesetzten Aglucons betrug.

Das Aglucon M bildet wetzsteinförmige Kristalle, die sehr leicht löslich in Alkohol, Aceton, Dioxan und Essigester, mäßig in Äther, schwer in Wasser und nahezu unlöslich in Benzol sind. Rotbraune Eisenchloridreaktion, die bald in Grün umschlägt.

$C_{18}H_{16}O_5$ (312.3) Ber. C 69.22 H 5.16 O 25.62

Gef. C 68.57, 69.29 H 5.17, 5.26 O 25.90, 25.49

Die übrigen nichtkristallisierenden Fraktionen des Trennungsversuches wurden zur Trockene gebracht und ergaben folgende Ausbeuten: L (480–560 ccm) 434 mg; „Zwi-

schenfraktion“ (560–600 ccm) 125 mg; N (760–900 ccm) 189 mg. Demnach waren insgesamt 65% der eingesetzten Substanz eluiert und gewonnen worden. Die Säule enthielt dann noch beträchtliche Mengen schwer eluierbarer blau und violett fluoreszierender Komponenten.

4. Verteilungschromatographie des Glucosidgemisches

Eine Säule von 100 cm Höhe und 6 cm Innendurchmesser wurde, wie beschrieben, gefüllt und mit 2 g des nach Abschnitt 1. gewonnenen essigesterlöslichen Rohproduktes beschickt. Man eluierte mit dem gleichen Lösungsmittel wie oben (Tropfgeschwindigkeit 50 ccm/Stde.). Man erhielt 6–7 Fraktionen, unter denen E mengenmäßig weit überwog (Abbild. 2). Die einzelnen Komponenten wurden auf ein kleines Volumen eingeeengt und mit Petroläther ausgefällt, wobei sich A und A' ölig, die übrigen in amorpher, zentrifugierbarer, aber beim Trocknen zerfließlicher Form abschieden.

Die nach dem Trocknen im Vak.-Exsiccator über Diphosphorpentoxyd und Paraffin in öli-ger Form erhaltene Fraktion E kristallisierte beim Anreiben mit Essigester. Rohausbeute 592 mg = 29.6% des eingesetzten Rohproduktes. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Wasser feine weiße Kristalle vom Schmp. 227–228°. Leicht löslich in Methanol, Äthanol, Dioxan, Aceton und Tetrahydrofuran; schwer löslich in kaltem Wasser; sehr schwer löslich in Essigester. Von der für ein Diglucosid errechneten Bruttoformel $C_{30}H_{34}O_{15}$ unterscheiden sich die Analysenergebnisse durch etwas zu hohe Werte an Kohlenstoff und zu niedrige an Sauerstoff sowie an gebundenem Zucker. Wir nehmen an, daß das Produkt durch kleine Mengen des Monoglucosids, möglicherweise infolge einer Zuckerabspaltung beim Umkristallisieren, verunreinigt sein könnte. Auch die um ein Molekül Wasser ärmere Bruttoformel $C_{30}H_{34}O_{14}$ wäre mit den gefundenen Werten vereinbar.

$C_{30}H_{34}O_{14}$ (618.6) Ber. C 58.24 H 5.54 O 36.22 Glucose 58

Gef. C 58.43 H 5.58 O 35.70 Glucose 53.6, 54.2 (enzymatisch)

Die angeführten Glucosewerte wurden nach enzymatischer Abspaltung erhalten (vergl. Abbild. 6, Kurve II). In Parallelbestimmungen wurden nach 8stdg. Hydrolyse mit 0.1 n und 1 n HCl durch photometrische Bestimmung des Osazons²⁴) 54 bzw. 52% Zucker gefunden. Papierchromatographisch konnte nur Glucose nachgewiesen werden.

Methylierung der Substanz E: 72 mg Glucosid wurden in 50 ccm Aceton gelöst und durch Einleiten von Diazomethan, das nach der Methode von R. Kuhn und H. W. Ruelius²⁵) gereinigt worden war, methyliert. Nach Stehenlassen über Nacht wurde nochmals Diazomethan eingeleitet und nach weiteren 24 Stdn. das Lösungsmittel verdampft. 78.7 mg amorphe Substanz (99% d. Th.). Die Analysenwerte entsprechen einer Aufnahme von drei Methylgruppen auf das Glucosid von der Formel $C_{30}H_{34}O_{15}$.

$C_{33}H_{42}O_{15}$ (678.6) Ber. C 58.41 H 6.23 O 35.36 OCH_3 13.65

Gef. C 58.89 H 6.04 O 34.86 OCH_3 13.20

Eine Mikrohydrierung in der Warburg-Apparatur (Versuchausführung G. Fries) ergab eine Aufnahme von 0.316 und 0.319% Wasserstoff in Parallelbestimmungen. Bei Annahme einer Doppelbindung errechnet sich eine Aufnahme von 0.297%.

Die Ausbeuten der übrigen, nicht kristallisierenden Komponenten des Trennversuches betrugen: A 42 mg; A' 18 mg; B 69 mg; D 151 mg; E' 150 mg. Das Ergebnis der enzymatischen Zuckerabspaltung an den Fraktionen B, D und E ist zusammen mit einem entsprechenden Versuch am rohen Glucosidgemisch in Abbild. 6 wiedergegeben. Während der Elution konnten im UV-Licht starke Fluoreszenzerscheinungen beobachtet werden. Legt man Austrittsbeginn und Austrittsende jeder einzelnen Zone im Eluat fest, so findet man die einzelnen Komponenten des Eluats von folgenden Fluoreszenzerscheinungen begleitet: A und A' schwach violett, B schwach gelb bis stark violett, C violett, D stark hellblau und E und E' sehr stark hellblau.

²⁴) W. Graßmann, H. Hörmann u. R. Hafter, unveröffentlicht.

²⁵) Chem. Ber. 83, 427 [1950].

Gewinnung des Aglucons aus dem krist. Glucosid E: 101 mg E wurden mit 9.4 mg dialysiertem Luitase-Extrakt, gelöst in 2 ccm n_{20} Acetatpuffer und auf 25 ccm aufgefüllt, gespalten und das Aglucon durch erschöpfendes Ausschütteln der auf wenige ccm eingegangenen Flüssigkeit mit Essigester abgetrennt. Nach Verdampfen des Essigesters in Kohlendioxid-Atmosphäre konnten aus Wasser Kristalle vom Schmp. 214 bis 216° erhalten werden. Der Misch-Schmelzpunkt mit dem Aglucon M war ohne Depression. Ausb. 29 mg (69% d. Th.).

5. Darstellung der Agluconderivate

a) 3.5-Dinitrobenzoylverbindung: 78 mg krist. Aglucon M wurden in 0.5 ccm trockenem Pyridin gelöst und langsam mit 480 mg frischem 3.5-Dinitrobenzoylchlorid versetzt. Die anfänglich rotbraune Flüssigkeit erstarrte und wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach leichter Erwärmung bis zur Verflüssigung wurde in 20 ccm Wasser gegossen, worauf sich das Reaktionsprodukt fest abschied. Nach Zerdrücken der Klumpen und eintägigem Stehenlassen im Eisschrank wurde der Niederschlag abgesaugt und mit Wasser bis zum Verschwinden des Pyridingeruches gewaschen. Zur Beseitigung der überschüss. Dinitrobenzoesäure wurde der Niederschlag zweimal mit je 15 ccm Alkohol (35°) aufgeschüttelt und abgesaugt. Ausbeute des Rohproduktes 348.6 mg. Nach zweimaliger Umkristallisation aus Dioxan-Methanol konnten feinkristalline Nadeln vom Schmp. 250–251° gewonnen werden.

Tetrakis-[3.5-dinitro-benzoyl]-aglucon

$C_{46}H_{24}O_{25}N_8$ (1088.7) Ber. C 50.79 H 2.20 O 36.76 N 10.29

Gef. C 49.94, 50.57 H 2.47, 2.84 O 36.90, 37.20 N 10.12, 9.61

b) *p*-Brombenzoylverbindung: Die Lösung von 56 mg Aglucon M in 1 ccm Pyridin wurde langsam mit 250 mg frischem *p*-Brombenzoylchlorid versetzt und analog der Darstellung der Dinitrobenzoylverbindung aufgearbeitet. Nach Ausfällen des in Dioxan gelösten Rohproduktes mit Petroläther wurde zweimal aus Chloroform umkristallisiert. Ausb. 45.8 mg (20.8% d. Th.); Schmp. 217.5°.

Pentakis-[*p*-brom-benzoyl]-aglucon

$C_{63}H_{31}O_{10}Br_5$ (1227.4) Ber. C 51.86 H 2.55 O 13.03 Br 32.55

Gef. C 51.61 H 2.70 O 12.90 Br 32.30

Jodzahlbestimmung nach G. Gorbach²⁶⁾ gef. 21.15, 20.4; berechnet für eine Doppelbindung 20.69.

6. Oxydation der 3.5-Dinitrobenzoylverbindung (Versuchsausführung A. Hastreiter)

60 mg der DNB-Verbindung wurden in 25 ccm Dioxan (über Kaliumpermanganat destilliert) bei 35° mit 1 ccm Natronlauge versetzt und eine ebenfalls 35° warme Lösung von 150 mg Kaliumpermanganat in 20 ccm Wasser zugegeben. Nach 48stdg. Aufbewahren bei 30° wurde abfiltriert und im Filtrat die restlichen Spuren von Permanganat mit Methanol zerstört. Der braune Rückstand wurde abfiltriert, mit heißem Wasser mehrmals gewaschen, Filtrat und Waschwässer vereinigt und i. Vak. (Wasserbad) eingeeengt. Nach Ansäuern wurde mit Äther extrahiert und der Ätherauszug nach Trocknen über Natriumsulfat weitgehend eingedampft. Bei Zugabe von wenigen Tropfen Methanol entstand eine schwache Trübung, und im Eisschrank bildeten sich allmählich gelbliche Kristalle vom Schmp. 166–168°. Der Misch-Schmelzpunkt mit 3.5-Dinitrobenzoylprotocatechusäure war ohne Depression. Die Ausbeute von 16.1 mg entspricht 54% d. Th. unter der Annahme, daß aus 1 Mol. Dinitrobenzoyl-aglucon 1 Mol. Dinitrobenzoylprotocatechusäure erhalten wird.

7. Darstellung der 3.5-Dinitrobenzoyl-protocatechusäure (A. Hastreiter)

100 mg Protocatechusäure (Schmp. 199°) wurden in 2 ccm Pyridin mit 1 g 3.5-Dinitrobenzoylchlorid umgesetzt. Die weitere Aufarbeitung wurde, wie bei der Dar-

²⁶⁾ Mikrochem. verein. Mikrochim. Acta 31, 320 [1944].

stellung des 3.5-Dinitrobenzoyl-aglucons beschrieben, durchgeführt. Zur Umkristallisation wurde die Substanz in wenig heißem Dioxan gelöst und tropfenweise mit einem Gemisch von Petroläther-Methanol (3:5) versetzt. Nach längerem Aufbewahren im Eisschrank konnte die Säure in Form feiner Kristalle vom Schmp. 167–168° und einer Ausbeute von 192.3 mg (54.3% d. Th.) erhalten werden.

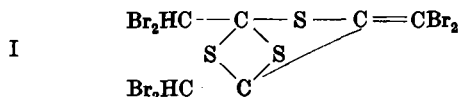
Extinktionsmessung: Die in den Abbild. 1, 2 und 3 angegebenen Extinktionswerte wurden nach der Methode von Vorsatz-Batzer¹⁷⁾ gemessen. Von den eluierten Fraktionen des Glucosidgemisches wurden je 1 ccm, von denen des Aglucons 0.1 ccm mit 1 ccm 10-proz. Essigsäure und 1 ccm 10-proz. Natriumnitritlösung versetzt, die Phasen gut durchgeschüttelt und 15 Min. stehengelassen. Nach Zugabe von 2 ccm 2*n*NaOH und Durchschütteln wurde die Extinktion der wäßrigen Phase bei 405 mμ gemessen.

366. Reinhard Mecke und Hilmar Spiesecke: Über die Struktur des 2.4.6-Tris-dibrommethylen-1.3.5-trithians

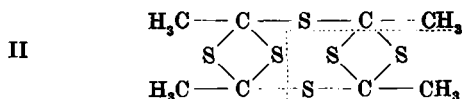
[Aus dem Institut für physikalische Chemie der Universität Freiburg i. Br.]
(Eingegangen am 7. Juli 1956)

Mit Hilfe des IR-Spektrums läßt sich zeigen, daß das sog. „Hexabromtrisulfid“ ($C_6Br_6S_3$) nach Fromm und Mangler Ringstruktur mit der Symmetrie C_{3v} oder D_{3h} hat. Das UV-Spektrum zeigt, daß in dieser ungesättigten Verbindung ein quasiaromatischer Elektronenausgleich durch Mesomerieeteiligung der Schwefelatome stattfindet.

Bei dem Versuch, die Struktur des Tetramethyl-hexathia-adamantans ($C_8H_{12}S_6$) aufzuklären, erhielten E. Fromm und G. Mangler¹⁾ 1901 durch Einwirkung von Brom auf diese Substanz eine Verbindung, die sie auf Grund ihrer Analysenwerte „Hexabromtrisulfid“ nannten ($C_6H_2Br_6S_3$). Mit naszierendem Wasserstoff ließ sie sich nicht reduzieren. Ammoniak, Anilin und Silberoxyd wirkten bei höherer Temperatur ein, ergaben aber keine definierten Produkte. Nur mit Natriummethylat ließ sich eine kristalline Verbindung fassen. Die Analyse ergab, daß an die Stelle von zwei Bromatomen drei Methoxylgruppen getreten waren. Da die Autoren keinen „Kristallalkohol“ nachweisen konnten, ließ diese Tatsache sie eine C=C-Doppelbindung im Molekül vermuten. Den so erhaltenen Orthoester konnte man leicht zum normalen Ester und weiter zur freien Säure verseifen, die sie durch das Ammoniumsalz charakterisierten. Um das reaktive Verhalten der Verbindung verständlich zu machen, schlugen sie folgende Strukturformel vor:



Sie leiteten sie aus der damaligen Formel für das Tetramethyl-hexathia-adamantan ($C_8H_{12}S_6$) ab:



¹⁾ Ber. dtsch. chem. Ges. 34, 204 [1901].