

Untersuchung über die Fettsäuren aus den Früchten und Samen. II.<sup>1)</sup>  
Über eine Neue Fettsäure (Goshuyusäure) aus den Früchten  
von *Evodia rutaecarpa* Hook. fil. et Thomson<sup>2)</sup>

GOICHI KURONO, YOSHIHIRO NISHIKAWA, SUSUMU MIYANO  
und SETSUKO ABURANO

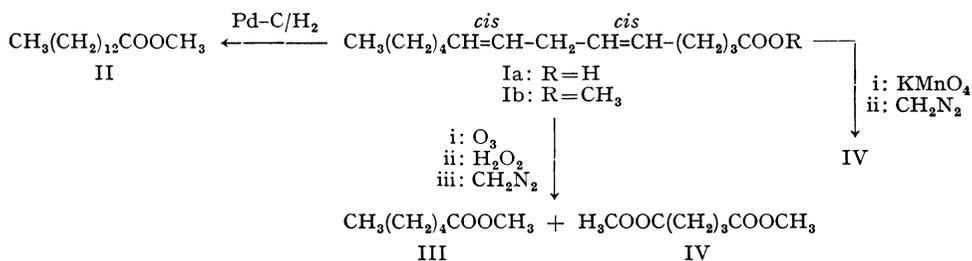
Fakultät der pharmazeutischen Naturwissenschaften, Kanazawa Universität<sup>3)</sup>

(Eingegangen am 1. Oktober 1971)

Aus den Fettsäure-fraction, die nach der Verseifung des Ätherextraktes von den Früchten des *Evodia rutaecarpa* Hook. fil. et Thomson (Rutaceae) erhalten wurde, wurde Goshuyusäure isoliert. Diese Säure ist eine Tetradeceadiensäure, die bis jetzt niemals in der Natur gefunden worden ist. Der Gehalt dieser Säure beträgt 25% der Gesamttettsäure in dieser Frucht. Nach dieser Untersuchung wurde eine Struktur *cis*-5,8-Tetradeceadiensäure (Ia) für Goshuyusäure ermittelt. Wie auf dem Tabelle I gezeigt, wurden auch andere bekannten Fettsäure ermittelt.

Von alters her gilt die Früchte von *Evodia rutaecarpa* Hook. fil. et Thomson (jap. Name Goshuyu) in japanischen und chienesischen Völkern als wirksames Heilmittel, während sich die Alkaloide wie Evodiamin,<sup>4)</sup> Rutaecarpin,<sup>4)</sup> Hydroxyevodiamin<sup>5)</sup> und Evocarpin A,B,C<sup>6)</sup> in der Literatur finden lassen. Auch kann man die Mitteilungen über die Bitterstoffe<sup>7)</sup> und die ätherische Öle<sup>8a)</sup> aus diesen Früchten finden. Aber bis jetzt gibt es keine Mitteilung über die Fettsäuren aus diesen Früchten.

Aus der Fettsäure-fraction, die durch die Verseifung des Ätherextraktes von *Evodia*-früchten erhalten wurde, wurde eine neue Fettsäure isoliert, die bis dahin niemals in der Natur gefunden worden ist, und sie Goshuyusäure genannt. Die Struktur dieser Säure wurde erstmal von uns als Ia aufgeklärt.



Formelschema

- 1) I. Mitteil: S. Aburano, A. Okamoto und G. Kurono, *Yakugaku Zasshi*, **90**, 1471 (1970).
- 2) Diese Mitteilung wurde bei der Hokuriku-Zweig Versammlung der pharmazeutischen Gesellschaft von Japon publiziert, Kanazawa, Juni 26, 1971.
- 3) Standort: *Takayamachi 13-1, Kanazawa*.
- 4) a) Y. Asahina und K. Kashiwagi, *Yakugaku Zasshi*, **405**, 1273 (1915); b) Y. Asahina und S. Maeda, *ibid.*, **416**, 871 (1916).
- 5) A. Chatterjee, S. Bose und C. Ghosh, *Tetrahedron*, **7**, 257 (1959); I. J. Pachter und G. Suld, *J. Org. Chem.*, **25**, 1680 (1960); M. Yamazaki und T. Kawana, *Yakugaku Zasshi*, **87**, 608 (1967).
- 6) R. Tschesche und W. Werner, *Tetrahedron*, **23**, 1873 (1967).
- 7) K. Keimatsu, *Yakugaku Zasshi*, **248**, 979 (1902); Y. Asahina und S. Ishio, *ibid.*, **404**, 1148 (1915); A. Fujita, H. Nozoe und T. Shimoda, *ibid.*, **55**, 474 (1935); S. Maeda, *ibid.*, **55**, 531 (1935); A. Fujita und M. Akatsuka, *ibid.*, **67**, 202 (1948); *idem*, *ibid.*, **69**, 72 (1949).

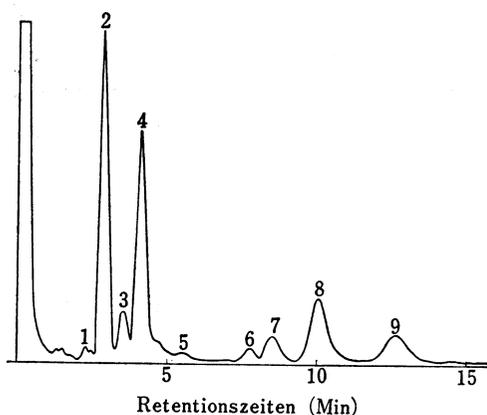
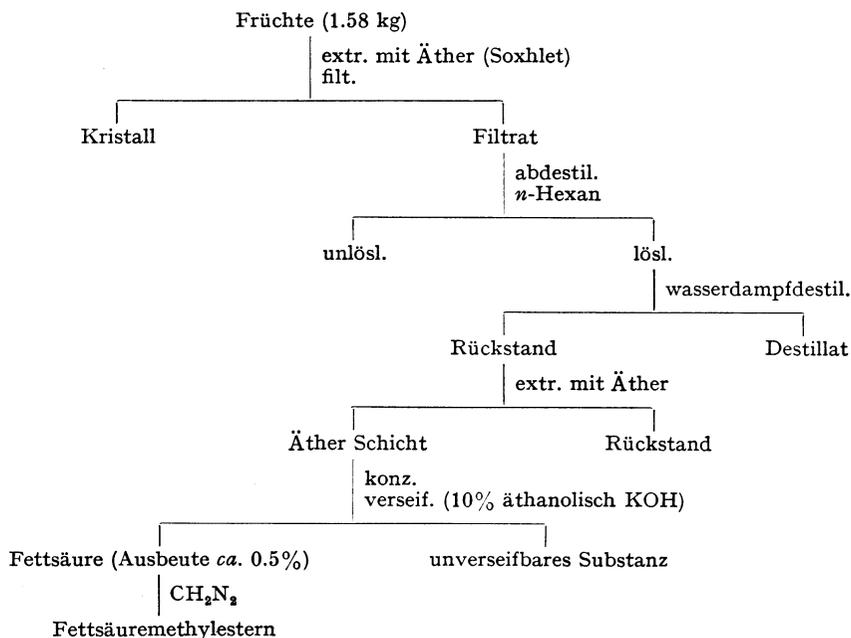
TAFEL I. Extraktion und Isolierung der Fettsäurefraktion aus den Früchten von *E. rutaecarpa*

Abb. 1. GLC von Fettsäuremethylestern

Siehe über die Bedingungen Fussnot d) in  
Tabelle I

Werte (Ä.K.L.)<sup>8)</sup> gezeigt. In Abb. 1 hat Goshuyusäuremethylester (Ib) den Peak 2 gezeigt und wurde nach der Vergleichung der Ä.K.L.-Werte als einer unbekannte Fettsäuremethylester erwiesen.

Weil die Gewichtsverhältnis dieser Fettsäuremethylester zu der Gesamtfettsäuremethylesterfraktion 25% beträgt, deshalb haben wir durch die präparative Gas Liquid Chromatographie und die Kieselgelsäulenchromatographie reinen Goshuyusäuremethylester zu isolieren gestrebt. Durch die präparative GLC wurde der Gesamtfettsäuremethylester in ca. 70 Stunden lang, bei 200° chromatographiert. Dann wurde sehr weniger unzersetzener

In dieser Mitteilung berichten wir über die Isolierung und die Strukturaufklärung dieser Säure. Nach dem Verfahren Tafel I wurde die gesammtsäure aus 1.58 kg getrockneten *Evodia*-früchten extrahiert. (Ausbeute 0.5%). Nachdem sie mit Diazomethan methyliert wurde, wurde ein Gemisch von Fettsäuremethylestern durch auf der Kieselgelsäule mit Benzol chromatographiert. Dann wurde ein öliges Gemisch von Methylestern erhalten und durch die Gaschromatographie (GLC) (Abb. 1) mit den authentischen Proben über die relativen Retentionszeiten verglichen. Und jeder Peak wurde identifiziert wie in Tabelle I. Auch in dieser Tabelle wurden die Gewichtsverhältnisse jedes Peaks nach dem Peakflächeninhalt (Peakbreite bei ihrer halben Höhe  $\times$  ihre Höhe) und die Äquivalenz Ketten Länge

8) T. K. Miwa, K. L. Mikolajczak, F. R. Earle und I. A. Wolff, *Anal. Chem.*, 32, 1739 (1960).

TABELLE I. Prozent der Bestandteile und Ä.K.L.-Wert des Gemisches von Fettsäuremethylestern

Peak Nr.	Kette <sup>a)</sup>	Gh. % <sup>b)</sup>	Ä.K.L.-Werte <sup>c)</sup>	
			1,4-BDS <sup>d)</sup>	PEG-6000 <sup>e)</sup>
1	14:0	2	14.0	14.0
2	14:2	25	14.6	14.6
3	unbekannt	8	15.3	15.2
4	16:0	26	16.0	16.0
5	unbekannt	1	17.0	17.0
6	18:0	3	18.0	18.0
7	18:1	7	18.4	18.1
8	18:2	18	18.9	18.6
9	18:3	9	19.6	19.2

a) C-Nr. und Doppelbindung Nr.

b) die Gewichtsverhältnisse-prozent (Peakbreite bei ihrer halben Höhe  $\times$  ihre Höhe)

c) die Äquivalenz Ketten Länge Werte<sup>b)</sup>

d) 5% 1,4-BDS auf Shimalite W, Glasrohr (2m  $\times$  4 mm I.D.) 190°, N<sub>2</sub>(58 ml/min)

e) 5% PEG-6000 auf Shimalite W, Glasrohr (2m  $\times$  4 mm I.D.) 185°, N<sub>2</sub>(60 ml/min)

reiner Goshuyusäuremethylester erhalten. Aber wegen kleines Gehaltes wurde eine andere Isolierungsmethode untergesucht. Dann wurde der Gesamtsäuremethylester durch die Kieselsäulenchromatographie mit Benzol als Elutionslösungsmittel fraktioniert und jede Fraktion wurde durch GLC auf die Probe gestellt. So wurde eine den höchsten Gehalt von Goshuyusäuremethylester haltende Fraktion erhalten. Wie in Experimenteller Teil gezeigt, nochmals wurde diese Fraktion durch die präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt. Zuletzt aus dieser Dünnschichtplatte wurde gereinigter Goshuyusäuremethylester extrahiert.

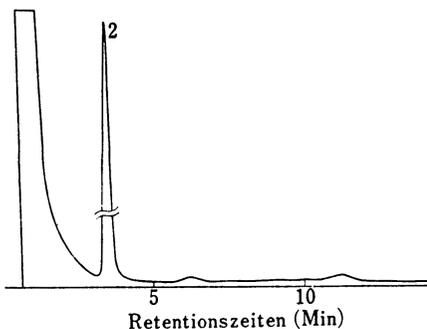


Abb. 2. GLC des Goshuyusäuremethylesters

5% 1,4-DBS auf Shimalite W, Glasrohr(2m  $\times$  4mm I.D.) 190°, N<sub>2</sub>(49 ml/min)

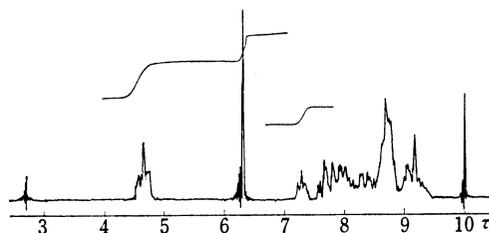


Abb. 3. NMR des Goshuyusäuremethylesters (CDCl<sub>3</sub>)

Auf dem hochauflösender Massenspektrum zeigte Goshuyusäuremethylester ein Molekül-Ion am  $M^+$  238.195. Nach diesem Resultat hat dieser Methylester Molekularformel  $C_{15}H_{26}O_2$ . Nach der Kontakthydrierung dieses Methylesters in Äthanol mit Paradium-Kohle hat dieser hydrierte Methylester auf dem Massenspektrum ein Molekül-Ion am  $M^+$  242 gezeigt. Auch durch GLC war der Peak 2 verschwunden, während der Peak 1 vergrößert war. Denn der Peak 1 mit Myristinsäuremethylester(II) identifiziert wurde, so war es klar geworden dass der Peak 2 ein *n*-Tetradecadiensäuremethylester sein soll.

Nach dem Grund, dass bei infrarotspektrum (IR) Goshuyusäuremethylester eine Absorption am  $1660\text{ cm}^{-1}$  (CH=CH) und keine Absorption am  $980\text{—}960\text{ cm}^{-1}$  gezeigt hat, soll diese Doppelbindung *cis* Lage sein. Auf nuklear magnetische resonanz (NMR) Spektrum hat dieser

Methylester die Signalen von 4H für die olefinischen Protonen am  $\tau$  4.65 und die von 2H für die methylenischen Protonen zwischen zwei Doppelbindungen am  $\tau$  7.26 gezeigt.

Auf der anderen Seite wurde Goshuyusäuremethylester in Chloroform ozonisiert und nach der Zersetzung dieses Ozonides mit Hydrogenperoxyd wurden die resultierte Carbonsäuren wieder mit Diazomethan methyliert. Durch GLC-bestimmung dieser Methylestern wurden Capronsäuremethylester(III) und Glutarsäuredimethylester(IV) ermittelt. Weiter wurde Goshuyusäuremethylester in Aceton mit Kaliumpermanganat oxydiert und die resultierte Carbonsäuren wieder wie oben methyliert. Durch GLC-bestimmung wurde ein erhaltener Methylester als Glutarsäuredimethylester(IV) identifiziert. Durch die Oxydation mit Kaliumpermanganat in Aceton wurde auch Glutarsäuredimethylester(IV) aus dem erhaltenen Methylester erwiesen. Bei beiden oben Oxydationen wurde kein erwarteter Malonsäuredimethylester erwiesen. Über dieses Resultat vermuten wir, dass Malonsäure bei der hohen Temperatur sehr leicht zersetzt würde. Nach den oberen Resultaten der Untersuchung wurde die Struktur von Goshuyusäure als *cis*-5,8-Tetradecadiensäure (Ia) sich erwiesen.

Noch bis jetzt wurde eine Tetradecadiensäure in *Hypnum cupressiforme* (ein Moss) und in den Blättern von *Ilex aquifolium* mit B.W. Nichols<sup>9)</sup> mitgeteilt, aber gab es keine Untersuchung über die Stelle der Doppelbindungen in dieser Literatur.

In Goshuyusäure sind 4 Methylenreste weniger als in Linolsäure. W. Stoffel und A. Scheid<sup>10)</sup> hatten mitgeteilt, dass die synthetische *cis*-5,8-Tetradecadiensäure zur Linolsäure in der Gewebekultur von HeLa-Zellen verlängert wurde. So haben wir über diese Säure ein Interesse, dass diese Säure eine Vorstufe der Linolsäure bei Biosynthese in Höherpflanzen sein könne.

#### Experimenteller Teil

In dieses Experiment wurden für GLC Perkin-Elmer F 21, präparative Gas Chromatograph (FID) und Shimadzu GC-4 BPF (FID), für IR-Spektren Jasco-Model DS-402G Spektrophotometer, für NMR-Spektren JEOL JNM C60H Spektrometer und für Massenspektren JMS-O1SG Spektrometer gebraucht.

**Extraktion und Isolierung der Fettsäure-fraktion aus *Evodia*-früchten (Tafel I)**—Als Rohstoffe wurden die auf dem Markt gekaufte Früchten gebraucht. 1.58 kg Pulver von trocknen *Evodia*-früchten wurden in Soxlet mit Äther extrahiert. Dann wurde der entstandene Kristall (19.1 g) abgesaugt und vom Filtrat wurde Äther abdestilliert. Der Rückstand (62.6 g) wurde in 630 ml *n*-Hexan aufgenommen. Hexan wurde aus dieser Lösung abdestilliert. Nach der Wasserdampfdestillation des Rückstandes (25.2 g) wurde der nicht abdestillierte Rückstand mit Äther geschüttelt. Von der Ätherlösung Äther abdestilliert und der Rückstand (19.2 g) wurde mit 58 ml 10% äthanolischen KOH-lösung zugefügt. Dann dieser alkalische Gemisch wurde auf dem Wasserbade 2 Stunden lang gekocht. Nach der Verseifung wurde ÄtOH abdestilliert und Wasser wurde bis zur Lösung zugefügt. Zur Entfernung der unverseifenden Substanzen (9.2 g) wurde diese Wasserlösung mit Äther geschüttelt. Die Wasserschicht wurde mit 10% HCl sauer gemacht und die befreiten Fettsäure-fraktion wurde ins Äther aufgenommen. Nach dem Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat wurde Fettsäure-fraktion (7.5 g) gewonnen. Diese Fraktion wurde mit  $\text{CH}_2\text{N}_2$  zu einen Gemisch von Fettsäuremethylestern verändert. Dieser Gemisch war tief gefärbt, so wurde er durch die Kieselgelsäulenchromatographie mit Benzol als Elutionmittel gereinigt. Nach der Chromatographie war dieser Gemisch dünn gelb geworden. In Abb. 1 und Tabelle I wurde die Resultat der Analyse von den extrahierten Fettsäuremethylestern durch GLC gezeigt. (Sich über die Bedingungen der GLC Tabelle I.) Auch wurden die Fettsäuren aus *Evodia*-früchten vom Medizinischergarten unser Fakultät untergesucht. Die gefundene Fettsäure-arten der beiden Früchten waren ganz identisch. Aber war das Gehaltsprozent jeder Fettsäure von zwei Früchten verschieden.

**Isolierung und Reinigung von Goshuyusäure aus dem Gemisch von Fettsäuremethylestern**—(i) Methode von den präparativen GLC: Durch die präparative GLC der ÄtOAc-Lösung des Gemisches von den Fettsäuremethylestern wurde ein Peak-teil 70 Stunden lang gesammelt, der 0.546 als die relative Retentionszeiten gegen die des Palmitinsäuremethylesters gezeigt hatte. Säule; 1.5% SE-30 auf Chromosorb W, (unrosstigem Eisenrohr, 2 m  $\times$  8 mm I.D.). Trägergas;  $\text{N}_2$ . Temperatur der Säule; 200°.

Weil dieser Fettsäuremethylester wenig gefärbt war, wurde er durch Vakuumdestillation nochmals verreinigt. Nach dieser Weise wurde sehr weniger reine Ib erhalten.

9) B. W. Nichols, *Phytochemistry*, **4**, 769 (1965).

10) W. Stoffel und A. Scheid, *Z. Physiol. Chem.*, **348**, 205 (1967).

(ii) Methode von den Säulenchromatographie und Dünnschichtchromatographie: Durch die einmalige Keiselsäulenchromatographie (Säule, 19.5 cm × 4 cm I.D.) der Benzollösung von 5.93 g Fettsäuremethylestergemisch wurde jede Fraktion von 16 g geteilt. Jede Fraktion wurde durch GLC identifiziert. Wieder durch die Keiselsäulenchromatographie (Säule, 19.0 cm × 4 cm I.D.) der Benzollösung von der Ib reichen Fraktion (Frak. Nr. 14) wurde jede Fraktion von 5 g geteilt. Zuletzt wurde 0.146 g von der rohen Ib aus der Ib am reichsten Fraktion (Frak. Nr. 38, 39) erhalten. Diese obene Verfahren wurden wiederholt und 0.236 g von der rohen Ib wurde gesammelt. Dann wurde diese rohen Ib auf dem Kieselgöldünnschichtplatte (Merck Kieselgel G; Dichte 0.5 mm) punktiert, der mit dem 12.5% AgNO<sub>3</sub> impregnierten Kieselgel dargestellt wurde. Dann wurde dieser Platte mit der Lösung (Petroläther: Äther=8:2) entwickelt und mit 0.2% ÄtOH-Lösung von 2,7-Dichlorofluoreszeïn gesprüht. Mit ultraviolettem Strahl (UV) wurde die Zone von Ib geschichert. Nach diesem Verfahren wurde die Zone der Dünnschichtplatte am Rf 0.27—0.52 versammelt und mit Äther extrahiert. Dann der reine ölige Fettsäuremethylester (Ib) wurde extrahiert. Die Ausbeute beträgt 0.111 g. Die Reinheit dieses Methylesters wurde GLC erwiesen. (Abb. 2).

Goshuyusäuremethylester: Hochauflösender Massenspektrum (Photoplatte Methode) *m/e*: C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>

Ber. 238.193 (M<sup>+</sup>), Gef. 238.195 (M<sup>+</sup>). IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 1742 (C=O), 1660 (C=C), 723 (CH<sub>2</sub>-Ketten). NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\tau$ : 9.10 (3H, C-CH<sub>3</sub>), 8.50—8.90 (8H, -CH<sub>2</sub>-), 7.50—8.50 (6H, >C-CH-C-, -CH<sub>2</sub>-C=O), 7.26 (2H, =C-CH<sub>2</sub>-C=), 6.34 (3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.65 (4H, -CH=CH-) (Abb. 3).

**Kontakthydrirung des Gemisches von Fettsäuremethylestern**—0.105 g von dem Gemisch der Fettsäuremethylestern wurde in 10 ml ÄtOH mit 50 mg von 10% Paladiumkohle 80 Minuten lang hydriert. Nach der Filtration wurde ÄtOH abdestilliert und der Rückstand wurde in Benzol gelöst. Diese Benzollösung wurde mit dem ersten Gemisch von den Fettsäuremethylestern durch GLC verglichen. Der Peak 2 (Goshuyusäuremethylester) war verschwinden, während der Peak 1 (Myristinsäuremethylester (II)) vergrößert wurde. Auch im Massenspektrum *m/e* 238 (M<sup>+</sup>) geschwunden und *m/e* 242 (M<sup>+</sup>) vergrößert.

**Ozonisierung von Goshuyusäuremethylester**—24.3 mg von Ib wurde in CHCl<sub>3</sub> gelöst und in dieser Lösung unter Kühlung wurde O<sub>3</sub> eine Stunde lang durchgeführt. Dann in diese Lösung wurde 5 ml H<sub>2</sub>O zugefügt und dem unter dem N<sub>2</sub>-Strom wurde CHCl<sub>3</sub> abdestilliert. Dieses Ozonid wurde mit 1 ml von Hydrogenperoxyd (30%) 1 Stunden lang auf dem Wasserbade gekocht. Dieser Reaktionsgemisch wurde mit CHCl<sub>3</sub> extrahiert und CHCl<sub>3</sub> abdestilliert. Der Rückstand wurde mit CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> methyliert. Dieser Methylester wurde durch GLC mit den authentischen Proben verglichen und III (Capronsäuremethylester) und IV (Glutarsäuredimethylester) wurden erwiesen.

GLC-Bedingungen: (i) 5% PEG-6000 auf Shimalite W, Glasrohr (2 m × 4 mm I.D.) 125°, N<sub>2</sub>, 40 ml/min, Caprosäuremethylester, Retentionszeiten 1.24 min, Glutarsäuredimethylester, Retentionszeiten 7.18 min. (ii) 5% 1,4-BDS auf Shimalite W, Glasrohr (2 m × 4 mm I.D.) 125°, N<sub>2</sub>, 40 ml/min, Capronsäuremethylester, Retentionszeiten 1.59 min, Glutarsäuremethylester, Retentionszeiten 12.85 min.

**Oxydation von Goshuyusäuremethylester mit KMnO<sub>4</sub>**—100 mg Pulver von KMnO<sub>4</sub> wurde in 2 ml Acetonlösung von Ib (9 mg) portionsweise zugefügt und diese Lösung wurde 2 Stunden lang unter Rückflusskühler auf dem Wasserbade umgerührt. Dann wurde das bleibende KMnO<sub>4</sub> mit wenigem ÄtOH zersetzt und das bestehende MnO<sub>2</sub> wurde abfiltriert. Aus diesem Filtrate wurde Aceton abdestilliert. Nachdem der Rückstand mit CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> methyliert wurde, wurde dieser Methylester durch GLC wie oben mit den authentischen Proben verglichen und er wurde mit IV identifiziert.

**Danksagung** Wir danken Herrn Yoshikata Itatani und Fläulein Taeko Tsuji von unser Fakultät für die Aufnahme der NMR-Spektren und Massenspektren.