

DIE KONSTITUTION DES FICHENRINDENGERBSTOFFES, EINER NEUEN KLASSE KONDENSIERBARER, VEGETABILISCHER GERBSTOFFE

von

HORST ENDRES*)

Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiss- und Lederforschung
München.

Kondensierbare Gerbstoffe unterscheiden sich von den hydrolysierbaren, die durch Säurehydrolyse in ihre Bausteine aufgespalten werden, dadurch, dass sie bei gleicher Behandlung oder durch Einwirkung von Enzymen in höher molekulare unlösliche Kondensationsprodukte übergehen. Diese Eigenschaft, die auch die Catechine zeigen, und das Vorkommen solcher in verschiedenen gerbstoffhaltigen Pflanzen führte zu der Annahme, dass alle kondensierbaren Gerbstoffe Polymere des Catechins darstellen (1). Eine strukturelle Variante dieser Catechintheorie ist die von RUSSEL(2) aufgestellte Flavopinakon-Hypothese, deren Monomeres nicht das Catechin (also das 3-Hydroxyflavan), sondern das 4-Hydroxyflavan ist.

Mag die Catechin-Theorie für den einen oder anderen Gerbstoff zutreffen, so dürfte es doch zu weit führen, ihr alle kondensierbaren Gerbstoffe zuzuordnen. Denn nicht nur für den Gerbstoff der Fichtenrinde, über den hier berichtet werden soll, und der mit einem Catechin in keinerlei Beziehung steht, sondern auch für die Gerbstoffe der Mimosarinde und des *Quebracho* ist es inzwischen sehr zweifelhaft geworden, ob sie strukturell überhaupt eine Verwandtschaft mit den Catechinen haben (3).

Die früheren Arbeiten, die Aussagen über den Aufbau des Gerbstoffes der Fichtenrinde machen sollten (4), können wir hier wohl übergehen, da die Autoren kaum einheitliche Substanzen in der Hand hatten, denn es hat sich inzwischen gezeigt, dass es sich nicht um einen Gerbstoff handelt (5, 6), sondern um eine Vielzahl verschiedener Gerbstoffkomponenten. Auch der Versuch, einheitliche Komponenten zu erhalten, sei es durch fraktionierte Fällung (7), fraktionierte Extraktion (8) oder durch Anwendung der Gegenstromverteilung (6, 9), schlugen fehl.

*) derzeitige Anschrift: National Research Center, Dokki-Cairo U. A. R Ägypten.

Ausgangspunkt unseres Arbeitskreises waren die von W. GRASSMANN & W. KUNTARA (10-12) während des Krieges mit rein praktischer Zielsetzung ausgeführten Untersuchungen. Diese hatten gezeigt, dass im lebenden Bast der Fichtenrinde der Gerbstoff in wasserlöslicher, farbloser und niedermolekularer, in der Borke dagegen vorwiegend in dunkler höhermolekularer und nur noch teilweise wasserlöslicher Form vorliegt. Die Borke enthält also alle Stufen einer fortschreitenden Kondensation bis hinauf zu den wasserunlöslichen Phlobaphenen, die nur noch durch Erhitzen mit Sulfiten, also durch die technisch übliche „Sulfitierung“, wasserlöslich gemacht werden können (10-12, 13). Die Umwandlung des ursprünglich niedermolekularen 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 rasch abläuft. GRASSMANN & KUNTARA konnten zeigen, dass diese Kondensation durch Enzyme der Rinde herbeigeführt wird (14) und dass die Kondensation durch Einwirkung von Enzymgiften (Blausäure, Schwefelwasserstoff, Schwefeldioxyd) unterbunden werden kann. Dass die Kondensation, mindestens der Hauptsache nach, oxydativer Art sein muss (15), folgt daraus, dass sie bei Abwesenheit von Sauerstoff völlig oder so gut wie völlig unterbleibt (11, 16).

Um die niedermolekularen Anteile des Fichtenrindengerbstoffes zu isolieren, denn nur an diesen kann eine konstitutionschemische Untersuchung durchgeführt werden, haben wir den Bast frisch gefällter Fichten sofort mit Schwefeldioxyd behandelt und alle Arbeiten unter Luftsauerstoffausschluss in einer Schwefeldioxydatmosphäre durchgeführt (17).

Der Bast enthält etwa 17—21 % seines Trockengewichtes an Gerbstoffen, die, wie bereits gesagt, fast vollkommen in wasserlöslicher Form vorliegen. Der mit Chloroform entharzte Bast liefert, unter Ausschluss oxydativer Veränderungen, bei der Extraktion mit Essigester 10—15 % des Basttrockengewichtes eines fast farblosen Gerbstoffgemisches mit einer Anteilzahl von 80—89 (17). Dieser Essigesterextrakt, auf den sich unsere Aufmerksamkeit zunächst konzentrierte, ist ein Glucosidgemisch, das etwa 30 % gebundenen Zucker und zwar nur Glucose enthält.

Durch säulenchromatographische Auftrennung des Glucosidgemisches an einer Kieselgel-Cellulose-Säule konnten 5 mengenmässig hervortretende Fraktionen isoliert werden, von denen es gelang die stärkste Fraktion (etwa 35 % des Glucosidgemisches) kristallin zu erhalten (17). Auch das zu diesem Glucosid gehörende Aglucon konnte durch enzymatische Zuckerabspaltung, der Zuckergehalt beträgt 54 %, kristallin gewonnen werden. Das gleiche Aglucon kann

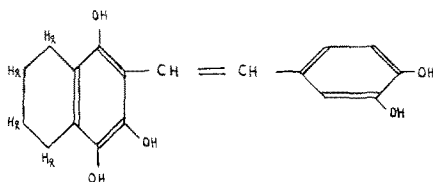
auch erhalten werden, wenn das aus dem Glucosidgemisch durch Zuckerabspaltung erhaltene Aglucongemisch an einer Kieselgel-Cellulose-Säule chromatographiert wird (17). Eine weit bessere Auftrennung des Aglucongemisches gelang an einer Polyamidsäule (18, 19). Von den erhaltenen 6 Fraktionen ist die mengenmässig stärkste Fraktion (etwa 40—45% des Aglucongemisches) mit dem aus dem Glucosid erhaltenen Aglucon identisch.

Die scharfen Trennungen, die in geeigneten Fällen an Polyamidsäulen erzielt werden, beruhen auf der unterschiedlichen Affinität der einzelnen Gerbstoffe zu den Amidbindungen, die ihrerseits der auch technisch wichtigen Affinität zum Eiweiss der Haut parallel gehen dürfte. Der besondere Vorteil dieses chromatographischen Systems zur Trennung von Gerbstoffen und darüber hinaus von phenolischen Substanzen überhaupt (20, 21) liegt aber in der Möglichkeit, auf einfache Weise präparative Trennungen relativ grosser Substanzmengen auszuführen. Interessanterweise wird das Glucosidgemisch an der Polyamidsäule wesentlich schlechter aufgetrennt als das Aglucongemisch (22) und kann bereits mit Wasser zum grössten Teil eluiert werden. Betrachten wir die Einwirkung von Phenolen auf Polyamid als eine reversible Gerbung, dann beruht die Haftfestigkeit der einzelnen Gerbstoffe z.T. auf der Affinität der Wasserstoffbrückenbindung der phenolischen Hydroxylgruppe zur Amidbindung. Wenn also die glucosidisch gebundenen Gerbstoffe nur geringe, die dazugehörigen Aglucone jedoch eine deutliche Affinität zu den Amidbindungen des Polyamids aufweisen, so ist hier bereits der Einfluss der glucosidisch gebundenen Glucose auf die Gerbwirkung angedeutet (23).

Aus der Analyse des Aglucons errechnet sich eine Bruttoformel $C_{18}H_{16-18}O_5$. Das UV-Spektrum in Alkohol, in alkoholischer Aluminium (III)-chloridlösung und in Natriumalkoholat (19), schliesst eine Catechinnatur aus. Das Spektrum ist vielmehr mit einem Stilben vereinbar, die quantitative Jodzahlbestimmung und die Hydrierung verschiedener Derivate beweisen das Vorhandensein einer Doppelbindung (17). Mit der Hydrierung der Doppelbindung ist eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 325 $m\mu$ auf 290 $m\mu$ verbunden (24). Das Ausmass dieser Verschiebung deutet auf eine Doppelbindung, die in Konjugation zu zwei Benzolkernen steht, also eine Stilbendoppelbindung.

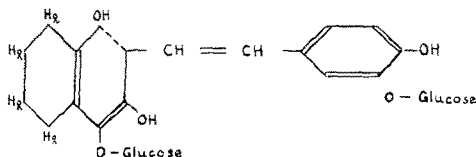
Aus verschiedenen Derivaten des Aglucons und des Glucosids können wir entnehmen, dass alle fünf Sauerstoffatome des Aglucons veresterbaren aromatischen Hydroxylgruppen angehören. Durch oxydative Spaltung des Penta-acetyl-aglucons an der Stilbendoppelbindung erhielten wir nach der Entacetylierung Protocatechusäure, 1, 3, 4-Trihydroxy-tetralin und 1, 3, 4-Trihydroxy-tetralincarbon-

säure (25). Das Trihydroxy-tetralin entsteht aus der Tetralincarbon- säure durch Decarboxylierung, die schon beim Erwärmen eintritt (25). Nach diesen Ergebnissen können wir die Konstitution des Aglucons als ein 2, 5, 6, 3' 4'-Pentahydroxy-3, 4-tetramethylen- stilben angeben. Wir haben dieser Verbindung den Namen Piceatan- nol (I) gegeben.



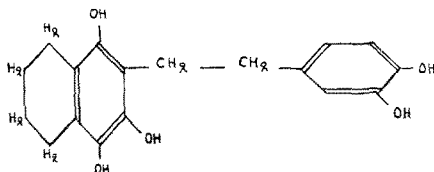
(I) Piceatannol

Das zuerst isolierte, zu diesem Aglucon gehörende Glucosid ent- hält 54% Glucose, entsprechend zwei Mol pro Mol Piceatannol. Je ein Mol Glucose ist an den beiden durch die Doppelbindung ge- trennten phenolischen Ringen gebunden (26, 27). Formel II zeigt die Konstitution des Piceatannol-diglucosids.



(II) Piceatannol-diglucosid

Von den sechs, an der Polyamidsäule isolierten Aglucon-Frak- tionen, ist neben dem Piceatannol ein weiteres Aglucon kristallin erhalten worden (18). Interessanterweise zeigt dieses Aglucon das gleiche UV-Absorptionsspektrum wie das hydrierte Piceatannol. Auch der Mischschmelzpunkt des Piceatannols wies mit diesem Aglucon keine Depression auf, sodass der einzige Unterschied zwischen diesen beiden Agluconen nur in der Stilbendoppelbindung liegt und wir dieses Aglucon als Dihydropiceatannol (III) anspre- chen können (24).

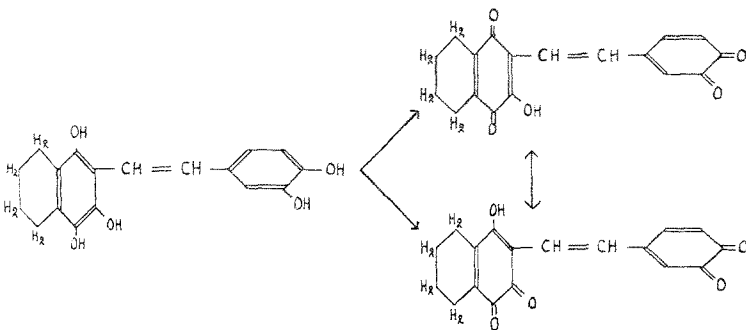


(III) Dihydropiceatannol

Neben dem Piceatannol-diglucosid konnten wir noch zwei Monoglucoside des Dihydropiceatannols und einen geringen Anteil eines Monoglucosides des Piceatannols aus dem Glucosidgemisch des Essigesterextraktes mittels Trennung an Polyamid isolieren (22). Über die Anordnung der Zucker in den einzelnen Glucosiden kann jedoch noch nichts endgültiges gesagt werden. Die Untersuchungen über den Essigesterextrakt, der aus etwa 8—10 Substanzen besteht, sind Gegenstand weiterer Arbeiten unseres Institutes.

Aus dem mit Essigester extrahierten Bast der Fichtenrinde können durch Extraktion mit Alkohol weitere 20—25% und mit Wasser nochmals 40—50% des Gesamtgerbstoffes extrahiert werden. Im Alkoholextrakt ist das Piceatannol in Form eines Monoglucosides zu etwa 50% enthalten (28). Wenn auch über die Natur der bisher noch nicht isolierten Gerbstoffanteile keine abschliessenden Aussagen möglich sind, so steht doch fest, dass ein sehr grosser Teil des Fichtengerbstoffes nicht den Katechinen angehört, sondern eine völlig neuartige Gerbstoffklasse repräsentiert. Mit den Katechinen hat die neue Gerbstoffklasse nicht mehr gemeinsam, als die Anwesenheit eines Brenzcatechinkernes und die Eigentümlichkeit, beim Kochen mit Säuren, oder – was biologisch und technisch wichtiger ist – bei Einwirkung dehydrierender Enzyme, in dunkel gefärbte, höher molekulare und schliesslich unlösliche Kondensationsprodukte (Phlobaphene) überzugehen.

In quantitativen Messungen in der WARBURG-Apparatur verbraucht 1 Mol Piceatannol, in Gegenwart von Fichtenrindenbast, 1 Mol Sauerstoff, entsprechend 4 Oxydationsäquivalenten (14). Das Piceatannol bietet die Möglichkeit zur Ausbildung von 2 Chinongruppen.



Alle Versuche, durch enzymatische Oxydation zu einheitlichen, definierten Reaktionsprodukten zu gelangen, schlugen fehl. Auch das als Zwischenprodukt auftretende Chinon, konnte, da es sehr schnell weiterreagiert, nicht isoliert werden. Als Endprodukt der

enzymatischen Oxydation, die wir auch mit $K_3(Fe(CN)_6)$ durchgeführt haben, wird ein braunes Kondensationsprodukt erhalten (14). Mit fortschreitender Kondensation wird die Wasserlöslichkeit immer geringer, das Endprodukt kann nur noch durch Einwirkung von Sulfit in Lösung gebracht werden.

Auch durch Erwärmen des Piceatannols mit verdünnten Mineralsäuren tritt Kondensation ein und auch dieses Kondensationsprodukt ist in Wasser nicht mehr löslich, doch muss das Endprodukt dieser Kondensation von dem der Oxydation verschieden sein: denn es kann auch mit Sulfit nicht mehr in Lösung gebracht werden (13). Nach unseren Beobachtungen (13, 14) ist eine Anlagerung von Sulfit nur möglich, wenn chinoide Gruppen vorhanden sind. Piceatannol selbst lagert kein Sulfit an, wohl aber sein Chinon.

Hydroxystilbenderivate, sowohl wie hoch hydroxylierte Naphthalinderivate finden sich im Tier- und Pflanzenreich ziemlich weit verbreitet und bei einigen von ihnen, oder den zugehörigen Chinonen handelt es sich um Wirkstoffe von erheblicher Bedeutung (Vitamin K, Echinochrom u.a.). Die Auffindung einer solchen Verbindung als Bestandteil eines massenhaft vorkommenden Gerbstoffes ist aber recht überraschend und wirft erneut die Frage nach der physiologischen Bedeutung dieser und anderer Gerbstoffe auf.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus dem Fichtenrindenbast, der etwa 15—17% Gerbstoff enthält, werden unter Ausschluss oxydativer Veränderungen, durch fraktionierte Extraktion, etwa 30% und mit Alkohol etwa 20% des Bastgerbstoffes erhalten. Aus dem Essigesterextrakt können nach enzymatischer Zuckerabspaltung zwei phenolische Substanzen durch säulenchromatographische Auftrennung an einer Polyamidsäule kristallin erhalten werden. Das in einer Menge von etwa 45% bezogen auf das Agluongemisch des Essigesterextraktes, isolierte Phenol, konnte als ein 2, 5, 6, 3' 4'-Pentahydroxy-3, 4-tetramethylenstilben aufgeklärt werden. Für diese Verbindung wurde der Namen Piceatannol vorgeschlagen. Bei dem zweiten Phenol, etwa 15% des Agluongemisches, handelt es sich um das an der Stilbendoppelbindung hydrierte Piceatannol.

Das Piceatannol ist im Bast als Diglucosid und Monoglucosid enthalten. Aus dem Essigesterextrakt wurde an einer Kieselgel-Cellulose-Säule das Diglucosid erhalten. Die 2 Mol Glucose sind an die Hydroxylgruppen 5 und 3' des Piceatannols gebunden. Der Alkohol-extrakt enthält zu etwa 50% das Monoglucosid des Piceatannols. Vom Dihydropiceatannol konnten bisher zwei Monoglucoside aus

dem Essigesterextrakt, mit einer Ausbeute von etwa 10%, isoliert werden.

Durch Phenoloxydasen, wie sie im Bast vorliegen, wird das Piceatannol in ein braunes, wasserunlösliches Kondensationsprodukt umgewandelt. Diese Kondensation verläuft unter Verbrauch von Sauerstoff und als Zwischenprodukte treten Chinone auf. Eine gleichartige Kondensation kann durch Einwirkung chemischer Oxydationsmittel erzielt werden. Ebenso wie das Catechin, kondensiert sich auch das Piceatannol beim Erwärmen mit verdünnten Mineralsäuren. Das entstehende Kondensationsprodukt ist jedoch von dem der enzymatischen oder chemischen oxydativen Kondensation verschieden.

SUMMARY

The cambium layer of spruce bark, which contains 15—17% of tanning material, was extracted with ethyl acetate and with ethanol under conditions which excluded oxidative changes, thereby removing 30% and 20% of the cambium tanning respectively. Enzymatic hydrolysis of the ethyl acetate extract followed by fractionation on a polyamide column lead to the isolation of two crystalline phenolic compounds. The main product constituting 45% of the aglucone mixture, was identified as 2, 5, 6, 3' 4'-pentahydroxy-3, 4-tetramethylenestilben and is here named piceatannol. The second phenol, nearly 15% of the aglucone mixture, is a piceatannol derivative in which the stilben double bond is saturated.

Piceatannol exists in the cambium as mono- and diglucosides. Direct chromatography of the ethyl acetate extract on a silica-gel-cellulose column gives the diglucoside in which glucose is attached to the 5 and 3'-position. The ethanolic extract contains nearly 50% of a monoglucosido-piceatannol. Two monoglucosides of dihydro-piceatannol have so far been isolated in 10% yield.

Piceatannol forms a brown water-insoluble condensation product by treatment with the phenoloxydases present in the cambium; oxygen taking part in the condensation with the intermediate formation of quinones. The condensation may also be effected with the use of chemical oxidising agents. Like catechin, piceatannol undergoes condensation with warm dilute hydrochloric acid and the product is different from that, obtained by enzymatic or chemical oxidation.

LITERATUR

1. FREUDENBERG, K., „Die Chemie der natürlichen Gerbstoffe“, Berlin 1920.
FREUDENBERG, K. & WEINGES, 1954. *Ann.* 90, 140.
FREUDENBERG, K. & MATTLAND, 1934. *Ann.* 510, 193.
2. RUSSEL, A., 1935. *Chem. Rev.* 17, 155.
3. WHITE, TH., Symposium of Vegetable Tannins, Croydon 1956.
4. ETTI, C., 1881. *Mhj. Chemie* 1, 266; BOTTINGER, C., 1890. *Ann.* 259, 125; BOTTINGER, C. & STROHMER, F., 1881. *Mhj. Chemie* 2, 539.
5. GRASSMANN, W. & LANG, O., 1935. *Coll.* 114, 401.
6. LINDSTEDT, G. & ZACHARIAS, B., 1955. *Acta Chem. Scand.* 9, 781.
7. KÜNTZEL, A. & MELZER, E., 1944/45. *Coll.* 1.
8. PRCHAL, K. Diplomarbeit Universität München 1953 (vgl. auch 9).
9. GRASSMANN, W., DEFFNER, G. & HASTREITER, A. unveröffentlicht, vgl. vgl. HASTREITER A., Diplomarbeit Universität München 1955.
10. GRASSMANN, W. & KUNTARA, W., 1941. *Coll.* 98.
11. GRASSMANN, W. & KUNTARA, W., 1941. *Coll.* 187; GRASSMANN, W. Ber. Reichsamt f. Wirtschaftsausbau, Arbeitstg. Leder 1942, 779.
12. GRASSMANN W. & KUNTARA, W., Lederindustrie, Berlin 1943. 86, 21; *Chemie* 56, 349 (1943); *Coll.* 1943, 79.
13. GRASSMANN, W., ENDRES, H. & BROCKHAUS, R., *Das Leder.* im Druck.
14. vgl: dazu GRASSMANN, W., BROCKHAUS, R. & ENDRES, H., *Chem. Ber.* in Vorb.
15. vgl. dazu FREUDENBERG, K. & WEINGES, K., 1954. *Liebigs Ann. Chem.* 590, 148.
16. GRASSMANN, W., Colloquiumsber. Inst. Gerbereichem. Techn. Hochschule Darmstadt, Heft 3, 59 (1949).
17. GRASSMANN, W., DEFFNER, G., SCHUSTER, E. & PAUCKNER, W., 1956. *Chem. Ber.* 89, 2523.
18. GRASSMANN, W., ENDRES, H., PAUCKNER, W. & MATHES, H., 1957. *Chem. Ber.* 90, 1125.
19. ENDRES, H., 1957. *Das Leder* 8, 222.
20. GRASSMANN, W., HORMANN, H. & HARTL, K., 1956. *Makromolekulare Chem.* 21, 37. SCHMIDT, OT. & SCHONLEBEN, W., 1957. *Z. schr. Naturf.* 12b, 262; HORHAMMER, H., WAGNER, P., IZQUIERDO & ENDRES, H., *Arch. Pharm.* im Druck; OPPELT, M., Dissertation Universität München 1958; NEU, R., private Mitteilung.
21. ENDRES, H., GRASSMANN, W., & OPPELT M. & HASSAN EL SISSI. *Das Leder.* im Druck.
22. GRASSMANN, W., ENDRES, H. & MERKLE, K., in Vorbereitung.
23. ENDRES, H., GRASSMANN, W. & OPPELT, M., in Vorbereitung.
24. ENDRES, H., GRASSMANN, W. & MATHES, H., 1958. *Chem. Ber.* 91, 141.
25. GRASSMANN, W., ENDRES, H. & PAUCKNER, W., 1958. *Chem. Ber.* 91, 134.
26. GRASSMANN, W., ENDRES, H., BROCKHAUS, R. & MERKLE, K., *Chem. Ber.* 90, 2416. 1957.
27. ENDRES, H., 1958 *Chem. Ber.* 91, 636.
28. GRASSMANN, W., ENDRES, H. & LEPPMEIER, F., in Vorber.