

# Prilog poznavanju kemijskih komponenata taninskog ekstrakta domaćih sirovina

---

**Biffl, Mladen**

*Source / Izvornik:* **Glasnik za šumske pokuse: Annales pro experimentis foresticis, 1974, 17, 5 - 90**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:108:250803>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-21**



*Repository / Repozitorij:*

[University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology](#)



Dr MLADEN BIFFL

**PRILOG POZNAVANJU KEMIJSKIH  
KOMPONENATA TANINSKOG EKSTRAKTA  
DOMAĆIH SIROVINA**

**A CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF  
THE CHEMICAL COMPONENTS OF TANNIN EXTRACTS  
FROM DOMESTIC RAW MATERIALS**

UDK 634.O.866.4:547.587.26

*Sadržaj — Contents*

Opći dio — *General*

A. Uvod — *Introduction*

B. O kemizmu tanina — *On the chemism of tannins*

Hidrolizirajući tanini — *Hydrolyzing tannins*

Kondenzirajući tanini — *Condensing tannins*

C. Zadatak istraživanja — *Task of research*

Specijalni dio — *Special*

1. Uvod — *Introduction*

2. Frakcioniranje taninskih ekstrakata — *Fractionation of tannin extracts*

2.1 Uvod — *Introduction*

2.2 Frakcioniranje kestenova ekstrakta — *Fractionation of Chestnut extract*

2.3 Frakcioniranje hrastova ekstrakta — *Fractionation of Oak extract*

2.4 Frakcioniranje rujeva ekstrakta — *Fractionation of Sumach extract*

3. Semimikro taninska analiza taninskih ekstrakata i frakcija — *Semimicro tannin analysis of tannin extracts and fractions*

3.1 Uvod — *Introduction*

3.2 Metode rada i pribor za semimikro taninsku analizu — *Working methods and utensils for semimicro tannin analysis*

3.21 Određivanje sadržaja vode — *Determination of water content*

3.22 Priprema analitičke otopine — *Preparation of analytical solution*

3.23 Određivanje ukupnoga isparnog ostatka — *Determination of the total evaporation residue*

3.24 Određivanje netopljivoga — *Determination of insoluble matter*

3.25 Određivanje netanina — *Determination of non-tannins*

3.26 Određivanje pH — *Determination of pH*

3.27 Analize — *Analyses*

3.3 Pregled taninskih analiza — *Survey of tannin analyses*

3.4 Diskusija rezultata — *Discussion of results*

4. Kromatografska ispitivanja taninskog ekstrakta i frakcija — *Chromatographic investigations of tannin extracts and fractions*

4.1 Uvod — *Introduction*

- 4.2 Papirna kromatografija tanina — *Paper chromatography of tannins*
  - 4.3 Eksperimentalni dio — *Experimental*
  - 4.4 Kromatografija standardnih supstanci — *Chromatography of standard substances*
  - 4.5 Diskusija rezultata — *Discussion of results*
  - 4.6 Kestenov tanin — *Chestnut tannin*
    - 4.61 Uvod — *Introduction*
    - 4.62 Kromatografija kestenova taninskog ekstrakta i frakcija — *Chromatography of Chestnut tannin extract and fractions*
    - 4.63 Diskusija rezultata — *Discussion of results*
  - 4.7 Hrastov tanin — *Oak tannin*
    - 4.71 Uvod — *Introduction*
    - 4.72 Kromatografija hrastova taninskog ekstrakta i frakcija — *Chromatography of Oak tannin extract and fractions*
    - 4.73 Diskusija rezultata — *Discussion of results*
  - 4.8 Rujev tanin — *Sumach tannin*
    - 4.81 Uvod — *Introduction*
    - 4.82 Kromatografija rujeva tanina i frakcija — *Chromatography of Sumach tannin and fractions*
    - 4.83 Diskusija rezultata — *Discussion of results*
  - 4.9 Ispitivanje šećera u taninskim ekstraktima — *Investigation of sugars in tannin extracts*
    - 4.91 Uvod — *Introduction*
    - 4.92 Kromatografija šećera taninskih ekstrakata — *Chromatography of sugars of tannin extracts*
    - 4.93 Diskusija rezultata — *Discussion of results*
  5. Spektralna analiza taninskih ekstrakata i frakcija — *Spectral analysis of tannin extracts and fractions*
    - 5.1 Mjerenje UV-spektra tanina — *Measurement of UV spectra of tannins*
    - 5.2 Eksperimentalni dio — *Experimental*
      - 5.21 Uvod — *Introduction*
      - 5.22 UV-spektri standardnih supstanci — *UV spectra of standard substances*
      - 5.23 UV-spektri kestenova taninskog ekstrakta i frakcija — *UV spectra of Chestnut extract and fractions*
      - 5.24 UV-spektri hrastova taninskog ekstrakta i frakcija — *UV spectra of Oak tannin extract and fractions*
      - 5.25 UV-spektri rujeva taninskog ekstrakta i frakcija — *UV spectra of Sumach tannin extract and fractions*
      - 5.26 Diskusija rezultata — *Discussion of results*
    - 5.3 Mjerenje IR-spektara tanina — *Measurement of IR spectra of tannins*
    - 5.4 Eksperimentalni dio — *Experimental*
      - 5.41 Uvod — *Introduction*
      - 5.42 IR-spektri standardnih supstanci — *IR spectra of standard substances*
      - 5.43 IR-spektri kestenova taninskog ekstrakta i frakcija — *IR spectra of Chestnut tannin extract and fractions*
      - 5.44 IR-spektri hrastova taninskog ekstrakta i frakcija — *IR spectra of Oak tannin extract and fractions*
      - 5.45 IR-spektri rujeva taninskog ekstrakta i frakcija — *IR spectra of Sumach tannin extract and fractions*
      - 5.46 Diskusija rezultata — *Discussion of results*
  6. Zaključna diskusija — *Conclusive discussion*
  7. Kemijska karakterizacija pojedinih taniha — *Chemical characterization of individual tannins*
- Literatura — *References*
- Summary*

Primljeno 22. XII. 1965.

Tiskanje ove publikacije omogućeno je dotacijom Republičkog fonda za naučni rad.

## OPĆI DIO — GENERAL

### A. Uvod — Introduction

Tanini su prirodna biljna štavila, kojih je osnovna karakteristika da su u stanju životinjsku kožu prevesti u ušavljenu.

Prema *Dekkeru* (32) tanini su biljne tvari koloidnih svojstava, djelomično topljivi u vodi i organskim otapalima. Adstringentnog su okusa, talože želatinu, alkalioide i bjelančevine. Tanini su amorfni te sa željeznim solima daju bojane reakcije. Lako oksidiraju na zraku i potamne. Tanini reagiraju slabo kiselo u području pH 2,5—5. Povećanjem pH vrijednosti iznad pH 5 tanini postaju tamniji i potpuno se tope u vodi, a daljnjim povećavanjem pH vrijednosti potpuno gube svojstvo šavljjenja.

Izraz »*tanin*« u nauku je uveo *Seguin* (140) namjeravajući tim pojmom označiti one tvari u biljnim ekstraktima koje su odgovorne za šavljenje kože. U kemijskoj i botaničkoj literaturi nailazi se na niz primjera tanina, identificiranih različitim testovima kao fenolnih derivata iz biljaka koji su kao takvi svrstani u tanine, a da ne pokazuju štavna svojstva. To je zamrsilo pojmove u literaturi o taninima, tako da je današnja kemija biljnih štavila relativno malo poznata u smislu aktivnih štavnih tvari po zamisli definicije *Seguina*.

Danas je prevladalo mišljenje koje zastupa *White* (163), tj. da su tanini kompleksne smjese mnogih tvari i da nismo u stanju nijednu supstancu nekog ekstrakta izdvojiti i smatrati je karakterističnom za proces šavljjenja. Izolacija takvih tvari ne samo da je veoma težak posao nego i nesiguran s obzirom na vrijednost te izolirane tvari za šavljenje. Npr. izolirana galna kiselina (m-digalna kiselina) iz najjednostavnijih tanina pirogalolnog tipa, dobivenih iz lišća domaćeg ruža (102), pokazuje sve osobine čiste kemikalije, ali nema svojstvo šavljjenja kože. Tek vezana s glukozom u obliku poligalolil glukoze postaje štavilo.

Na osnovi takvog stanja nauke o kemizmu tanina sigurnije je upotrijebiti naziv »*taninski ekstrakt*«, kod čega se misli na prisutnost mnogih tvari, koje u nekim slučajima poznamo kao kemijske tvari, ali sastav kojih se može mijenjati u tipu formule, a i u pojedinostima. Npr. taninski ekstrakt iz kore mimoze i drva quebracho spadaju u pirokatehinske tanine, ali svaki od njih ima svoje osobine, koje se ne mogu razjasniti na osnovi jednoga kemijskog spoja.

Od vremena prvih studija o vegetabilnim štavilima — taninima pa do danas tanini se klasificiraju na dvije odnosno tri velike grupe:

1. hidrolizirajući ili pirogalolni tanini — galotanini,
2. kondenzirajući ili pirokatehinski tanini — katehinski tanini.

Kad se zapazilo, da neki tanini nisu mogli biti sa sigurnošću raspoređeni niti u jednu od gornjih grupa, dodana je treća grupa nazvana:

3. mješoviti tanini, koji sadrže pored pirogalolnih i pirokatehinskih spojeva i neke, danas, nepoznate spojeve, koji odlučuju njihova štavna svojstva.

Pojam taninskog ekstrakta sadrži i takozvane netanine. To su tvari u ekstraktu, koje su topljive u vodi, ali nemaju svojstva šavljjenja, kao: šećeri, kiseline, bjelančevine, smole, boje, alkaloidi i slične tvari, specifične za pojedine sirovine. Uloga spomenutih tvari u tijeku šavljjenja nije jasno definirana. Očito je da mnogo utječu na adstringentna svojstva tanina te da pomažu topljivost tanina u vodi. Odvajanjem netanina iz taninskih otopina dializom povećava se štavna vrijednost do određene granice. Potpunim odvajanjem gube se štavne osobine, ali tijekom stajanja u vodenoj otopini tanina, u kojoj su odvojeni netanini, dolazi do ponovnog stvaranja netanina hidrolizom ili oksidacijom tanina, dok se ne uspostavi stanje ravnoteže.

Većinu tanina u prirodni čine međusobno esterski vezane galne kiseline, koje su opet esterski vezane na glukozu. Takve taninske molekule se lako razaraju hidrolizom (kiseline, alkalije, encimi) i zovu se hidrolizirajući tanini.

Druga grupa tanina ima vrlo malo ugljikohidrata. Kod njih su se kondenzirale fenolne grupe, pa se ne mogu hidrolizom rastaviti. Takvi tanini zovu se nehidrolizirajući ili kondenzirajući tanini.

Iako je navedena podjela uobičajena i u praksi primljena, sa znanstvenog gledišta ne zadovoljuje, jer u praksi ne postoje tako izrazito odijeljeni taninski ekstrakti. S tih je razloga uvedena treća grupa tanina, nazvana miješani tanini.

Ako se još jednom osvrnemo na podjelu tanina na hidrolizirajuće i nehidrolizirajuće, može se kazati da je ta klasifikacija imala svoj praktičan smisao, jer je kod tanina koji se u praksi najčešće upotrebljuju utvrđeno, da hidrolizirajući tanini imaju relativno visoku adstringentnost, dok su kondenzirajući tanini uglavnom slabije adstringentni. Na temelju te konstatacije u modernoj tehnologiji prerade kože stvoreni su i različiti oblici tehničkog tanina za primjenu: zaslađeni tanini ili slabo adstringentni tanini koji se koriste u početku štavljenja, da bi duboko prodrli u fibrile kožnog kolagena. Adstringentni tanini upotrebljuju se pri završetku štavljenja, da se površina kože što bolje prošavi te koža dobije čvrstoću i punoću. Praksa je dakle pokazala, da se na početku štavljenja koriste tanini katehinskih grupa, odnosno kondenzirajući tanini kao npr. quebracho, a na kraju štavljenja se koriste tanini pirogalolnog tipa odnosno hidrolizirajući tanini. KomPLICIRANOST, odnosno nepoznavanje kemijske strukture tanina ima neke sličnosti s kemizmom lignina. Način izoliranja tanina iz biljnih supstrata putem ekstrakcije izričito utječe na osobine taninskog ekstrakta. Drugačiji je sastav i osobina ekstrakta, dobivenog hladnom ekstrakcijom od onoga vrućom ekstrakcijom. Velik utjecaj na ekstrakciju imaju čimbenici kao što su: pritisak, prisutnost zraka, pH vrijednost otapala, koncentracija, vrijeme ekstrakcije i slično.

U posljednje vrijeme mnogo se radilo na rješavanju konstitucije tanina, a također su se usavršile i metode ispitivanja. Poznati radovi *Whitea*, *Kirbya* i *Knowlesa* imaju ne samo znanstvenu nego i praktičnu vrijednost. Spomenuti autori su se bavili istraživanjem ekstrakta quebracha, pri čemu su strogo kontrolirali svoje radove kao i radove ostalih autora na navedenom ekstraktu. Konstatirali su, da se rijetko postižu identični rezultati pa su zaključili da je to zbog toga — barem djelomično — što postojeće industrijske metode ekstrahiranja vegetabilnih taninskih ekstrakata uvjetuju parcijalnu oksidaciju i kondenzaciju prisutnih produkata te na taj način povećavaju njihov broj i kompleksnost u usporedbi s nativnim taninima u biljkama.

Današnja naučna istraživanja taninskog ekstrakta krenula su u dva smjera:

— da se istraže nativni tanini, tj. što sličniji onima koji se nalaze u biljnim stanicama, odnosno

— da se istraže tehnički tanini, tj. oni koji su pretrpjeli izvjesne, ali karakteristične promjene svojih kemijskih grupacija, važnih za štavljenje.

Na tima posljednjim istraživanjima mnogo se radilo, i ti radovi veoma zanimaju industriju jer služe direktno za poboljšanje taninskih ekstrakata i njihovo bolje korištenje, a s druge strane omogućuju bolji uvid u strukturu tehničkog tanina.

U našem radu istraživane su kemijske osobine tehničkih tanina, koji su proizvedeni na uobičajene tehnološke načine i to iz drva hrasta — *Quercus pedunculata*, kestenovine — *Castanea vesca* i lišća domaćeg ruja — *Rhus cotinus*, dakle radovi koji odgovaraju drugom znanstvenom smjeru istraživanja kemije tanina. Rezultati naših istraživanja tek su prilog rješavanju spomenutih problema, koji se kod nas nisu obrađivali. Mnoge komponente taninskog ekstrakta, koje su u našem radu uočene kao zasebne tvari, nisu identificirane i do danas se nije za njih znalo. Da bi se identificirale, potrebno je nastaviti rad s većim mogućnostima i novim metodama.

Ako se istraživanja na kemizmu tanina nastave ovim intenzitetom, može se očekivati da će se jednog dana dobiti taninski ekstrakti s određenim karakteristikama, isto kao što je to urađeno u drugim industrijama, gdje se npr. regulira polimerizacija jednog proizvoda da bi se dobio polimer s točno definiranim svojstvima. Ta misao, koju je dao *Bravo* (15a), potpuno je opravdana i treba biti smjer rješavanja kemije tanina.

Naš rad treba biti prilog rješavanju toga zadatka.

## B. O kemizmu tanina — On the chemism of tannins

### HIDROLIZIRAJUĆI TANINI — HYDROLYZING TANNINS

U područje tih tanina spadaju taninski ekstrakti iz lišća plodova i izraslina. Najvažniji predstavnici tih ekstrakata dani su u donjoj tabeli.

Naziv biljke	Dio biljke	Naziv ekstrakta
<i>Rhus semialata</i>	jabučice na listu	taninska kiselina
<i>Quercus infectoria</i>	jabučice na plodu	turski tanin
<i>Rhus coriaria</i>	lišće	sumah ekstrakt
<i>Rhus cotinus</i>	lišće	rujev ekstrakt
<i>Quercus Aegilops</i>	žir	valonea ekstrakt
<i>Terminalia chebula</i>	plod	mirobalan ekstrakt
<i>Caesalpinia coriaria</i>	plod	divi-divi ekstrakt
<i>Caesalpinia brevifolia</i>	plod	algarobila ekstrakt

Pored navedenih ekstrakata u tu grupu dolaze ekstrakti iz kore i drva različitih vrsta hrastova (*Quercus*) i kestena (*Castanea*).

Hidrolizirajući tanini dijele se u dvije skupine:

1. galotanini u užem smislu i
2. elagni tanini.

Radovi u vezi s kemijom galotanina spadaju u najranije radove s područja istraživanja kemije tanina. Sigurno se zna da su na tom području radili poznati kemičari kao što su: *Scheele*, *Berthelot*, *Proust* i drugi. Radovi na istraživanju galnih jabučica (*Rhus semialata*) i jabučica *Quercus infectoria*, iz kojih je dobiven turski tanin, dali su prve izolirane proizvode, nazvane taninska kiselina. U klasičnim radovima *Fischera* (44) navodi se da je prvi od njih penta-m-digaloilglukoza, a drugi pentagaloilglukoza.

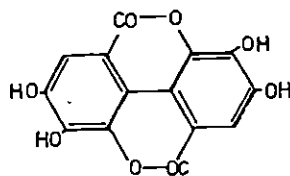
Daljnijim radovima *Karrera*, *Salomona* i *Peyera* (73) utvrđeno je, da postoje mogućnosti daljnje esterifikacije hidroksilnih grupa s galnom kiselinom. Kod toga dolazi do potpune supstitucije svih hidroksilnih grupa molekule glukoze s poligaloilnim grupama.

Radovima *Whitea* i koautora (165) pomoću dvodimenzionalne papirne kromatografije utvrđeno je, da ekstrakt iz jabučica *Rhus semialata* (taninska kiselina) daje 21% galne kiseline, 7% m-digalne kiseline i 3%, vjerojatno, pentagaloilglukoze, dok za 1% smatra da bi to mogla biti trigalna kiselina. Oko 70% ima »galotanina«.

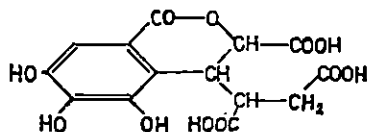
Druga grupa hidrolizirajućih tanina osniva se na prisutnosti elag kiseline, koja se stajanjem taloži u obliku kristaliničnog dilaktona. Ona se mora smatrati za derivat galne kiseline, a karakteristična je kao »cvijet« na površini uštavljene kože — što je znak dobrog proštavljenja. Elag kiselinu opisao je već *Braconet* (1818), a sintezu su proveli *Perkin* i *Nierenstein* (113) iz galne kiseline. Karakteristika elag kiseline je njezina ekstremna netopljivost u vodi.

U ekstraktu mirobalana istaloženi »cvijet« sadrži kristaliničnu hebulinsku kiselinu koja, po *Freudenbergu* (48), kiselom hidrolizom daje glukozu, galnu kiselinu i neku nepoznatu strukturu, koja je kasnije identificirana kao hebulna kiselina.

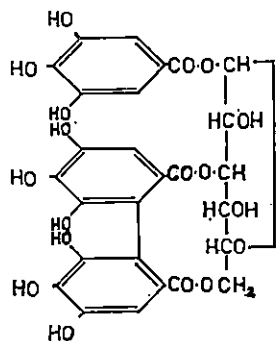
Iz mirobalana su *Schmidt* i *Nieswandt* (148) izolirali hebulagnu kiselinu, a kasnije su *Schmidt* i *Lademann* (145) našli hebulagnu kiselinu i u divi-divi ekstraktu. Ona daje hidrolizom po jednu molekulu glukoze, galne, elag kiseline i hebulne kiseline.



ELAG KISELINA

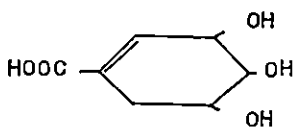


HEBULNA KISELINA



CORILAGIN

Slični radovi rađeni su na valonea ekstraktu i na ekstraktu iz kestenova lišća. *Davis* (31), a kasnije i *Robinson* (122) ukazuju na metabolistički put, kako priroda proizvodi aromatske amino kiseline u organizmima. U svojim radovima *Brown* i *Neish* (17) ukazuju, da taj put općenito može biti izvor aromatske jezgre u biljkama, odnosno da je shikimic kiselina prethodnik aromatskog prstena lignina, a po *Burtonu* i *Nurstenu* (20) također i prethodnik tanina u bilju.



SHIKIMIC KISELINA

Rezimirajući radove na kemiji hidrolizirajućih tanina, može se konstatirati da je (prema *Whiteu*, 163) pronađeno desetak komponenata, ali oni tvore tek mali dio ekstrakta. Kromatogrami pokazuju da je mnogo više tvari preostalo za identifikaciju, nego što ih je identificirano. U svakom slučaju dosadašnji radovi ne mogu dati konačan zaključak o kemijskom sastavu hidrolizirajućih taninskih ekstrakata.

## KONDENZIRAJUĆI TANINI — CONDENSING TANNINS

U područje tih tanina spadaju taninski ekstrakti iz drva, kore, a u nekim slučajima i lišća. Najvažniji predstavnici su ekstrakti, navedeni u nihoj tabeli:

Naziv biljke	Dio biljke	Naziv ekstrakta
Shinopsis lorenzii, balansae	drvo	quebracho ekstrakt
Acacia catechu	"	katehu "
Rhus pentaphylla	"	tizerah "
Astronium balansae	"	urunday "
Acacia spp.	kora	mimoza "
Rhizophoraceae spp.	"	mangrove "
Tsuga canadensis	"	hemlock "
Picea abies	"	smrekov "
Uncaria gambier	list	gambir "
Camellia sinensis	"	čajni "

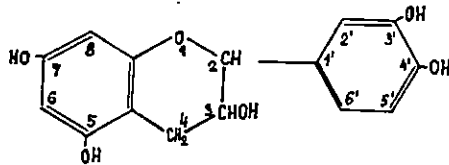
Najšira istraživanja kemizma obavljena su na ekstraktima quebracho, mimoze, katehu i gambira.

Mnogi radovi obrađuju i tanine čaja, dok je na ostalim kondenziranim tanini malo urađeno.

Kemijska struktura kondenzirajućih tanina vrlo je malo poznata, pa do danas uglavnom postoje tri hipoteze.

### 1. Katehinska hipoteza

Katehinska hipoteza kondenzirane strukture tanina koju zastupaju *Freudenberg* (47) i *Weinges* (53) osniva se na katehinu,



KATEHIN

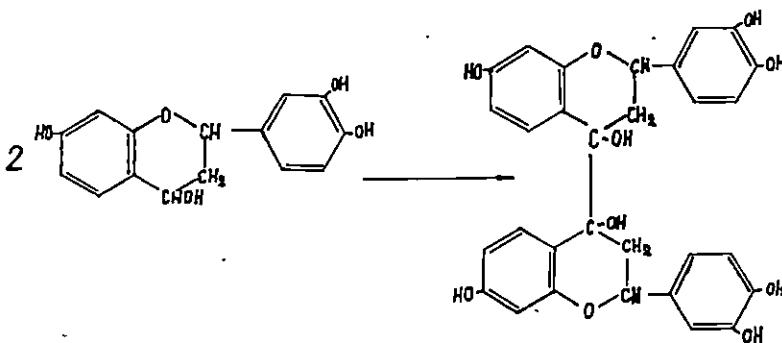
koji je derivat flavana ili flavena. Po hipotezi spomenutih autora kondenzirani tanini su polimerizati, kondenzati ili dehidracijski polimerizati »reaktivnih katehina«. Katehinsku hipotezu postavio je *Freudenberg* (48) radovima s Burma cutch (*Acacia catechu*) i gambir ekstraktom, u kojima katehin tvori 50% u vodi topljivog sadržaja. Međutim, prisutne su i druge tvari. Osim toga katehin ne stvara crveni talog s mineralnim kiselinama (flobafene).

Prema *Whiteu* (166) »može se zaključiti da katehinska hipoteza vjerojatno ne vrijedi ni za quebracho ekstrakt, a čini se ni za većinu drugih kondenziranih tanina«.

### 2. Flavpinakolna hipoteza

Ovu hipotezu prvi je postavio *Russell* (50, 43, 139), a po njoj su kondenzirani tanini dimerne strukture katehina. To je, u stvari, varijanta prve hipoteze.

Tako se npr. iz 4,7,3',4'-tetrahidroksiflavana dobije bis-(7,3',4'-trihidroksi) flavpinakol:



*Russel* i *Todd* (139) pretpostavljaju, da su »flobatanini« sastavljeni na isti način.

Tu je hipotezu *Freudenberg* (50) podvrgao kritici. Po mišljenju *Whitea* (163) *Russellova* hipoteza je važna jer pokazuje, da se nakupljanjem fenolnih grupa dobije tvar koja može štaviti, ali *Finch* i *White* (43) navode da *Russellovi* produkti imaju linearnu strukturu.

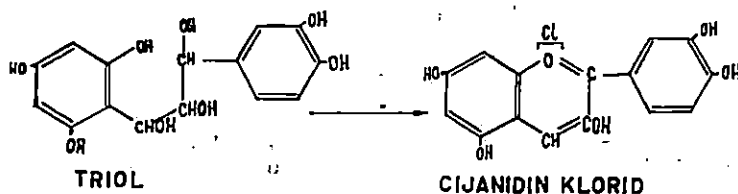


### 3. Leukoantocijanidinska hipoteza

Spomenuta hipoteza počinje radovima *Bate-Smitha* (5), koji su zapazili da se mnoge tvari u lišću i cvijeću mogu pomoću testova identificirati kao tanini, koji pokazuju, da su te tvari polifenoli te da se takvi »tanini« mogu smatrati kao leukoantocijanidini. Identifikaciju leukoantocijanidinskih tvari u ekstraktu utvrdili su flobafenskim testom (155), tj. dodatkom vruće vode alkoholnom ekstraktu. Kod toga se izoliraju crveni antocijani — flobafeni.

*Bate-Smith* i *Swain* (9) pretpostavljaju, da su leukoantocijanidini u vezi s katehinima te da se slično njima mogu smatrati za prototipove kondenziranih tanina. Oni ih u stvari smatraju taninima (6, 7, 8). *Bate-Smith* ograničuje svoju interpretaciju na laticu, lišće i voće.

Prema *Robinsonu* (122a) hipotetske tvari tipa  $C_6-C_3-C_6$  dolaze u tkivu biljaka kao bezbojne. One služe biljci kao rezervna tvar za stvaranje prirodnih boja, pigmentata i štavnih tvari, koje se tek pomoću testa vrućom vodom mogu identificirati kao flobafenski kondenzirajući tanini.



Leukoantocijanidinska hipoteza bi prema *Kingu* i *Whiteu* (77) te *Hillisu* (164) odgovarala za slučaje *eucalyptus* i mangrove ekstrakte, ali ne i za ostale kondenzirane tanine (hidrolizirajući tanini ne daju antocijanidine).

Spomenute tri hipoteze ni izdaleka ne mogu potpuno objasniti kemizam tanina. *White* (164) odbacuje kao potpuno neosnovane ideje, da bi se jednom formulom mogao objasniti kemizam taninskog ekstrakta. Isti je autor (*White*) u nizu radova ukazao na kompleksnost smjese različitih polifenola, prisutnih u svakom kondenziranom ekstraktu.

*White*, *Kirby* i *Knowles* (165) objašnjuju svoj stav riječima: »Naša ispitivanja počela su dokazom, da razjašnjenje kemizma i ponašanje svakoga taninskog ekstrakta uzima u obzir cijeli ekstrakt, a ne samo dio početnog materijala izoliranoga po nekoj propisanoj metodi pročišćivanja, a onda razmatranog bez obzira na ostalo... Činjenica da se taninski ekstrakti sastoje od smjese velikog broja tvari, kod kojih prevladavaju polifenoli, izgleda da je jedan od najvažnijih faktora koji određuju kemijsko i fizikalno ponašanje ekstrakata«.

Radovima *Whitea* i *Kirbya*, odnosno primjenom dvosmjerne papirne kromatografije citirana je misao nedvojbeno potvrđena, ali time da za sada ni jedan taninski ekstrakt nije potpuno identificiran u svim svojim kemijskim komponentama.

### C. Zadatak istraživanja — Task of research

Poznajući današnje stanje kemije tanina, htjelo se ispitati kemijski sastav domaćih taninskih ekstrakata iz kestenova i hrastova drva kao i lišća domaćeg ruja.

Istraživanje tih ekstrakata malo je obrađeno u našoj i u stranoj literaturi, a metode rada su zastarjele. Novija se istraživanja taninskih ekstrakata u svijetu s obzirom na njihov kemizam osnivaju na kromatografskim i spektrografskim metodama. U vezi s ovim radovima s područja istraživanja quebracho i mimoza ekstrakta željelo se bolje upoznat i kemizam taninskih ekstrakata iz naših sirovina.

Naš rad predstavlja samo jedan korak k upoznavanju kompleksnosti domaćih taninskih ekstrakata te identificiranju njegovih komponentata. Potpuno rješenje ovog zadatka bilo bi ne samo velik prilog znanstvenom istraživanju nego i velika praktična vrijednost za bolje i uspješnije pripremanje taninskog ekstrakta za industrijsku primjenu kod proizvodnje koža i bušenja izvora nafte.

## 1. Uvod — Introduction

O podjeli tanina, odnosno o današnjem pogledu na kemizam tanina rečeno je u općem dijelu.

Niz autora prema Kirbyu, Knowlesu i Whiteu (80) nalaze, da su pojedini tanini složene prirode, npr. po Fischeru i Freudenbergu (46) te Fischeru i Bergmanu (45) kineski galotanin (*Rhus chinensis* Mill.), ili po Catravasu (23) sumah ekstrakt (*Rhus coriaria* L.), ili po Clarku i Levyu (26) kestenov ekstrakt, itd. itd. Odnosno, niz autora ukazuje na kompleksnost taninskog materijala.

I dok jedni autori, kao npr. Freudenberg i Maitland (49), Roux (126), Braunschweig (16) ili Putnam i Gensler (116) nalaze formule za quebracho, odnosno »pročišćen« mimosin tanin i smatraju da je to jedna tvar, drugi ukazuju na nepotpunu desorpciju s kožnog praha (97) ili na nezadovoljavajuću metodiku (19), tj. ukazuju na kompleksnost taninskih ekstrakata. Da materijal, dobiven desorpcijom kožnog praha nije manje kompleksan nego izvorni, utvrdio je White (164) svojim radom na kromatografiji quebracho tanina dokazavši da je quebracho taninski ekstrakt smjesa velikog broja tvari.

Kromatografijom taninskog ekstrakta myrobalana Hillis (69) također zaključuje da su tanini kompleksne smjese.

Kasnije White, Kirby i Knowles nizom radova (82, 165, 83) kromatografski dokazuju i utvrđuju kompleksnost taninskih ekstrakata, specijalno quebracha i mimoze. Prije kromatografije oni obavljaju frakcionaciju ekstrakata (82, 83) organskim otapalima.

U našem je radu također prije kromatografiranja obavljena frakcionacija ekstrakata tanina kestena, hrasta i ruja organskim otapalima. Rezultati frakcioniranja i kromatografiranja izloženi su u daljnjem tekstu.

Obavljena je i taninska analiza (semimikro) pojedinih frakcija, da bi se vidjelo koliko je štavne tvari u pojedinim frakcijama ispitivanih taninskih ekstrakata.

Konačno, da bi se dobio orijentacijski uvid u grupe tvari ili pojedine tvari, koje sudjeluju u kompleksnosti ispitivanih taninskih materijala, obavljena su mjerenja UV i IR-spektra pojedinih frakcija ispitivanih taninskih ekstrakata.

## 2. Frakcioniranje taninskih ekstrakata — Fractionation of tannin extracts

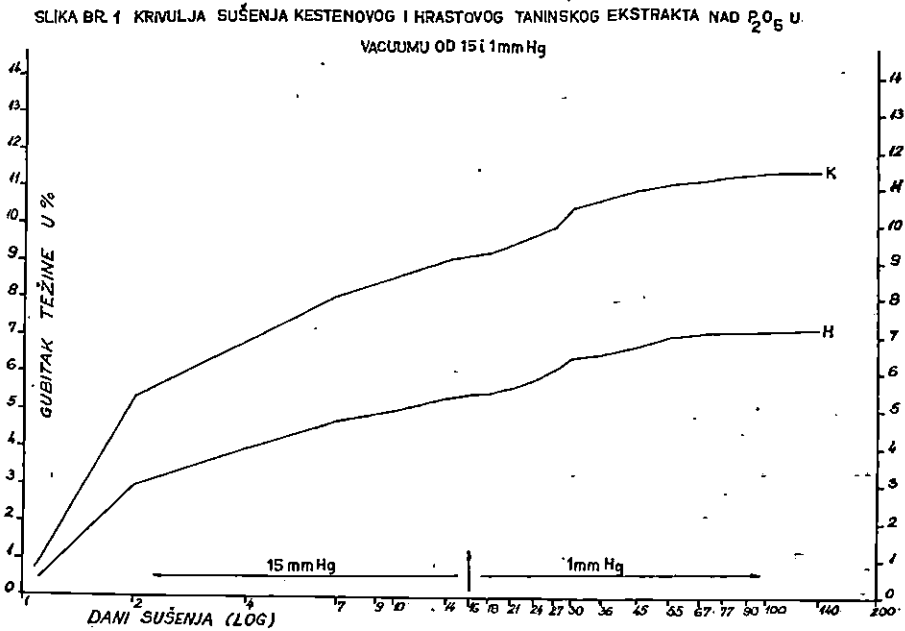
## 2.1 Uvod — Introduction

Komercijalni\* taninski ekstrakti iz kestenova i hrastova drva te rujeva lišća u prahu sušeni su kod sobne temperature u vakuumu nad  $P_2O_5$ . Nakon duljeg sušenja i smanjenja vakuuma od 15 mm Hg na manje od 1 mm Hg postignuta je približno konstantna težina, što se za tanine hrasta i

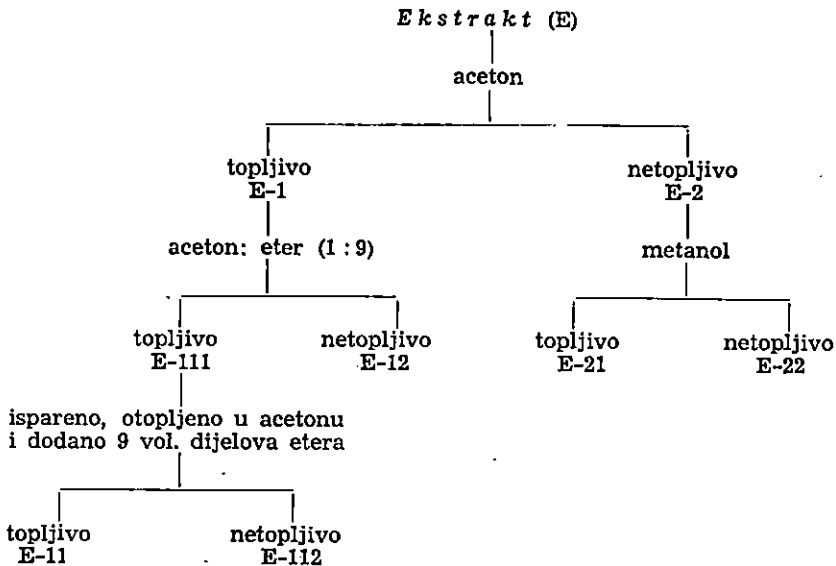
\* Taninski ekstrakt kestenova drva — u prahu — dobiven od Jugotanina, Sevnica.

Taninski ekstrakt hrastova drva — u prahu — dobiven od DIK-a Belišće.  
Taninski ekstrakt rujeva lišća — u prahu — dobiven od prof. dr Opačića, a proizveden je po toplom postupku ekstrakcije u tvornici tanina i furfurola Sisak.

kestena vidi na slici 1. Količina vode, vezana na  $P_2O_5$  iznosi konačno za kestenov ekstrakt 11,50%, a za hrastov oko 70% od početno uzetih količina.



Ekstrakti kestena, hrasta i ruja su nakon sušenja podvrgnuti frakcioniranju otapalima. Frakcioniranje je izvedeno prema shemi (sl. 2)



Slika 2. Shema frakcioniranja taninskih ekstrakata pomoću otapala

Kirby i koautora (82) za frakcioniranje mimoza ekstrakta, koja se i u tom slučaju pokazala povoljnom, specijalno za kestenov i hrastov ekstrakt.

Dobivene frakcije upotrijebljene su za kromatografska i ostala ispitivanja.

Gore navedeni autori (82) upotrijebili su i *Craigovu* protustrujnu razdjelnu tehniku (27). Ova separacija pokazala se odličnom za odjeljivanje relativno jednostavnih smjesa ili za odjeljivanje malih količina nečistoća iz kemikalija (167). Primjena spomenute tehnike na složene smjese nepoznatih tvari — kao u slučaju taninskih ekstrakata — nije najoptimalnija. Dobivena je, međutim, izrazita sličnost separacija objema metodama u slučaju mimozina ekstrakta (82, 165). U ovom radu separacija *Craigovom* tehnikom nije primijenjena.

Jednostavna frakcionacija polifenolnih tanina je teško izvediva. Polifenolna reaktivnost grupa u molekuli vrlo malo varira od tanina do tanina, tako da za separaciju na bazi kemijske razlike praktički ne postoji mogućnost.

*Kirby* i koautori (82) tvrde, da su polifenolni tanini uzajamno vrlo topljivi te da tvore krute otopine koje uzrokuju da se tanini ponašaju kao homogene tvari. Nadalje dok se s jedne strane ističe da taninski ekstrakti pokazuju golem porast topljivosti u organskim otapalima uz tragove vode (25, 112), s druge strane se navodi da je praktički neizvedivo dobivanje *potpuno* bezvodnih ekstrakata.

Gore spomenuta uzajamna topljivost taninskih tvari je i od praktične važnosti jer se time, odnosno parcijalnim uklanjanjem nekih komponenata, može protumačiti izlučivanje nekih tvari na površini kožnih vlakana («cvijet» od elag kiseline).

## 2.2 Frakcioniranje kestenova ekstrakta — Fractionation of Chestnut extract

Osušeni kestenov ekstrakt u količini od 50 g promućkan je 2 puta s po 100 ml acetona p.a. («Kemika»), a zatim još 9 puta s po 50 ml istog otapala. Svako mućkanje trajalo je prosječno 15 dana. Nakon svakog mućkanja dekantiran je aceton koji je otopio frakciju K-1.

Sve dekantirane otopine su pomiješane, uparene i konačno osušene nad silikagelom u vakuumu. Sušenje ove, kao i pojedinih kasnije navedenih frakcija nad silikagelom u vakuumu trajalo je oko 60 dana, a kontrolirano je vaganjem. Isto tako je osušena i preostala frakcija K-2. Količina dobivene supstance K-1 iznosila je 25,94 grama, a K-2 24,70 grama.

Nakon sušenja i vaganja frakcija K-2 je mućkana 6 puta s po 100 ml metanola. Svako mućkanje je trajalo 2 dana. Otopine otopljenog dijela frakcije K-2 su spojene, koncentrirane, isparene pod sniženim tlakom nad silikagelom te su dale frakciju K-21. Preostali neotopljeni dio je frakcija K-22. Nakon sušenja nad silikagelom u vakuumu dobilo se 12,14 grama frakcije K-21 i 11,97 grama frakcije K-22.

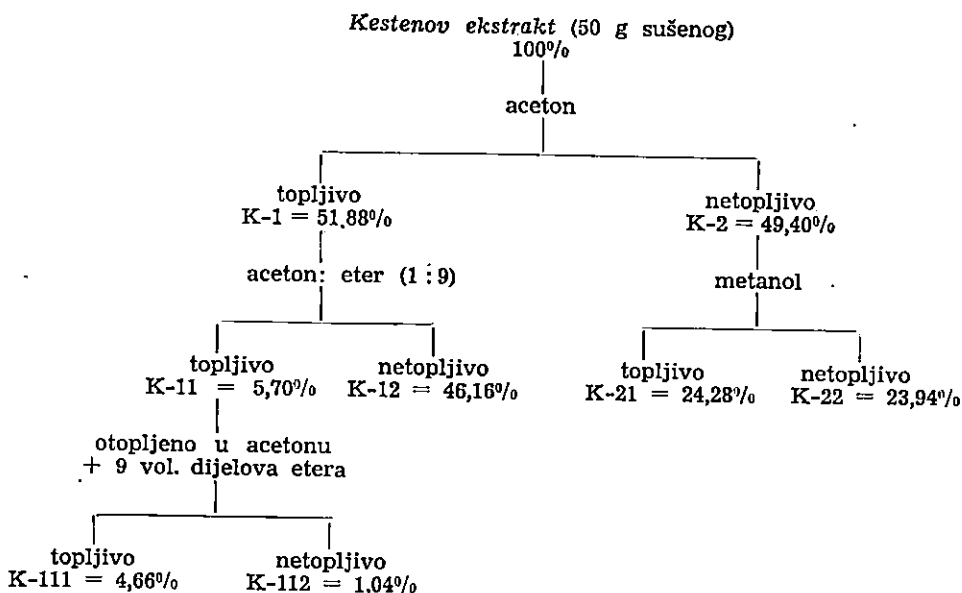
Na frakciju K-1 dodano je 35 ml acetona, a zatim je uz jako potresivanje dodano 315 ml etera (9 puta više od acetona) i promućkano. Nakon toga otopina je dekantirana. Na talog je opet dodano 35 ml acetona i 315 ml etera, promućkano, itd. Ta separacija frakcije K-1 obavljena je 4 puta na gore opisani način a mućkanje je svaki puta trajalo 6 dana. Nakon zadnje dekantacije spojene su sve četiri otopine, profiltrirane i djelomično uparene u frakciju K-11. Talog je frakcija K-12. Obje frakcije su zatim sušene nad silikagelom u vakuumu. Količina dobivene tvari K-11 iznosila je 2,55 grama, a K-12 tvari 23,08 grama.

Nakon sušenja frakcija K-11 otopljena je u deseterostrukoj (28,5) količini acetona, odnosno u 36,0 ml, a zatim je dodana deveterostruka volumna količina etera (prema acetonu), tj. 324 ml. Iza jednosatnog mućkanja ostavljena je da stoji oko 20 sati. Talog je frakcija K-112, a u otopini ostaje K-111. Nakon sušenja nad silikagelom u vakuumu dobivena količina K-112 iznosila je 0,52 grama, a K-111 2,33 grama.

Konačno su dobivene ove frakcije:

frakcija K-111	. . . . .	2,33 grama
" K-112	. . . . .	0,52 "
" K-12	. . . . .	23,08 "
" K-21	. . . . .	12,14 "
" K-22	. . . . .	11,97 "

Slika 3 daje pregled frakcioniranja kestenova ekstrakta. Neslaganje zbroja do 100% je zbog nedovoljnog sušenja.



Slika 3. Shema frakcioniranja kestenova taninskog ekstrakta pomoću otapala.

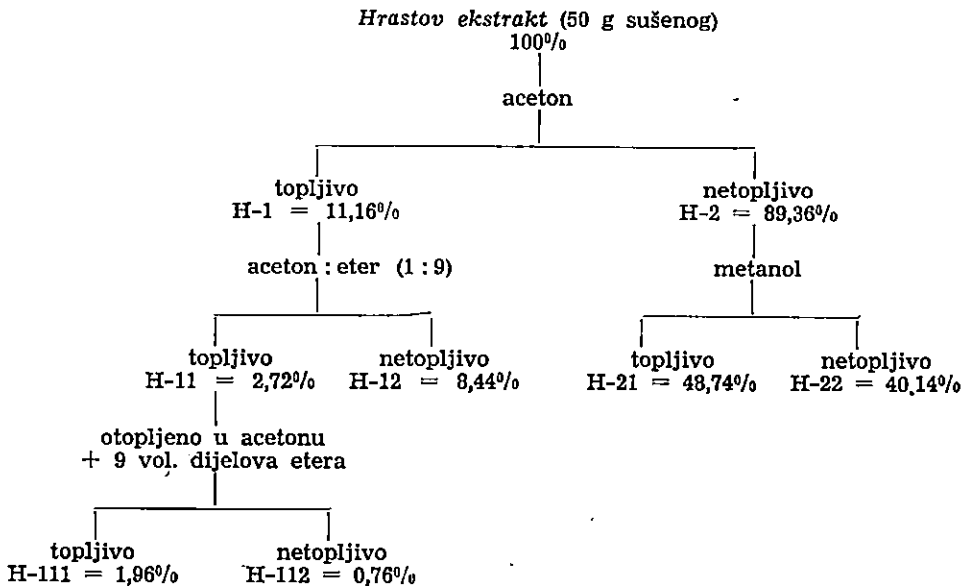
### 2.3 Frakcioniranje hrastova ekstrakta — Fractionation of Oak extract

Frakcioniranje osušenoga hrastova ekstrakta izvedeno je potpuno analogno kao i kod, već opisanoga, kestenova ekstrakta (Sl. 3).

Frakcioniranjem dobivene su slijedeće frakcije:

frakcija H-111	. . . . .	0,98 grama
" H-112	. . . . .	0,38 "
" H-12	. . . . .	4,22 "
" H-21	. . . . .	24,37 "
" H-22	. . . . .	20,07 "

Slika 4 daje pregled frakcioniranja hrastova ekstrakta. Neslaganje zbroja do 100% je zbog nedovoljnog sušenja.



Slika 4. Shema frakcioniranja hrastova taninskog ekstrakta pomoću otapala

#### 2.4 Frakcioniranje rujeva ekstrakta — Fractionation of Sumach extract

Osušeni rujev ekstrakt (50 g) promućkan je prvo s 150 ml acetona p.a. (»Kemika«), a kasnije još pet puta s po 100 ml acetona. Svako mućkanje je trajalo 6 dana. Dekantacijom je dobivena otopljena frakcija R-1 (vrlo malo), dok je daleko veći dio ostao neotopljen R-2.

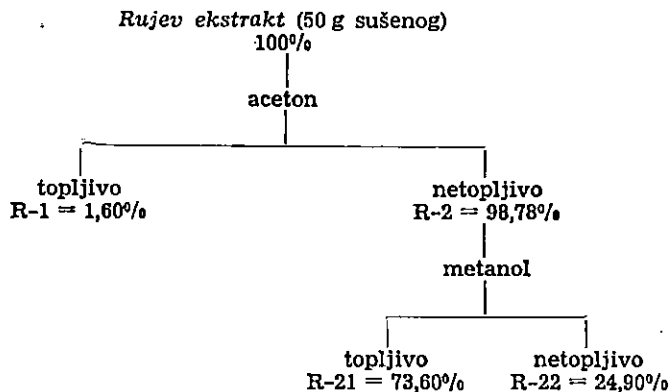
Nakon sušenja (oko 60 dana) nad silikagelom u vakuumu dobiveno je 0,80 grama R-1 i 49,25 grama R-2. Količina dobivene frakcije R-1 je toliko mala, da nije dalje frakcionirana.

Osušena frakcija R-2 mućkana je 9 puta s po 100 ml metanola. Svaki put prosječno pet dana. Nakon otparivanja i sušenja nad silikagelom u vakuumu dobivena je metanolom frakcija R-21, dok je frakcija R-22 ostala neotopljena. Dobiveno je 36,80 grama frakcije R-21 i 12,45 grama frakcije R-22. Daljnje frakcioniranje nije izvedeno, iako bi bilo potrebno — naročito frakcije R-21 zbog analogije frakcioniranja s ekstraktima kestena i hrasta.

Dobiveno je ukupno:

frakcija R-1 . . . . .	0,80 grama
" R-21 . . . . .	36,80 "
" R-22 . . . . .	12,45 "

Slika 5 shematski prikazuje tu frakcionaciju. Odstupanja od 100% su vjerojatno zbog sušenja, koje je vrlo teško izvedivo.



Slika 5. Shema frakcioniranja rujeva taninskog ekstrakta pomoću otapala

### 3. Semimikro taninska analiza taninskih ekstrakata i frakcija *Semimicro tannin analysis of tannin extracts and fractions*

#### 3.1 Uvod — Introduction

Kruti taninski ekstrakti kestena, hrasta i ruja kao i njihove frakcije ispitani su na sadržaj tanina, netanina i netopljivoga semimikro taninskom analizom.

Semimikro taninskoj analizi pribjeglo se zbog malih količina tvari pojedinih ekstrakata, naročito nekih frakcija.

Semimikro taninska analiza po filter metodi opisana je i razrađena po *Grassmanu* i koautorima (56). Autori se drže propisa službene filter metode s time, da je pribor smanjen, a količina ispitivane tvari iznosi jednu desetinu od propisane za makro taninsku analizu. Kako autori navode, metoda se u stotinama ispitivanja pokazala kao dobra. Svoju tvrdnju autori potkrepljuju i tabelarnim pregledom cijelog niza taninskih analiza, izvedenih po makro- i semimikro metodi.

#### 3.2 Metode rada i pribor za semimikro taninsku analizu — Working methods and utensils for semimicro tannin analysis

##### 3.21 Određivanje sadržaja vode — Determination of water content

Sadržaj vode određivao se indirektno kao razlika do 100% kod taninske analize. Osim toga direktno je određivan tako da se oko 1 g tvari odvajalo s točnosti od 0,1 mg u posudicu za vaganje s ubrušenim čepom i sušilo kod 100°C do konstantne težine (efektivna voda).

##### 3.22 Priprema analitičke otopine — Preparation of analytical solution

Za makroanalize po filter metodi uzima se za 1000 ml analitičke otopine  $\frac{400}{x}$  g ekstrakta ( $x$  = postotak tanina u ekstraktu). U našim slučajima odvaga je iznosila 0,5—0,6 g. Odvagnuti ekstrakt je prelišen desetorostrukom količinom kipuće

destilirane vode i miješanjem na vodenoj kupelji jednoliko suspendiran. S oko 40 ml kipuće destilirane vode suspenzija je prelivena u odmjernu tikvicu od 100 ml uz dodatak destilirane vode do oko 90 ml. Nakon toga se tikvica hladi u vodi od 18°C (temperatura ne smije biti niža) uz često potresivanje, da ne dođe do pothlađivanja otopine uz stijenke tikvice. Kad se postigne 18°C, tikvica se dopuni do 100 ml s destiliranom vodom, promućka i filtrira.

### 3.23 *Određivanje ukupnoga isparnog ostatka — Determination of the total evaporation residue*

Od pripremljene analitičke otopine otpipetira se 5 ml u srebrnu zdjelicu s ravnim dnom (promjer 3 cm, visina 2 cm, težina oko 6,4 g).

Zdjelica se stavi na vodenu kupelj (na porcelanski prsten). Sadržaj se ispari do suha, a zatim kroz 4 sata suši u sušioniku kod 98,5–100°C. Iz literature i vlastitim ispitivanjem utvrđeno je sušenje kroz 4 sata kao najoptimalnije.

Srebrne zdjelice se prije svake analize peru koncentriranom solnom kiselinom, isperu vrućom destiliranom vodom i zatim suše u sušioniku do konstantne težine. Zbog pranja nastaju gubici, pa se zdjelice moraju prije svake analize vagati. Prosječni gubitak težine zdjelice iznosi oko 0,013% od početnih težina zdjelica.

### 3.24 *Određivanje netopljivoga — Determination of insoluble matter*

Netopljivo se određuje analogno kao kod makroanalize, tj. filtracijom preko filter svijeće kod sobne temperature. Upotrijebljene su svijeće iz specijalnoga poroznog porcelana, proizvedene od Berkefeld-filter društva (Celle). Dužina svijeće je 60 mm, a promjer 15 mm. Nove svijeće prane su nekoliko dana 10%-tnom solnom kiselinom, a zatim dobro isprane vrućom destiliranom vodom i osušene kod 100°C. Cilindar u koji se postavi svijeća i otopina za filtriranje visok je ukupno 120 mm. Gornji (širi) dio je 40 mm promjera i 45 mm visine, a donji (uži) dio ima promjer 25 mm i visinu 75 mm. Oblik cilindra omogućuje malen utrošak otopine. Usisna cijev ima razliku nivoa od 360 mm (kod makroanalize 750 mm). Prije filtracije svijeća stoji u otopini oko 10 minuta i istom tada se počinje s izvlačenjem. Analogno kao kod makroanalize prvih se 25 ml odbaci. Od daljnjega bistrog filtrata otpipetira se 5 ml u srebrnu zdjelicu, ispari do suha na vodenoj kupelji, suši na 98°C kroz 4 sata, ohladi u vakuumu (eksikatoru) i važe. Po završenoj filtraciji filter-svijeće se peru u toploj krom-sumpornoj kiselini i ostave preko noći, a zatim se isperu temeljito vrućom destiliranom vodom i osuše.

### 3.25 *Određivanje netanina — Determination of non-tannins*

Za određivanje netanina u našim analizama koristila se filter metoda. Radi se *Procterovim* filter zvonom, ali je zvono manjih dimenzija, tj. dužina mu je 50 mm, a unutrašnji promjer 11 mm, promjer kapilare 1,5 mm, a dužina cijevi 320 mm. U gornji kraj zvona stavi se malo vate, a zatim  $0,9 \pm 0,05$  g kromiranoga kožnog praha. U ovim je analizama upotrijebljen slabo kromirani darmstadski kožni prah. Zvono se stavi u stakleni cilindar visine 75 mm i promjera 20 mm u koji se ulijeva otopina. Nakon što se zvono, ispunjeno kožnim prahom, napije otopinom, povuče se zrak na kraju kapilare tako da tekućina počne kapati u menzuru. Broj kapi u minuti iznosi 7–9. Prvih 3 ml se odbaci, a od slijedećih 6 ml otpipetira se točno 5 ml, otpari na vodenoj kupelji, a zatim suši 4 sata u sušioniku kod 98,5–100°C.

Kod takvog određivanja važan je postupak punjenja zvona kožnim prahom, jer se brzina protjecanja regulira punjenjem. Način punjenja zvona kožnim prahom detaljno je opisan i ilustriran po *E. Grosjeanu* (58), i prema njemu se postupalo u našim analizama.



### 3.26 Određivanje pH — Determination of pH

Od svake analitičke otopine mjereno je pH, ali također i od njezine desetostruko manje koncentracije. Mjerenja su obavljena pH-metrom Iskra MA 5701 s točnosti od dvije decimale. Prije svakog mjerenja obavljeno je baždarenje pomoću KH-ftalata na pH 4,00.

### 3.27 Analize — Analyses

Za svaku ispitivanu tvar obavljena je paralelna analiza. Primjer izračunavanja jedne analize hrastova ekstrakta pokazan je na jednoj frakciji hrastova taninskog ekstrakta.

#### 3.271 Odvaga:

Posudica za vaganje + uzorak:	30,3380 g
posudica za vaganje:	29,8270 g
odvaga:	0,5110 g

#### 3.272 Određivanje ukupnoga isparnog ostatka:

Ovdje se određuje suha tvar koja sadrži tanin (T) + netanin (NT) + netopljivo (Net.).

zdjelica + ostatak:	6,4315 g
zdjelica:	6,4067 g
isparni ostatak:	0,0248 g

#### 3.273 Određivanje netopljivoga:

Ovdje se određuje suha tvar koja sadrži tanin (T) + netanin (NT).

zdjelica + ostatak:	6,7228 g
zdjelica:	6,7000 g
ostatak:	0,0228 g

#### 3.274 Određivanje netanina:

Ovdje se određuje suha tvar koja sadrži netanin, dobiven filter metodom.

zdjelica + ostatak:	6,8352 g
zdjelica:	6,8295 g
ostatak:	0,0057 g

#### 3.275 Određivanje pH-vrijednosti:

pH analitičke otopine (a) =	3,39
pH a/10 =	4,10

#### 3.276 Izračunavanje:

##### 3.2761 Ukupni isparni ostatak:

u 5 ml ima	0,0248 g
u 100 ml ima	x g

$$\frac{0,0248 \cdot 100}{5} = 0,4960 \text{ g T + NT + Net. u 100 ml (0,5110 g)}$$

u 0,5110 g ima 0,4960 g  
u 100 g ima . x g

$$x = \frac{0,4960 \cdot 100}{0,5110} = 97,06\% \text{ (T + NT + Net.)}$$

3.2762 *Netopljivo:*

u 5 ml ima 0,0228 g  
u 100 ml ima y g

$$y = \frac{0,0228 \cdot 100}{5} = 0,4560 \text{ g T + NT u 100 ml (0,5110 g)}$$

u 0,5110 g ima 0,4560 g  
u 100 g ima y g

$$y = \frac{0,4560 \cdot 100}{0,5110} = 89,24\% \text{ (T + NT)}$$

3.2763 *Netanin:*

u 5 ml ima 0,0057 g  
u 100 ml ima z g

$$z = \frac{0,114 \cdot 100}{0,5110} = 22,31\% \text{ NT}$$

3.2764 *Izračunavanje iz gornjih podataka:*

$$T = (T + NT) - NT = 89,24 - 22,31 = 66,93\%$$

$$\text{Net} = (T + NT + \text{Net}) - (T + NT) = 97,06 - 89,24 = 7,82\%$$

$$\text{H}_2\text{O} = 100 - (T + NT + \text{Net}) = 100 - 97,06 = 2,94\%$$

3.2765 *Izračunavanje na suhu tvar:*

$$T \quad - \quad 66,93\% \quad \%T = \frac{66,93 \cdot 100}{(100 - 2,94)} = 69,00$$

$$NT \quad - \quad 22,31\% \quad \%NT = \frac{22,31 \cdot 100}{(100 - 2,94)} = 23,00$$

$$\text{H}_2\text{O} \quad - \quad 2,94\% \quad \%Net = \frac{7,82 \cdot 100}{(100 - 2,94)} = 8,00$$

100,00%

3.2766 *Izračunavanje omjernog broja (O. B.):*

$$\text{O. B.} = \frac{T \cdot 100}{T + NT} = \frac{69 \cdot 100}{69,0 + 23,0} = 75,0\%$$

3.2767 *Prikazivanje analize u našem radu (prema gornjim podacima) je slijedeće:*

$$\begin{aligned} T &= 69,0\% \\ NT &= 23,0\% \\ \text{Net.} &= 8,0\% \\ \text{OB} &= 75,0\% \\ \text{pH(a)} &= 3,39 \\ \text{pH(a/10)} &= 4,10 \end{aligned}$$

### 3.3 Pregled taninskih analiza — Survey of tannin analyses

Prema naprijed opisanoj metodi obavljene su sve analize taninskih otopina.

Podaci za tanin, netanin i netopljivo izračunati su na suhu tvar zbog lakše usporedbe. Rezultati koji su izneseni na tabeli 1 predstavljaju srednje vrijednosti većeg broja analiza.

Reakcija želatina — kuhinjska sol bila je u svim ispitivanjima negativna.

Taninske analize frakcija K-112, H-111, H-112 i R-1 nisu izvedene zbog premale količine tvari (ispod 2%).

Osim taninskih analiza na tabeli 1 dodan je na kraju i težinski postotak frakcije pojedinih tanina.

Tab. 1

Frakcija	T%	NT%	Net. %	O. B. %	pH anal. otop.	pH 0,1 anal. otop.	% frakcije
K	81,9	17,4	0,7	82,5	3,79	4,24	—
K-21	72,8	22,7	4,5	76,4	3,71	4,40	23,94
K-22	78,4	20,0	1,6	79,7	4,85	5,23	24,28
K-12	79,3	18,5	2,2	80,1	3,33	4,05	46,16
K-111	95,0	1,9	3,1	98,1	2,80	3,50	4,66
K-112	—	—	—	—	—	—	1,04
H	66,7	31,3	2,0	68,0	4,20	4,65	—
H-21	60,8	37,4	1,8	61,9	3,71	4,25	48,74
H-22	71,8	27,1	1,1	72,6	5,19	5,45	40,14
H-12	67,0	26,0	7,0	72,0	3,45	4,20	8,44
H-111	—	—	—	—	—	—	1,96
H-112	—	—	—	—	—	—	0,76
R	58,9	40,5	0,6	59,3	4,40	4,55	—
R-21	62,5	33,2	4,3	65,3	4,03	4,22	73,60
R-22	9,2	59,5	31,3	13,4	6,70	6,79	24,90
R-1	—	—	—	—	—	—	1,60

Pojava koju su *White* i koautori (165) uočili kod mimoza tanina i *Häglund* (59) kod drugih opažena je i u našim ispitivanjima. Naime, analizom se pokazalo da su pojedine frakcije siromašnije na taninu nego ishodni taninski ekstrakt, a uz istovremeni porast netanina (sve računato na suhu tvar). Uzrok je tome što kod analiziranja s kožnim prahom dolazi do taloženja netanina na kožnom prahu nakon vezanja otopljenih polifenolnih tanina. Ti istaloženi netanini, zbog netopljivosti u vodi, nisu isprani s kožnog praha, pa tako dođu kao tanini. U slučaju frakcija izoliranih iz ekstrakta »separacija netanina i topljivost tanina u različitim frakcijama može uvjetovati, da netanini budu analizirani u odsutnosti topljivih tanina, tako da ne može doći do nikakvog taloženja« (165). Kao posljedica toga može se pokazati viši rezultat netanina od onoga u ishodnom ekstraktu.

Složenost taninskog ekstrakta ovdje pokazuje dvostruko ponašanje, tj. da se jednom pod određenim okolnostima javlja kao tanin, a drugi puta kao netanin.

U našim ispitivanjima opaženo je da se pH-vrijednost ishodne tvari »fracionira«. Naime, suma pH-vrijednosti pojedinih taninskih frakcija

jednaka je pH-vrijednosti ishodnog ekstrakta uzevši u obzir količinu frakcije, kojom sudjeluje u ekstraktu. Računski izvedena pH-vrijednost ekstrakta ne razlikuje se bitno (osim kod ruja) od pH-vrijednosti ekstrakta izmjenjenog s pH-metrom.

### 3.4 Diskusija rezultata — Discussion of results

1. Obavljena je frakcionacija otapalima kestenova, hrastova i rujeva komercijalnog taninskog ekstrakta u prahu.
2. Od kestenova i hrastova taninskog ekstrakta dobiveno je po pet frakcija, a od rujeva tri frakcije.
3. Taninski ekstrakti kestena, hrasta i ruja kao i njihove frakcije ispitani su na sadržaj tanina, netanina i netopljivoga semimikro taninskom analizom (osim frakcija s prinosom ispod 20%). Obavljeno je određivanje njihove pH-vrijednosti.
4. a) Kod kestenova ekstrakta u acetonu netopljiva frakcija sadrži nešto manji postotak aktivne taninske tvari, ali zato više topljivih netaninskih tvari. U acetonu topljiva frakcija ima neznatno niži sadržaj tanina i nešto povišen sadržaj netanina.  
b) Kod hrastova ekstrakta frakcija netopljiva u acetonu pokazuje kod topljiva dijela (H-22) vrlo osjetno povećanje tanina i znatno smanjenje netanina. Frakcija, topljiva u metanolu (H-21) pokazuje značajno smanjenje tanina uz veoma veliko povećanje netanina. Frakcija, topljiva u acetonu (H-12) pokazuje isti sadržaj tanina kao izvorni ekstrakt uz pojavu velikog sadržaja netopljivoga.  
c) Kod rujeva ekstrakta frakcija netopljiva u acetonu daje veoma povoljne rezultate, tj. znatno se povećava sadržaj tanina, smanjuju netanini, ali se osjetljivo povećava netopljivo. Netopljiva frakcija u metanolu (R-22) sadrži vrlo malo tanina, velike količine netanina i veoma velike količine netopljivoga. Frakcije, koja je topljiva u acetonu, dobiveno je vrlo malo pa se zato nije mogla izvesti taninska analiza.
5. Pokazalo se da je suma pH vrijednosti pojedinih frakcija, uzevši u obzir količinu frakcije, približno jednaka pH-vrijednosti ishodnog ekstrakta.  
Tanini i njihove frakcije podvrgnuti su dalje kromatografskom i spektrometrijskom ispitivanju.

## 4. Kromatografska ispitivanja taninskih ekstrakta i frakcija *Chromatographic investigations of tannin extracts and fractions*

### 4.1 Uvod — Introduction

Za ispitivanje tanina kestena, hrasta i ruja u našem je radu primijenjena papirna kromatografija, jer se pokazala sposobnom za karakterizaciju polifenolnih tvari (82, 83). Kod polifenolnih tvari postoje male razlike u kemijskim reakcijama s obzirom na njihovu fenolnu reaktivnost,

koja dominira. Osim toga tanini zbog velike uzajamne topljivosti tvore krute otopine u kojima se grupe tvari ponašaju kao jedna homogena tvar. Tako se npr. frakcija, izolirana iz ekstrakta ne topi u otapalu pomoću kojeg je izolirana — bila je topljiva samo uz prisutnost drugih tvari. Isto tako ima frakcija koje se lako tope u otapalu, s kojim nisu mogle biti odijeljene iz cijelog ekstrakta, jer se on ponaša kao kruta otopina (165). Ta pojava čini, kako je već prije naglašeno, poteškoće kod frakcioniranja.

Papirna kromatografija se, međutim, ipak pokazala zadovoljavajućom za separaciju takve kompleksne smjese kao što je tanin, a naročito ako se kombinira s frakcioniranjem pomoću otapala.

Ispitivanja tanina su obavljena na različite načine, a dalje je dan samo pregled ispitivanja tanina pomoću papirne kromatografije prema dostupnoj literaturi.

#### 4.2. Papirna kromatografija tanina — Paper chromatography of tannins

Analiza taninskog materijala pomoću papirne kromatografije spominje se u literaturi prvi puta 1944. godine (29). Do godine 1952. ima još registriranih 11 radova koji su dani u popisu literature.

Autori ispituju različite tanine i različitim načinima.

Kružnom papirnom kromatografijom 5%-tnih otopina uz mobilnu fazu 40% octenu kiselinu ispitivano je 10 vrsta taninskih ekstrakta (75), a među njima i ekstrakti hrasta, kestena i ruja. Rezultat ispitivanja je kod hrasta 7, kod kestena 4 i kod sumaha 5 različito obojenih zona pod UV-svjetlom.

U svojem prvom radu *White* (164) je pokazao da je quebracho taninski ekstrakt smjesa velikog broja raznolikih stvari. Slično opaža kasnije i *Hillis* (67) za *Eucalyptus* *kinos*, a ispitivanjem niza drugih tanina (gambir, katehin, quebracho, mimoza, mirobalan, malet i mirtan) to i potvrđuje (68).

*Kirby* s koautorima (81) je ispitao, uzlaznom metodom uz različita otapala 23 vrste taninskih ekstrakata, a među njima i taninske ekstrakte hrasta, kestena i sumaha. Dobiveni rezultati dani su na tabeli 2. Mrlja s  $R_f$  0,65—0,66 je galna kiselina (u tabeli potertano).

Dok rezultati prikazani na tabeli 2 nesumnjivo pokazuju složenost ekstrakta, *Schmidt* i *Lademann* (146) su, ispitujući hidrolizirajuće tanine, dobili samo jednu mrlju. Uzrok tome su prazarijeđene otopine, premalo osjetljivi reagensi za prskanje i nepovoljna mobilna faza.

Isto su tako po jednu mrlju dobili *Putnam* i *Bowles* (114) ispitujući mimozu, gambir, mangrovu i quebracho. Oni su upotrijebili terciarni butanol: 0,1N pufer (pH = 9) — 1 : 1, za jednosmjernu silaznu metodu na *Whatman* papiru 11.

Isti autori (114) kažu da, ispitujući svoj mimoza ekstrakt (117) metodom *Kirby* i koautora i uz njihove uvjete (82), nisu dobili nikakve ni vidljive ni fluorescentne mrlje u UV-svjetlu, izuzev plavobijele fluorescentne mrlje na startu. Dobili su (s bis-diazotiranim benzidinom) samo jednoličnu trokutastu mrlju s bazom na prvom smjeru kretanja. Smatraju da su svojim načinom dobili bolje rezultate te zaključuju, da je ekstrakt homogen i da mu odgovara iznesena osnovna formula.

Svoj daljnji rad su *Kirby* i koautori usmjerili na ispitivanje mimozina (82) i quebracho (83) taninskog ekstrakta. Nakon frakcioniranja otapalima autori primjenjuju dvosmjernu uzlaznu kromatografiju. Ispitivanjem mimoza taninskog ekstrakta našli su 10 fluorescentnih mrlja nakon izlaganja amonijskim parama te 27 mrlja nakon prskanja amonijakalnom otopinom srebrnog nitrata. Separacija komponenata mimoza taninskog ekstrakta je prva stvarna frakcionacija jednoga taninskog ekstrakta. Kod quebracho ekstrakta dobili su 17 glavnih i 23 sporedne fenolne komponente te 21 spoj koji fluorescira.

Tab. 2

Taninski ekstrakt	Mobilna faza	Način razvijanja mrlje	Rf i boja mrlje
Kesten	n-butanol: octena kisel.: voda (4 : 1 : 5)	Fluorescentne mrlje	0,75 — plava
		Fluorescentne mrlje nakon izlaganja amonijakalnim parama	0,75 — plava
		Amonijakalni srebrni nitrat (7 tamnih mrlja)	0,34 — blijedožuta 0,03 0,07 0,12 0,19 0,30 0,41
		Fluorescentne mrlje	<u>0,65</u>
Hrast	"	Fluorescentne mrlje	0,05 — blijedožuta 0,38 — plava 0,81 — plava
		Fluorescentne mrlje nakon izlaganja amonijevim parama	0,34 — žuta
		Amonijakalni srebrni nitrat (6 tamnih mrlja)	0,62 — žuta 0,03 0,11 0,19 0,24 0,26 <u>0,65</u>
	sek-butanol (zasić. vodom)	Amonijakalni srebrni nitrat (5 tamnih mrlja)	0,05 0,08 0,12 0,22 0,37
Sumah	n-butanol: octena kisel.: voda (4 : 1 : 5)	Fluorescentne mrlje	0,07 — žuta i bijela 0,26 — bijela 0,40 — bijela 0,52 — bijela 0,65 — apsorpcija 0,77 — bjelkasta 0,88 — plava
		Fluorescentne mrlje nakon izlaganja amonijevim parama	0,05 — bijela 0,22 — plava 0,35 — žuta 0,48 — žuta 0,62 — apsorpcija 0,71 — žuta 0,88 — bijela
		Amonijakalni srebrni nitrat (8 tamnih mrlja)	0,04 0,07 0,13 0,22 0,33 0,50 <u>0,66 0,89</u>

Primijenivši dvodimenzionalnu kromatografiju za ispitivanje taninskih ekstrakata *White* i koautori (165) su, među ostalima, kromatografirali i kestenov ekstrakt. Kromatogram je vrlo sličan našem. Mobilne faze, koje su koristili, su sljedeće:

- prvi smjer — N/20 HCl zasićen terc. amilnim alkoholom,  
drugi smjer — sekundarni butanol zasićen s N/20 HCl.

Kromatogram je razvijen amonijakalnim srebrnim nitratom. Nađene su galna i elag kiselina.

Kvantitativno mjerenje biljnih fenola metodom transparencije na papirnim kromatogramima opisali su *Bradfield* i *Flood* (14). Oni su jednosmjerno kromatografirali različite tvari na *Whatman* papiru 1 s mobilnom fazom n-butanol-octena kiselina-voda, izrezali odgovarajuće zone i mjerili njihov UV-spektar.

Slično su kvantitativno ispitivanje pokušali primijeniti na taninske ekstrakte *King* i *White* (24) mjerenjem UV-spektra fisetina.

Daleko bolje rezultate isti su autori (24) dobili spektrofotometriranjem reflektiranog svjetla komponenata i uspoređivanjem sa standardima. Mjerili su galnu kiselinu koja, razvijena smjesom feriklorida i fericijanida (165), daje mrlju s maksimumom optičke gustoće kod 680 m $\mu$ . Kao nul-podlogu (blank) koristili su ili neprskani papir, ili magnezijev karbonat. Istom metodom mjerili su galnu kiselinu u quebracho ekstraktu, glukozu i arabinozu u mimoza ekstraktu, katehin u mimoza ekstraktu, galnu i m-digalnu kiselinu u taninskoj kiselini, itd.

Dvodimenzionalnom kromatografijom služi se i Roux (125) za određivanje kondenziranih tanina u koži, a uz upotrebu 3 N HCl otopine kao specifičnog reagensa na leukoantocijanidine. Koristeći tu reakciju, pretvara leukoantocijanidine u antocijanidine koji su karakteristični za pojedine ekstrakte. Među ispitivanim taninima autor navodi, da tanin kestena i općenito hidrolizirajući tanini ne daju antocijanidinsku reakciju.

Kromatografska ispitivanja obavlja i Del Pezzo ispitujući netanine (33) kao i hidrolitičke produkte kestenovine (34).

Hathway (61, 62) kod određivanja flobatanina hrastove kore koristi dvosmjernu uzlaznu kromatografiju uz slijedeće mobilne faze: (I). 6% octena kiselina s 2% mravlje kiseline i (II). butan-2-ol: octena kiselina: voda (14 : 1 : 5). Zadnju mobilnu fazu koristio je za kromatografsko dobivanje katehina.

Papirnu kromatografiju koriste King, Kirby i White praktički u svim svojim radovima, a osim njih i niz drugih autora.

#### 4.3 Eksperimentalni dio — Experimental

U ovom radu je primijenjena dvosmjerna uzlazna papirna kromatografija.

Taninski ekstrakti, njihove frakcije i standardne tvari otopljeni su u smjesi: voda : metilcelosolv : acetone (2 : 1 : 1) za dobivanje 20%-tnih otopina (standardne tvari kao 2% tne). Te su se koncentracije pokazale kao najpovoljnije.

Od svake otopine stavljeno je mikropipetom 5  $\mu$ l u donji lijevi ugao papira na udaljenost od oko 3 cm od donjega i lijevog ruba papira. Nanošena je dakle količina od 1000  $\mu$ g. Količine koje se obično nanose, tj. 10—100  $\mu$ g kao 0,1—1%-tne otopine (28) pokazale su se nedovoljnima, jer su mnoge mrlje vidljive tek kod većih koncentracija.

Svi su eksperimenti rađeni na kromatografskom papiru *Schleicher-Schüll* 2043 b, formata 29  $\times$  30 cm, kod čega je dulja strana upotrijebljena za I. smjer. Papir je spojen pomoću 2 staklene spojnice prvo uzduž dulje strane, a nakon izvršenog kromatografiranja u I. smjeru uzduž kraće strane. Po dva papira, stavljena u *Petrijeve* zdjelice s mobilnom fazom, razvijana su pod staklenim zvonom, obrubljenim gumom na staklenoj ploči kod sobne temperature.

Kao mobilna faza za I. smjer upotrijebljena je voda zasićena terciarnim amilnim alkoholom i zakiseljena octenom kiselinom (sadržaj octene kiseline = 0.1%). Octena kiselina u maloj količini sprečava ionizaciju polifenolnih tvari (82, 165). Niz mobilnih faza za tanine navodi *Hillis* (68).

Nakon kromatografiranja u I. smjeru, koje je trajalo oko 5 sati, kromatogrami su izvađeni ispod zvona i sušeni u tami kod sobne temperature.

Za II. smjer kromatografiranja upotrijebljen je sekundarni butanol zasićen vodom. Kromatografiranje u II. smjeru trajalo je oko 20 sati.

Po završetku kromatografiranja kromatogrami su sušeni kod sobne temperature u mraku.

Malo vlažni, a zatim i potpuno osušeni kromatogrami promatrani su pod UV-svjetlom (živina visokotlačna svjetiljka s nikalj-oksidi filtrom) zbog registriranja fluorescentnih mrlja.

Nakon označivanja fluorescentnih mrlja kromatogrami su prskani amonijakalnom otopinom srebrnog nitrata u mraku, gdje su i osušeni. Polifenolne tvari s tim reagensom daju tamno sive, tamno smeđe ili crne mrlje.

Amonijakalni srebrni nitrat pripremljen je tako da je na 20 ml 5%-tne vodene otopine srebrnog nitrata dodan višak 10%-tnog amonijeva hidroksida za otapanje nastalog srebrnog oksida (81). Nakon otapanja otopina je dopunjena vodom do 100 ml i tada prskana pomoću prskalice.

Kromatogrami, osušeni nakon prskanja amonijakalnim srebrnim nitratom fiksirani su oko 30 minuta pomoću 10%-tne otopine natrijeva tiosulfata, a zatim prani u tekućoj vodi oko 1 sat i sušeni.

Osim navedenih reagensa kromatogrami su ispitivani i prskani anilinfталatом («Merck-Sprühareagenz f. Chromatographie) na šećere, a zatim sušeni oko 10 minuta na 105 °C. Dobivene su smeđasto-crvenkaste mrlje.

King i White (78) daju slijedeći pregled reagensa koji se upotrebljavaju za prskanje kromatograma uz odgovarajuću literaturu za svaki pojedini reagens:

1. feriklorid, fericijanid — fenoli općenito,
2. bis-diazotirani benzidin — fenoli općenito i razlikovanje katehol-pirogalola od resorcinol-floroglucinola,
3. amonijakalni srebrni nitrat — fenoli općenito.
4. vanilin/HCl — floroglucinolne grupe (hladno), resorcinolne grupe i leukoantocijanini (vruće),
5. 1% HCl u etanolu — leukoantocijanini (vruće),
6. alkalijske, a zatim kiseline — za dihidroflavonole (npr. fustin),
7. anilinfталat — za reducirajuće šećere,
8. etilen diamin — galna kiselina i galoil-derivati,
9. U. V. (s i bez amonijevih para) — fluorescentni spojevi općenito.

Mjerenje Rf-vrijednosti pojedinih mrlja obavljeno je pomoću prepravljene sprave za nanošenje tangenta za lukove zakrivljenosti. Sprava je analogna s *Jerchel-Mohleovim* razmiernim šestarom (28). Očitavanju se direktno Rf · 100 vrijednosti s točnošću 0.2. U cijelom radu Rf-vrijednosti su izražene kao 100 puta veće, tj. Rf · 100.

#### 4.4 Kromatografija standardnih supstanci — *Chromatography of standard substances*

Već opisanom tehnikom ispitane su slijedeće standardne tvari (strukturne formule su dane kod IR-spektrometarskih mjerenja):



1. resorcin — »Merck«
2. pirogalol — Schmidt\*
3. galna kiselina — „
4. elag kiselina — „
5. 3,6 digaloiilglukoza — „
6. pentagaloilglukoza — „
7. hebulinska kiselina — „
8. hebulagna kiselina — „
9. d-katehin — »Fluka« AG-purum
10. fisetin — »Fluka« AG-puriss.

Najprije su sve standardne tvari, svaka posebno, kromatografirane samo u I. smjeru. Zatim su sve tvari, posebno, kromatografirane samo u II. smjeru. Tabela 3 prikazuje Rf-vrijednosti pojedinih tvari posebno

Tab. 3

Tvar	Rf u I. smjeru	Rf u II. smjeru	Primjedba
1.	77,5	92,8	
2.	70,7	83,5	
3.	53,2	73,5	srednje vrijednosti plava fluorescencija na startu
4.	52,6	84	
5.	35,3	49,2	
6.	56,2	67,5	
7.	14,2	37,4	trag i kod Rf 16,4 i 11,2
8.	26,3	24,7	trag i kod Rf 10,8
9.	55,0	80,0	
10.	6,6	90,5	jaka žuta fluorescencija

u I, posebno u II. smjeru. Otopina uzorka za kromatografiju je 2%, a pripravljena je u sastavu voda : metilcelosolv : aceton (2 : 1 : 1). Na-start je nanoseno 5 µl otopine. Prskano je amonijakalnom otopinom srebrnog nitrata.

Nakon ispitivanja standardnih tvari posebno u I, posebno u II. smjeru ispitane su dvodimenzionalno galna i elag kiselina. Na start

Tab. 4

Tvar	Rf I	Rf II
galna kiselina	55,0	72,5
elag kiselina	65,0	81,6

\* Standardne tvari, navedene pod brojem 2—8 poklon su prof. dr O. Th. Schmidta, Sveučilište Heidelberg, na čemu mu se i ovom prilikom zahvaljujem. — Standard substances under Nos. 2—8 are a gift by Prof. Dr. O. Th. Schmidt, University Heidelberg, for which also on this occasion I am expressing him my thanks.

je stavljeno 5  $\mu$ l 1 % otopine galne kiseline i veća količina elag kiseline (jer je skoro netopljiva u stalno upotrebljavanoj smjesi otapala). Prskano je amonijakalnom otopinom  $\text{AgNO}_3$ . Rezultati su dani u tabeli 4.

Promatranjem u UV-svjetlu opažene su dvije žute fluorescentne mrlje uz mrlju galne kiseline. Oko Rf (I) 5 do 13 i Rf (II) oko 78 nalazi se skupina od tri žute fluorescentne mrlje. Mrlje potječu od nepoznatog onečišćenja (fisetin ?).

U UV-svjetlu opažene su žute fluorescentne mrlje na istoj lokaciji kao i tri mrlje kod galne kiseline. Osim toga opažena je mrlja crvene fluorescencije na lokaciji Rf (I) 27,6 i Rf (II) 92,2. Na startu ostaje plava fluorescentna mrlja.

Uspoređujući podatke u tabeli 4 s onima u tabeli 3, opaža se dobro podudaranje za galnu kiselinu, dok se Rf I za elag kiselinu znatno razlikuje.

Nakon tih uvodnih ispitivanja standardnih tvari prešlo se na dvodimenzionalnu kromatografiju smjese standardnih tvari. Na start su nanosene slijedeće količine tvari (Tabela 5):

Tab. 5

Standardna tvar	Količina 2%-tnih otopina za kromatograme »A« i »B«	
	»A«	»B«
1. resorcin	5,0 $\mu$ l	5,0 $\mu$ l
2. pirogolol	3,0 $\mu$ l	5,0 $\mu$ l
3. galna kiselina	5,0 $\mu$ l	5,0 $\mu$ l
4. elag kiselina	10,0 $\mu$ l	10,0 $\mu$ l
5. 3,6 digaloil-glukoza	4,0 $\mu$ l	5,0 $\mu$ l
6. pentagaloil-glukoza	3,0 $\mu$ l	5,0 $\mu$ l
7. hebulinska kiselina	3,0 $\mu$ l	5,0 $\mu$ l
8. hebulagna kiselina	3,0 $\mu$ l	5,0 $\mu$ l
9. katehin	5,0 $\mu$ l	5,0 $\mu$ l
10. fisetin	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l

Nakon stavljanja otopine prve tvari mrlja je osušena, zatim je stavljena otopina druge tvari, itd. Mobilne faze bile su standardne.

Po završetku razvijanja kromatograma u oba smjera, isti su promatrani pod UV-svjetlom, pa su zapažene slijedeće fluorescencije: na startu žućkasta mrlja te vrlo intenzivna žuta mrlja fisetina stopljena sa zelenkastom.

Prskanjem kromatograma amonijakalnim srebrnim nitratom pokazale su se mrlje i drugih tvari, kako se vidi iz slike 6. Na slici 6 prikazan je kromatogram »B«. Na startu je ostala jaka mrlja. Brojevi na slici označuju tvari, kojih su Rf vrijednosti izmjerene na kromatogramima »A« i »B« u I. i II. smjeru, dane u tabeli 6.

Usporede li se Rf vrijednosti standardnih tvari kromatografiranih u smjeru I. pojedinačno (Tab. 3) i u smjesi (Tab. 6), opaža se da su Rf standardnih tvari u smjesi redovno manji za 2—6 jedinica. U smjeru

Tvar	Rf I. smjer		Rf II. smjer		Primjedba
	»A«	»B«	»A«	»B«	
1. resorcin	71,0	72,0	93,0	93,0	
2. pirogalol	66,6	66,0	84,4	82,5	
3. galna kiselina	49,0	47,9	68,2	67,2	veliki trag u II. smjeru
4. elag kiselina	53,4	53,5	89,2	87,0	
5. 3,6 digaloiil-glukoza	31,2	31,3	49,7	54,2	
6. pentagaloiil-glukoza	49,5	50,5	64,5	68,9	
7. hebulinska kiselina	12,8	12,3	34,2	37,5	
8. hebulagna kiselina	22,7	22,4	26,1	27,1	
9. d-katehin	49,0	51,5	83,0	80,0	
10. fisetin	3,6	2,3	85,5	85,2	žuta fluorescencija
10a. fisetin	3,6	2,3	91,5	91,0	zelena fluorescencija

II. te razlike variraju. Može se očekivati da će i kod kromatografije tanina i frakcija određene tvari imati niže Rf vrijednosti, naročito u I. smjeru, nego što bi ih pokazale pojedinačno kromatografirane.

#### 4.5 Diskusija rezultata — Discussion of results

1. Kromatografirane su standardne tvari pojedinačno i u smjesi. Nađene su Rf vrijednosti za I. i II. smjer kromatografiranja.
2. Rf vrijednosti standardnih tvari, ispitivanih pojedinačno i u smjesi, uglavnom se podudaraju.
3. Zapaženo je da su Rf-vrijednosti tvari, ispitivanih u smjesi za I. smjer sve niže za Rf 2—6 od Rf vrijednosti tvari ispitivanih pojedinačno (I. smjer). To bi se moglo protumačiti uzajamnim djelovanjem tvari u smjesi.

#### 4.6 Kestenov tanin — Chestnut tannin

##### 4.6.1 Uvod — Introduction

Kestenovo drvo, tj. drvo pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill., *C. vesca* Gaertn.) ima slijedeći kemijski grupni sastav (156):

- 0,41% pepela
- 4,72% ekstrakta smole (alkohol-benzen 1 : 1)
- 34,65% lignina (po *Ender-Ubelu*)
- 19,69% pentozana
- 20,10% topljivoga u 1% NaOH
- 42,0% celuloze (po *Kürschneru*)
- 41,86% celuloze (po *Cross-Bevanu*)
- 2—3% sadržaj škroba
- 12,5% tanina u kori

- 7,4% tanina u bjeljiki
- 8,7% tanina u srži
- 8,2% tanina ukupno u drvu
- 8,5% tanina u okoranom drvu

Prilikom istraživanja kemijskog sastava kore, bijeli i srži kestena za proizvodnju tanina *Opačić* i koautor (106) su našli, da prema starosti sadržaj tanina varira (uz 25% vlage) u kori od oko 5—11%, u bijeli oko 2—5,5%, a u srži oko 7—14%.

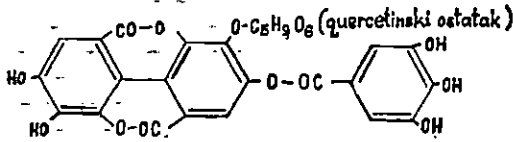
1891. godine *Trimble* (157) ispituje izoliranu tvar iz drva kestena i dobivši galnu kiselinu uz prisutnost šećera, zaključuje da je taj tanin identičan s galotaninom.

*Freudenberg* i koautor (51) su pročišćivali tanin pomoću olovne soli. Dobivena je tvar kiselom hidrolizom dala 15—20% elag kiseline i tragove galne kiseline, šećera te quercetina.

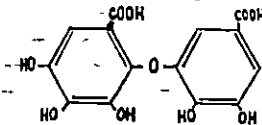
*Kurmeier* (89) je iz lišća dobio — preko olovnog tanata, odvajanjem s  $H_2SO_4$ , taloženjem s pirimidinom, ponovnim pročišćavanjem s olovnom soli i oslobađanjem s  $H_2SO_4$  te konačno taloženjem s kinolinom — pročišćeni tanin formule  $C_{24}H_{20}O_{16}$ . Metiliranjem je nađeno da ima 8 slobodnih —OH grupa. Djelovanjem tanaze ili hidrolizama (i alkalnom i kiselom) dobio je 8—17% elag-kiseline.

*Našš* (99) je dobio hidrolizom elag i galnu kiselinu te glukozu. Elag kiselinu su našli i *Curtius* i *Franzen* (30).

Formulu tanina kestenova drva dao je *Nierenstein* (100) 1934. godine, tako da je jednostavno spojio produkte hidrolize:



*Mayer* (92) je iz mladog lišća kestena izolirao dehidrodigalnu kiselinu i utvrdio ovu strukturu:



Iz kestenove kore *Mayer* i *Bauni* (93, 94) su izolirali d-katehin i galokatehin. *Schmidt* i *Hull* (144) izolirali su d-katehin iz kestenovih ljuski.

*Clark* i *Levy* (26) su frakcionirali vodom otopinu kestenova tanina preko kolona od celuloznog praha. Frakcionirali su s 4%-tnom slanom vodom u struji dušika te su dobili 6 različitih zona.

Titracijom eterski ekstrahiranog tanina kestenova *Sourlanges* (154) je zaključio da postoje slobodne karboksilne grupe.

*Putnam* i *Browne* (115) su ionoforetski uklonili svu slobodnu elag kiselinu, a encimatskom razgradnjom su je opet dobili, što potvrđuje da je elag kiselina konstituent taninske molekule. Galnu kiselinu su dobili u maloj količini grijanjem s NaOH i Zn-prahom. Dokazali su je kristalima KCN, kojima vođena otopina galne kiseline daje crvenu boju, koja stajanjem nestaje, a potresanjem se opet vraća. To je *Sidney-Youngova* (47) reakcija na slobodnu galnu kiselinu.

Elag- i galnu kiselinu u kestenovu taninskom ekstraktu je utvrdio i *White* (81, 165).

Galna kiselina je dobivena i iz pročišćenog tanina japanskog kestena (*C. cre-nata*) (101).

Pregled ispitivanja tanina kestenova dali su *Allegrini* i koautori (1).

4.62 Kromatografija kestenova taninskog ekstrakta i frakcija —  
 Chromatography of Chestnut tannin extract and fractions

Već opisanom tehnikom učinjeni su dvodimenzionalni papirni kromatogrami kestenova taninskog ekstrakta i njegovih frakcija.

Mrlje, opažene pod UV-svjetlom označene su (sa strane) velikim slovima, a malim slovima (unutar mrlje) označene su boje, i to: p = plava, t = tirkizna, c = crvena, z = zelena, s = smeđa, sp = svijetlo plava, žc = žućkasta.

TAB. 7

MR- LJE	K		K-111		K-112		K-12		K-21		K-22	
	i.	ii.	i.	ii.	i.	ii.	i.	ii.	i.	ii.	i.	ii.
1	46,5	67,8	56,4	64,9	46,0	69,0	52,6	66,0				
2	27,6	49,0	34,3	29,1	26,0	41,0	26,9	17,6	22,6	35,4		
3	4,2	39,2	3,1	37,8	3,3	40,0	4,9	44,9				
4	50,3	6,2	58,2	6,2	53,0	6,3	56,8	6,0	61,2	2,4	45,0	6,6
5	64,9	3,3			66,6	3,2	68,9	4,0	72,0	2,9		
6	59,0	9,0			61,0	9,3	65,8	9,3	63,3	7,5	56,6	8,4
7	61,7	18,2	67,3	14,7	68,0	13,7	70,2	19,0	73,0	14,3		
8	78,0	19,7							82,7	19,0		
9	78,2	24,2							82,7	23,5		
10			58,8	12,4	53,4	14,9						
11					53,5	20,2						
12			63,0	24,0								
13							63,5	29,0				
14					60,2	35,2	53,4	37,7				
15					59,0	40,9	54,4	43,9				
16			70,3	39,5			71,8	40,5				
17			73,1	66,1								
18			77,5	84,6								
19	57,5	32,4	67,4	28,4	69,6	22,1						
20	61,6	42,0										
21			58,0	32,9	47,8	43,0						
22			59,5	41,1	49,5	49,4						
23			61,0	38,0								
A	68,8	4,8	62,8	10,2	78,0	2,5					61,5	5,9
B	86,0	4,4			88,8	4,0	87,5	7,3	86,0	1,3	73,5	4,8
C	79,4	7,2							84,0	5,1	70,5	9,2
D	77,0	10,9	74,8	17,0					80,5	10,0		
E	70,8	19,0	74,2	24,7								
F	70,0	24,7	70,8	31,8								
G			61,6	75,0	49,3	77,0						
H	48,2	76,5	60,5	79,5	51,0	89,5	55,0	75,7				
I			62,6	84,2								
J							37,4	93,6	40,0	95,0		
K	15,8	78,2	5,5	94,0	4,6	71,9	15,5	75,0				
L					81,0	31,6						
M			64,5	18,0	67,6	17,5						
N	50,8	40,7			55,7	39,1	52,1	46,0				
O			57,3	14,7	45,0	29,7						
P			58,0	22,3								
R					61,8	28,7						

RF-VRIJEDNOSTI KOMPONENATA KESTENOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA I FRAKCIJA

Mrlje su nakon prskanja amonijakalnim srebrenim nitratom označene brojevima. Neke od njih pokazuju i fluorescenciju, pa je to označeno odgovarajućim slovima.

Mrlje kao i njihove Rf-vrijednosti ( $\cdot 10^2$ ) u pojedinim ispitivanim ekstraktima dane su u tabeli 7. Brojevi I. i II. označuju prvi odnosno drugi smjer kretanja mobilnih faza.

Slike 7—12 prikazuju po jedan dvodimenzionalni kromatogram kestenova tanina i njegovih frakcija.

Iz tabele 7 vidi se da je dobiven znatan broj mrlja, odnosno da je postignuto dobro razlučivanje. Naročito dobro razlučivanje postignuto je kod frakcija K-111 i K-112. Zadovoljuje i razlučivanje kod K i K-12, dok su frakcije K-21 i K-22 slabo razlučene.

Broj mrlja kod pojedinih frakcija dan je u tabeli 8.

Tab. 8

Frakcije	Mrlje s AgNO <sub>3</sub>	Mrlje pod UV	Ukupno
K	11	9	20
K-111	14	11	25
K-112	14	10	24
K-12	11	5	16
K-21	7	4	11
K-22	2	3	5

Ukupno su registrirane 23 mrlje nakon prskanja kromatograma amonijakalnim srebrnim nitratom, a 17 ih je bilo vidljivo pod UV-svjetlom.

Opaža se da Rf-vrijednosti ( $\cdot 10^2$ ) pojedinih mrlja pokazuju i znatnije razlike od jednoga do drugog eksperimenta. Međutim, po njihovoj lokaciji najvjerojatnije se ipak radi o istim tvarima.

Zanimljivo je da K-111 i K-112 pokazuju veći broj stvari nego K. To se može protumačiti time da su u izvornom ekstraktu te stvari u premaloj koncentraciji, da bi se mogle opaziti na kromatogramu, dok se frakcionacijom njihova koncentracija povećala.

Mobilna faza I. pokazala se u svim ispitivanjima kao povoljna. Dobrom se pokazala i mobilna faza II. osim u slučajima K-21 i K-22 kromatogrami kojih su u pravcu II. slabi. Neka druga mobilna faza za smjer II. vjerojatno bi bolje rastavila te frakcije.

Posebno treba istaći da je znatan dio frakcije K-22 ostao na startu, dok su sve druge frakcije bile dobro topljive.

Što se tiče količina stvari u kromatografiranju kestenova ekstrakta, najveća količina je u mrljama 1, 4, 5, 6 kao i u tragu.

Frakcije K-111 i K-112 su odlično rastavljene. Najveće količine u frakciji K-111 su u mrljama 1, 2, 22, 21, 2, 23, 4 i 10, a u frakciji K-112 u mrljama 1, 4, 19, 14. Frakcija K-12 pokazuje najveću količinu stvari u mrlji 4, a manje u 5, 6 i 1. Kod frakcija K-21 i K-22 najveći dio stvari je ostao na tragu, odnosno kod K-21 u mrljama 4, 6 i 5, a kod K-22 u mrlji 4.

Tvari koje fluoresciraju vjerojatno su vrlo malih koncentracija. Upotreba drugih mobilnih faza vjerojatno bi rastavila i frakcije K-21 i K-22, a možda i koju mrlju, inače dobro izoliranu.

#### 4.63 *Diskusija rezultata — Discussion of results*

1. Kestenov taninski ekstrakt i njegove frakcije ispitivani su dvo-smjernom kromatografijom.
2. Na kromatogramima pojavile su se 23 komponente, sposobne da reagiraju s amonijakalnim srebrnim nitratom (polifenoli).
3. Osim njih je nađeno daljnjih 17 komponenata, koje fluoresciraju pod UV-svjetlom.
4. S obzirom na sliku broj 6, koja prikazuje kromatogram standardnih tvari, kromatogrami pojedinih frakcija kestenova ekstrakta pokazuju slijedeće rezultate:
  - a) Frakcija K-111 pokazuje velike količine galne kiseline. (mrlja 1). Mrlja 2 pripada 3,6-digaloil glukozu. Mrlje 17 i 18 pokazuju prisutnost pirogalola i resorcina.
  - b) Frakcija K-112 pokazuje prisutnost galne kiseline (mrlja 1). Mrlja 2 koja pripada 3,6-digaloil glukozu je slabije izražena nego kod K-111. Nema mrlja, karakterističnih za niže polifenole.
  - c) Frakcija K-12 pokazuje još slabiju mrlju galne kiseline (1). Digaloil glukozu i niži fenoli potpuno iščezavaju. U toj frakciji naročito se ističu količinom nepoznate mrlje 4, 5 i 6.
  - d) Frakcija K-21 karakteristična je zbog potpune odsutnosti fenola i galne kiseline. Karakteristična je mrlja 2 koja bi mogla odgovarati hebulinskoj ili hebulagnoj kiselini. Nepoznate mrlje 4, 5 i 6 ostale su na istoj lokaciji. Mrlje 8 i 9 pripadaju sigurno hidroliziranim šećerima i pojavljuju se samo još na kromatogramu K.
  - e) Frakcija K-22 kao netopljiva frakcija u metanolu slabo se rastavila, i u njoj dolaze neidentificirane mrlje.
  - f) U kromatogramu originalnoga kestenova ekstrakta ne vide se sve mrlje koje su frakcijama jasno izražene i determinirane. Jasno dolazi do izražaja prisutnost galne kiseline (mrlja 1) kao i prisutnost šećera (mrlje 8, 9) dok je slabo izražena mrlja 2 koja pripada 3,6-digaloil glukozu. Nepoznate mrlje 4, 5 i 6 vrlo su dobro izražene.

Iz te identifikacije može se zaključiti da u frakciji, netopljivoj u acetonu a topljivoj u metanolu, dolaze hidrolizirani šećeri i tragovi hebulinske ili hebulagne kiseline. U aceton-topljivim frakcijama dolaze do izražaja galna kiselina, digaloil glukozu te manje količine nižih fenola kao pirogalol i resorcin.

Uspoređivanje kromatograma kestenova ekstrakta i njegovih pet frakcija sa svega deset standardnih tvari ne može dati pravu sliku kompleksnosti kemijskog sastava, ali upućuje na prisutnost karakterističnih grupa. Karakteristično je da u taninskom ekstraktu nije određena prisutnost slobodne elag kiseline.

## 4.7 Hrastov tanin — Oak tannin

### 4.71 Uvod — Introduction

Hrastovo drvo, koje služi kao sirovina, najčešće je drvo hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L., *Quercus pedunculata* Ehrh.) i kitnjaka (*Quercus petraea* Liebl., *Quercus sessiliflora* Salisb.). Za lužnjak i kitnjak dan je slijedeći kemijski skupni sastav (156):

24,9%	lignina
42,8%	celuloze
25,5%	pentozana
0,39%	mast, vosak, ulje
0,27%	pepeo
0,16%	pepeo u srži
0,42%	pepeo u bijeli
5... 9...	16% tanina u kori
5...12...	(38%) tanina u drvu.

Istražujući hrastovinu za proizvodnju tanina, Opačić (103) je našao da (uz 30% vode) kora sadrži 6,53%, bijel 1,70%, srž 5,20%, a drvo s korom i bijeli 4,34% tanina.

Od različitih tvari izoliran je iz kore hrasta d-katehin (93), a našao ga je uz galokatehin u taninu hrastove kore (*Q. pedunculata*) i Hatway (61, 62). On u svojim radovima u vezi s taninima hrastove kore smatra da pirogalolni tanini uz leuko-antocijanidine sudjeluju u formiranju kondenziranih tanina. Osim galokatehina i katehina našao je u lišću hrasta i flavonoide te elag i galnu kiselinu.

Galnu kiselinu izolirao je i White (81).

### 4.72 Kromatografija hrastova taninskog ekstrakta i frakcija *Chromatography of Oak tannin extract and fractions*

Dvodimenzionalni papirni kromatogrami hrastova taninskog ekstrakta i njegovih frakcija pripremljeni su već opisanom tehnikom.

Pod UV-svjetlom opažene mrlje označene su velikim slovima. Malim slovima (u mrlji) su označene boje: p = plava, z = zelena, ž = žuta, t = tirkiz, l = ljubičasta, sp = svijetlo plava, tp = tamno plava, žc = žućkasta i žz = žutozelena.

Mrlje, koje su se pojavile nakon prskanja amonijakalnim srebrnim nitratom (polifenoli), označene su brojevima. Ukoliko je koja od njih pokazivala fluorescenciju pod UV, označena je slovima boja.

Rf-vrijednosti mrlja ( $\cdot 10^3$ ) ispitivanih taninskih frakcija dane su na tabeli 9. Brojevi I. i II. označuju prvi odnosno drugi smjer kretanja mobilnih faza.

Slike 13—19 prikazuju dvodimenzionalne kromatograme hrastova tanina i njegovih frakcija.

Tabela 9 pokazuje da je dobiven velik broj mrlja, tj. da je postignuto dobro razlučivanje.

Kod frakcije H-111 i H-112 postignuto je odlično razlučivanje komponenata. Frakcije H-12, H-21 i H su također dobro razlučene, ali H-22 je praktički ostala nerazlučena (u II. smjeru).

Broj mrlja komponenata u pojedinim frakcijama dan je u tabeli 10.



TAB. 9

MR-LJE	H		H-111 A		H-112		H-12		H-21		H-22	
	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.
1	48,5	66,5	58,5	67,5			49,3	67,0	57,0	65,5		
2	76,2	82,8	86,5	84,0	85,2	82,0	80,8	83,0	86,5	81,5		
3	75,0	71,5	80,0	77,0					83,5	70,0		
4	77,0	63,4	80,5	70,2	86,0	82,0	82,2	64,0	83,5	59,4		
5	74,3	51,6	81,8	62,5	82,0	51,0	82,2	55,0	83,0	50,0		
6			66,8	37,2	63,0	32,0	61,5	36,2	66,7	32,4		
7			72,5	40,0	70,5	35,6	67,7	38,4	72,5	35,5		
8	63,0	3,1					63,5	3,6	63,6	4,3		
9	53,2	6,5	58,5	6,5	54,0	5,5	51,3	8,5	54,8	6,0	47,4	74,0
10	61,6	10,2	63,1	13,3			63,9	12,0	65,2	9,4		
11			72,5	12,0	69,7	12,7	66,8	16,5	72,3	13,7		
12			73,0	19,7	70,2	19,7	68,0	22,2	72,3	18,4		
13	81,1	25,8			81,5	25,1	79,0	29,5	81,6	22,3		
14			76,5	51,5	72,5	46,1						
15					31,2	11,4						
16	4,7	35,7	1,3	10,8	5,7		0,0	24,8	7,0	46,2		
17			34,8	6,6	38,2	5,8						
18			37,6	44,2	32,9	35,5						
19			42,6	47,7								
20					61,0	54,5						
21					51,5	41,0						
22					50,0	20,0						
23					58,2	17,7						
24					64,0	47,1						
25					85,4	64,1						
A	47,0	85,8	H-111 B 23 FLUORESCENTNE MRLJE				48,5	85,3	54,7	89,0		
B	60,0	81,5			54,4	81,0	50,4	81,4	56,7	82,5		
C	44,7	77,0					42,0	73,4	47,3	74,6		
D	70,4	4,9							83,0	7,7		
E	23,5	4,9			88,5	4,2	83,2	5,8	88,0	3,6		
F	63,2	64,6			68,1	56,4			69,4	54,0		
G					45,8	20,2						
H	87,0	61,0							89,5	57,4		
I							7,6	75,4				
J	0,0	17,6			0,0	4,7	0,0	6,2	1,7	26,8		
K					46,4	62,0						
L					46,5	48,5						
M					65,2	52,4						
N							7,7	33,0				
O	55,4	39,6							58,2	35,0		

## RF-VRIJEDNOSTI KOMPONENATA HRASTOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA I FRAKCIJA

Ukupno je registrirano 25 mrlja nakon prskanja amonijakalnim srebrnim nitratom, a 15 ih je bilo vidljivih pod UV-svjetlom (frakcija H-111 pokazuje 23 fluorescentne mrlje, ali neke se mogu uključiti među 15 registriranih).

Rf-vrijednosti ( $\cdot 10^3$ ) pojedinih mrlja; označenih istim znakom, variraju od frakcije do frakcije. Međutim, po njihovoj lokaciji može se pretpostaviti, da se radi o istim komponentama.

Tvar	Mrlje s AgNO <sub>3</sub>	Mrlje pod UV	Ukupno
H	10	9	19
H-111	16	(23)	39
H-112	20	8	28
H-12	13	7	20
H-21	14	9	23
H-22	1	0	1

Sve frakcije (osim H-22) pokazuju veći broj komponenata nego H. To se može protumačiti time, što su se neke komponente tek frakcioniranjem našle u tolikoj količini da ih se može kromatografski registrirati.

Mobilna faza I. pokazala se u svim ispitivanjima kao potpuno zadovoljavajuća. Mobilna faza II. ne zadovoljava u potpunosti kod frakcije H-12 i H-21, dok je za frakciju H-22 nepovoljna.

Na startu je ostalo nešto tvari kod kromatograma H-12 i H-22.

Količinski su najveće mrlje 9, 8 i 1 kod H, mrlja 1 kod H-111, mrlje 9, 6, 7, 12 i 17 kod H-112, mrlje 1, 9, 8 i 10 kod H-12 i H-21, dok je frakcija H-22 ostala praktički nerastavljena.

Fluorescentne tvari su, vjerojatno, u posve malim količinama.

Upotreba drugih mobilnih faza bi vjerojatno i bolje rastavila pojedine frakcije, a možda čak i neke komponente.

#### 4.73 Diskusija rezultata — Discussion of results

1. Hrastov taninski ekstrakt i njegove frakcije ispitivani su dvo-smjernom kromatografijom.
2. Na kromatogramima pojavilo se 25 komponenata, koje reagiraju s amonijakalnim srebrnim nitratom. Sve frakcije (osim H-22) pokazuju veći broj komponenata od izvornog ekstrakta.
3. Pod UV-svjetlom nađeno je 15 fluorescentnih komponenata. Frakcija H-111 pokazuje 23 fluorescentne mrlje, ali se neke mogu uključiti među 15 registriranih.
4. S obzirom na sliku broj 6, koja prikazuje kromatogram standardnih tvari, kromatogrami pojedinih frakcija hrastova ekstrakta pokazuju slijedeće rezultate:
  - a). Frakcija H-111 pokazuje velike količine galne kiseline. Mrlja 18 odgovara 3,6-digalolil glukozi, a mrlja 17 mogla bi predstavljati trag hebulagne kiseline. Za tu frakciju karakteristična je prisutnost velikog broja mrlja, koje pripadaju jednostavnim fenolima, od kojih su utvrđeni resorcin i pirogalol (mrlje 2—7 i 14). Područje mrlja 9—12 pripada nepoznatim komponentama.

- b) Frakcija H-112 ne pokazuje prisutnost galne kiseline, a prisutnost jednostavnih fenola znatno se smanjila. Potpuno se izgubio pirogalol. Do većeg izražaja dolaze nepoznate tvari.
- c) Frakcija H-12 pokazuje malu količinu galne kiseline (mrlja 1), a veću količinu nepoznatih tvari (mrlje 8 i 9). Količina jednostavnih fenola je kao u frakciji H-112. Mrlja 13 predstavlja slobodne šećere.
- d) Frakcija H-21 potpuno je analogna frakciji H-12 s time, da se među jednostavnim fenolima ponovno pojavljuje mrlja 3, koja bi mogla odgovarati pirogalolu.
- e) Frakcija H-22 kao netopljivi dio u acetonu i metanolu pokazuje veoma slabu razdiobu što je, s obzirom na netopljivost frakcije, i razumljivo.
- f) U kromatogramu hrastova taninskog ekstrakta nisu uočljive sve mrlje, koje su opažene u frakcijama. Prisutnost galne kiseline je slabo izražena mrljom 1. Dobro se uočuju jednostavni fenoli (mrlje 2—5). Nepoznate tvari na gomilavaju se u mrljama 8—10. Slobodni šećeri pokazali su se u mrlji 13.

Na temelju gornjih identifikacija zaključuje se, da u netopljivom u acetonu dolaze do izražaja u manjim količinama galna kiselina i jednostavni fenoli uz veliku količinu nepoznatih tvari. U frakcijama, potpuno topljivim u acetonu, nalazi se velika količina galne kiseline i jednostavnih fenola, a karakteristična je odsutnost nepoznatih tvari i šećera.

Uspoređujući kromatogram hrastova ekstrakta i njegovih pet frakcija sa svega deset standardnih tvari, još teže nego kod kestena može se zaključiti kemijski sastav ekstrakta. Karakteristično je da, u uspoređenju s kestenovim ekstraktom, hrastov ekstrakt sadrži znatno više jednostavnih fenola. Ni u spomenutom ekstraktu nije zapažena prisutnost slobodne elag kiseline.

## 4.8 Rujev tanin — *Sumach tannin*

### 4.81 Uvod — *Introduction*

Sve sirovine za tanine iz porodice »*Rhus*« zovu se sumah, a rijetko ili nikako ne navodi se vrsta.

Prema Opačiću (108, 109) kod nas za tehnološku preradu dolaze u obzir 3 vrste rujeva lišća (porodica *Anacardiaceae*):

Domaći ruj (*Cotinus coggygria* Scop., syn.: *C. Coccygea* C. Koch., *Rhus cotinus* L.) nalazimo u: Istri, Hrv. Primorju, Sjevernoj Dalmaciji, Velebitu, Makedoniji i Kosmetu. Najbolje lišće ruja je iz Istre i Hrv. Primorja. Sadržaj tanina uz 15% vlage lišća je 18—22% (109), odnosno uz 12% vlage rujevo tamnozeleno lišće sadrži 21,5%, žutozeleno 23,0% i crveno 22,0% tanina (105).

Tehnološki proces dobivanja tanina iz rujeva lišća uz karakteristike njegovih štavni svojstava opisao je Opačić (104).

Kiseli ruj (*Rhus typhina* L.) prenesen je iz CSR i Francuske. Uzgajao se plantažno kod Belišća i Voćina. Analize su pokazale slijedeći sadržaj tanina: tamnozeleni list (rujan) — 24%, žutozeleni i djelomično crveni list (listopad) — 24,8%, crveni list (studen) — 26,2%, odnosno uz 15% vlage 18—30% tanina (109).

Sicilijanski ruj (*Rhus coriaria*) uvezio se prije rata. Sadržaj tanina je oko 22—26% (15% vlage) (109).

Ramić i koautori (119) navode strane literaturne podatke za sadržaj tanina u gornjim sirovinama i nalaze za domaći, kiseli i sicilijanski ruj 23,7%, 24,6% i 26,0% kao prosječni (?) sadržaj tanina (ne navode postotak vlage). Isti autori nisu izgleda upoznati s radovima, koji obrađuju te domaće sirovine (108, 102, 104, 109).

Ispitujući kemizam rujeva tanina, pojedini autori iznose slijedeće podatke:

Izolacijom čistog tanina Opačić i koautor (105) su iz taninskog ekstrakta lišća ruja (*R. cotinus*) dobili preparat s fizičkim i kemijskim konstantama koje su vrlo blizu pentagaloilglukozi. Zbog veće količine galne kiseline, dobivene hidrolizom, autori (105) pretpostavljaju da je dio galne kiseline vezan kao metadigalna kiselina.

Osim toga, isti su autori utvrdili i slobodnu galnu kiselinu Youngovom reakcijom s KCN i vezanu elag kiselinu Procter-Paesslerovom reakcijom s K-nitritom.

Catras (23) pokazuje da se rujev (*R. Coriaria* L.) ekstrakt sastoji uglavnom od smjese m-digalne kiseline, m-digaloilglukoze i di-(m-digaloil)-galoilglukoze. Kvantitativnim određivanjem slobodne galne kiseline u ruju bavio se posebno Opačić (102).

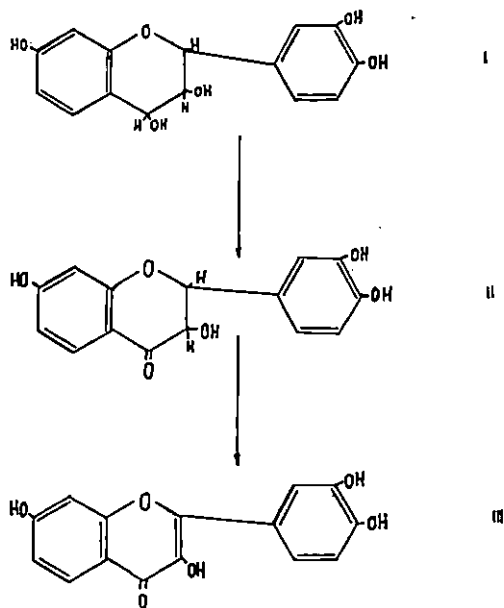
Galnu kiselinu našao je i Kirby s koautorima (81) ispitujući među ostalima i sumah tanin.

White (162) navodi da jezgra molekule hidrolizirajućih tanina nije nužno monosaharid. On kaže da klasična taninska kiselina (*R. semialata*, šiške), koja čini glavni dio tog tanina, nije strukturno penta-m-digaloilglukoza (Fischer), već da se radi barem o trisaharidu s dvije nesupstituirane hidroksilne grupe, a ostale nose uglavnom galoilne grupe, mali broj di-, a možda tri-galoilne grupe.

Slično Whiteu Grassman i koautori (57) pretpostavljaju tetrasaharidnu jezgru za glavni dio tanina u kiselom ruju (*R. typhina*).

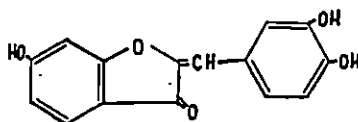
Durio i koautori (36, 37), ispitujući sastav tanina iz rujeva lišća (*R. coriaria*), ekstrakcijom su separirali:  $\alpha$ - i  $\beta$ -klorofil, flavonske derivate, galnu kiselinu i neke fenolne spojeve.

U ruju (*R. cotinus*) su Freudenberg i koautor (52) te Weinges (161) našli fustin kromatografiju kojeg su opisali Roux i koautori (129). Za fisetin (III.) Roux i Paulus (130) smatraju da nastaje iz fustina (II.), a taj od 7,3',4'-trihidroksi flavan-3,4 diola (I.) prema shemi:



Sva tri spoja našao je zajedno u ruju (*Cotinus coggygria* syn. *R. cotinus*) Freudenberg (52).

U drvu ruja (*R. cottinus*) osim fisetina — pronađenog 1886. — kojemu se pripisivalo bojenje King i koautor (79) su našli značajnu količinu (0,5%) aurona svlfuretina (2-benziliden-6,3',4'-trihidroksikumaran-3-ona):



za koji smatraju, da sudjeluje više kod bojenja nego fisetin.

Značajno je da su isti autori (78), ispitujući genezu i međusobno srodstvo tanina i polifenola *Quebracho* tanina, našli da *Quebracho* drveće sintetizira »hidrolizirajuće« tanine u lišću te da ti tanini tvore polifenolni sirovinski materijal, koji se konačno pretvara u tipične »kondenzirane« tanine srži. Kako ruj spada u *Anacardiaceae* kao i *quebracho* (*Schinopsis balansae* i *lorentzii*), autori zaključuju da je analogna geneza i tanina drva ruja, što su svojim radom (79) i potvrdili.

#### 4.82 Kromatografija rujeva tanina i frakcija — Chromatography of Sumach tannin and fractions

Već navedenom tehnikom učinjeni su dvodimenzionalni kromatogrami rujeva taninskog ekstrakta i njegovih frakcija.

Mrlje, opažene pod UV-svjetlom, označene su istim slovima abecede na slikama kromatograma kao i na tabeli 11.

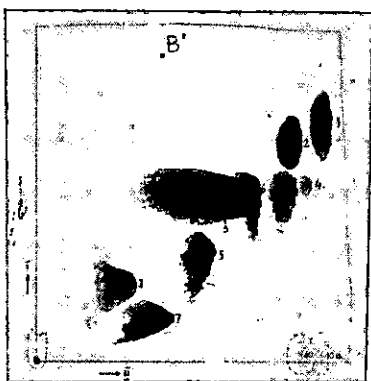
TAB. 11

MRLJE	R				R-1				R-21				R-22			
	A		B		A		B		A		B		A		B	
	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.
1	48,8	58,0	43,7	74,6	54,6	60,0	47,0	73,8	55,0	74,5	55,3	74,0	52,1	52,5	53,0	52,3
2	35,7	61,5	31,2	81,5	43,2	62,0	33,1	80,8	42,5	77,4	41,0	78,8				
3			27,4	55,0			30,2	56,6	31,4	63,1	29,6	62,4				
4									62,5	86,1	61,8	88,0	52,5	81,0	52,5	88,3
5									67,3	44,8	65,5	41,1				
6									71,5	31,1	67,7	28,5				
7									76,1	19,5	73,0	16,4	72,3	14,2	70,2	16,8
8									74,1	48,1	69,0	46,1				
9									67,8	68,0	64,5	69,0	56,4	66,5	48,0	68,2
10													3,8	67,3	2,5	64,3
A - PLAVKASTA	86,0	15,5	87,5	22,6					85,5	21,8	81,8	16,1				
B - ŽUČKASTA					0	0	0	0	3,5	0	4,0	0				
C - SVJ. PLAVA									83,5	27,6	79,8	22,6				
D - ŽUTA									9,0	79,5	6,0	84,5				
E - TIRKIZ									74,1	48,1	69,0	46,1				
F - SVJ. PLAVA									76,0	53,6	72,4	51,5				
G - SVJ. ŽUTA													83,5	6,0	89,5	4,0

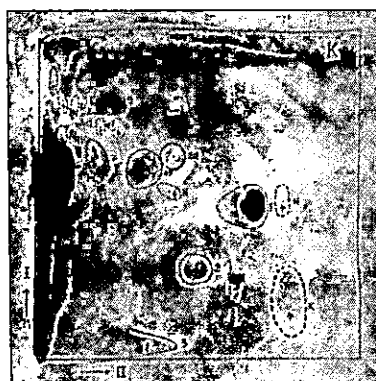
Rf-VRIJEDNOSTI KOMPONENATA RUJEVOG TANINSKOG EKSTRAKTA I FRAKCIJA

Mrlje, koje su se pokazale nakon prskanja amonijakalnim srebrnim nitratom, označene su brojevima i na slikama kromatograma i u tabeli 11.

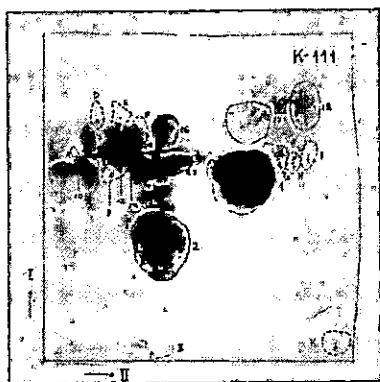
Tabela 11 pokazuje Rf vrijednosti pojedinih mrlja, dobivenih dvodimenzionalnom kromatografijom rujeva ekstrakta i njegovih frakcija.



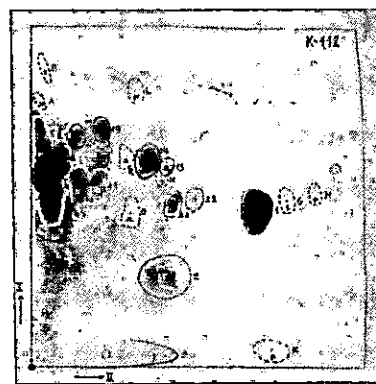
Sl. 6. Kromatogram smjese standardnih tvari



Sl. 7. Kromatogram kestenova taninskog ekstrakta — K



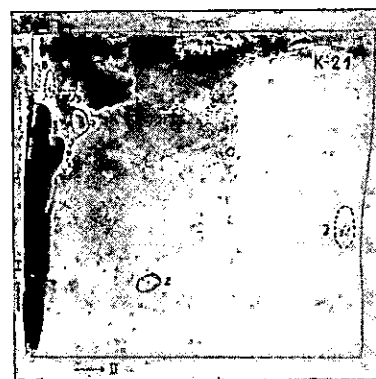
Sl. 8. Kromatogram kestenova taninskog ekstrakta — frakcija K-111



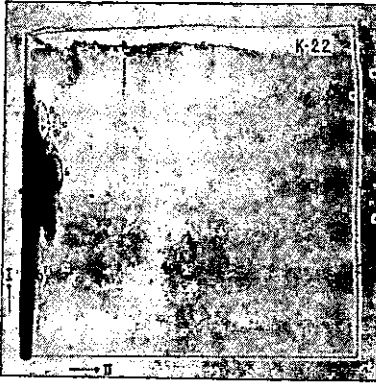
Sl. 9. Kromatogram kestenova taninskog ekstrakta — frakcija K-112



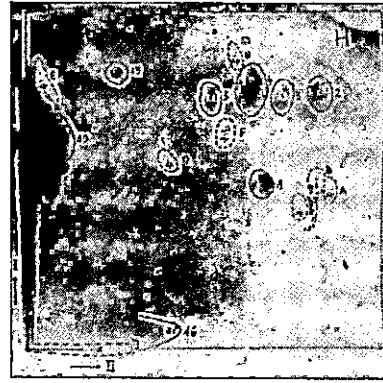
Sl. 10. Kromatogram kestenova taninskog ekstrakta — frakcija K-12



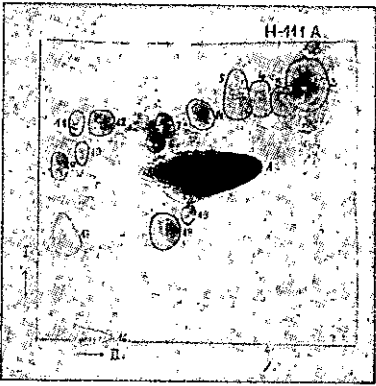
Sl. 11. Kromatogram kestenova taninskog ekstrakta — frakcija K-21



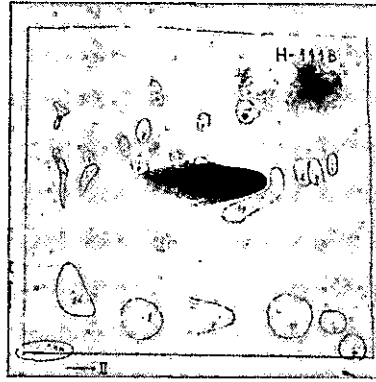
Sl. 12. Kromatogram kestenova taninskog ekstrakta — frakcija K-22



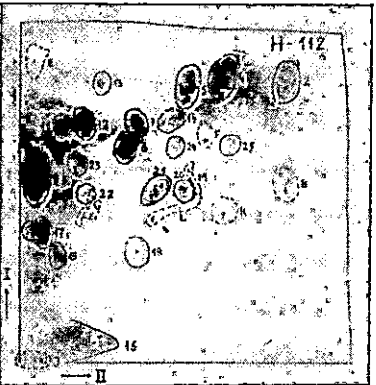
Sl. 13. Kromatogram hrastova taninskog ekstrakta — H



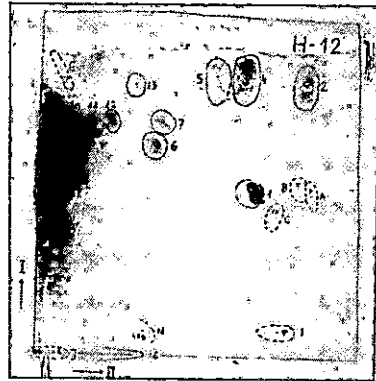
Sl. 14. Kromatogram hrastova taninskog ekstrakta — frakcija H-111. (A) Prskano s amonijakalnom otopinom srebrnog nitrata



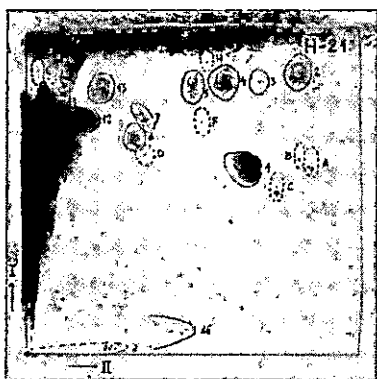
Sl. 15. Kromatogram hrastova taninskog ekstrakta — frakcija H-111. (B) Komponente vidljive pod UV-svijetlom. Naknadno prskano s amonijakalnom otopinom srebrnog nitrata



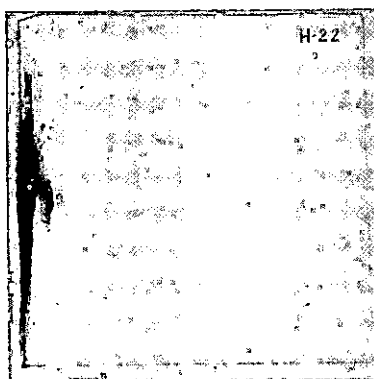
Sl. 16. Kromatogram hrastova taninskog ekstrakta — frakcija H-112



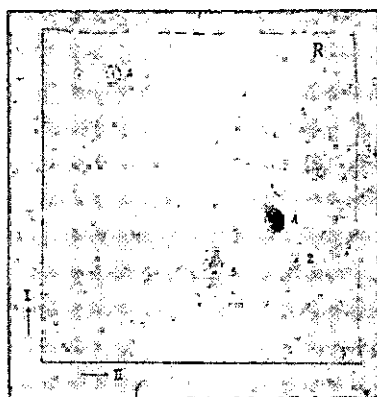
Sl. 17. Kromatogram hrastova taninskog ekstrakta — frakcija H-12



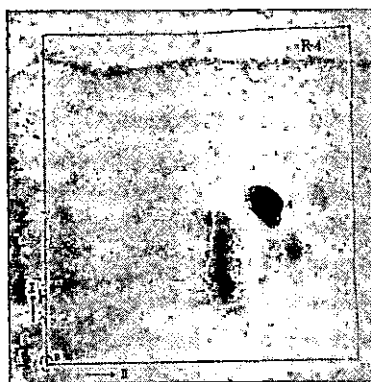
Sl. 18. Kromatogram hrastova taninskog ekstrakta — frakcija H-21



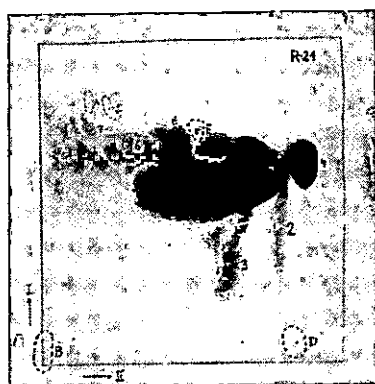
Sl. 19. Kromatogram hrastova taninskog ekstrakta — frakcija H-22



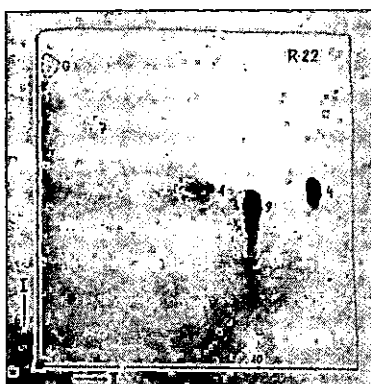
Sl. 20. Kromatogram rujeva taninskog ekstrakta — R



Sl. 21. Kromatogram rujeva taninskog ekstrakta — frakcija R-1



Sl. 22. Kromatogram rujeva taninskog ekstrakta — frakcija R-21



Sl. 23. Kromatogram rujeva taninskog ekstrakta — frakcija R-22



- b) Frakcija R-21 pokazuje slijedeće mrlje: mrlja 1 pripada galnoj kiselini, mrlja 2 je nepoznata tvar iz grupe digaloil glu-koze, mrlja 3 je digaloil glu-koza, mrlja 4 pripada katehinskom spoju, a mrlja 9 pentagaloil glu-kozi koja je, s obzirom na položaj, vjerojatno penta-m-digaloil glu-koza.
- c) Frakcija R-22 pokazuje (u maloj količini) mrlje od kojih su mrlja 1 — tragovi galne kiseline, mrlja 9 — pentagaloil glu-koza, a mrlja 4 — spoj katehinskog tipa. Mrlje 7 i 10 pokazuju prisutnost tragova neidentificiranih tvari.
- d) U kromatogramu originalnog rujeva ekstrakta ne vide se sve mrlje, koje su jasno izražene u frakcijama. Mrlja 1 pokazuje prisutnost galne kiseline, mrlja 2 nepoznatu tvar, a mrlja 3 digaloil glu-kozu.

Iz spomenutih identifikacija može se zaključiti da u frakciji netopljivoga u acetonu i metanolu dolaze neke neidentificirane tvari, dok frakcija koja je topljiva u metanolu, sadrži glavne količine rujeva ekstrakta, a ove sadrže u najvećoj količini slobodnu galnu kiselinu, galoil glu-koze i spoj katehinskog tipa.

Frakcija, topljiva u acetonu, sadrži neznatni dio rujeva tanina, koji se sastoji od galne kiseline i nešto galoil glu-koze.

Uspoređujući kromatograme rujeva taninskog ekstrakta i njegove tri frakcije, može se dobiti dosta jasna slika kemijskog sastava. Karakteristično je i za taj taniški ekstrakt, da se kromatografskim putem nije mogla odrediti prisutnost slobodne elag kiseline.

#### 4.9 Ispitivanje šećera u taninskim ekstraktima — Investigation of sugars in tannin extracts

##### 4.91 Uvod — Introduction

Putnam i Browne (115) su pronašli, da u američkom kestenovu ekstraktu (*C. dentata*) ima najmanje 7 šećera, od kojih su identificirali glu-kozu i ksilozu.

U japanskom kestenu (*C. crenata*) nađena je također glu-koza i ksiloza (101). Hidrolizom kestenovine sa 72% sumpornom kiselinom našao je Del Pezzo (34) u ekstrahiranom drvu glu-kozu, ksilozu, manozu (trag) i arabinozu, a u ekstraktu ksilozu, manozu (trag), arabinozu, fruktozu i uronske kiseline.

Ispitivanjem netanina kestenova ekstrakta isti autor (33) je našao dehidroaskorbinsku kiselinu, glu-kozu, arabinozu, ksilozu, galaktozu, fruktozu i araboketozu.

U netaninu hrastova taninskog ekstrakta Del Pezzo (33) je pronašao glu-kozu i arabinozu.

U netaninu rujeva ekstrakta isti autor (33) je pronašao uronske kiseline, dehidroaskorbinsku kiselinu, glu-kozu i arabinozu. Grassmann i koautori (57) našli su glu-kozu, ramnozu i arabinozu, koji su možda i u obliku di-tri- ili tetrasaharida.

Određujući ukupne šećere u rujevu taninu, Opačić (102) ih je našao 6,48%, odnosno reduktivnih 3,74%.

#### 4.92 Kromatografija šećera taninskih ekstrakata — Chromatography of sugars of tannin extracts

Prilikom ispitivanja polifenola kromatogrami su prškani i anilinfatatom, da bi se odredili reduktivni šećeri. Rezultat je crvenosmeđa mrlja sa lokacijom  $R_f I. = 78,5$  i  $R_f II. = 32,8$ .

S istim mobilnim fazama su zatim kromatografirani slijedeći standardni šećeri: 1. riboza, 2. ramnoza, 3. arabinoza, 4. manoz, 5. glukoza, 6. ksiloza i 7. galaktoza. Mjerenjem njihovih Rf-vrijednosti u I. i II. smjeru dobiveni su rezultati dani u tabeli 12.

Tab. 12

	1	2	3	4	5	6	7
Rf I.	91,6	94,5	93,2	92,0	92,6	94,0	93,5
Rf II.	41,0	46,8	34,1	34,2	25,8	38,5	22,8
Boja u UV-svjetlu	crvena	crven-kasta	crvena	žuć-kasta	žuta	crvena	žuta

Rf-vrijednosti I. smjera su praktički iste, ali u drugom smjeru variraju. Općenito obje su više od srednjih Rf-vrijednosti šećera, nađenih prskanjem taninskih kromatograma istim reagensom. To se može protumačiti time što su standardni šećeri kromatografirani pojedinačno, a tanini su smjese uzajamno topljivih tvari.

Rekognosciranje šećera tima mobilnim fazama nije bilo moguće, pa se zato prišlo drugoj tehnici.

Taninski ekstrakti kestena, hrasta i ruja kromatografirani su (silaznom) protočnom metodom (*Durchlaufchromatographie*). Kod toga se nisu određivale Rf-vrijednosti, nego su mrlje determinirane pomoću slijedećih standardnih šećera: galaktoze, glukoze, manoze, arabinoze i ksiloze.

Kao mobilna faza upotrebljavala se smjesa: piridin — etilacetat — voda (1 : 2,5 : 3,5), koja je u lijevku za odjeljivanje dobro izmiješana. Donji, vodeni sloj je odijeljen i upotrijebljen za klimatiziranje atmosfere u cilindru za razvijanje. Gornji sloj se koristio kao mobilna faza. Kromatografirano je kod sobne temperature kroz 16 sati, zatim je kromatogram sušen 5 minuta u sušioniku, a iza toga je kromatografija nastavljena još 4 sata. Ukupno 20 sati. Detekcija je obavljena prskanjem s anilinfталatom i zagrijavanjem 10 minuta na 105 °C.

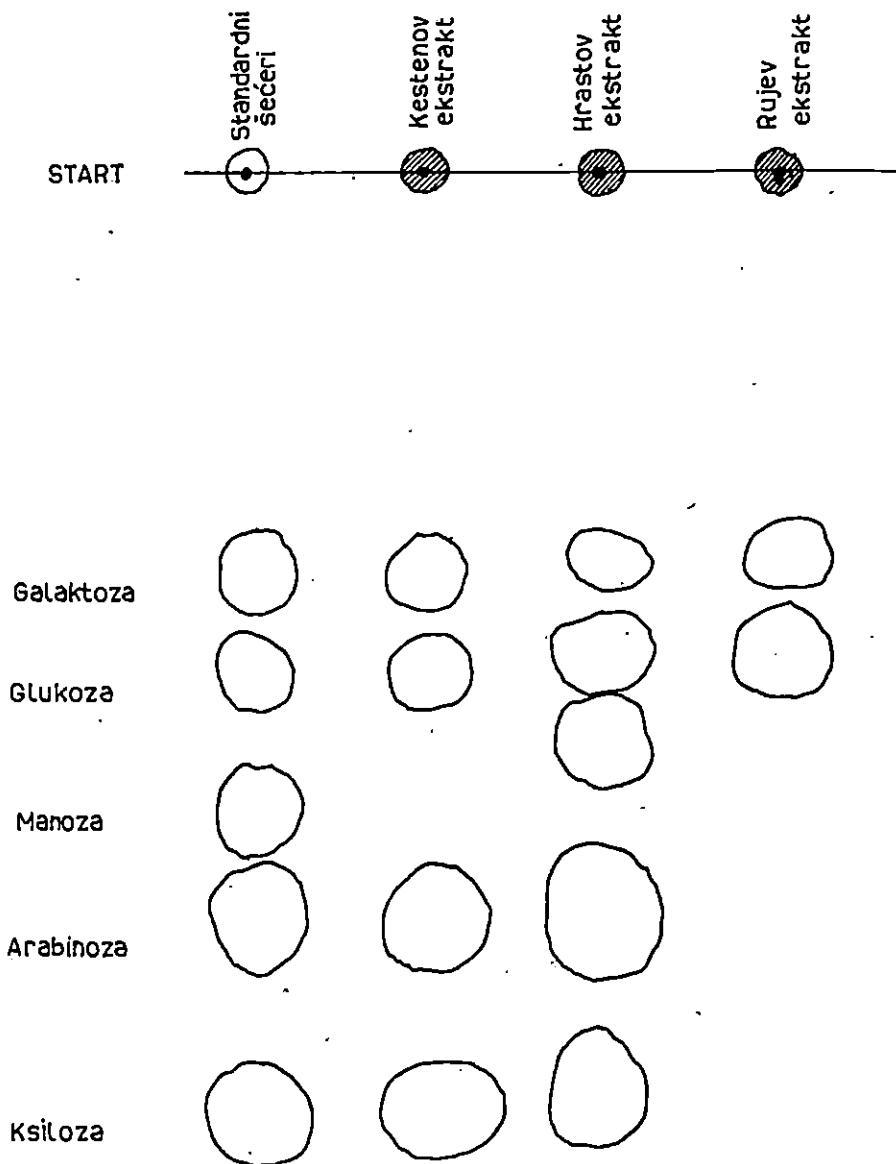
Tab. 13

Nađeni šećeri	Taninski ekstrakti		
	kestena	hrasta	ruja
1. galaktoza	+	++	+
2. glukoza	++	++	+++
3. neidentificiran	—	+	—
4. manoz	—	—	—
5. arabinoza	+++	+++	—
6. ksiloza	+	++	—

+ = mala količina  
++ = srednja količina

+++ = velika količina  
— = nema mrlje

# KROMATOGRFSKO ISPITIVANJE ŠEĆERA U TANINSKIM EKSTRAKTIMA /CRTEŽ-1:2/



MOBILNA FAZA: PIRIDIN - ETILACETAT - VODA (1 - 25 - 35); PRSKANO S ANILINFTALATOM

Taninski ekstrakti za nanošenje pripremljeni su kao 10<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-tne vodene otopine. Taninski ekstrakti nisu frakcionirani niti hidrolizirani osim izvorno, tj. prilikom tehnološkog procesa (ekstrakcijom i isparivanjem) dobivanja tanina. Količina nanosa taninskih otopina na start iznosila je 6  $\mu$ l (2  $\times$  3  $\mu$ l).

Standardni šećeri su nanoseni u količini od 3  $\mu$ l, a količina svakoga pojedinog šećera iznosila je 3  $\mu$ g. Nakon kromatografiranja poredak standardnih šećera od starta prema dolje bio je slijedeći: galaktoza, glukoza, manosa, arabinoza i ksiloza. Tabela 13 na str. 43, odnosno crtež na str. 44 prikazuju rezultat ispitivanja šećera u taninskim ekstraktima.

Šećeri, koji reagiraju s anilinfталatom, su determinirani pomoću standarda. Samo jedan šećer nije determiniran, a registriran je kod hrastova ekstrakta između glukoze i manose.

#### 4.93 *Diskusija rezultata — Discussion of results*

1. Taninski ekstrakti kestena, hrasta i ruja ispitani su kromatografski na sadržaj šećera.
2. Mobilne faze, koje su upotrijebljene za kromatografiju taninskih ekstrakata i njihovih frakcija, nisu se pokazale kao povoljne za determinaciju šećera.
3. Determinacija je određena smjesom piridin-etilacetat-voda (1 : 2,5 : :3,5) kao mobilnom fazom, a pomoću standardnih šećera.
4. U kestenovu ekstraktu nađena su četiri šećera: galaktoza, glukoza, arabinoza i ksiloza.

U hrastovu ekstraktu pronađeno je pet šećera: galaktoza, glukoza, neidentificiran, arabinoza i ksiloza.

U rujevu ekstraktu nađena su dva šećera: galaktoza i glukoza.

#### 5. *Spektralna analiza taninskih ekstrakata i frakcija — Spectral analysis of tannin extracts and fractions*

##### 5.1 *Mjerenje UV-spektara tanina — Measurement of UV spectra of tannins*

Organski materijali, koji sadrže rezonantne strukture (kromoforne grupe) apsorbiraju energiju zračenja u UV i vidljivom dijelu spektra. Aromatski spojevi npr. s benzenskim prstenom pokazuju jaku apsorpciju u području od 250—280 m $\mu$ , pa u slučaju alkilbenzenskoga homolognog niza spektri su slični po lokaciji, obliku i intenzitetu, jer apsorpcija bitno zavisi o benzenskom prstenu (54). »Sličnost UV spektra ima manu, da se slični spojevi obično ne mogu međusobno razlikovati, pa upotreba za analizu više komponentnih sistema nije korisna« (127). Unatoč tome ispitivanjem UV-spektara različitih tanina bavilo se niz autora. Najviše ispitivani tanini u svakom pogledu su tanini mimoze i quebracha.

Roux (123) predlaže upotrebu UV fotometrijske metode za analizu mimosina ekstrakta. Ta se metoda bazira na apsorpcijskom maksimumu kod  $\lambda = 203$  m $\mu$ , uz već prijašnju metodu s maksimumom kod  $\lambda = 280$  m $\mu$  po tome, što je krivulja apsorpcija—koncentracija bila pravac, a što je i Sohn (153) pokazao kod quebracha. U svojem kasnijem radu Roux (127) kaže da mimosin tanin sadrži kromofore u obliku fenolnih jezgri te da u razrijeđenim vodenim otopinama metanola i etanola (0,1 g/l) daje izrazitu apsorpciju kod 280 m $\mu$ , dok je minimum kod

253 m $\mu$ . Kod maksimalne apsorpcije 280 m $\mu$  je *Rusell* (138) dobio s preciznijim aparatom dva maksimuma, i to viši kod 285 m $\mu$  te niži kod 270 m $\mu$ . Taj maksimum nije karakterističan samo za mimozin tanin, nego se pokazuje i kod katehina (127), elag kiseline (138), lignina (120, 151), taninske kiseline (18) itd. uz različite vrijednosti molarnih ekstinkcija. Netanini u mimozinu ekstraktu (gume, šećeri i sl.) ne pokazuju apsorpciju (137).

*Roux* (124) navodi, da su maksimumi kod 203 m $\mu$  i 280 m $\mu$  (nađeni kod kondenziranih tanina u mimozinu ekstraktu, a koji sadrže velik % tak ortohidroksi fenolnih grupa) tipični za katehine (flavan-3-ole) i leukoantocijanidine (flavan-3,4-diole), a također i za njihove konstitucijske fenole.

Ispitujući mimoza-taninski ekstrakt na sadržaj fenolnih hidroksila (vidi u daljnjem tekstu), *King* i koautori (77) su dobili podatke, prikazane u tabeli 14. Oni smatraju da je pomak od 279 m $\mu$  na 292 m $\mu$  uzrokovan resorcinolnom i kateholnom grupom.

Tab. 14

Ispitivana tvar	Vodena otopina		5% NaOH otopina	
	max	E <sub>1cm</sub> <sup>1%</sup>	max	E <sub>1cm</sub> <sup>1%</sup>
mimozin ekstrakt	279	90	292	196
resorcinol	272	174	291	290
katehol	275	220	298	416
pirogalol	265	54	—	—
floroglucinol	266	27	349	374

Ispitujući quebracho tanin i njegove frakcije, *Kirby*, *Knowles* i *White* (83) mjerili su spektar ekstrakta u otopini voda:metanol (1:1) od 210—400 m $\mu$ . Sve krivulje pokazuju maksimum kod 280—281 m $\mu$ , signirajući fenolnu jezgru, a E<sub>1cm</sub><sup>1%</sup> kreće se u vrijednosti od 170—192,5 m $\mu$ . Te vrijednosti se slažu s ispitivanjima *Sohna* (153). Utjecajem alkalija (83) minimum (258 m $\mu$ ) uglavnom iščezava, a maksimum se pomiče na 285—290 m $\mu$ , što podsjeća na utjecaj alkalija na UV-spektar lignina (2), koji ima nekoliko slobodnih fenolnih hidroksilnih grupa.

Za uzrok utjecaja alkalija autori (83) pretpostavljaju križanje kromofornih efekata od velikog broja prisutnih tvari. Isti autori u daljem radu (84) nalaze, da acetilirane quebracho frakcije imaju maksimum kod 273 m $\mu$ , ali smatraju da je još ipak polovina fenolnih hidroksila neacetilirana. Veću vrijednost nekih frakcija tumače tako, da vjerojatno ima više eterskog veza nego hidroksilnih grupa, što potkrepljuju i time jer frakcija ima veliki postotak u vodi netopljive tvari.

*Kishimoto* (87) je ispitivao UV-spektre tanina šiške (*Rhus javanica* L.), hrastove kore (*Quercus dentata* Thunb.) i kore mimoze (*Acacia decurrens* Willd. var. *mollis* Lindl.) Prije mjerenja obavljena je frakcionacija (7 frakcija). Mjerene su 0,001% vodene otopine kod pH 2, koja je kiselost postignuta s 0,1 N HCl. Nađeno je da se frakcije kod sva tri tanina razlikuju samo po E vrijednosti, a maksimumi i minimumi su slijedeći:

	maksimum (m $\mu$ )	minimum (m $\mu$ )
rujeva (javanska) šiška	277	243
mimozina kora	278	258
hrastova kora	275	260

U daljnjim ispitivanjima (88) autor navodi da između tanina javanskog ruja i grozdastog distilija (*Distylium racemosum* Sieb. et Zucc.) postoji sličnost UV-spektara ne samo u pojedinim dijelovima drva nego i u šiškama.

Isti autor (86) ispituje i UV-apsorpcijski spektar tanina iz kore japanskog kestena — kuri (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.). Autor je izveo frakcionaciju tanina kuri kore i dobio 5 frakcija. Smatralo se da tanin kuri kore nema maksi-

mum u UV-apsorpcijskom spektru, međutim je autor dokazao, da postoji apsorpcija kod svih pet frakcija kod pH 2,7 i pH 2,2, u području od 265—274 m $\mu$ , te minimum u području od 246—254 m $\mu$ . Cirkularnom papirnom kromatografijom dalje je dokazano da su i frakcije sastavljene.

Sakata i koautori (169) također smatraju, da kora kestena sadrži i kondenzirane i hidrolizirajuće tanine s UV-apsorpcijskim maksimumom kod 269 m $\mu$ , dok je tanin drva hidrolizirajući i ne pokazuje tu apsorpciju.

Za pročišćeni tanin japanskog kestena (*C. crenata*) Okamura i Sizuka (101) nisu našli maksimum apsorpcije pa navode da je sličan taninu kestena (*C. vesca*).

Hathway (61) ispitujući tanine kestenove kore, navodi za flavo-tanine apsorpcijski maksimum kod 280 m $\mu$ .

Sohn (152, 153) je pronašao da »kateholni« (kondenzirani) taninski ekstrakti (quebracho, mimoza i smreka) pokazuju minimum kod 260 m $\mu$ , a maksimum kod 280 m $\mu$ . »Pirogalolni« (hidrolizirajući) taninski ekstrakti (hrast, kesten, valonea) nemaju određen maksimum i minimum. To zadnje potvrđuje i ispitivanje 0,002%-tnih otopina taninskog ekstrakta valonee, hrasta i kestenova drva koje su proveli Blažej i koautori (12).

Ispitujući frakciju »D« taninskog ekstrakta kestena, Putnam (115) je također našao da 0,001% i 0,01%-tne otopine u aps. etanolu u području od 230—435 m $\mu$  nemaju apsorpcijski maksimum. Za kestenov ekstrakt je to isto zaključio i Buchanan s koautorima (19).

Međutim, Mladek (168) navodi za kestenov ekstrakt, da ima UV-apsorpcijsku krivulju, identičnu smjesi kondenzirajućih i hidrolizirajućih tanina s maksimumom apsorpcije kod 280 m $\mu$ .

Myrobalan, iako označen kao »pirogalolni« ekstrakt, pokazao je maksimum kod 280 m $\mu$ .

Za određivanje količine fenolnih hidroksila u polifenolima Maranville i Goldschmidt (91) koristili su Aulin-Erdtman (3) i Goldschmidtovu (55) metodu, koja omogućuje određivanje količina fenolnih hidroksila prema razlici neutralnog i alkalnog spektra lignina. Njihova mjerenja pokazala su maksimum apsorpcije kod 290 m $\mu$  za ekstrakte quebracha, katehu, smreke, bora, johe, sekvoje, jele i cedra. Otapanjem ekstrakta u natrijevu boratu (pH 10) mjerili su promjene i kao rezultat dobili slijedeće postotke fenolnih hidroksila za gornje ekstrakte (isti redoslijed):

18,0; 8,0; 6,0; 5,9; 5,8; 0,9; 3,3; i 1,3%.

Općenito je zapaženo, da se UV-apsorpcijska metoda može koristiti i za određivanje komponenata, izoliranih iz tanina, a kod tako ispitanog galokatehina zapaženo je (13) da spektralni maksimum odgovara sumi maksimuma za pirogalol i kroman, koji su kromoforne grupe molekule.

Spektrofotometrijsko UV-ispitivanje kestenova taninskog ekstrakta obavili su i Lasserre i Magarian (90). Autori su pronašli da ekstrakt sadrži galnu kiselinu te da ima maksimum kod 290 m $\mu$ , a minimum kod 270 m $\mu$ .

Galna kiselina ima maksimume kod 213 i 265 m $\mu$ , a minimum kod 237 m $\mu$ .

Pirogalol ima maksimume (prema koncentraciji) kod 204—225 i 265 m $\mu$ .

Tanin iz šiške ima maksimume kod 213 i 275 m $\mu$ .

Nadalje su autori našli da Beerov zakon vrijedi za kestenov ekstrakt u koncentraciji 30—280 mg/l, te da kiselost ispod pH 5 ne utječe na E, dok u alkalnom raste.

## 5.2 Eksperimentalni dio — Experimental

### 5.21 Uvod — Introduction

Taninski ekstrakti i frakcije kao i standardne tvari bili su pripremljeni uglavnom kao 0,001%-tne otopine u vodi i metanolu (1 : 1). Mjeren je UV-apsorpcijski spektar u području od 190—390 m $\mu$ .

Sve ispitivane tvari izmjerene su i uz dodatak  $5 \cdot 10^{-3}$  M HCl (oko 0,02%) odnosno  $5 \cdot 10^{-3}$  M KOH (0,02%), da bi se dobila koncentracija HCl ili KOH u ispitivanom uzorku od  $5 \cdot 10^{-4}$  M. Otopine KOH i HCl su priređene u voda : metanolu (1 : 1).

Debljina kvarcne kivete: 1 cm, prerez: 25, a brzina snimanja je polagana (8 minuta).

U tabeli 15 naveden je popis tvari, kojima je mjeran UV-apsorpcijski spektar kao i odgovarajuće koncentracije. Strukturne formule standardnih tvari dane su na str. 67.

Tab. 15

Ispitivana tvar	H <sub>2</sub> O : MeOH (1 : 1)	H <sub>2</sub> O : MeOH (1 : 1) KOH (5 · 10 <sup>-4</sup> M)	H <sub>2</sub> O : MeOH (1 : 1) HCl (5 · 10 <sup>-4</sup> M)
1. Resorcinol »Merck« p. a.	0,0001%	0,0001%	0,0001%
2. Pirogalol O. T. Schmidt	0,0001% i 0,1%	0,0001%	0,0001%
3. Galna kiselina O. T. Schmidt	0,001%	0,001%	0,001%
4. Elag kiselina O. T. Schmidt	0,001%	0,001%	0,001%
5. 3,6 digalailglukoza O. T. Schmidt	0,001%	0,001%	0,001%
6. Pentagalailglukoza O. T. Schmidt	0,001%	0,001%	0,001%
7. Hebulinska kiselina O. T. Schmidt	0,001%	0,001%	0,001%
8. Hebulagna kiselina O. T. Schmidt	0,001%	0,001%	0,001%
9. d-katehin »Fluka« puriss.	0,0001%	0,0001%	0,0001%
10. Fisetin »Fluka« purum	0,001%	0,001%	0,001%
11. K	0,001%	0,001%	0,001%
12. K-111	0,001%	0,001%	0,001%
13. K-112	0,001%	0,001%	0,001%
14. K-12	0,001%	0,001%	0,001%
15. K-21	0,001%	0,001%	0,001%
16. K-22	0,001%	0,001%	0,001%
17. H	0,001%	0,001%	0,001%
18. H-111	0,001%	0,001%	0,001%
19. H-112	0,001%	0,001%	0,001%
20. H-12	0,001%	0,001%	0,001%
21. H-21	0,001%	0,001%	0,001%
22. H-22	0,001%	0,001%	0,001%
23. R	0,001%	0,001%	0,001%
24. R-1	0,001%	0,001%	0,001%
25. R-21	0,001%	0,001%	0,001%
26. R-22	0,001%	0,001%	0,001%

### 5.22 UV-spektri standardnih tvari — UV spectra of standard substances

Slika 24 prikazuje UV-apsorpcijski spektrogram resorcina. U literaturi (110, 111) je nađeno, da resorcin ima slijedeće apsorpcijske maksimume ( $\lambda_{\max}$  u m $\mu$ ):

U pH 3: 216; 273,5 (35)  
U pH 11: 236; 287 (35)

U metanolu:	276,5; 283; 237,5	(21)
U NaOH:	287,5	(21)
U etanolu:	277	(85)
U pH 1,4:	220; 275	(38)

Na slici 24 vidi se, da su nađena dva apsorpcijska maksimuma i to kod 202 m $\mu$  i 276 m $\mu$ . Naslućuje se maksimum kod oko 215  $\mu$ . Uz dodatak HCl apsorpcija je manja uz malen hipsokromni pomak. Uz dodatak KOH apsorpcija se povećava uz batokromni pomak. Izgleda da je maksimum kod 270—280 dvostruk, a može se naslutiti maksimum kod ~240 s KOH.

Slika 25 prikazuje UV-apsorpcijski spektrogram pirogalola. U literaturi (110, 111) je pronađeno da pirolagol u raznim medijima ima slijedeće maksimume ( $\lambda_{max}$  u m $\mu$ ):

kod pH 7,3:	270	(95)
u metanolu:	267,5	(21)
u metanolu:	244,5; 275	(21)
u etanolu:	266	(13,85)

Na slici 25 vidi se, da je nađen jedan maksimum kod 202 m $\mu$  koji se uz dodatak HCl i KOH mijenja samo po intenzitetu apsorpcije. Naslućuje se maksimum kod ~225 m $\mu$ , odnosno uz KOH kod ~245. Povećanje koncentracije na 0,1% pokazuje vrlo jaku apsorpciju kod oko 225 m $\mu$  te izrazite maksimume kod 270 i 312 m $\mu$ .

Mjerenjem u vidljivom dijelu spektra (VIS) nađen je apsorpcijski maksimum kod 374 m $\mu$ .

Slika 26 prikazuje UV-apsorpcijski spektrogram galne kiseline. U literaturi (110, 111) nađeni su slijedeći apsorpcijski maksimumi ( $\lambda_{max}$  u m $\mu$ ).

H <sub>2</sub> O:	255	(15)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH 1,2:	216; 271	(158)
metanol:	272,5	(21)
metanol, NaOH:	262,5; 335	(21)
etanol:	272	(13)

Na slici 26 vidi se, da su nađena 2 maksimuma: kod 215,5 i 269 m $\mu$ . Dodatkom HCl dolazi do batokromnog pomaka (217, 273 m $\mu$ ), a uz dodatak KOH prvi maksimum je kod 202 m $\mu$  a drugi se gubi.

Slika 27 prikazuje UV-apsorpcijski spektrogram elag kiseline. U literaturi (110, 111, 65, 66) nađeno je, da elag kiselina ima slijedeće apsorpcijske maksimume ( $\lambda_{max}$  u m $\mu$ ):

80% vod. dioksan:	256, 368	(11)
dioksan:	255, 370	(149)
etanol:	255, 365	(76)
etanol:	255, 365	(71)

Na slici 27 vide se slijedeći maksimumi: 218, 255, 277 i 364 m $\mu$  (ovaj zadnji maksimum je utvrđen ispitivanjem u VIS). Dodatkom HCl dolazi do batokromnog pomaka s time, što drugi maksimum postaje izrazit, a treći se praktički gubi. Dodatkom KOH dolazi do jakoga hipsokromnog pomaka.



Tab. 16

Slika	Tvar	$\lambda_{\max}$ (m $\mu$ )				$\lambda_{\max}$ (m $\mu$ ) — (HCl)				$\lambda_{\max}$ (m $\mu$ ) — (KOH)			
		I.	II.	III.	IV.	I.	II.	III.	IV.	I.	II.	III.	IV.
24	Resorcinol	202	220			201	220			205	240		
25	Pirogalol	202	228	—	374	202	228			202	245		
26	Galna kiselina		215	270			217	273		202	260		
27	Elag kiselina		218 244 255	277	364		219	258	370	204	244 254	280	360
28	3,6-digaloilglukoze		218	276,5			220	278,5		204	249	283	
29	Pentagaloilglukoza		218	284			218	284		202	243	332	
30	Hebulinska kiselina	205	216	281		201	~230	~278		203	—	~290	
31	Hebulagna kiselina	203	225	281		~203	225	281		202	~245	326	
32	d-katehin	206	225	284	396	205	231	284		201,5	246		
33	Fisetin	208	252	330	372	207	251	—	330 370	207	251	346	466

Na slici 28 je UV-apsorpcijski spektrogram 3,6 digaloiil glukoze.  
Na slici 29 je UV-apsorpcijski spektrogram pentagaloiil glukoze.  
Na slici 30 je UV-apsorpcijski spektrogram hebulinske kiseline.  
Na slici 31 je UV-apsorpcijski spektrogram hebulagne kiseline.  
Na slici 32 je UV-apsorpcijski spektrogram d-katehina.  
Na slici 33 je UV-apsorpcijski spektrogram fisetina.

U vezi s tvarima kojih su UV-apsorpcijski spektrogrami prikazani na slikama 28—33 u literaturi (65) je nađen samo podatak, koji se odnosi na hebulnu kiselinu (a ona je konstitucijski dio hebulinske kiseline i hebulagne kiseline) te se navode maksimumi kod 227 i 289 m $\mu$ , dok otapalo nije dano (147).

Apsorpcijski maksimumi, nađeni na UV-spektrogramima (sl. 28—33), sumirani su u tabeli 16.

Na slici 28 vide se dva apsorpcijska maksimuma (218 i 276,5 m $\mu$ ). Dodatak HCl-a uzrokuje malen batokromni pomak oba maksimuma (220 i 278,5 m $\mu$ ). Dodatak KOH znatno mijenja položaj oba maksimuma (hipokromno) uz pojavu novog maksimuma. Njihovi položaji su 204, 249 i 283 m $\mu$ .

Na slici 29 vrlo su analogne pojave kao na sl. 30 time, da se treći maksimum batokromno pomiče. Maksimumi su u vodi i metanolu: 218 i 284 m $\mu$ , vodi-metanolu uz HCl: 218 i 284 m $\mu$ , te uz dodatak KOH: 202, 243 i 332 m $\mu$ .

Spektrogram na slici 30 pokazuje maksimum oko 200—220 (dvostruki) i 281 m $\mu$ . Dodatkom HCl apsorpcija se znatno smanjuje, i maksimum je kod 201, ~230, ~278 m $\mu$ . Apsorpcija se povećava dodatkom KOH, a maksimumi su kod 203, ~290 m $\mu$ .

Hebulagna kiselina (sl. 31) pokazuje istu apsorpciju za vodu-metanol i dodatak HCl s maksimumima: 203, 225 i 281 m $\mu$ . Uz dodatak KOH maksimumi se hipokromno pomiču, odnosno drugi maksimumi nestaju. Položaj maksimuma: 202, ~245, ~326 m $\mu$ .

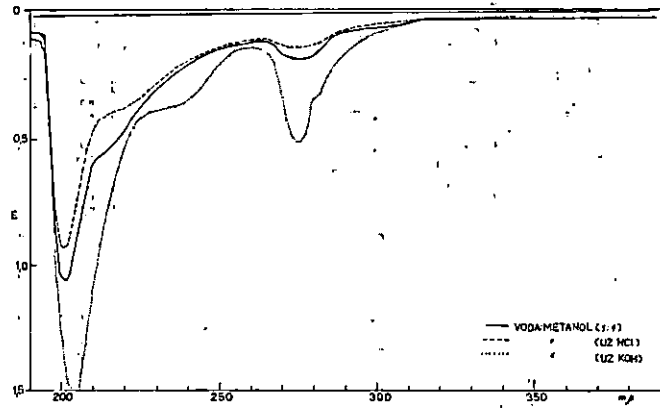
D-katehin (sl. 32) ima apsorpcijske maksimume 206, 225, 284 m $\mu$ . Mjerenjem u VIS području nađen je maksimum kod 396 m $\mu$ . Uz dodatak HCl 205, 231, 284 m $\mu$ , a uz dodatak KOH apsorpcija se povećava: 201,5 i 246 m $\mu$ .

Fisetin (sl. 33) pokazuje apsorpciju kod 208, 252, 330 i 372 m $\mu$  (zadnji maksimum je mjeren i u VIS). Dodatkom HCl apsorpcijski maksimumi su slijedeći: 207, 251, 330 i 370 m $\mu$  (zadnji maksimum je mjeren i u VIS), a dodatkom KOH: 207,5, 251, 346 i 466 m $\mu$  (VIS).

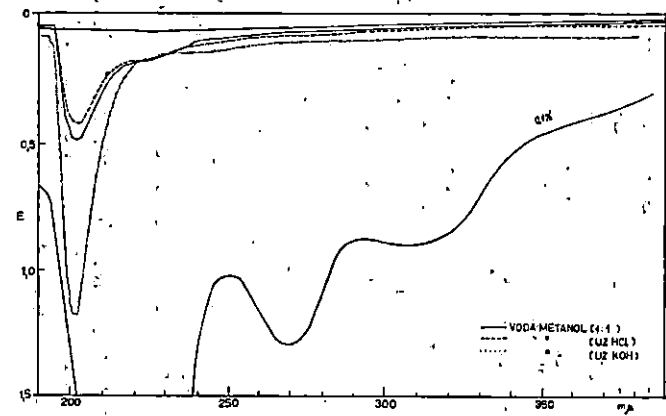
### 5.23 UV-spektri kestenova taninskog ekstrakta i frakcija — UV spectra of Chestnut extract and fractions

Taninski ekstrakt kestena i njegove frakcije mjereni su u voda : metanol (1 : 1) otopinama, a također su izmjerene apsorpcije uz dodatak KOH i HCl analogno standardnim tvarima.

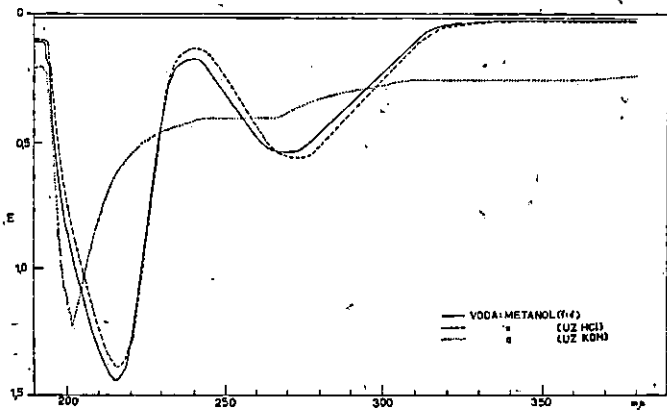
Obavljena su i neka mjerenja u vidljivom području spektra (VIS), ali bez dodataka HCl i KOH.



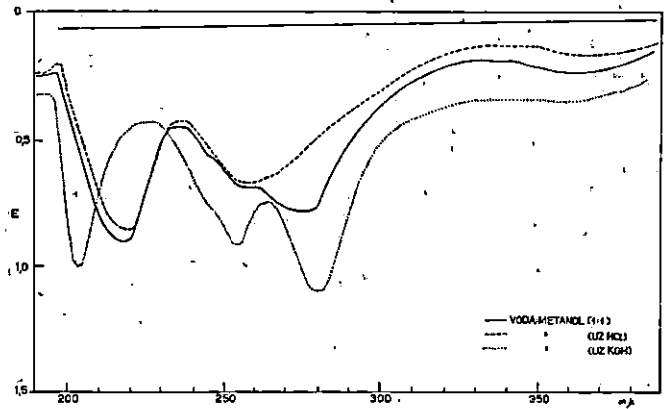
SLIKA 24 UV-APSORPCIJNI SPEKTAR REZORODINA



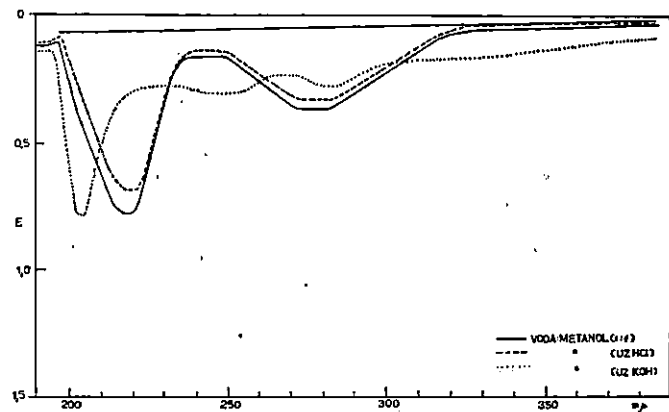
SLIKA 25 UV-APSORPCIJNI SPEKTAR PIRIDOLOLA



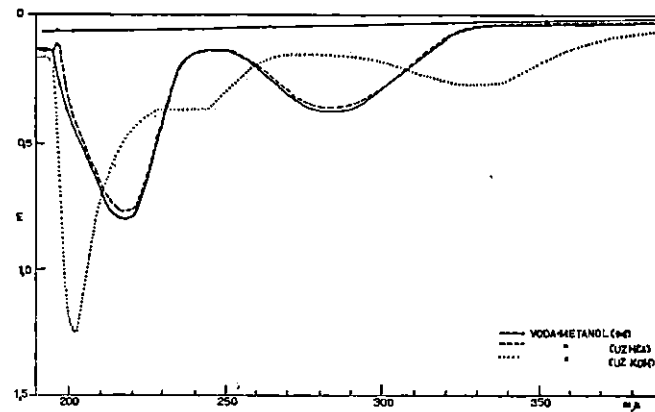
SLIKA 26 UV-APSORPCIJNI SPEKTAR GALNE KISELINE



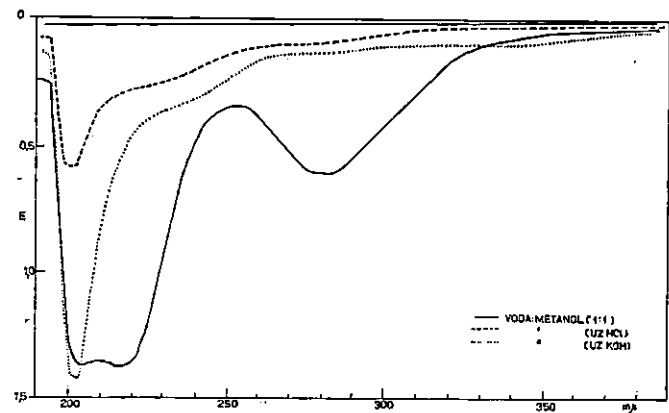
SLIKA 27 UV-APSORPCIJNI SPEKTAR ELA8 KISELINE



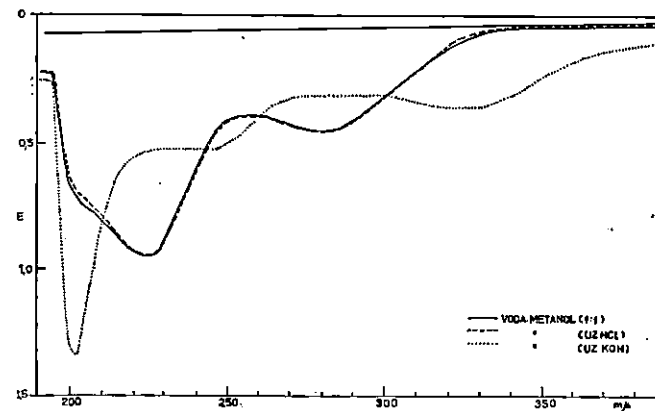
SLIKA 28 UV-APSORPCIONI SPEKTAR 3,6-DIGALAKTOZE



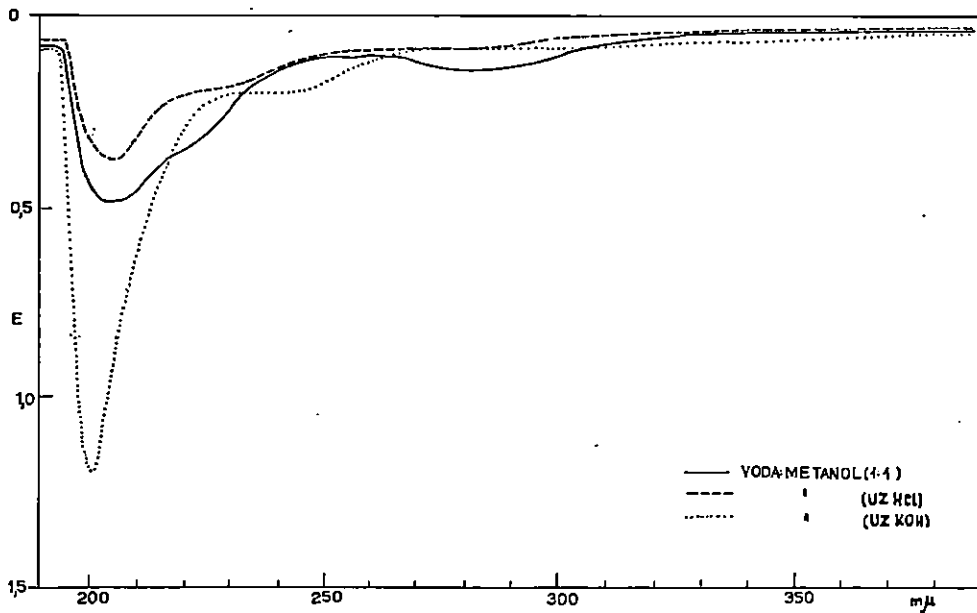
SLIKA 29 UV-APSORPCIONI SPEKTAR PENTAGALAKTOZE



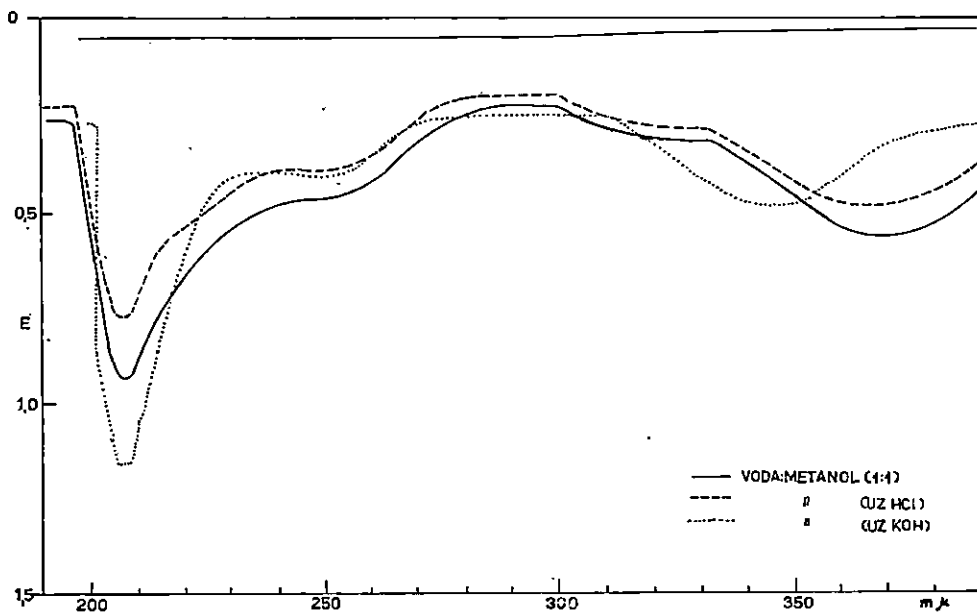
SLIKA 30 UV-APSORPCIONI SPEKTAR HEPTULONISKE KISELINE



SLIKA 31 UV-APSORPCIONI SPEKTAR HEPTULAGONE KISELINE



SLIKA 32 UV-APSORPCIONI SPEKTAR D-KATEHINA



SLIKA 33 UV-APSORPCIONI SPEKTAR FISETINA

Apsorpcijski spektrogram K (kestenov taninski ekstrakt) dan je na slici 34. Izrazit je samo jedan maksimum (213 m $\mu$ ), a drugi se može naslutiti prema obliku krivulje na oko 260—280 m $\mu$ . Dodatkom HCl nema promjene, osim što je apsorpcija nešto manja, a dodatkom KOH maksimum pokazuje oštriju apsorpciju kod 202 m $\mu$ , dok se naslućuje kod 257 i 336 m $\mu$ .

Povećanjem koncentracije (0,1%) nađen je maksimum kod 364 m $\mu$  mjerenjem u VIS području.

Apsorpcijski spektrogram frakcije K-111 prikazan na slici 35 pokazuje maksimum apsorpcije kod 214 i 270 m $\mu$ . Dodatkom HCl maksimumi ostaju skoro identični (215 i 271 m $\mu$ ), dok utjecajem KOH dolazi do hipsokromnog pomaka (203 i 245 m $\mu$ ) i naslućuje se pojava dvaju novih maksimuma (285 i 345 m $\mu$ ).

Povećanjem koncentracije (0,1%) nađen je maksimum kod ~372 m $\mu$ .

Apsorpcijski spektrogram frakcije K-112 dan je na slici 36. Vidi se maksimum kod 215 m $\mu$  i naslućuje kod 263 m $\mu$ . Dodatkom HCl dolazi do maloga batokromnog pomaka (271 i 266 m $\mu$ ), a hipsokromni pomak nastaje dodatkom KOH (203 i 248 m $\mu$ ) te se naslućuje novi maksimum kod 288 m $\mu$ .

Povećanjem koncentracije (0,1%) i mjerenjem u VIS području opaža se apsorpcija kod ~364 m $\mu$ .

Apsorpcijski spektrogram frakcije K-12 (slika 37) pokazuje da je maksimum apsorpcije kod 215 m $\mu$ , a može se naslutiti i kod ~275 m $\mu$ . Maksimumi ostaju isti uz dodatkom HCl, samo se smanjuje apsorpcija. Dodatkom KOH dolazi do hipsokromnog pomaka sa maksimumom kod 202 m $\mu$ , a pretpostavljaju se maksimumi kod 243 i 335 m $\mu$ .

Apsorpcijski spektrogram frakcije K-21 (slika 38) ima maksimum kod 213 m $\mu$ , a naslućuje se kod ~285. Dodatkom HCl dobiva se maksimum kod 212 m $\mu$ , a pretpostavlja se kod 282 m $\mu$ . Utjecajem KOH dobiva se maksimum kod 203 m $\mu$ , a naslućuje kod 243, 281 i 327 m $\mu$ .

Kod veće koncentracije, mjerenjem u VIS području nađen je maksimum kod ~350 m $\mu$ .

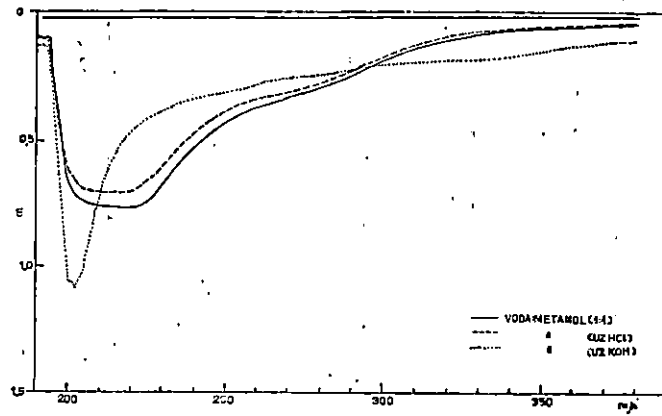
Apsorpcijski spektrogram frakcije K-22 (slika 39) pokazuje maksimum kod 206 m $\mu$ , a naslućuje se i kod 226 i 273 m $\mu$ . Dodatkom kiseline apsorpcija je nešto povećana s maksimumom kod 206 m $\mu$ , a pretpostavlja se maksimum kod 224 i 273 m $\mu$ . Dodatkom KOH maksimum je kod 203 m $\mu$ , drugi se izgubio, a treći se naslućuje kod 243 m $\mu$ .

Pregled svih maksimuma kestenova ekstrakta i frakcija dan je u tabeli 17 (str. 61) pod brojevima 34—39.

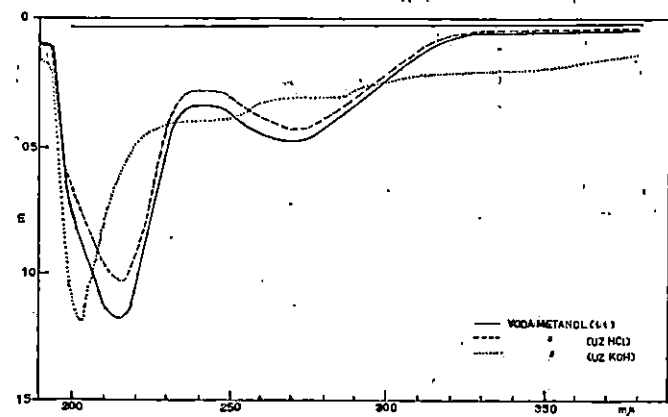
#### 5.24 UV-spektri hrastova taninskog ekstrakta i frakcija — UV spectra of Oak tannin extract and fractions

Taninski ekstrakt hrasta i njegovih frakcija ispitan je u sistemu metanol : voda (1 : 1), a također uz dodatak KOH i HCl, kao što su mjerene standardne tvari i kestenov tanin s frakcijama.

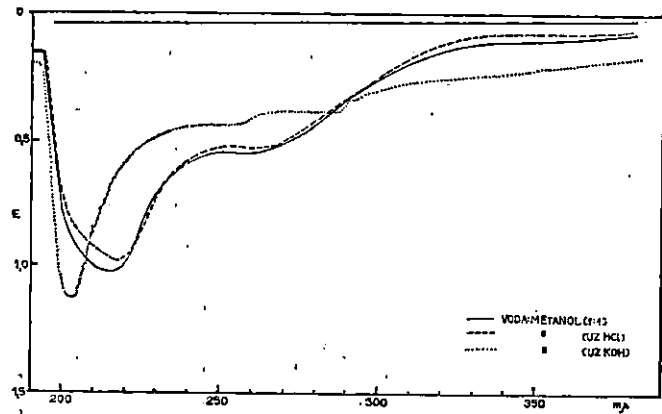
Neka su mjerenja obavljena i u VIS području.



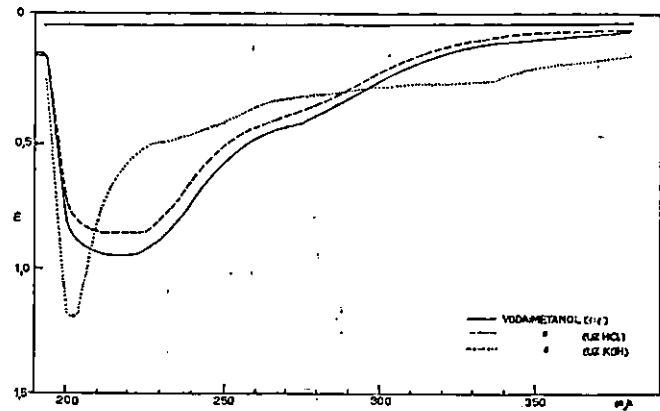
SLIKA 34 UV-APSORPCIONI SPEKTAR KESTENOG TANINSKOG EKSTRAKTA-K



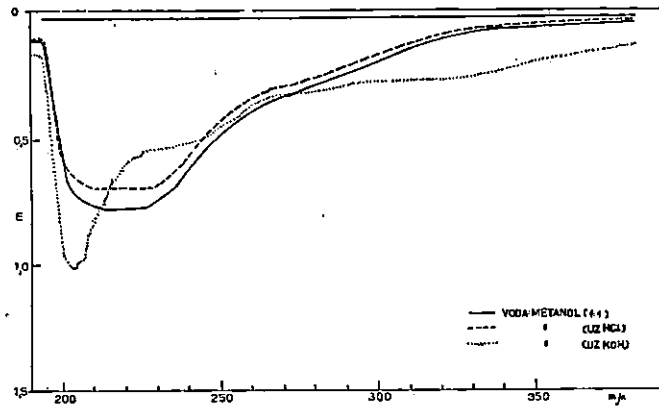
SLIKA 35 UV-APSORPCIONI SPEKTAR KESTENOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA-FRAKCIJA K-113



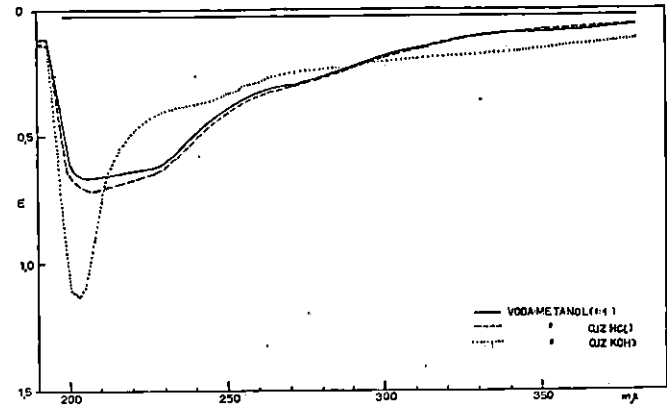
SLIKA 36 UV-APSORPCIONI SPEKTAR KESTENOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA-FRAKCIJA K-112



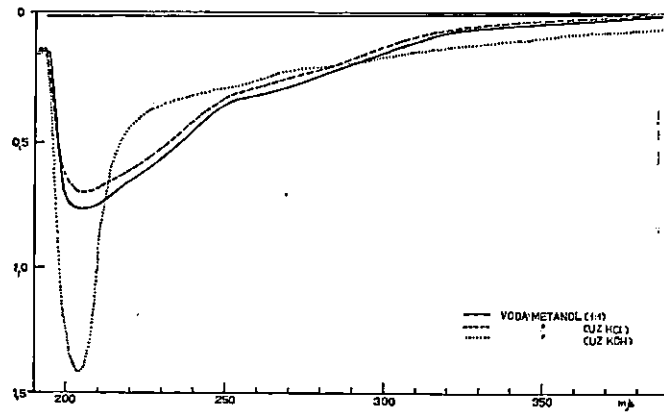
SLIKA 37 UV-APSORPCIONI SPEKTAR KESTENOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA-FRAKCIJA K-12



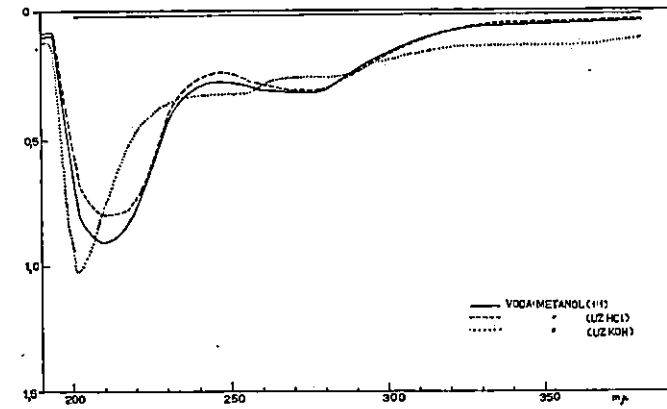
SLIKA 38 UV-APSORPCIONI SPEKTAR KESTENOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA-FRAKCIJA K-21



SLIKA 39 UV-APSORPCIONI SPEKTAR KESTENOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA-FRAKCIJA K-22

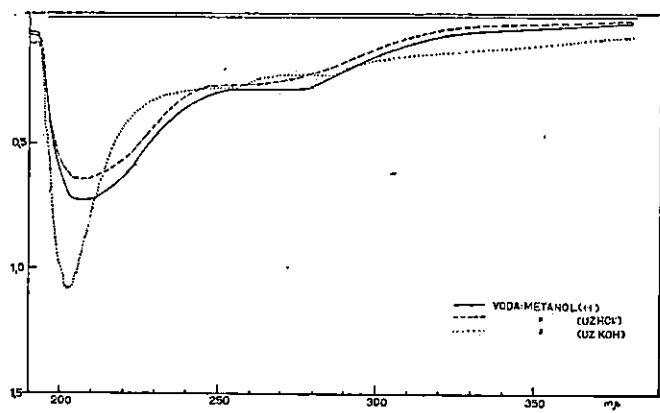


SLIKA 40 UV-APSORPCIONI SPEKTAR HRASTOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA H

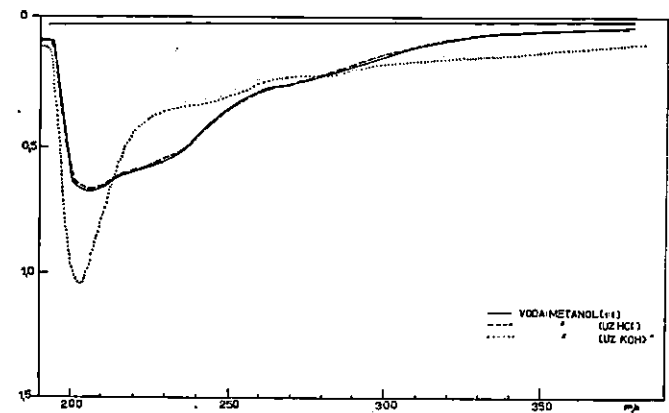


SLIKA 41 UV-APSORPCIONI SPEKTAR HRASTOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA-FRAKCIJA H-22

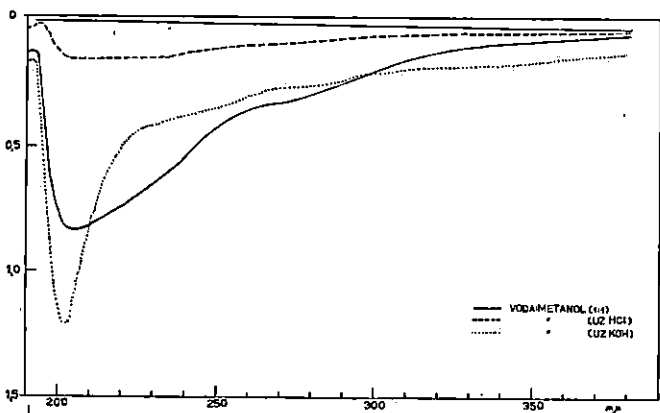




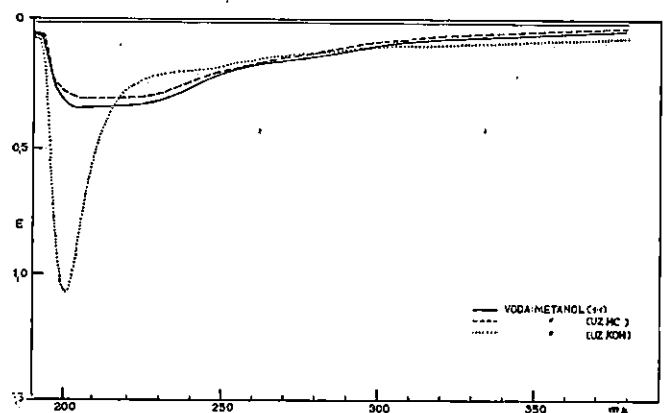
SLIKA 42 UV-APSORPCIONI SPEKTAR HRASTOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA-FRAKCIJA H-12



SLIKA 43 UV-APSORPCIONI SPEKTAR HRASTOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA-FRAKCIJA H-12



SLIKA 44 UV-APSORPCIONI SPEKTAR HRASTOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA-FRAKCIJA H-21



SLIKA 45 UV-APSORPCIONI SPEKTAR HRASTOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA-FRAKCIJA H-22

Apsorpcijski spektrogram hrastovog ekstrakta (slika 40) pokazuje maksimum apsorpcije kod 207 m $\mu$  sa blagim padom prema većim valnim dužinama gdje se mogu jedva naslutiti maksimumi kod ~230 i ~280 m $\mu$ . Dodatkom HCl krivulja ostaje ista (nešto manja apsorpcija), a dodatkom KOH poveća se apsorpcija s maksimumom kod 204 m $\mu$ , a predmnijeva se maksimum kod 256 i 285 m $\mu$ .

Mjerenjem u VIS, uz veću koncentraciju (0,1%) nađen je i maksimum kod 360 m $\mu$ .

Apsorpcijski spektrogram frakcije H-111 (slika 41) pokazuje izrazite maksimume i to kod 210 i 272 m $\mu$ . Dodatkom HCl apsorpcija se nešto smanjuje, a položaji maksimuma ostaju isti, dok uz dodatak KOH dolazi do hipsokromnog pomaka s maksimumom kod 202 m $\mu$ , a pretpostavlja se i kod 255, 285 i 365 m $\mu$ .

Apsorpcijski spektrogram frakcije H-112 (slika 42) ima maksimum apsorpcije kod 207 m $\mu$ , a naslućuju se i kod 278 m $\mu$ . Dodatkom HCl apsorpcija se smanjuje, maksimum je kod 206 m $\mu$ , a predmnijeva se i kod ~270 m $\mu$ . Dodatkom KOH dolazi do hipsokromnog pomaka, maksimum je kod 203 m $\mu$ , a naslućuje se i kod 256 i 286 m $\mu$ .

Mjerenjem u VIS području nađen je maksimum kod 368 m $\mu$ .

Apsorpcijski spektrogram frakcije H-12 (slika 43) pokazuje apsorpcijski maksimum kod 205 m $\mu$ , a naslućuje se kod 232 i 286 m $\mu$ . Dodatkom HCl krivulja ostaje ista, a dodatkom KOH, uz hipsokromni pomak, dobije se maksimum kod 203 m $\mu$ , a predmnijeva kod 243 i 283 m $\mu$ .

Apsorpcijski spektar frakcije H-21 (slika 44) pokazuje apsorpcijski maksimum kod 205 m $\mu$ , a jedva se naslućuje kod 230 i 280 m $\mu$ . Dodatkom HCl apsorpcija se jako smanjuje, a maksimum je ravan od 205—230 m $\mu$ . Dodatkom KOH maksimum se pomiče na 202 m $\mu$ , a naslućuje se i maksimum kod 251 i 283 m $\mu$ .

Apsorpcijski spektar frakcije H-22 (slika 45) s obzirom na malenu koncentraciju pokazuje samo maksimum kod 205—220, isto tako u kiselom mediju. Dodatkom KOH maksimum je kod 200 m $\mu$ , a pretpostavlja se kod 247 m $\mu$ .

Svi maksimumi hrastova ekstrakta i frakcija dani su u tabeli 17 (str. 61) pod brojevima 40—45.

#### 5.25 UV-spektari rujeva taninskog ekstrakta i frakcija — UV spectra of Sumach tannin extract and fractions

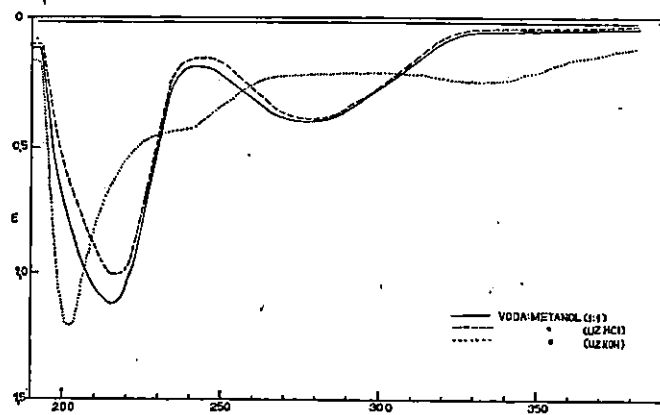
Taninski ekstrakt ruja i njegove frakcije ispitane su analogno kao i taninski ekstrakti kestena i hrasta.

Apsorpcijski spektrogrami R, R-1, R-21, i R-22 dani na slikama 46—49 su toliko slični, da će biti opisani zajednički.

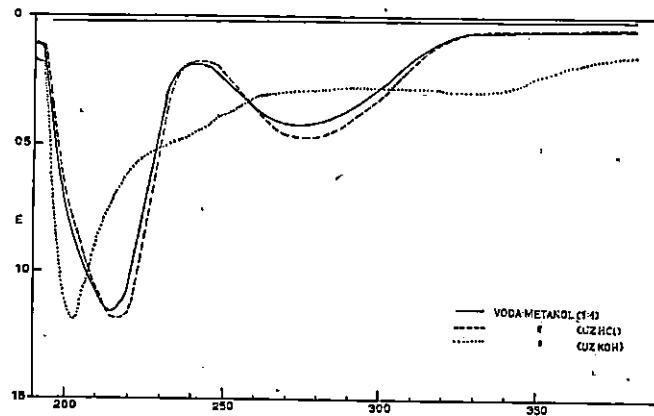
Svi oni pokazuju izrazite maksimume apsorpcije kod ~215 i 268 m $\mu$ .

Dodatak HCl kod svih dovodi do batokromnog pomaka, ali kod R i R-21 apsorpcije su smanjene, kod R-1 ostaje gotovo ista, dok se kod R-22 jako povećava. Dodatkom KOH dolazi do hipsokromnog pomaka.

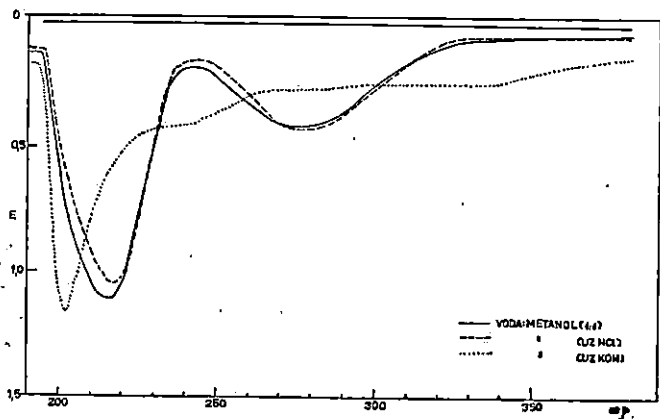
Svi maksimumi rujeva ekstrakta i frakcija dani su u tabeli 17 pod brojem 46—49.



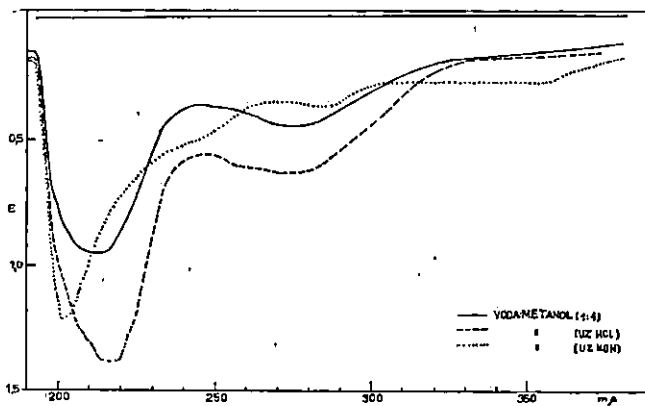
SLIKA 46 UV-APSORPCIONI SPEKTAR RUJEVOG TANINSKOG EKSTAKTA R



SLIKA 47 UV-APSORPCIONI SPEKTAR RUJEVOG TANINSKOG EKSTAKTA-FRAKCIJA R1



SLIKA 48 UV-APSORPCIONI SPEKTAR RUJEVOG TANINSKOG EKSTAKTA-FRAKCIJA R-21



SLIKA 49 UV-APSORPCIONI SPEKTAR RUJEVOG TANINSKOG EKSTAKTA-FRAKCIJA R-22

Tab. 17

Slika	Tvar	$\lambda_{\max}$ (m $\mu$ )				$\lambda_{\max}$ (m $\mu$ ) — (HCl)				$\lambda_{\max}$ (m $\mu$ ) — (KOH)				
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IVa	IV
34	K	213	—	—	~364	213	—	260, 280	—	202	—	257	—	336
35	K-111	214	—	270	~370	215	—	271	—	203	—	245	285	345
36	K-112	215	—	263	~364	217	—	266	—	203	—	255	288	—
37	K-12	215	—	275	—	215	—	275	—	202	—	243	—	335
38	K-21	213	—	280	~360	213	—	282	—	203	—	243	283	327
39	K-22	206	226	273	—	206	224	273	—	203	—	243	—	—
40	H	207	230	280	360	207	230	280	—	204	—	256	285	—
41	H-111	210	—	272	—	210	—	272	—	202	—	255	285	365
42	H-112	207	—	278	368	207	—	270	—	203	—	256	286	—
43	H-12	205	230	—	—	205	232	—	—	203	—	243	283	—
44	H-21	205	230	280	—	205	—	—	—	202	—	251	283	—
45	H-22	205	220	—	—	205	220	—	—	200	—	247	—	—
46	R	215	—	279	~370	217	—	279	—	202	—	241	285	—
47	R-1	215	—	276	—	217	—	278	—	202	—	242	285	—
48	R-21	215	—	278	—	217	—	278	—	202	—	242	287	—
49	R-22	211	—	277	—	216	—	275	—	202	—	245	286	359

## 5.26 Diskusija rezultata — Discussion of results

Općenito se može kazati, da ispitivani tanini pokazuju jaku apsorpciju kod 205—215  $\mu$ . Vrh maksimuma apsorpcije uglavnom je širok. Oštrij vrh pokazuju rujev taninski ekstrakt i njegove frakcije te K-111 i H-111. U nizu: K-111, K-112, K-12 i K-22 maksimumi apsorpcije su sve neizrazitiji, a vrhovi širi. Analogno se primjećuje i kod hrastova ekstrakta i njegovih frakcija. Kod rujeva ekstrakta samo frakcija R-22 ima nešto neoštiji vrh, dok su ostali oštri. Moglo bi se kazati, da je oblik apsorpcijskog spektrograma kestenova ekstrakta rezultanta spektrograma frakcija.

Kod ispitivanih ekstrakata i njihovih frakcija nađena su 4 apsorpcijska maksimuma.

Prvi apsorpcijski maksimum kestenova ekstrakta nalazi se kod 213—215  $m\mu$ . Iznimku čini K-22, ali on ima dvojni maksimum, veći (206  $m\mu$ ) i manji (226  $m\mu$ ), koji bi rezultirali kao i ostali. Taj apsorpcijski maksimum kod hrastova ekstrakta je kod 205—210  $m\mu$ . Kod H, H-12, H-21 i H-22 primjećuje se i jedan stopljeni maksimum kod 230  $m\mu$ . Apсорpcijski maksimum kod rujeva ekstrakta je kod 215  $m\mu$  izuzev R-22 gdje je 211  $m\mu$ .

Drugi apсорpcijski maksimum naslućuje se, a spomenut je uz prvi kod K-22, H, H-12, H-21 i H-22. Taj je maksimum stopljen s prvim, a nalazi se između 220—230  $m\mu$ .

Treći maksimum nalazi se kod svih ispitivanih taninskih ekstrakata između 270—280  $m\mu$ , izuzev K-112, gdje je 263  $m\mu$ . Taj se maksimum slabo zapaža kod slijedećih frakcija: H, H-12, H-21, H-22, K, K-12, K-21, K-22. Potpuno je izrazit i jak kod: R, R-1, R-22, H-111, H-112, K-111, K-112,

Četvrti maksimum je nađen mjerenjem u VIS području i kod većih koncentracija otopine. Lokacija mu je između 360—370  $m\mu$ .

Dodatkom HCl — tako da je ispitivani uzorak sadržavao  $5 \cdot 10^{-4}$  M HCl — primijećeno je da je oblik krivulje ostao praktički isti.

Kod svih ispitivanih tvari (osim kod K-22, R-1, a naročito R-22 gdje je efekt obrnut) došlo je do smanjenja apsorpcije.

Maksimumi se podudaraju s onima bez dodatka HCl time, da su ili ostali isti ili je došlo do malog batokromnog pomaka (izuzev R-22 i H-112) koji iznosi 1—3  $m\mu$ , a u jednom slučaju i 5  $m\mu$  (R-22).

Dodatkom KOH, tako da je uzorak sadržavao  $5 \cdot 10^{-4}$  M KOH, primijećene su znatne promjene.

Znatno je izmijenjen oblik spektrograma: prvi maksimum je postao oštar i izrazit, drugi je nestao, treći je pomaknut, a između trećega i četvrtog maksimuma predmnijeva se novi maksimum kod 283—288  $m\mu$ .

Prvi maksimum apsorpcije se znatno povećao, a apsorpcija se u cijelom području povećala tek nešto bez naročito izrazitog maksimuma.

Općenito utjecaj KOH je znatno jači od utjecaja HCl.

Naročito se ističe jak hipsokromni pomak kod svih ispitivanih tvari.

Taj je pomak za prvi maksimum kod kestenova ekstrakta i frakcija 11—13  $m\mu$ , kod hrastovog ekstrakta i frakcije 3—8  $m\mu$ , a kod rujeva ekstrakta i frakcije 13  $m\mu$  (osim R-22: 9  $m\mu$ ). Drugi maksimum je nestao.

Treći maksimum ima hipsokromni pomak kod kestenova ekstrakta i frakcije 25—37 m $\mu$  (osim K-112: 8 m $\mu$ ), kod hrastova ekstrakta i frakcije 17—29 m $\mu$ , a kod rujeva ekstrakta i frakcije 32—38 m $\mu$ .

Novi maksimum leži između 283—288 m $\mu$ .

Četvrti maksimum ima hipsokromni pomak 25—33 m $\mu$  za kestenove ekstrakte, dok su za ostale manjkavi podaci.

Uspoređujući apsorpcijske krivulje standarda sa spektrogramima ispitivanih tanina i frakcija po obliku, skoro svi spektrogrami imaju sličnosti s taninskim spektrogramima.

Naročite sličnosti su između spektrograma galne kiseline i spektrograma ruja i njegovih frakcija, kako po obliku, tako i po identičnosti položaja maksimuma.

Spektrogram elag kiseline pokazuje izvjesnu sličnost u kraćim valnim dužinama s H-111, K-111.

Spektrogrami 3,6 digalolil glukoze i pentagalolil glukoze — zadnje naročito zbog veće apsorpcije prvog maksimuma u KOH — pokazuju sličnosti sa frakcijama K-111, K-112, H-111, H-112, a naročito s R, R-1 i R-21.

Spektrogrami hebulagne i hebulinske kiseline naročito su interesantni zbog širokoga, zapravo dvojnoga prvog maksimuma, koji podsjećaju na maksimum frakcija K-12, K-21, K-22, H-12, H-21 i H-22, a koji možda sudjeluju u oblikovanju širokog maksimuma kod K- i H-ekstrakta.

Fisetin i d-katehin ne pokazuju bitne promjene u promjeni položaja maksimuma dodatkom kiseline ili lužine slično kao i resorcin i pirogalol. Pojedini maksimumi se pojavljuju i na mjestima apsorpcije u taninskim frakcijama, ali cijele krivulje teško je uspoređivati.

Prema literaturnim podacima (127) kromofori u obliku fenolnih jezgri pokazuju apsorpciju kod 280 m $\mu$ , ali ne samo kod mimoza tanina i quebracha (83) već i kod elag kiseline (138) i katehina (127). To isto nađeno je i u našim ispitivanjima kod nekih standardnih tvari (hebulagna i hebulinska kiselina), supstituirane glukoze, d-katehina, elag kiseline i skoro svih taninskih tvari. U nekim je slučajima maksimum stopljen, ali se naslućuje.

Maksimum kod 277 m $\mu$  za tanin iz galnih jabučica i 275 m $\mu$  za tanin iz hrastove kore, koji je našao *Kishimoto* (87), podudara se s našim podacima, a isto tako se podudara maksimum K- frakcija 263—275 m $\mu$  sa onim nađenim u taninu kore kestena (*C. crenata* — tj. 265—274 m $\mu$  (86).

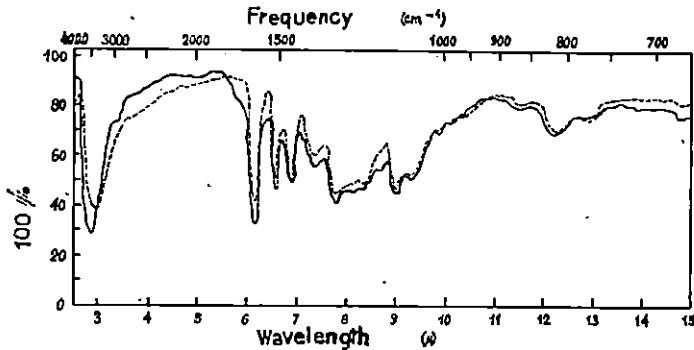
*Sohn* (152, 153) navodi da hidrolizirajući tanini, za razliku od pirogalolnih, nemaju maksimuma kod 280 — što potvrđuje i *Blažej* (12), *Putnam* (125) i *Buchanan* (19). Međutim, mi smo taj maksimum našli više ili manje izražen kod svih ispitivanih tanina što se slaže za kestenov ekstrakt s ispitivanjem *Mladeka* (168). Uzrok je, vjerojatno, što je ispitivani ekstrakt dobiven iz drva i kore zajedno (komercijalan). Koncentracija također igra veliku ulogu, a treba naglasiti da se maksimum naročito ističe kod nekih frakcija, dok se kod drugih jedva zamjećuje. Maksimum kod 290 m $\mu$  kestenova ekstrakta našli su *Lasserre* s koautorima (90), a s njihovim se podacima slažu u biti i podaci za galnu kiselinu.

Općenito se može smatrati, da je postignuta dosta dobra podudarnost s literaturnim podacima.

### 5.3 Mjerenje IR-spektara tanina — Measurement of IR spectra of tannins

O IR-apsorpcijskim spektrima tanina u prvom *Hershensonovom* indeksu (63) nema podataka, dok se u drugom indeksu (64) nalazi registriran jedan rad. U tom se radu (41) uspoređuje IR-spektre od gambira, produkata autooksidacije (+) katehina i »tanina«, dobivenoga HCl kondenzacijom (+) katehina.

Autori su uzorke tanina (0,6 mg) miješali s KBr (250 mg) i pripremili pastilu. Mjerenja su obavljena na *Perkin-Elmer* Infracord IR-spektrofotometru. Slika 50 prikazuje dobivene IR-apsorpcijske spektre.



SLIKA BR.50 IR-SPEKTROGRAMI AUTOOKSIDACIONIH PRODUKATA

(—) KATEHINA (—) »TANINA« DOBIVENOG HCl KONDENZACIJOM

(---) KATEHINA (---) (BIOCHEM. J. (1960) 76, 25

Za ispitivane tanine, tj. za hrast, kesten ili ruj nađen je samo podatak za kestenov tanin. Autor (115) je ispitivao kestenove taninske frakcije i elag kiselinu u nujolu te iznosi, da su sve kestenove frakcije pokazale jaku keto-apsorpciju.

Ispitujući IR-spektar za pročišćeni kestenov (*C. crenata*) taninski ekstrakt, *Okamura* (101) je našao također jaku keto-apsorpciju.

U nizu radova na kondenziranim taninima *Roux* i koautori su ispitivali i njihove IR-spektre. Pregled valnih dužina apsorpcijskih maksimuma pojedinih funkcionalnih grupa dan je u tabeli 18. Mjerenja su obavljena metodom KBr-pastila.

Jednu studiju IR-spektara tanina dao je *Putnam*'s koautorima (118). Ispitani su IR-spektri slijedećih tvari:

tanini i katehini	(9 spektrograma)
acetilirani derivati	(8 spektrograma)
deacetilirani tanini	(3 spektrograma)
metilirani tanini	(3 spektrograma).

Mjerenja su obavljena s *Perkin-Elmer* Model 21 s NaCl prizmom u području 2,5—15 $\mu$ .

Preparati su pripremljeni u nujolu i autori navode, da zbog toga nisu mogla biti analizirana područja:

3,35—3,65  $\mu$ ; 6,75—7,60  $\mu$  i 7,20—7,33  $\mu$ .

Kod preparata, pripremljenih u kloroformu nisu mogla biti analizirana područja 8,10—8,45  $\mu$  i 12,70—15,0  $\mu$ .

Grupa	Valni broj (cm <sup>-1</sup> )	Ispitivana tvar (literatura)
1. —O—Me	1038	(Iz quebracha) 2-benzil-4'-metoksi-2,6,3'-trihidroksikumarin-3-on (131)
2. —C—H	2940	4'7-dihidroksiflavan-3,4-diol (136)
3. =C=O (arom.)	a) 1270 b) 1280	kao 1 (-)butin (iz mimoze), tj. (-)-7,3',4'-trihidroksiflavanon (132)
4. arilalkil eter	a) 1120 b) 1125 c) 1120 d) 1120	kao 1 kao 2 kao 1 kao 3b
5. —C=C— (arom.)	a) 1615, 1590, 1508 b) 1630, 1525, 1470 c) 1600 (stopljeno) d) 1600, 1530, 1465	kao 1 kao 2 (iz akacije) robtin (7,3',4',5'-tetrahidroksiflavanon) (135) kao 3b
6. =C=O	a) 1680—1660 b) 1690 c) 1640 d) 1640—1725 e) 1650 f) 1655 i 1345 g) 1650 h) 1655	o-quinoni (41) kao 1 (ne helatizirani aril keton) kao 5c (128) butin (7,3',4'-trihidroksiflavanon) (132) trimetilbutin (133) kao 3b butin (135)
7. —OH (fenol.)	1170	kao 2
8. —OH (sek.)	a) 1015 b) 1030 c) 1000—1100 d) 1000—1100	fustin (3,3',4',7-tetrahidroksiflavan-4-on) (132) kao 2 kao 5c kao 2
9. —OH	a) 3345—3335 b) 3250 c) 3340 d) 3500 e) 3475 f) 3450	+ katehin kondenzirani kao 6a kao 1 kao 2 7,3',4'-trihidroksiflavan-3,4 diol (pentaacetat) (134) 7,3',4'-trimetoksiflavan-4-ol (133) kao 3b

Od tanina i katehina su ispitivane slijedeće pojedine tvari: pročišćeni quebracho ekstrakt, quebracho ekstrakt A, pročišćeni mimoza ekstrakt, pročišćeni gambir ekstrakt, pročišćeni mangrove ekstrakti: A, B i A-181, nekristalizirani quebracho-katehin i kristalinični d-katehin. Sva ispitivanja prve grupe obavljena su u nujolu.

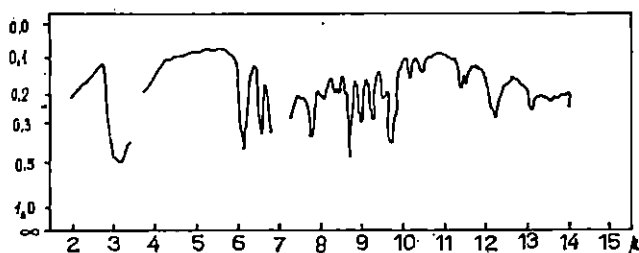
Apsorpcijsko područje, zajedničko za sve ispitivane flobatanine, sumirano je u tabeli 19.



3,00—3,70 $\mu$	(3270—3330 $\text{cm}^{-1}$ )	udružene OH grupe
3,30—3,40 $\mu$	(2930—3030 $\text{cm}^{-1}$ )	$\begin{array}{c}   \\ -\text{C}-\text{H} \\   \end{array}$
5,70—5,82 $\mu$	(1725—1760 $\text{cm}^{-1}$ )	= C = O
6,20—6,26 $\mu$	(1590—1610 $\text{cm}^{-1}$ )	fenil prsten
6,60—6,75 $\mu$	(1480—1515 $\text{cm}^{-1}$ )	
8,40 $\mu$	(1190 $\text{cm}^{-1}$ )	vjerojatno $\begin{array}{c}   \\ -\text{C}-\text{O}- \\   \end{array}$
10,20 $\mu$	(980 $\text{cm}^{-1}$ )	$-\text{R}-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}$

Usprkos sličnosti krivulje se međusobno razlikuju. Razlike na području 10—15  $\mu$  mogu potjecati od različitih skeletnih oblika.

Najinteresantnija je svakako apsorpcijska krivulja d-katehina, koja je u predanoj literaturi ujedno jedina zanimljiva u vezi s našim ispitivanjima (sl. 51).



SLIKA BR.51 IR-SPEKTROGRAM D-KATEHINA U NUJOLU  
(J.A.L.C.A. 1954.427)

## 5.4 Eksperimentalni dio — Experimental

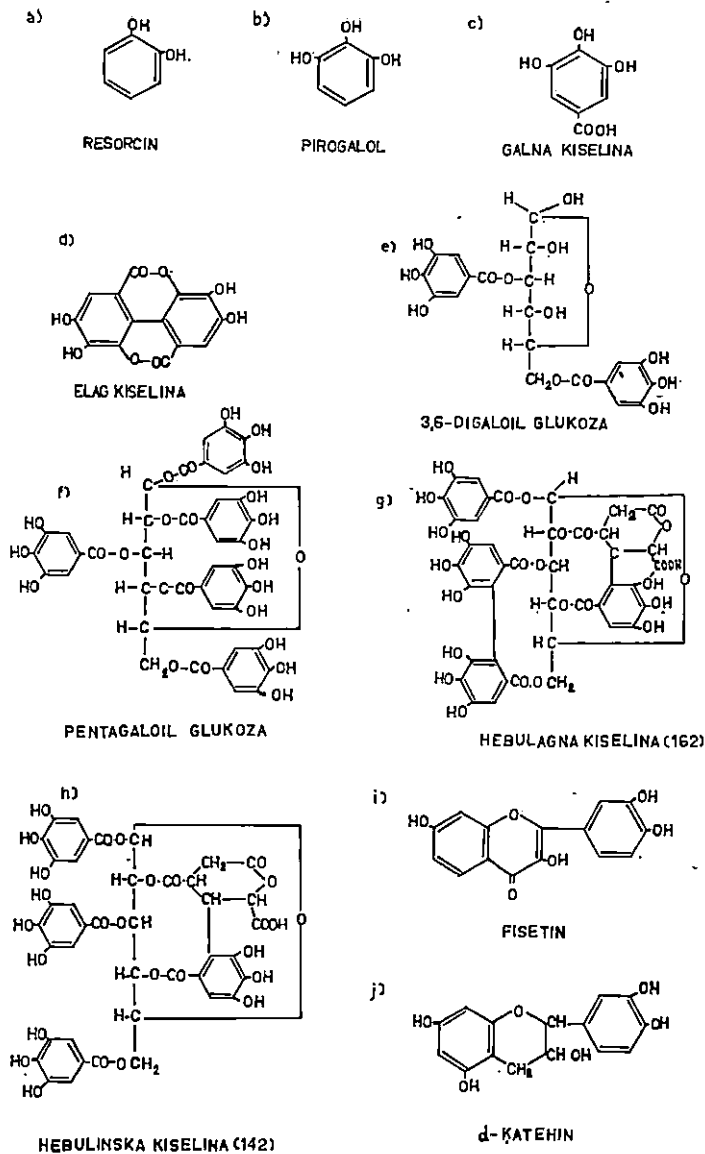
### 5.41 Uvod — Introduction

Uzorci standarda i tanina (1—2 mg) su dobro izmiješani s cca 250 mg kalijeve bromida te su učinjene pastile. Mjerenja su obavljena *Perkin-Elmer* Infracord spektrofotometrom.

Ispitivane tvari mogu se podijeliti u 4 grupe:

#### 1. Standardne tvari

- resorcin ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ ) — »Merck«
- pirogolol ( $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_3$ ) — O. Th. Schmidt (Heidelberg)
- galna kiselina ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ) — O. Th. Schmidt (Heidelberg)
- elag kiselina ( $\text{C}_{14}\text{H}_6\text{O}_8$ ) — O. Th. Schmidt (Heidelberg)
- 3,6-digalailglukoza ( $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{O}_{13}$ ) — O. Th. Schmidt (Heidelberg)
- pentagalailglukoza ( $\text{C}_{41}\text{H}_{32}\text{O}_{25}$ ) — O. Th. Schmidt (Heidelberg)
- hebulagna kiselina ( $\text{C}_{41}\text{H}_{30}\text{O}_{27}$ ) — O. Th. Schmidt (Heidelberg)
- hebulinska kiselina ( $\text{C}_{41}\text{H}_{32}\text{O}_{27}$ ) — O. Th. Schmidt (Heidelberg)
- fisetin ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ ) — »Fluka« AG — purum
- d-katehin ( $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ ) — »Fluka« AG — puriss.



2. Kestenov taninski ekstrakt i njegove frakcije

a) K, b) K-111, c) K-112, d) K-12, e) K-21, f) K-22.

3. Hrastov taninski ekstrakt i njegove frakcije

a) H, b) H-111, c) H-112, d) H-12, e) H-21, f) H-22.

4. Rujev taninski ekstrakt i njegove frakcije

a) R, b) R-1, c) R-21, d) R-22.

### 5.42 IR-spektri standardnih supstancā — IR spectra of standard substances

Određene atomske grupacije, zavisno o strukturi molekule, daju karakteristične apsorpcijske vrpce.

Strukturne formule standardnih tvari prikazane su na str. 67.

Slike od 52—61 prikazuju IR-apsorpcijske spektrograme 1 grupe, tj. standardnih tvari.

Jedini apsorpcijski spektar koji se može usporediti prema dostupnoj literaturi je spektar d-katehina. Usporede li se spektrogrami (sl. 51 i 61) vidi se identičnost, iako postoji razlika u pomaku od cca 0,3  $\mu$ . Treba naglasiti da je d-katehin jednom mjereno u nujolu, a drugi puta u KBr-u.

### 5.43 IR-spektri kestenova taninskog ekstrakta i frakcija IR spectra of Chestnut tannin extract and fractions

Drugu grupu IR-apsorpcijskih spektrograma prikazuju slike 62—67. To su spektrogrami kestenova taninskog ekstrakta i njegovih frakcija.

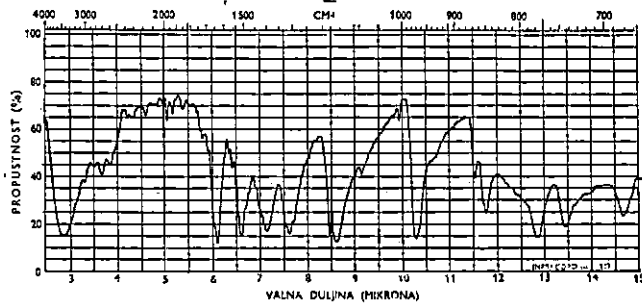
Uspoređujući apsorpcijske spektrograme kestenova taninskog ekstrakta i njegovih frakcija, mogu se kod svih uočiti slijedeći apsorpcijski maksimumi, svrstani u tabeli 20.

Tab. 20

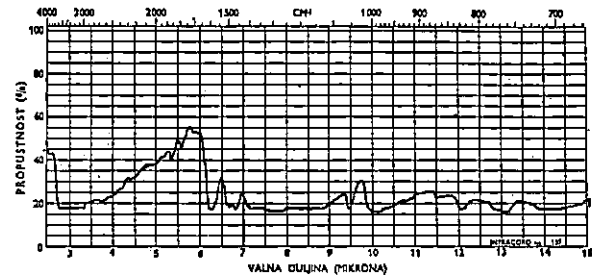
max (cm <sup>-1</sup> )	K	K-111	K-112	K-12	K-21	K-22
1. 3500—3600	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2. ~3025	—	?	?	+(-)	+(-)	+(-)
3. 2320	+	+	+	+	++	++
4. 1740	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5. 1625	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6. 1550	—	++	—	—	—	—
7. 1450	++	++	++	+	+	+
8. 1325	+	++	++	—	—	+
9. 1190—1210	++	++	++	—	—	+
10. 1100	?	+	+	—	—	—
11. 1035	++	+++	+++	—	—	+
12. 860—870	+	++	+	+	—	—
13. 775—780	+	++	+	+	+	+
14. 740—750	+	++	—	—	—	—

Oznake u tabeli:

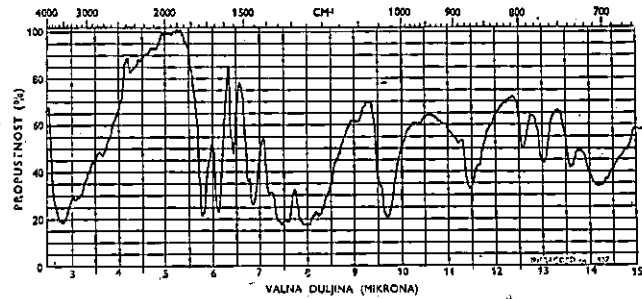
- +++ jak apsorpcijski maksimum
- ++ apsorpcijski maksimum
- + slab apsorpcijski maksimum
- bez apsorpcijskog maksimuma



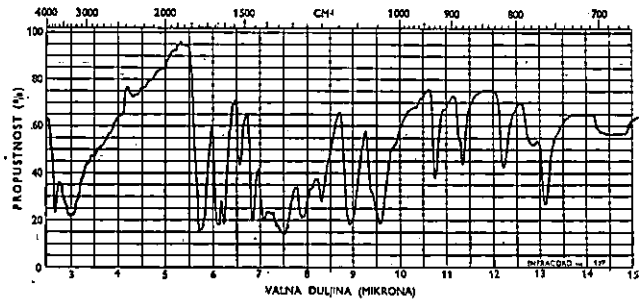
SLIKA B2 IR-SPEKTROGRAM PESORCINA



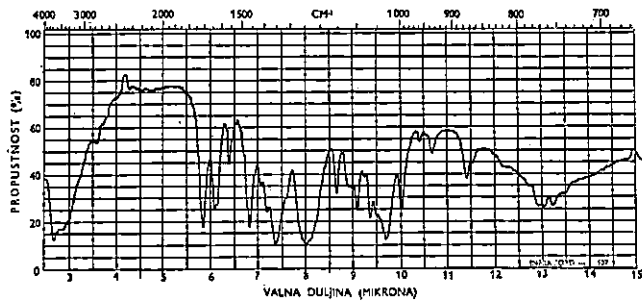
SLIKA B3 IR-SPEKTROGRAM PESORCINA



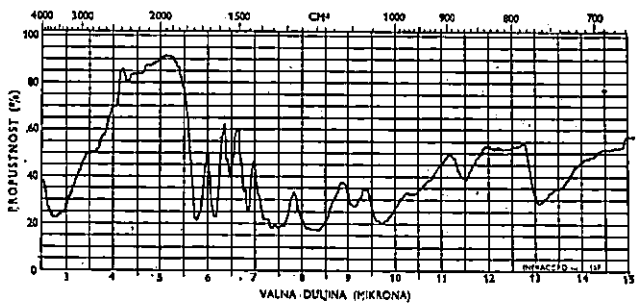
SLIKA B4 IR-SPEKTROGRAM GALNE KISELINE



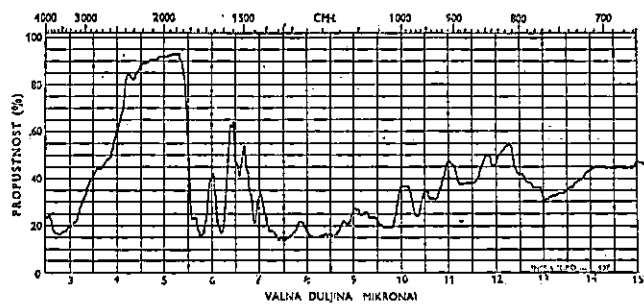
SLIKA B5 IR-SPEKTROGRAM GALNE KISELINE



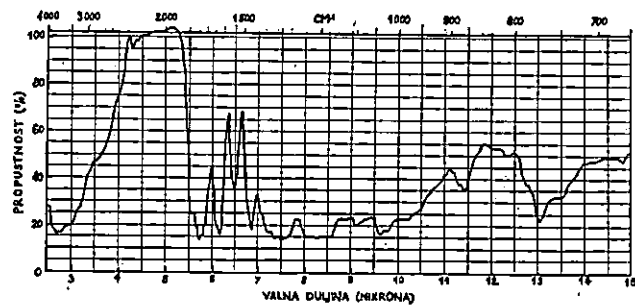
SLIKA B6 IR-SPEKTROGRAM D-GALDOLIL GLUKOZE



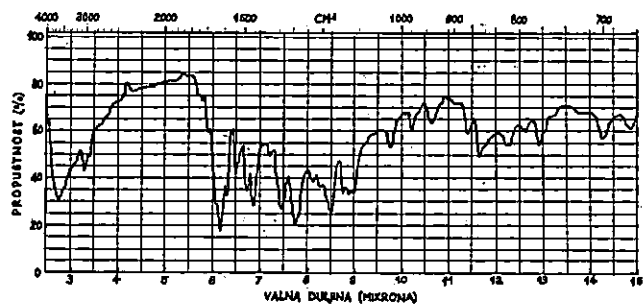
SLIKA B7 IR-SPEKTROGRAM D-GALDOLIL GLUKOZE



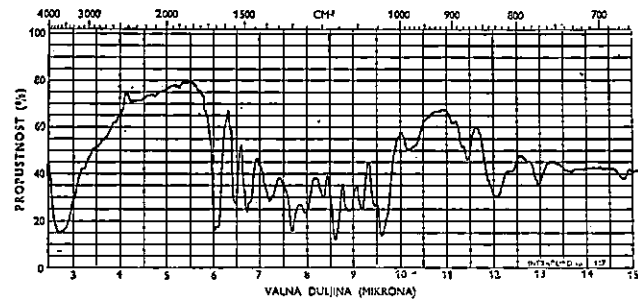
SLIKA 55 IR-SPEKTROGRAM METILACETNE KISELINE



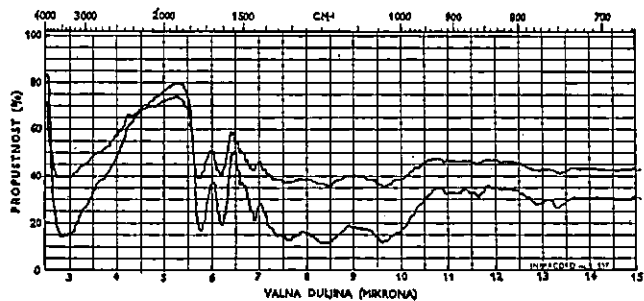
SLIKA 59 IR-SPEKTROGRAM METILACETNE KISELINE



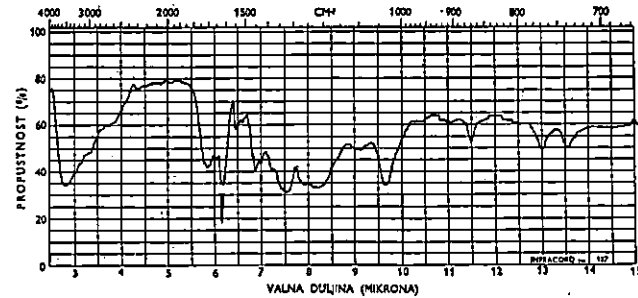
SLIKA 60 IR-SPEKTROGRAM ACETONA



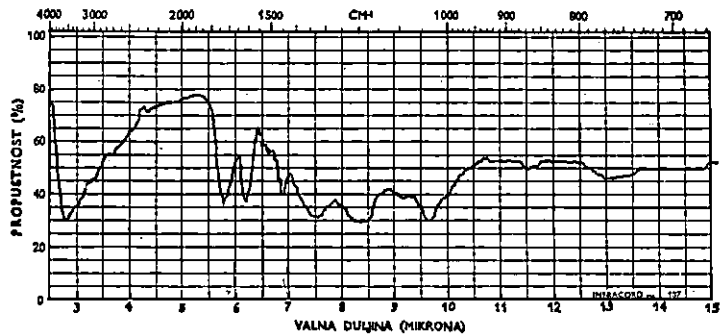
SLIKA 61 IR-SPEKTROGRAM ACETONA



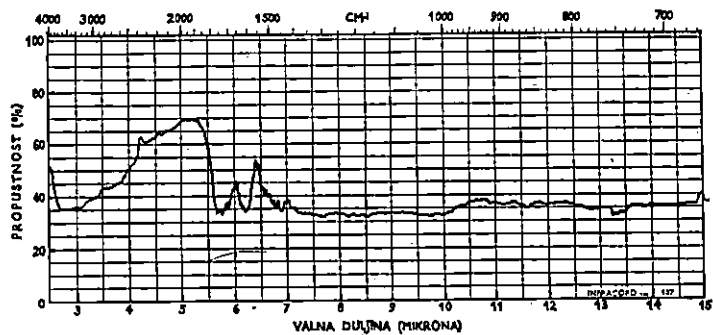
SLIKA 62 IR-SPEKTROGRAM ACETONOVOG TAVNIŠKOG EKSTRAKTA-K



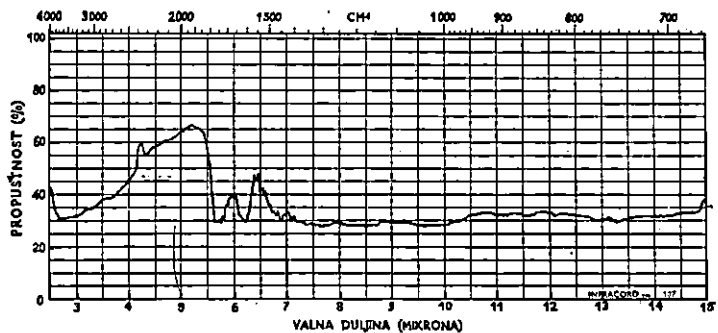
SLIKA 63 IR-SPEKTROGRAM ACETONOVOG TAVNIŠKOG EKSTRAKTA FRAKCIJA K-111



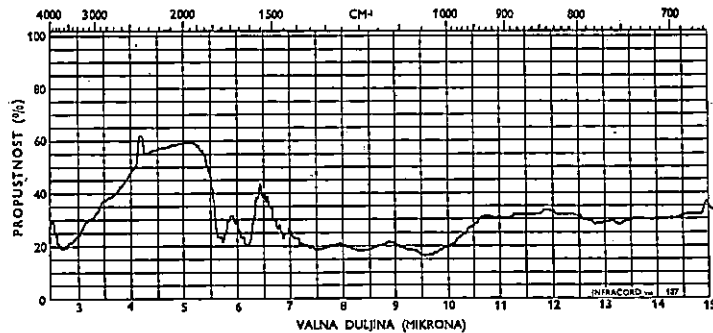
SLIKA 64 IR-SPEKTROGRAM KESTENOVOG TANINISKOG EKSTRAKTA FRAKCIJA K-11E



SLIKA 65 IR-SPEKTROGRAM KESTENOVOG TANINISKOG EKSTRAKTA FRAKCIJA K-12



SLIKA 66 IR-SPEKTROGRAM KESTENOVOG TANINISKOG EKSTRAKTA FRAKCIJA K-21



SLIKA 67 IR-SPEKTROGRAM KESTENOVOG TANINISKOG EKSTRAKTA FRAKCIJA K-22

5.44 IR-spektri hrastova taninskog ekstrakta i frakcija  
*IR spectra of Oak tannin extract and fractions*

Treća grupa IR-apsorpcijskih spektrograma dana je na slikama 68—73, koje prikazuju spektrograme hrastova taninskog ekstrakta i njegovih frakcija.

Apsorpcijski maksimumi dani su pregledno u tabeli 21, a uz iste oznake kao i kod kestenova ekstrakta i njegovih frakcija.

Tab. 21

max (cm <sup>-1</sup> )	H	H-111	H-112	H-12	H-21	H-22
1. 3500—3600	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2. 3050	+	+	+	+	+	+
3. 2320	?	+	+	+	—	+
4. 1720—1750	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5. 1620	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6. 1525	++	+	++	++	+	—
7. 1450	++	++	++	++	++	+
8. 1325	+	++	+++	+++	+	++
9. 1190—1210	+	+	++	++	+	++
10. 1110	+	—	—	?	—	—
11. 1030—1040	+	+	+++	+++	+	++
12. 880	+	—	—	—	—	—
13. 770	+	?	+	+	+	?
14. 750	?	?	+	+	+	?

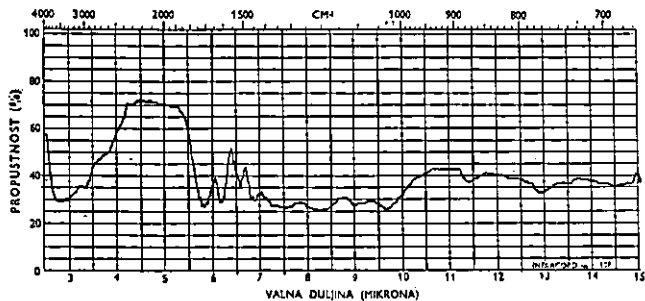
5.45 IR-spektri rujeva taninskog ekstrakta i frakcija  
*IR spectra of Sumach tannin extract and fractions*

Četvrtu grupu IR-apsorpcijskih spektrograma čine slike 74—77, koje prikazuju spektrograme rujeva taninskog ekstrakta i njegovih krivulja.

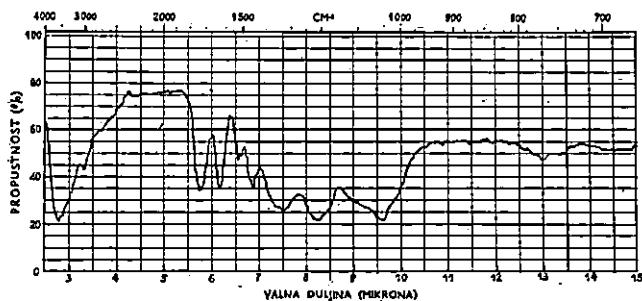
Apsorpcijski maksimumi dani su u tabeli 22 (oznake kao i kod kestenova i hrastova tanina).

Tab. 22

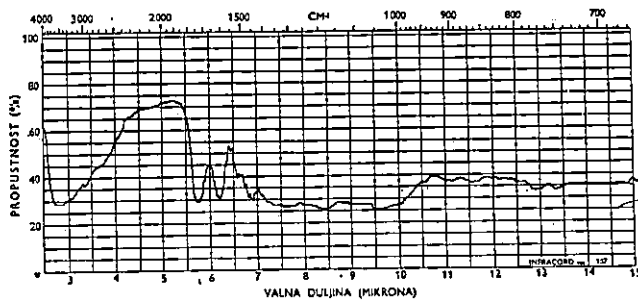
max (cm <sup>-1</sup> )	R	R-1	R-21	R-22
1. 3600	+++	+++	+++	+++
2. 3050	?	+	?	?
3. 2350	+	+	+	+
4. 1720—50	++	+++	++	+
5. 1625	+	+++	++	?
6. 1540—1560	+	++	+	+
7. 1450	+	++	+	+
8. 1330	+	+++	+	?
9. 1200	+	+++	+	?
10. 1100	?	+	?	?
11. 1030	+	+++	+	?
12. 875	+	++	+	?
13. 770	+	++	+	+



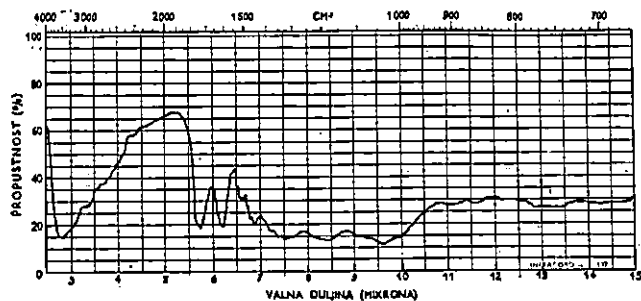
SLIKA 68 IR-SPEKTROGRAM HRASTOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA



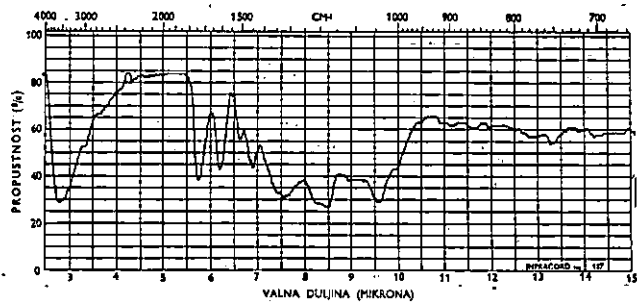
SLIKA 70 IR-SPEKTROGRAM HRASTOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA FRAKCIJA H-112



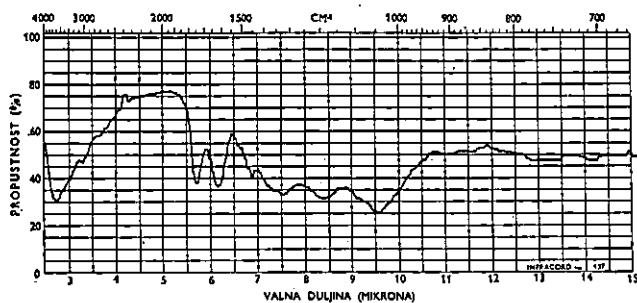
SLIKA 72 IR-SPEKTROGRAM HRASTOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA FRAKCIJA H-21



SLIKA 69 IR-SPEKTROGRAM HRASTOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA FRAKCIJA H-111

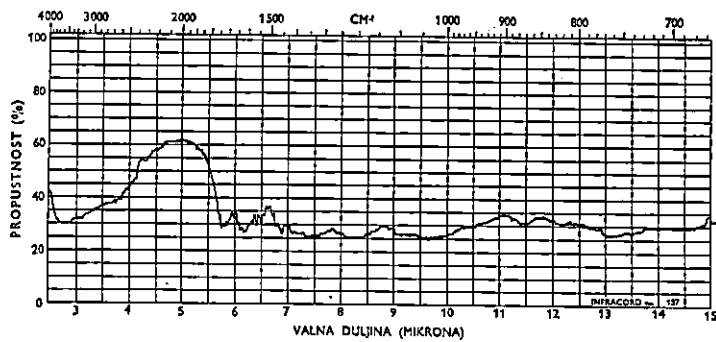


SLIKA 71 IR-SPEKTROGRAM HRASTOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA FRAKCIJA H-12

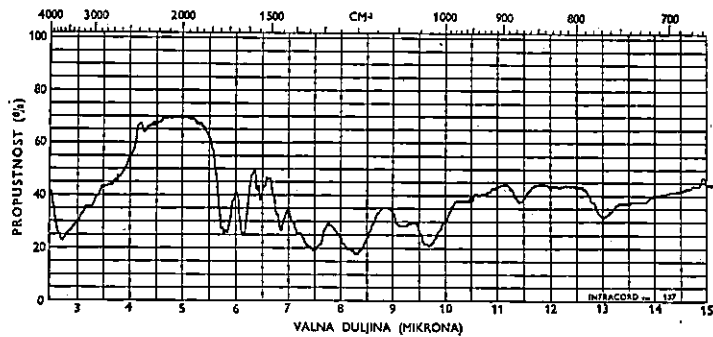


SLIKA 73 IR-SPEKTROGRAM HRASTOVOG TANINSKOG EKSTRAKTA FRAKCIJA H-22

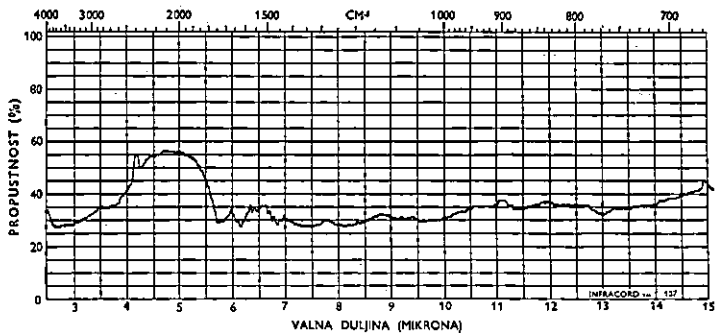




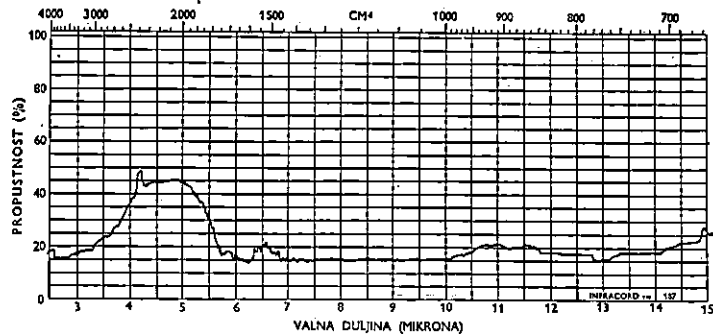
SLIKA 74 IR-SPEKTROGRAM RUJEVOG TANINSKOG EKSTRAKTA



SLIKA 75 IR-SPEKTROGRAM RUJEVOG TANINSKOG EKSTRAKTA FRAKCIJA R-1



SLIKA 76 IR-SPEKTROGRAM RUJEVOG TANINSKOG EKSTRAKTA FRAKCIJA R-21



SLIKA 77 IR-SPEKTROGRAM RUJEVOG TANINSKOG EKSTRAKTA FRAKCIJA R-22

Iz spektrograma i tabela je vidljivo, da su apsorpcijski maksimumi kod sva tri tanina i njihovih frakcija skoro identični. Variranja mogu donekle zavisiti i o pripremi pastile.

U sve tri vrste tanina i njihovim frakcijama nađeno je četrnaest izrazitijih analognih apsorpcijskih maksimuma. Ti maksimumi variraju od frakcije do frakcije pojedinih tanina, u nekima su izrazitiji, a u nekima nestaju, ali su ipak nađeni u svim ispitivanim taninskim ekstraktima i njihovim frakcijama.

Općenito se opaža, da intenzitet i definiranost maksimuma apsorpcije pada od većih valnih brojeva prema manjima.

Isto tako, općenito, frakcije, topljive u acetonu, (npr. K-111) pokazuju izrazitije apsorpcijske maksimume nego frakcije netopljive u acetonu (npr. K-22).

U detaljima razlike također nisu velike. S obzirom na maksimume apsorpcije uočuje se slijedeća razlika:

maksimum apsorpcije kod  $1550\text{ cm}^{-1}$  je kod K-111, zapravo dvostruki (veći 1550, manji 1530), dok se kod drugih frakcija kestenova tanina primjećuje slabo ili nikako.

Isti taj maksimum kod H i H-frakcija je kod  $1525\text{ cm}^{-1}$ , s time da mu izrazitost pada ovim redom:

H, H-111, H-12, H-112, H-21, dok ga frakcija H-22 nema. Kod rujeva tanina je taj maksimum apsorpcije kod  $1540$  i  $1560\text{ cm}^{-1}$ . On je u frakciji R-1 najbolje izražen, ali tako da je maksimum zapravo kod  $1550\text{ cm}^{-1}$ , a dva neznatna, stopljena maksimuma postoje na  $1540$  i  $1560\text{ cm}^{-1}$ .

Usporedbom spektrograma istoimenih frakcija (npr. H-12 s K-12 i R-12 ili H-22 s K-22 i R-22) opaža se slijedeće:

Frakcije H-12 i K-12 se znatno razlikuju time, što je spektrogram frakcije K-12 od  $1400\text{--}700\text{ cm}^{-1}$  bez izrazitog apsorpcijskog maksimuma.

Frakcija R-22 u usporedbi s H-22 i K-22 ima znatno slabije izražene apsorpcijske maksimume.

Ostale frakcije se međusobno vrlo malo razlikuju.

Usporedbom spektrograma standarda sa spektrogramima taninskih ekstraktata i njihovih frakcija moguća su slijedeća uspoređivanja:

1. Spektrogram resorcina (Sl. 52) nema bitne sličnosti s taninskim spektrogramima.
2. Za spektrogram pirogalola (Sl. 53) vrijedi isto kao i za resorcin.
3. Spektrogram galne kiseline (Sl. 54) donekle je sličan spektrogramima: K, K-112, H i H-112, a u cijelosti je vrlo sličan spektrogramima: K-111 i R-1 (kao rujevoj frakciji s najizrazitijim apsorpcijskim maksimumima).
4. Spektrogram elag kiseline (Sl. 55) sličan je samo na valnom području od cca  $3500\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$  spektrogramima: K, K-111, K-112, H, H-111, H-112, H-12, H-21 i R-1.
5. Spektrogram 3,6-digaloilglukoze (Sl. 56) sličan je spektrogramima K-111, H-112 i R-1.

6. Spektrogram pentagaloilglukoze (Sl. 57) vrlo je sličan spektrogramima: K, H, H-111, H-112, H-12, H-21 i H-22 (s time da sličnost pada u nizu od H do H-22), a gotovo je identičan spektrogramima: K-111, K-112.
7. Spektrogram hebulagne kiseline (Sl. 58) vrlo je sličan u valnom području  $4000-1100\text{ cm}^{-1}$  sa spektrogramima K, K-111, K-112, K-22, H i svim H-frakcijama, a frakciji R-1 sličan je u cijelom valnom području.
8. Spektrogram hebulinske kiseline (Sl. 59) sličan je u valnom području  $4000-1000\text{ cm}^{-1}$  spektrogramima: K, H-12, H-21, a na cijelom području gotovo analogan sa spektrogramima K-111, K-112, H, H-111, H-112, a s R-1, može se kazati, da je identičan.
9. Spektrogram fisetina (Sl. 60) nema sličnosti sa spektrogramima ispitivanih tanina i njihovih frakcija osim donekle kod većih valnih brojeva.
10. Za spektrogram d-katehina (Sl. 61) vrijedi isto kao i za fisetin.

S obzirom na valne brojeve pojedinih apsorpcijskih maksimuma, nađenih IR-spektrografskom analizom pojedinih taninskih ekstrakata i njihovih frakcija, može se pretpostaviti da su uzrokovani atomskim grupacijama koje su navedene u tabeli 23.

Tab. 23

1. max $3500-3600\text{ cm}^{-1}$	jaka apsorpcija	—OH
2. max $3050\text{ cm}^{-1}$	slaba apsorpcija	—C—H aromatski
3. max $2320-2350\text{ cm}^{-1}$	slaba apsorpcija	?
4. max $1720-1750\text{ cm}^{-1}$	jaka apsorpcija	=C=O karboksil (aldehid, ketoni)
5. max $1620-1625\text{ cm}^{-1}$	jaka apsorpcija	=C=O (ili aromatski —C=C—)
6. max $1525-1560\text{ cm}^{-1}$	jaka apsorpcija	
7. max $1450\text{ cm}^{-1}$	jaka apsorpcija	—C=C— (aromatski)
8. max $1325-1330\text{ cm}^{-1}$	jaka apsorpcija	—OH ili —C=C— (aromatski)
9. max $1190-1210\text{ cm}^{-1}$	jaka apsorpcija	≡ C — OH (fenolni)
10. max $1100-1110\text{ cm}^{-1}$	slaba apsorpcija	—C—O—C— ili —CHOH
11. max $1030-1040\text{ cm}^{-1}$	jaka apsorpcija	—OH (sekundarni) ili —CH <sub>2</sub> OH
12. max $860-880\text{ cm}^{-1}$	slaba apsorpcija	tri supstituirani benzenski prsten
13. max $770-780\text{ cm}^{-1}$	slaba apsorpcija	1, 2, 3 tri ili 1,3 disupsti- tuirani benzenski prsten
14. max $740-750\text{ cm}^{-1}$	slaba apsorpcija	mono ili 1,2 disupstitui- rani benzenski prsten

Da su apsorpcijski maksimumi vjerojatno uzrokovani navedenim grupama, zaključeno je prema tabeli 18, tabeli 19, standardnim tvarima te prema *Bellamy* (10) i *Flettu* (42).

## 6. Zaključna diskusija — *Conclusive discussion*

U tijeku ove radnje obavljena su istraživanja domaćih taninskih ekstrakata i to:

taninskog ekstrakta iz drva pitomog kestena (*C. vesca*)

taninskog ekstrakta iz drva hrasta (*Q. pedunculata*)

taninskog ekstrakta iz rujeva lišća (*R. cotinus*)

Ekstrakti su frakcionirani, zatim je obavljena semimikrotaninska analiza i određivanje pH te određivanje šećera. Konačno su ekstrakti i frakcije ispitani metodama dvosmjerne kromatografije, te UV- i IR-spektrofotometrijski.

Rezultati navedenih istraživanja su slijedeći:

1. Frakcioniranjem pomoću otapala kruti taninski ekstrakti rastavljeni su u frakcije. Kod kestenova i hrastova ekstrakta dobiveno je po pet frakcija, a kod rujeva tri frakcije.

2. Taninska analiza obavljena je semimikro filter metodom, i to originalnih ekstrakata kao i njihovih frakcija. Nije obavljena analiza onih frakcija, koje u taninskom ekstraktu sudjeluju s manje od 2%.

Frakcioniranjem kestenova ekstrakta dobila se jedna frakcija (K-111), koja ima bolje osobine od originalnog ekstrakta, ali te frakcije ima svega oko 4,6%. Frakcioniranjem hrastova ekstrakta dobilo se oko 40% frakcije H-22, koja ima dobre osobine i odlična štavna svojstva. Frakcioniranjem rujeva ekstrakta dobilo se oko 74% frakcije R-21, koja ima vrlo dobre analitičke osobine s odličnim svojstvima štavljenja.

Zaključujući prema osobinama svih triju ekstrakata, može se kazati da se aktivne taninske tvari u kestenovu ekstraktu donekle jednolično raspoređuju u frakcije. Kod hrastova ekstrakta može se dobiti kvalitetni ekstrakt kao netopljiva tvar u acetonu i metanolu. Kod rujeva ekstrakta otapanjem u acetonu izdvajaju se manje vrijedne tvari, a otapanjem u metanolu u otopinu prelazi kvalitetni tanin.

Spomenute osobine naših ekstrakata nisu prije ovih radova bile poznate u praksi i znanstvenom istraživanju.

3. Kao standardne tvari za sva daljnja istraživanja uzete su ove kemikalije: resorcin, pirogalol, galna kiselina, elag kiselina, 3,6-digaloil glukoza, pentagaloil glukoza, hebulinska kiselina, hebulagna kiselina, fisetin i d-katehin, koje su dobivene kao ispitani preparati.

Kod kromatografiranja standardnih tvari opaženo je, da su Rf vrijednosti u smjesi niže od Rf vrijednosti istih tvari, kromatografiranih pojedinačno.

4. Kromatogrami kestenova taninskog ekstrakta i njegovih frakcija pokazali su 23 komponente, razvijene s amonijakalnim srebrnim nitratom kao i 17 komponentata vidljivih pod UV-svjetlom.

Na temelju obavljenih pokusa nađeno je da kestenov ekstrakt i njegove frakcije sadrže: galnu kiselinu, 3,6-digaloil glukozu, pirogalol, resorcin, tragove hebulinske ili hebulagne kiseline te šećere. Karakteristično je da nije prisutna slobodna elag kiselina.

Frakcije netopljive u acetonu pokazuju velike količine mrlja, identifikacija kojih se nije mogla odrediti.

5. Kromatogrami hrastova taninskog ekstrakta i njegovih frakcija pokazali su 25 komponenata, koje reagiraju s amonijakalnim srebrnim nitratom i 15 komponenata vidljivih pod UV-svjetlom.

Na temelju obavljenih pokusa nađeno je, da hrastov taninski ekstrakt i njegove frakcije sadrže: galnu kiselinu, 3,6-digaloil glukozu, hebulagnu kiselinu, velike količine jednostavnih fenola, od kojih je determiniran resorcin i pirogalol, te šećere. Prisutnost slobodne elag kiseline nije se opazila.

U originalnom ekstraktu kao i u frakcijama netopljivim u acetonu i metanolu pokazalo se nagomilavanje, odnosno teško odvajanje nepoznatih tvari.

Frakcija H-22 (netopljiva u acetonu i metanolu) na osnovi taninske analize pokazala je, da ima najbolje štavne osobine. Kromatogram te frakcije pokazao je veoma slabu razdiobu. Iz navedenoga se može zaključiti da nijedna od determiniranih supstanca nije jače odgovorna za kvalitetu štavljenja i da to pripada nepoznatim tvarima spomenutog ekstrakta.

Dobro izražene mrlje jednostavnih fenola razjašnjavaju pojavu tamne boje toga ekstrakta duljim stajanjem na zraku.

6. Kromatogrami rujeva taninskog ekstrakta i njegovih frakcija pokazali su deset komponenata, koje reagiraju s amonijakalnim srebrnim nitratom i sedam komponenata vidljivih pod UV-svjetlom.

Na temelju obavljenih pokusa nađeno je, da rujev taninski ekstrakt i njegove frakcije sadrže: galnu kiselinu, 3,6-digaloil glukozu, pentagaloil glukozu, katehinski spoj i tragove nekih nepoznatih tvari.

Frakcija R-21 (netopljiva u acetonu, topljiva u metanolu), koja se na osnovi taninske analize pokazala kao najbolja, ukazuje na prisutnost digaloil- i pentagaloil-glukoze, a vjerojatno i penta-m-digaloil glukozu. Na temelju navedenoga slijedi, da su upravo te tvari odgovorne za kvalitetne osobine rujeva taninskog ekstrakta.

Za taj taninski ekstrakt karakteristično je da nema slobodnih fenola, čime se može razjasniti svijetla boja i stabilnost vodenih otopina spomenutog ekstrakta.

7. Kromatografskim ispitivanjem istražena je prisutnost slobodnih šećera. U našim taninskim ekstraktima nađeni su slijedeći šećeri:

a) U kestenovu ekstraktu: galaktoza, glukozu, arabinoza i ksiloza.

Najveća je količina arabinoze, koja sigurno dolazi u netaninskom dijelu, a nastala je razgradnjom pentozana tijekom ekstrakcije drva. Količina glukoze je nešto manja, a nastala je manjim dijelom uslijed hidrolize heksozana, a većim dijelom razgradnjom galoil-glukoza i ostalih nedeterminiranih glukozida.

b) U hrastovu ekstraktu: galaktoza, glukozu, nepoznati šećer, arabinoza i ksiloza. Najveća količina je arabinoze, koja je nastala hidro-

lizom pentozana hrastova drva u tijeku ekstrakcije. Količine glukoze, galaktoze i ksiloze su nešto manje. Ksiloza je nastala iz pentozana drva hidrolizom tijekom ekstrakcije. Količina pentozana, arabinoze i ksiloze je veća nego kod kestenova ekstrakta, što se slaže sa sadržajem pentozana u drvu, tj. da hrastovina sadrži više pentozana od kestenovine. Glukoza, pored hidrolize heksozana drva, nastala je i hidrolizom galoil glukoza. Zanimljiva je pojava galaktoze kao i nepoznatog šećera. Može se pretpostaviti da su oni nastali hidrolitičkom razgradnjom nepoznatih tvari, karakterističnih za hrastov ekstrakt.

c) U rujevu taninskom ekstraktu: galaktoza i glukoza. S obzirom na porijeklo toga ekstrakta, tj. iz lišća, može se razjasniti odsutnost arabinoze i ksiloze. Velika količina glukoze karakteristična je za taj ekstrakt, a izražava se u netaninskoj komponenti ekstrakta. Porijeklo joj se može tražiti u nestabilnoj i osjetljivoj galoil-glukoznoj molekuli. Prisutnost galaktoze ne može se razjasniti te se pretpostavlja da su na nju bile vezane nepoznate tvari spomenutog ekstrakta, nađene na kromatogramima.

Iz sadržaja šećera vidi se, da je na fermentativnu razgradnju najstabilniji kestenov ekstrakt, osjetljiviji hrastov, a najviše će se razgraditi rujev ekstrakt.

8. Izmjereni su UV-apsorpcijski spektri tanina kestena, hrasta, ruja u neutralnom (voda-metanol), kiselom (HCl) i lužnatom (KOH) mediju. Obavljena su neka ispitivanja i u vidljivom području spektra.

a) Prema obliku krivulja ispitivanih tanina i njihovih frakcija moglo bi se zaključiti, da je spektrogram pojedinih tanina rezultanta spektrograma njihovih frakcija.

b) Između spektrograma kestenova i hrastova tanina i njihovih frakcija postoji znatna sličnost, dok rujev taninski ekstrakt i njegove frakcije pokazuju, iako uz analogne maksimume, znatno izrazitiju apsorpciju.

c) Nađena su 4 maksimuma u svim ispitivanim taninskim tvarima (uz manje iznimke) i to:

	Kestenov ekstrakt i frakcije	Hrastov ekstrakt i frakcije	Rujev ekstrakt i frakcije
I. maksimum (m $\mu$ )	213—215	205—210	215
II. maksimum (m $\mu$ )		220—230	—
III. maksimum (m $\mu$ )		270—280	
IV. maksimum (m $\mu$ )		360—370	

d) Utjecajem HCl-a apsorpcijska krivulja se praktički ne mijenja. Apsorpcije su uglavnom nešto smanjene uz mali batokromni pomak (1—2 m $\mu$ ).

e) Utjecaj KOH je znatan: I. maksimum postaje oštiji, II. maksimum nestaje, a između III. i IV. nastaje novi maksimum (III.a). Do-

lazi do jačeg hipsokromnog pomaka kod svih ispitivanih tvari. Kod I. maksimuma taj je pomak 3—13 m $\mu$ . II. maksimum je nestao. Kod III. maksimuma pomak je 17—38 m $\mu$ . Novi maksimum (III.a) je između 283—288 m $\mu$ . IV. maksimum ima pomak 25—33 m $\mu$ . (samo za kestenov ekstrakt).

f) Uspoređujući spektrograme taninskih frakcija sa spektrogramima standardnih tvari, naročita sličnost opažena je između galne kiseline i rujeva ekstrakta te njegovih frakcija. Ima sličnosti između spektrograma 3,6-digaloil glukoze te pentagaloil glukoze sa spektrogramima K-111, K-112, H-111, H-112, a naročito s R, R-1 i R-21. Pomoću spektrograma hebulagne i hebulinske kiseline mogu se možda protumačiti široki, zapravo dvojni maksimumi K-12, K-21, K-22, H-12, H-21, H-22 te, u krajnjoj liniji, i K i H.

Nađeni maksimum kod 280 m $\mu$ ; prema literaturi, signalizira općenito fenolnu jezgru. Taj se maksimum u literaturi uglavnom spominje kao karakterističan za kondenzirane tanine. U našim je mjerenjima taj maksimum relativno malen. Daleko je izraženiji maksimum I, ali taj se u literaturi i ne spominje, već se navodi da hidrolizirajući taninski ekstrakti nemaju određeni maksimum i minimum.

Na temelju kromatografskih određivanja i UV-spektrograma standardnih tvari može se zaključiti, da rujev ekstrakt i njegove frakcije sadrže benzenove prstene koji pripadaju galnoj kiselini i galoil glukozi. Moglo bi se zaključiti, da kestenovi i hrastovi ekstrakti i njihove frakcije pored derivata galne kiseline sadrže i kondenzirane jezgre elag kiseline, hebulinske kiseline, hebulagne kiseline, pa i katehina.

9. U spektralnom području od 2—15  $\mu$  ispitano je 10 standardnih tvari te 16 taninskih ekstrakata i njihovih frakcija.

a) IR-spektroskopskim ispitivanjem taninskih tvari i njihovih frakcija nađeno je 14 izrazitih apsorpcijskih maksimuma.

b) Svi apsorpcijski maksimumi locirani su kod svih ispitivanih tvari na analognim valnim dužinama (isključivši maksimum od 1550 cm<sup>-1</sup>, odnosno 1525 cm<sup>-1</sup>).

c) Svi maksimumi ne javljaju se u pravilu u svakoj ispitivanoj tvari. Intenzitet i definiranost maksimuma općenito pada od većih valnih brojeva prema manjima.

d) IR-spektrogrami onih standardnih tvari koje su složenije građe mnogo su sličniji spektrogramima tanina i frakcija nego jednostavni.

e) Na osnovi obavljenih IR-spektralnih analiza može se zaključiti (prema tabeli 23) da:

Kestenov ekstrakt sadrži jako izražene slobodne hidroksilne grupe, karboksilne grupe, karbonilne grupe i sekundarne alkoholne grupe. Frakcija K-111 sadrži supstituirane 1—2, 1—3 i 1—2—3 benzenске prstene.

Hrastov ekstrakt sadrži vrlo izrazite hidroksilne grupe, aldehidne i ketonske grupe, karbonilne grupe i C = C (aromatski). Kod frakcija hrasta karakteristično je, da H-112 i H-12 posjeduju izrazite hidroksilne grupe na aromatskim jezgrama uz prisutnost sekundarnih hidroksilnih grupa. Frakcija H-22, kao najbolja frakcija hrastova ekstrakta sadrži skoro sve iste grupe kao i originalni hrastov ekstrakt, tj. daje mu glavne karakteristike.

Rujev ekstrakt karakteriziran je velikom prisutnosti hidroksilnih grupa, a ostale grupe nisu izražene. Vrlo karakteristična je frakcija R-1, koja sadrži izražene karboksilne grupe, karbonilne grupe te hidroksilne grupe, vezane na aromatske prstene, kao i primarne i sekundarne hidroksilne grupe. Osim toga sadrži i di- i tri-supstituirane benzenove prstene. Ta frakcija, međutim, količinski je neznatna, ali je dovoljno da njezinim odstranjenjem nastala frakcija R-21 ima bolje osobine od rujeva ekstrakta.

### 7. Kemijska karakterizacija pojedinih tanina — *Chemical characterization of individual tannins*

Na osnovi ispitivanja, provedenih u našem radu može se zaključiti slijedeće:

1. *Kestenov taninski ekstrakt* dosta se jednolično razdvaja u frakcije. Jedna frakcija (K-111) pokazuje enormno visoki postotak tanina.

Za ekstrakt je karakteristična prisutnost galne kiseline, digaloiil glukoze, arabinoze i glukoze. Vrlo malo ima slobodnih fenola, a prisutnost slobodne elag kiseline nije utvrđena. Prevladavaju do danas neidentificirane tvari. Utvrđene su i kondenzirane jezgre katehina. Od karakterističnih grupa nađene su hidroksilne, karbonilne i karboksilne grupe.

2. *Hrastov taninski ekstrakt* ne razdvaja se jednolično u frakcije. Jedna frakcija (H-22) pokazuje bolje analitičke osobine nego originalni ekstrakt.

Za ekstrakt je karakteristična prisutnost galne kiseline, digaloiil glukoze, hebulagne kiseline, velike količine jednostavnih fenola, arabinoze, ksiloze, galaktoze i glukoze. Prisutnost slobodne elag kiseline nije utvrđena. Prevladavaju nepoznate tvari. Izražena je prisutnost kondenziranih jezgra katehina. Kao i u kestenovu ekstraktu, izražene su hidroksilne, karbonilne i karboksilne grupe.

3. *Rujev taninski ekstrakt* ne razdvaja se jednolično na frakcije. Jedna od frakcija (R-21) predstavlja odlično pročišćeni ekstrakt s izrazito dobrim analitičkim svojstvima, mnogo boljim od originalnoga rujeva ekstrakta.

Za ekstrakt je karakteristična prisutnost velike količine digaloiil glukoze i slobodne galne kiseline. Od šećera sadrži dosta glukoze, s nešto malo galaktoze. Ekstrakt ima malo nepoznatih tvari. U derivatima galne kiseline prevladavaju benzenove jezgre. Od funkcionalnih grupa ističu se hidroksilne grupe, a ostale nisu izražene.

Rezultati dobiveni u našim radovima, mogu služiti daljnjem znanstvenom ispitivanju kemijskog sastava domaćih tanina kao i u praktičnoj primjeni kod ekstrakcije biljnih sirovina, odnosno njihovoj primjeni u industrijske svrhe.

Istraživanja na tom području treba usmjeriti na istraživanja neidentificiranih tvari. U tom smjeru kreću se i istraživanja taninskih ekstrakata, koja se obavljaju u inozemstvu na ekstraktima quebracha i mimoze.



## LITERATURA — REFERENCES

Kratice u literaturi:

J.A.L.C.A. = Journal of the American Leather Chemists Association.

J.S.L.T.C. = Journal of the Society of the Leather Trades Chemists.

J.C.S. = Journal of the Chemical Society.

J.I.S.L.T.C. = Journal of the International Society of the Leather Trades Chemists.

1. Allegrini R. and De Pisapia N., *Cuoio, pelli, mat. concianti*, 34, 1958, 279.
2. Aulin — Erdtman, *TAPPI*, 32, 1949, 160.
3. Aulin — Erdtman, *Svensk Papperstidn.*, 55, 1952, 745.
4. Bate — Smith E.C., *Biochim. Biophys. Acta*, 4, 1950, 427.
5. Bate — Smith E.C., *J. Exp. Bot.*, 4, 1952, 1.
6. Bate — Smith E.C., *Biochem. J.*, 53, 1954, 122.
7. Bate — Smith E. C., *Chem. & Ind. (London)*, 1954, 1457.
8. Bate — Smith E.C., and Lerner N. H., *Biochem. J.*, 58, 1954, 126.
9. Bate — Smith E.C. and Swain T., *Chem. & Ind. (London)*, 1953, 377.
10. Bellamy L.J., *The Infra-red Spectra of Complex Molecules*, London, Mathuen and Co., 1960.
11. Bernauer K., *Ann. Chem. Liebigs*, 588, 1954.
12. Blažej A., Šuty L. i Mladek M., *Kožarstvi*, 10, 1960, 354.
13. Bradfield A.E. and Penney E., *J.C.S.*, 1948, 2249.
14. Bradfield A.E. and Flood, *J.C.S.*, 1952, 4740.
15. Brande, *Ann. Repts. Chem. Soc.*, 42, 1945, 105.
- 15a. Bravo G.A., *Revue technique des Industries du Cuir*, 1962, IX, vol. LIV, No. 9, 247.
16. Braunschweig T.D., *J.A.L.C.A.*, 40, 1945, 185.
17. Brown S.A. and Neish A. G., *Nature, Lond.*, 175, 1955, 688.
18. Buchanan M.A., Lewis H.F. and Kurth, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 16, 1944, 907.
19. Buchanan M.A., Lewis H.F. and Weber B.W., *J.A.L.C.A.*, 45, 1950, 513.
20. Burton D. and Nursten H.E., *Chemistry of of Vegetable Tannins — A Symposium*, Croydon, S.L.T.C., 1956.
21. Campbell T. W. and Coppinger G. M., *J. Am. Chem. Soc.* 73, 1951.
22. Catravas G. N., *Ph. D. Thesis, Leeds University*, 1948.
23. Catravas G. N. and Kirby K. S., *J.I.S.L.T.C.*, 32, 1948, 155.
24. *The Chemistry of Vegetable Tannins — A Symposium S.L.T.C.*, Croydon 1956.
25. Cheshire A., *J.I.S.L.T.C.*, 27, 1943, 145.
26. Clark L. M. and Levy W. J., *J. Sci. Food & Agric.*, 1, 1950, 213.
27. Craig L. C., *J. Biol. Chem.*, 155, 1944, 819.
28. *Chromatography*, E. Merck A. G. Darmstadt.
29. Consden R., Gordon A. H. and Martin A. J. P., *Biochem. J.*, 38, 1944, 224.
30. Curtius und Franzen, *Sitzber. Heidelberg's Akad. Wiss. math. naturw. Klasse*, 1916.
31. Davis B. D., *Advances in Enzymol.*, 16, 1955, 247.
32. Dekker J., *Die Gerbstoffe*, Berlin 1913.
33. Del Pezzo L., *Cuoio, pelli, mat. concianti*, 31, 1955, 71.
34. Del Pezzo L., *Cuoio, pelli, mat. concianti*, 32, 1956, 11.
35. Doub L. and Vandenberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 1949.
36. Durio I. E., Catino A. and Oddone A., *Cuoio, pelli, mat. concianti*, 35, 1959, 183.
37. Durio I. E., Catino A. and Oddone A., *Cuoio, pelli, mat. concianti*, 36, 1960, 137.
38. Eggers J., Posse R. und Scheibe G., *Z. Elektrochem.*, 58, 1954.
39. *Elektrotehnika i telekomunikacija*, Tehnička knjiga, Beograd 1949.
40. Evans R.A., Parr W. H. and Ewans W.C., *Nature, Lond.*, 164, 1949, 674.
41. Evelyn S. R., Maifs E. A. and Roux D. G., *Biochem. J.*, 76, 1960, 23.
42. Flett M. St. C., *Characteristic Frequencies of Chemical Groups in the Infra-red*, Amsterdam — London — New York, Elsevier Publishing Company, 1963.
43. Finch L. R. and White D. E., *J. C. S.*, 1950, 3367.
44. Fischer E., *Untersuchungen über Depside und Gerbstoffe*, J. Springer — Berlin, 1919.

45. Fischer E. und Bergmann M., *Berichte*, 51, 1918, 1760. 52, 1919, 829.
46. Fischer E. und Freudenberg K., *Annalen*, 384, 1911, 238; *Berichte*, 45, 1912, 119; 47, 1914, 2485.
47. Freudenberg K., *Die Chemie der natürlichen Gerbstoffe*, Berlin, J. Springer, 1920.
48. Freudenberg K., *Tannin, Cellulose, Lignin*, Berlin, J. Springer, 1933.
49. Freudenberg K., und Maitland P., *Annalen*, 510, 1934, 193.
50. Freudenberg K., Steinbrunn G. und Karimullah, *Ann. Chem. Liebigs*, 518, 1935, 37.
51. Freudenberg K., und Walpuski, *Berichte*, 54, 1921, 1695.
52. Freudenberg K. and Weinges K., *Chem. & Ind.*, 1959, 486.
53. Freudenberg K. and Weinges K., *Ann. Chem. Liebigs*, 590, 1954, 140.
54. Gogenschall, *Anal. Chem.*, 22, 1950, 381.
55. Goldschmidt, *Anal. Chem.*, 26, 1954, 1421.
56. Grassmann W., Endisch O. und Kuntara W., *Das Leder*, 2, 1951, 202.
57. Grassmann W., Stiefenhofer G. und Endres H., *Chem. Ber.*, 89, 1956, 454.
58. Grosjean W., *Das Leder*, 5, 1954, 153.
59. Hügglund A., *Das Leder*, 2, 1951, 147.
60. Harrison G. R., Lord R. C., Loofbourow J. R., *Praktička spektroskopija*, Naučna knjiga, Beograd 1962.
61. Hathway D. E., *Biochem. J.*, 70, 1958, 35.
62. Hathway D. E., *Biochem. J.*, 71, 1959, 533.
63. Hershenson H. M., *Infrared Absorption Spectra (1945—1957)*, Academic Press, New York — London 1959.
64. Hershenson H. M., *Infrared Absorption Spectra (1958—1962)*, Academic Press, New York — London 1964.
65. Hershenson H. M., *Ultraviolet and Visible Absorption Spectra— Index 1930—1954*, New York 1956.
66. Hershenson H. M., *Ultraviolet and Visible Absorption Spectra — Index 1955—1959*, New York — London 1961.
67. Hillis W. E., *Nature, Lond.*, 166, 1950, 195.
68. Hillis W. E., *J.S.L.T.C.*, 35, 1951, 211.
69. Hillis W. E., *J.S.L.T.C.*, 35, 1951, 211.
70. Hillis W. E., *J.S.L.T.C.*, 38, 1954, 91.
71. Jurd L., *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 1957, 6045.
72. Karrer P., *Lehrbuch der organischen Chemie*, Stuttgart 1954.
73. Karrer P., Salomon H. P., and Peyer J., *Helv. Chim. Acta*, 6, 1923, 17.
74. Kenten R. H., *Brit. Leath. Man. Res. Assoc. 1947, Laboratory Reports*, 26, No. 2.
75. Kilcher H., *J.S.L.T.C.*, 36, 1952, 331.
76. King F. E., King T. J. and Ross J. M., *J. Chem. Soc.*, 1955.
77. King H. G. C. and White T., *The Chemistry of Vegetable Tannins — A Symposium S.L.T.C.*, 1956.
78. King H. G. C. and White T., *J.S.L.T.C.*, 41, 1957.
79. King H. G. C. and White T., *J.C.S.*, 686, 1961, 3538.
80. Kirby K. S., Knowles E. and White T., *J.S.L.T.C.*, 35, 1951, 338.
81. Kirby K. S., Knowles E. and White T., *J.S.L.T.C.*, 35, 1951, 338.
82. Kirby K. S., Knowles E. and White T., *J.S.L.T.C.*, 36, 1952, 45.
83. Kirby K. S., Knowles E. and White T., *J.S.L.T.C.*, 37, 1953, 283.
84. Kirby K. S., and White T., *J.S.L.T.C.*, 38, 1954, 215.
85. Kiss A., Molnar J. and Sandorfy C., *Bull. Soc. Chim. France*, (5), 16, 1949.
86. Kishimoto J., *Bulletin of the Tottori University Forests*, 2, 1961, 18.
87. Kishimoto J., *J. Jap. For. Soc.*, 43, 6, 1961, 212.
88. Kishimoto J., *Transactions of the Tottori Society of Agricultural Science, Tottori*, 13, 1961, 125.
89. Kurmeir, *Collegium*, VI 1927, 273.
90. Lassere R. et Magarian S., *Bull. Assoc. Franç. Chimistes Inds. Cuir et Doc. Sci. et Techn. Ind. Cuir*, 23, 1961, 253.
91. Maranville and Goldschmidt, *Anal. Chem.*, 26, 1954, 1423.
92. Mayer W., *Ann.*, 578, 1952, 34; *Das Leder*, 2, 1951, 277.
93. Mayer W. und Bauni G., *Das Leder*, 7, 1956, 33.
94. Mayer W. und Bauni G., *Ann. Chem. Liebigs*, 611, 1957, 264.
95. Mehler A. H. and Knox W. E., *J. Biol. Chem.*, 187, 1950.
96. Meić Z., *Automatizacija*, 1965, 273.

97. Merrill H. B. et al., *J.A.L.C.A.*, 42, 1947, 536; 43, 1948, 481; 44, 1949, 54.
98. Moore W. J., *Fizička kemija*, Naučna knjiga, Beograd 1962.
99. Nass, *Über den Gerbstoff der Castanea vesca*, Dorpat, 1884.
100. Niernstein, *The Natural Organic Tannins*, Churchill, London 1934, 198.
101. Okamura H. and Jizuka Y., *Nippon Ringaku Kaishi*, 42, 1960, 309.
102. Opačić I., *Disertacija*, Zagreb 1955.
103. Opačić I., *Drvena industrija*, 12, 1961, 66.
104. Opačić I., *Kemija u industriji*, 2, 1953, 250.
105. Opačić I. und Linke V., *Österr. Leder-Zeitung*, Festival 1954 (Wien).
106. Opačić I. i Linke V., *Kemija u industriji*, 1954, 221.
107. Opačić I., *Šumarska enciklopedija*, I, 1959, 726.
108. Opačić I., *Šumarska enciklopedija*, II, 1959, 539.
109. Opačić I., *Šum. List*, 1950, 304.
110. *Organic Electronic Spectral Data I (1946—1952)*, Interscience Publishers, New York — London 1960.
111. *Organic Electronic Spectral Data II (1953—1955)*.
112. Page R. O., *J.I.S.L.T.C.*, 31, 1947, 338.
113. Perkin A. G. and Niernstein M., *J. C. S.*, 87, 1905, 1415.
114. Putnam R. C. and Bowles A. V., *J.A.L.C.A.*, 48, 1953, 343.
115. Putnam R. C. and Browne W. R., *J.A.L.C.A.*, 50, 1955, 64.
116. Putnam R. C. and Gensler W. J., *J.A.L.C.A.*, 46, 1951, 613.
117. Putnam R. C. and Gensler W. J., *J.A.L.C.A.*, 47, 1952, 478.
118. Putnam R. C., Wiederhorn N. M., Rockett J. C., Bowles A. V. and Salerno M. D., *J.A.L.C.A.*, 49, 1954, 422.
119. Ramić S, Murko D. i Devetak Z., *Farmaceutski glasnik*, 20, 1964, 371.
120. Ritter et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 1950, 1347.
121. Roberts and Wood, *Biochem. J.*, 49, 1951, 414.
122. Robinson R., *Structural Relationship of Natural Products*, Oxford, Clarendon Press, 1955.
- 122a. Robinson R. and Robinson G. M., *Biochem. J.*, 27, 1933, 206.
123. Roux D. G., *J.A.L.C.A.*, 1937, 319.
124. Roux D. G., *J.A.L.C.A.*, 1959, 614.
125. Roux D. G., *J.A.L.C.A.*, 1960, 272.
126. Roux D. G., *J.S.L.T.C.*, 34, 1950, 122.
127. Roux D. G., *J.S.L.T.C.*, 35, 1951, 322.
128. Roux D. G., *Biochem. J.*, 37, 1963, 435.
129. Roux D. G. and Paulus E., *Biochem. J.*, 77, 1960, 315.
130. Roux D. G. and Paulus E., *Biochem. J.*, 78, 1961, 120.
131. Roux D. G. and Paulus E., *Biochem. J.*, 78, 1961, 786.
132. Roux D. G. and Paulus E., *Biochem. J.*, 80, 1961, 62.
133. Roux D. G. and Paulus E., *Biochem. J.*, 80, 1961, 476.
134. Roux D. G. and Paulus E., *Biochem. J.*, 82, 1962, 320.
135. Roux D. G. and Paulus E., *Biochem. J.*, 82, 1962, 326.
136. Roux D. G. and Bruyn G. C., *Biochem. J.*, 87, 1963, 439.
137. Roux D. G., *Wattle Tannin and Mimosa Extract*, Leather industries Research Institute, Grahamstown, South Africa, 1955.
138. Russel A., *J.C.S.*, 1934, 1940.
139. Russell A. and Todd J., *J.C.S.*, 1934, 1066, 1506.
140. Seguin A., *Ann. der Chemie*, 20, 1796, 15.
141. Schmid, *Berichte*, 19, 1886, 1734.
142. Schmidt O. T., *On the Constitution of Chebullinic Acid*, Symposium *S.L.T.C.*, 1956.
143. Schmidt O. T. und Bernauer K., *Ann. Chem. Liebigs*, 588, 1954, 211.
144. Smidt and Hull, *Berichte*, 80, 1947, 509.
145. Schmidt O. T. und Lademann R., *Ann. Chem. Liebigs*, 569, 1950, 149.
146. Schmidt O. T. und Lademann R., *Ann. Chem. Liebigs*, 571, 1951, 41, 232.
147. Schmidt O. T. und Mayer W., *Ann. Chem. Liebigs*, 572, 1951.
148. Schmidt O. T. und Nieswandt W., *Ann. Chem. Liebigs*, 568, 1950, 165.
149. Schmidt O. T., Voigt H. und Bernauer K., *Berichte*, 88, 1955, 92.
150. Schubert W. M. and Gardner J. D., *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 1953.
151. Schubert and Nord, *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 1950, 977.
152. Sohn A. W., *Angew. Chem.*, 1950, 539.

153. Sohn A. W., *Das Leder*, 2, 1951, 4.
154. Sourlanges and Atkin, *J.I.S.L.T.C.*, 27, 1943, 183.
155. Stahelin C. und Hofstetter J., *Ann. Chem. Liebigs*, 51, 1844, 63
156. Šumarska Enciklopedija, Zagreb 1959, Leksikografski Zavod FNRJ.
157. Trimble, *J. Franklin Inst.*, 132, 1891, 303.
158. Venkateswarlu C., Das M. S. and Athavale V. T., *Proc. Indian Sci.*, 40 A, 1954.
159. Weber K., Fotokemija i kemizam fotografskih reakcija, Zagreb 1964.
160. Weber K., Optičke metode, Zagreb 1958.
161. Weinges K., *Ann. Chem. Liebigs*, 672, 1959, 229.
162. White T., *J. Sci. Food & Agric.*, 7, 1957, 377.
163. White T., Chemistry of the Vegetable Tannins, The Chemistry and Technology of Leather, vol. II, Reinhold P. C., New York 1958.
164. White T., *J.S.L.T.C.*, 33, 1949, 39.
165. White T., Kirby K. S. and Knowles E., *J.S.L.T.C.*, 36, 1952, 148.
166. White T., The Scope of Vegetable Tannin Chemistry — A Symposium, *S.L.T.C.*, 1956.
167. Williamson B. and Craig L. C., *J. Biol. Chem.*, 168, 1947, 187.
168. Mladek M., Benčat F. i Blažej A., *Kožarstvi*, 9, 1959, 323.
169. Sakata K., Kishimoto J., Sakai H. and Kosaka N., *Tottori Nogakkaiho*, 15, 1963, 52.

### Summary

In the course of this work were carried out investigations of the chemical components of domestic tannin extracts, such as: tannin extract from the wood of Sweet Chestnut (*Castanea vesca*), tannin extract from the wood of Pedunculate Oak (*Quercus pedunculata*), tannin extract from the leaves of domestic Sumach (*Rhus cotinus*).

The extracts were examined by the methods of double-way chromatography, UV and IR spectrophotometry.

The results of these investigations were as follows:

1. Through fractionation by means of solvents solid tannin extracts were separated into fractions. From Chestnut and Oak extracts five fractions each were obtained, and from Sumach three fractions.

2. Tannin analysis of original extracts and their fractions was performed by the semimicro filter method. No analysis was performed of those fractions which accounted for less than 2% in tannin extract.

Through fractionation of tannin extract one fraction (K-111) was obtained which possessed better qualities than the original extract, but accounted for only about 4,6%. Through fractionation of tannin extract about 40% of H-22 fraction was obtained, which possessed good properties and excellent tanning qualities. Through fractionation of Sumach extract about 74% of R-21 fraction was obtained which possessed very good analytical characteristics and excellent tanning qualities.

On the basis of the characteristics of these three extracts it may be said that the active tannin substances in Chestnut extract are in some degree evenly distributed into fractions. From Chestnut extract a quality extract can be obtained as an insoluble matter in acetone and methanol. In Sumach extract by solving in acetone less valuable substances were obtained, while by solving in methanol the high-grade tannin passed over into solution.

The mentioned characteristics of domestic extracts have not been known either in practice or in scientific investigations until these works were completed.

3. As standard substances for all further investigations the following chemicals were taken: resorcin, pyrogallol, gallic acid, elagic acid, 3,6-digalloil glucose, pentagalloyl glucose, chebullinic acid, chebullagic acid, fisetin and d-catechin, which were obtained as tested preparations.

4. Chromatograms of Chestnut tannin extract and its fractions exhibited 23 components developed by the ammoniacal silver nitrate, and 17 components visible under UV light.

On the basis of the author's experiments it was found that Chestnut extract and its fractions contain: gallic acid, 3,6-digalloil glucose, pyrogallol, resorcin, traces of chebullinic or chebullagic acids, and sugars. It is characteristic that free ellagic acid was not present.

Fractions insoluble in acetone exhibited large quantities of spots whose identification could not be determined.

5. Chromatograms of Oak tannin extract and its fractions exhibited 25 components which reacted with ammoniacal silver nitrate, and 15 components visible under UV light.

On the basis of the author's experiments it was found that Oak tannin extract and its fractions contain: gallic acid, 3,6-digalloil glucose, chebullagic acid, large quantities of simple phenols of which resorcin and pyrogallol were determined, and sugars. No free ellagic acid was evidenced.

In the original extract as well as in the fractions insoluble in acetone and methanol was manifest an accumulation and a difficult separation of unknown substances.

On the basis of the tannin analysis H-22 fraction (insoluble in acetone and methanol) showed to possess best tanning characteristics. A chromatogram of this fraction exhibited very poor distribution. From which it may be concluded that none of the determined substances is greatly responsible for the quality of tanning and that this is to be attributed to the unknown substances of this extract.

Well-expressed spots of simple phenols account for the appearance of dark colour of this extract on longer exposure to air.

6. Chromatograms of Sumach tannin extract and its fractions exhibited 10 components which reacted with ammoniacal silver nitrate, and 7 components visible under UV light.

On the basis of the author's experiments it was found that Sumach tannin extract and its fractions contain: gallic acid, 3,6-digalloil glucose, pentagalloyl glucose, a catechin compound and traces of certain unknown substances.

R-21 fraction (insoluble in acetone, soluble in methanol) which on the basis of the tannin analysis proved best is indicative of the presence of digalloil- and pentagalloyl-glucose, probably also of penta-m-digalloil glucose. On the basis of which it follows that these substances are responsible for the quality characteristics of Sumach tannin extract.

It is characteristic of this tannin extract that it does not possess free phenols by which a bright colour and stability of water solutions of this extract can be explained.

7. Through chromatographic testing the presence of sugars was examined. In our tannin extracts the following sugars were found:

a) In Chestnut extract: galactose, glucose, arabinose and xylose.

Arabinose is foremost in quantities which surely occur in the non-tannin part and which was formed through the break-down of pentosans during the extraction of wood. The amount of glucose was slightly smaller, and it was formed to a smaller part because of hydrolysis of hexosans, and to a greater part through the break-down of galloil glucose and of the other nondetermined glucosides.

b) In Oak extract: galactose, glucose, an unknown sugar, arabinose and xylose. Arabinose is foremost in amounts which were formed through the hydrolysis of pentosans of Oakwood during the extraction. Quantities of glucose, galactose and xylose were slightly smaller. Xylose resulted from wood pentosans through hydrolysis during the extraction. The quantity of pentosans, arabinose and xylose was greater than in Chestnut extract, which is in harmony with the pentosan content in wood, because Oakwood contains more pentosans than Chestnutwood. Glucose, in addition to the hydrolysis of pentosans in wood, resulted also through the hydrolysis of galloil glucose. Interesting was the appearance of galactose, as well as of an unknown sugar. It may be assumed that they resulted through the hydrolytic break-down of unknown substances characteristic of Oak extract.

c) In Sumach extract: galactose and glucose. Considering the origin of this extract, i. e. from leaves, the absence of arabinose and xylose may be explained. The large amount of glucose is characteristic of this extract, and it is expressed in the non-tannin component of the extract. Its origin can be sought in the unstable and delicate galloil glucose molecule. The presence of galactose is not explainable, and it is assumed that the unknown substances of this extract found in the chromatogram were bound to it.

From the sugar content it is visible that towards a fermentative break-down Chestnut extract is the most stable, Oak extract more sensitive, while Sumach extract is broken down most.

8. Measured were the UV absorption spectra of the tannins of Chestnut, Oak, Sumach in the neutral (water-methanol), acid (HCl) and alkaline (KOH) media. Some tests were also made in the visual field.

a) According to the shape of curves of examined tannins and their fractions it may be concluded that the spectrogram of individual tannins is a resultant of the spectrograms of their fractions.

b) Between the spectrograms of Chestnut and Oak tannins and their fractions there exists a considerable similarity, while Sumach tannin extract and its fractions exhibit — although under analogous maxima — a much more pronounced absorption.

c) Four maxima were found in all the examined tannin substances (with fewer exceptions), thus:

	Chestnut extract and fractions	Oak extract and fractions	Sumach extract and fractions
1st maximum (m $\mu$ )	213—215	205—210	215
2nd maximum (m $\mu$ )		220—230	
3rd maximum (m $\mu$ )		270—280	
4th maximum (m $\mu$ )		360—370	

d) Under the influence of HCl the absorption curve did not change practically. In general the absorption was slightly lessened under small bathochromic displacement (1—2 m $\mu$ ).

e) The influence of KOH was considerable: 1st maximum became sharper, 2nd maximum vanished, while between the 3rd and 4th maxima a new maximum (3a) arose. A stronger hypsochromic displacement occurred in all the examined substances. In the 1st maximum this displacement was 3—13 m $\mu$ . The 2nd maximum vanished. In the 3rd maximum the displacement was 17—38 m $\mu$ . A new maximum (3a) arose between 283—288 m $\mu$ . The 4th maximum had a displacement of 25—33 m $\mu$  (only for the Chestnut extract).

f) When comparing the spectrograms of tannin fractions with the spectrograms of standard substances a particular similarity was noticed between gallic acid and Sumach extract and its fractions. There is a similarity between the spectrograms of 3,6-digalloil glucose and pentagalloyl glucose with spectrograms K-111, K-112, H-111, H-112, and especially with R, R-1 and R-21. By means of the spectrograms of chebulagic and chebullinic acids could perhaps be explained the wide, actually double maxima K-12, K-21, K-22, H-12, H-21, H-22, and in the last resort also K and H.

The maxima found at 280 m $\mu$ , according to literature, refer in general to a phenolic ring. Such a maximum is mentioned in the literature in general as characteristic of condensed tannin. In the author's measurements this maximum was relatively small. By far more marked was the maximum 1; however, it is not mentioned in the literature, but it is stated that hydrolyzing tanning extracts have not a fixed maximum or minimum.

On the basis of chromatographic determinations and UV spectrograms of the standard substances it may be concluded that Sumach extract and its fractions contain benzene rings which belong to gallic acid and galloyl glucose. It could be concluded that Chestnut and Oak extracts and their fractions — in addition to the derivatives of gallic acid — also contain condensed rings of ellagic acid, chebullinic acid, chebulagic acid, and even catechin.

9. Within the spectral range of 2—15 m $\mu$  were examined 10 standard solutions and 16 tannin extracts and their fractions.

a) Through IR spectroscopic examinations of tannin substances and their fractions, 14 marked absorption maxima were found.

b) All the absorption maxima in all examined substances were located at analogous wave lengths (excluding the maximum of  $1550\text{ cm}^{-1}$  and  $1525\text{ cm}^{-1}$ ).

c) All the maxima did not appear, as a rule, in each examined substance. The intensity and definability of the maxima decreased in general from the greater wave numbers towards the smaller ones.

d) The IR spectrograms of those standard substances which were of a more complex structure, were by far more similar to the spectrograms of tannins and fractions than those of a simpler structure.

e) On the basis of IR spectral analysis it may be concluded according to the  $\lambda$ -maxima and data from Table 27, as follows:

Chestnut extract contains strongly pronounced free hydroxyl groups, carboxyl and carbonyl groups, and secondary alcoholic groups. Fraction K-111 contains the substituted 1-2, 1-3, and 1-2-3 benzene rings.

Oak extract contains very marked hydroxyl groups, aldehyde and ketone groups, carbonyl groups and  $\text{C}=\text{C}$  (aromatic). In Oak fractions it is characteristic that H-112 and H-12 contain distinct hydroxyl groups on aromatic rings in the presence of secondary hydroxyl groups. Fraction H-22, as the best fraction of Oak extract, contains almost all the same groups as the original Oak extract, i. e. it bestows upon the latter the main characteristics.

Sumach extract is characterized by a marked presence of hydroxyl groups, while the other groups are not pronounced. Very characteristic is the R-11 fraction, which contains marked carboxyl groups, carbonyl groups, and hydroxyl groups bound to aromatic rings, as well as the primary and secondary hydroxyl groups. In addition it contains also the di- and tri-substituted benzene rings. This fraction, however, is quantitatively insignificant, but it suffices that by its elimination the resulting fraction R-21 should possess better qualities than Sumach extract.

#### *Chemical characterization of individual tannins*

On the basis of the present investigation the following may be concluded:

1. *Chestnut tannin extract* segregates rather evenly into fractions. Fraction K-111 exhibits an excessively high percentage of tannin. Of the extract is characteristic the presence of gallic acid, digalloil glucose, arabinose and glucose. It contains very small amounts of free phenols, while the presence of free ellagic acid was not established. There have prevailed so far unidentified substances. Established were also condensed rings of catechin. Of the characteristic groups were found the hydroxyl, carbonyl and carboxyl groups.

2. *Oak tannin extract* does not segregate evenly into fractions. Fraction H-22 is characteristic of showing better analytic qualities than the original extract.

Of the extract is characteristic the presence of gallic acid, digalloil glucose, chebullagic acid, large amounts of simple phenols, arabinose,



xylose, galactose and glucose. No presence of ellagic acid was demonstrated. Prevailing are unknown substances. Marked was the presence of condensed rings of catechin. As in the Chestnut extract marked were the hydroxyl, carbonyl and carboxyl groups.

3. *Sumach tannin extract* does not segregate evenly into fractions. Fraction R-21 is characteristic of representing an excellently purified extract with markedly good analytical qualities, by far better than those of the original Sumach extract.

Of the extract is characteristic the presence of large quantities of digalloil glucose and free gallic acid. The extract contains a small amount of unknown substances. In the derivatives of gallic acid there prevail rings. Of the functional groups the hydroxyl groups are pronounced, while the other groups are not pronounced.

The results obtained in these investigations can serve in further scientific examinations of the chemical composition of domestic tannins and in practical application when extracting vegetable raw materials, or in their application in industry.

Scientific research in this field ought to be channelled towards investigations on unidentified substances. In the same direction are channelled also studies in foreign countries on tannin extracts from Quebracho and Mimosa.