

macrocyclic ring show a lower ID 50 ($1 \times 10^{-8} \text{M}$ and $3 \times 10^{-8} \text{M}$, respectively) than T-2 toxin ($6 \times 10^{-8} \text{M}$). These findings clearly demonstrated, as already reported,³⁾ that the inhibitory potency depends on a chemical nature, especially, on lipophylicity of side chains in the trichothecenes.

Acknowledgement This experiment was partly aided by a Grant-in-Aid for Mycotoxin Research from the Ministry of Welfare.

[Chem. Pharm. Bull.]
22(11)2746—2749 (1974)

UDC 547.587.51.02 : 581.192

Über die Cumarine der *Boenninghausenia japonica* (SIEB.) NAKAI

MITSUGI KOZAWA, KIMIYE BABA, MASAFUMI MINAMI,
HARUMI NIITA und KIYOSHI HATA

Osaka Pharmazeutische Hochschule¹⁾

(Eingegangen am 29. Mai 1974)

Aus Rutazeen sind bisher zahlreiche Cumarinderivate isoliert worden, und für diese Familie sind die Cumarine mit der 1,1-Dimethylallyl-Seitenkette typisch. Die *Ruta*-Arten sind für uns unter anderem deshalb chemotaxonomisch interessant, weil sie Furocumarine sowie die an der Stelle 3 substituierte Cumarine enthalten, die zum großen Teil die 3-(1',1'-Dimethylallyl)-Cumarine sind. In Japan sind diese Arten nicht wild, nur *Ruta graveolens* L. und *Ruta chalepensis* L. werden als Alzneipflanze gezüchtet, aber die ähnliche Pflanze, *Boenninghausenia japonica* (SIEB.) NAKAI (japanischer Name Matsukazeso), die früher *Ruta japonica* SIEB. genannt worden war, wächst in Japan wild, und sie interessiert uns für die Bestandteilsbeziehung mit den *Ruta*-Arten. Als Cumarine von *B. japonica* sind Bergapten (I) und Matsukaze-lacton (II)²⁾ isoliert worden.

In Rahmen unserer Untersuchungen über die Cumarine sowie die Chemotaxonomie von Rutazeen haben wir auch dieser Pflanze untersucht.

Die Kräuter, die auf dem Gebirge des Großbezirk Osaka gesammelt worden waren, wurden getrocknet und mit Hexan sowie Äthylacetat extrahiert und auf die in dem experimentellen Teil beschriebene Weise aufgearbeitet. Dabei erhielt man aus dem Hexan-Extrakt Xanthotoxin (III), ein weißes Blättchen (IV) vom Schmp. 87—87.5° sowie ein schwach gelbes Nadelchen (V) vom Schmp. 111—112° und aus dem Äthylacetat-Extrakt I, II, III, Umbelliferon (VI) sowie ein schwach gelbes Nadelchen (VII) vom Schmp. 249—250°.

IV ist weißes Blättchen vom Schmp. 87—87.5°, $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_3$ (M^+ 254). Das Ultraviolett-(UV)-Spektrum entspricht dem Substitutionstyp des Psoralens. Auf dem Chromatogramm fluoresziert es im UV-Licht blaue. Das Infrarot(IR)-Spektrum zeigt das Vorhandensein eines ungesättigten Lactons, eines aromatisierten Ringes, Furanringes und der Doppelbindung. Das Kernmagnetischresonanz(KMR)-Spektrum³⁾ zeigt die für die an der Stelle 3 substituierte 6,7-Furo-Cumarine typischen Signale: Zwei Singletten bei τ 2.33 (1H), τ 2.37 (1H) und ein breite Singlett bei τ 2.59 (1H) entsprechen den drei Protonen der 4-, 5- und 8-Stelle des Cumarin-komplexes, und ein Dublett bei τ 2.34 (1H, $J=2$) und ein Dublett-Dublett bei τ 3.20 (1H, $J=2$

1) Lokalität: *Kawai 2-chome, Matsubara, Osaka.*

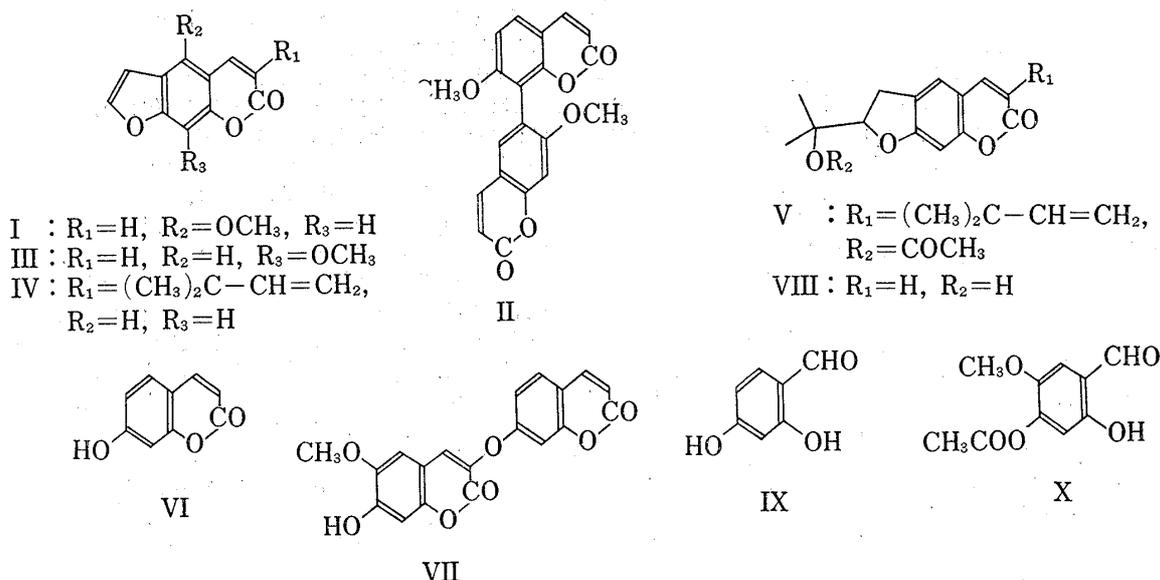
2) T. Miyazaki und S. Mihashi, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 12, 1232 (1964); T. Miyazaki, S. Mihashi und K. Okabayashi, *ibid.*, 12, 1236 (1964).

3) Dieses Spektrum wurde in CDCl_3 gemessen.

und 1.5) entsprechen den zwei Protonen des Furanringes. Weiterhin zeigt es die für 1,1-Dimethyl-allylgruppe typischen Signale: Ein Dublett-Dublett bei τ 3.76 (1H, $J=18$ und 10.5) und ein Multiplett bei τ 4.89 (2H) entsprechen den drei Protonen der Allylgruppe, $C-CH=CH_2$, und ein Singlett bei τ 8.49 (6H) entspricht den sechs Protonen der C-Dimethyl der Dimethylallylgruppe. Aus diesen Daten wurde IV angenommen, daß es mit dem aus *R. chalepensis* isolierte Chalepentin⁴⁾ identisch war, und auf den Vergleich des KMR-Spektrums wurde es mit Chalepentin identifiziert.

V ist schwach gelbes Nadelchen vom Schmp. 111—112°, $[\alpha]_{D}^{25} +20.5^\circ$, Mol. Gew. 356 (Mass.). Auf dem Chromatogramm fluoresziert es im UV-Licht blaue. Das IR-Spektrum zeigt das Vorhandensein eines ungesättigten Lactons, eines aromatisierten Ringes und eines Esters. Das KMR-Spektrum³⁾ zeigt wie IV die für die an der Stelle 6, 7 substituierte 3-(1',1'-Dimethylallyl)-Cumarine typischen Signale: Drei Singletten bei τ 2.52 (1H), τ 2.80 (1H) und τ 3.30 (1H) entsprechen den drei Protonen der 4-, 5- und 8-Stelle des Cumarin-komplexes, und ein Dublett-Dublett bei τ 3.79 (1H, $J=18$ und 10.5), ein Multiplett bei τ 4.93 (2H) sowie ein Singlett bei τ 8.53 (6H) entsprechen den neun Protonen der 1,1-Dimethylallyl-Seitenkette, und zeigt die für 1-Acetoxy-isopropylgruppe typischen Signale: Drei Singletten bei τ 8.03 (3H), τ 8.44 (3H) und τ 8.49 (3H) entsprechen den drei Protonen der Acetylgruppe und sechs Protonen der C-Dimethylgruppe. Weiterhin zeigt es ein ABX-System bei τ 4.91 (1H, Triplet, $J=9$) und τ 6.80 (2H, Dublett, $J=9$). Diese KMR-Datum stimmte mit den in der Literatur beschriebene KMR-Datum des Rutamarins,⁵⁾ das aus dem *Ruta graveolens* isoliert wurde, überein. Aus diesen Ergebnissen wurde V mit Rutamarin identifiziert. Noch wird das Asymmetriezentrum in V zu S-Konfiguration entschieden, da V die negativen Optischerrotationsdispersion(ORD)-Kurve gegen das Nodakenetin (VIII), das die positiven ORD-Kurve zeigte und R-Konfiguration entschieden wurde, zeigt.

VII ist schwach gelbes Nadelchen vom Schmp. 249—250°, $C_{19}H_{12}O_7$ (M^+ 352). Auf dem Chromatogramm fluoresziert es im UV-Licht blaue. Das IR-Spektrum zeigt das Vorhandensein eines ungesättigten Lactons, eines aromatisierten Ringes und einer Hydroxylgruppe. Das UV-Spektrum ist verwandt mit Umbelliferon. Das KMR-Spektrum⁶⁾ zeigt die für die 7-Oxy-Cumarine typischen Signale: Zwei Dubletten bei τ 1.97 (1H, $J=9.5$) und



Schema 1

4) R.M. Brooker, J.N. Eble und N.A. Starkovsky, *Lloydia*, 30, 73 (1967).

5) I. Novak, K. Szendrei und E. Minker, *Acta Pharm. Suecica*, 4, 179 (1967).

6) Dieses Spektrum wurde in $DMSO-d_6$ gemessen.

τ 3.63 (1H, $J=9.5$) entsprechen den zwei Protonen der 3- und 4-Stelle des Cumarinkomplexes, und ein Dublett bei τ 2.29 (1H, $J=9$), ein Dublett-Dublett bei τ 2.89 (1H, $J=9$ und 2) und ein Dublett bei τ 2.82 (1H, $J=2$) entsprechen den drei Protonen der 5-, 6- und 8-Stelle des Cumarinkomplexes. Weiterhin zeigt es die für die an der Stelle 3 (oder 4), 6, 7 substituierte Cumarine geeignete Signale: Drei Singletten bei τ 2.80 (1H), τ 3.14 (1H) und τ 2.15 (1H) entsprechen den drei Protonen der 5-, 8- und 4 (oder 3)-Stelle des Cumarinkomplexes. Außerdem sind ein Methoxy-Singlett bei τ 6.19 und ein Hydroxy-Singlett bei τ 0.23 zu erkennen. VII bildet sich bei der Behandlung mit 10 proz. wäßriger Kalilauge eine gelbe Lösung, aus der beim Ansäuern sich die Ausgangsmaterial und geringen Umbelliferon bilden. VII liefert mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat ein Monoacetat (VII-Acetat) vom Schmp. 240–242°, Zusammensetzung $C_{21}H_{14}O_8$ (M^+ 394). Durch Ozonspaltung und nachfolgende hydrolytische Zersetzung des Ozonids erhält man aus VII ein gelbes harzartiges Reaktionsprodukt, die sich an einer Kieselgelsäule VI, VII und β -Resorcinaldehyd (IX) trennen lassen. Auch VII-Acetat liefert durch Ozonspaltung und nachfolgende hydrolytische Zersetzung des Ozonids ein gelbes harzartiges Reaktionsprodukt, sich an einer Kieselgelsäule VI, IX und 2-Hydroxy-4-acetoxy-5-methoxy-benzaldehyd (X) trennen lassen. Aus diesen Ergebnissen wurde VII angenommen, daß es mit dem aus dem *Daphne mezereum* sowie *Ruta graveolens* isolierte Daphnoretin⁷⁾ identisch war, und auf den Vergleich der IR- und KMR-Spektren wurde es mit Daphnoretin identifiziert.

Bei diesem Versuche wurde es bewiesen, daß *Boenninghausenia japonica* (SIEB.) NAKAI sechs derselbe Cumarine enthielt, die aus den *Ruta*-Arten isoliert worden waren, daß drei von diesen die an der Stelle 3 substituierte, charakteristische Cumarine waren. So erklärt sich, daß diese Pflanze mit den *Ruta*-Arten chemotaxonomisch nahe ist.

Experimentelles

Die UV-Spektren und die ORD-Kurve wurden mit dem JASCO ORD/UV-5, die IR-Spektren mit dem Hitachi EPI-G2, die KMR-Spektren mit dem NEVA Model A-60 Analytisch NMR Spektrometer (TMS als innerer Standard) und die Massenspektren mit dem Hitachi RMU-7L Mass Spektrometer (Direkteinlaß) aufgenommen. Die Schmelzpunkte sind mit dem Büchi Schmelzpunktbestimmungs Apparat nach Dr. Tottoli bestimmt worden.

Isolierung der Inhaltsstoffe aus *B. japonica*—6,6 kg getrocknete, zerkleinerte Kräuter extrahierte man 5 Stdn. dreimal mit Hexan sowie Äthylacetat unter dem Rücklauf und erhielt einen schwarzgrünen Hexan-Extrakt (110 g) sowie einen schwarzgrünen ÄtOAc-Extrakt (223 g).

Der Hexan-Extrakt wurde an 2 kg Kieselgel-Säulen mittels Hexan/ÄtOAc chromatographiert und die folgenden Fraktionen (Fraktionsgröße 250 ccm) getrennt: Nr. 1–68 (1:0), Nr. 69–90 (6:1), Nr. 91–199 (5:1), Nr. 200–297 (3:1), Nr. 298–326 (2:1), Nr. 327–360 (1:1) [() zeigt das Verhältnis des Lösungsmittels, v/v]. Die Fraktionen von 82–111 gaben durch Umkristallisieren aus Hexan eine wächsern Substanz. Von der Mutterlauge wurde IV durch Chromatographieren von Al_2O_3 -Säulen mittels $CHCl_3$ erhielt. Die Fraktionen von Nr. 112–130 wurden an Kieselgel-Säulen mittels Hexan/ÄtOAc rechromatographiert und lieferten V. Die Fraktionen von Nr. 186–203 ergaben durch Umkristallisieren aus Hexan/ÄtOAc III.

Der ÄtOAc-Extrakt wurde an 2 kg Kieselgel-Säulen mittels Hexan/ÄtOAc chromatographiert und die folgenden Fraktionen (Fraktionsgröße 200 ccm) getrennt: Nr. 1–151 (3:1), Nr. 152–324 (2:1), Nr. 325–396 (1:1), Nr. 397–453 (0:1) [() zeigt das Verhältnis des Lösungsmittels, v/v]. Die Fraktionen von Nr. 18–21 und die von Nr. 25–37 ergaben jeder durch Umkristallisieren aus Hexan/ÄtOAc I und III. Die Fraktionen von Nr. 57–88 wurden an Kieselgel-Säulen mittels Hexan/ÄtOAc rechromatographiert und lieferten VI. Die Fraktionen von Nr. 309–324 wurden an Al_2O_3 -Säulen mittels $CHCl_3$ rechromatographiert und lieferten II. Die Fraktionen von 325–432 ergaben durch Umkristallisieren aus Aceton sowie MeCOÄt VII und auch wurden die Mutterlauge an Polyamid mittels MeOH rechromatographiert und lieferten VII.

Bergapten (I)—Weißen Nadeln aus ÄtOH, Schmp. 188–189°, der Mischschmelzpunkt mit der authentischen Probe zeigte keine Erniedrigung, das IR-Spektrum stimmte mit dem der authentischen Probe überein. Ausbeute 50 mg.

Matsukaze-lacton (II)—Weißes Nadelchen aus Aceton Schmp. 264–265° [Lit. Schmp. 267–268°], das IR-Spektrum stimmte mit dem in der Literatur beschriebene IR-Spektrum des Matsukaze-lactons überein. Ausbeute 1.2 g.

7) R. Tschesche, U. Schacht und G. Legler, *Ann.*, **662**, 113 (1963); J. Reisch, I. Novak und E. Minker, *Planta Medica*, **16**, 372 (1968).

Xanthotoxin (III)—Weißen Nadeln aus ÄtOH, Schmp. 146—147°, der Mischschmelzpunkt mit der authentischen Probe zeigte keine Erniedrigung, das IR-Spektrum stimmte mit dem der authentischen Probe überein. Ausbeute 1.94 g.

Umbelliferon (VI)—Weißes Nadelchen aus ÄtOAc, Schmp. 225—227°, der Mischschmelzpunkt mit der authentischen Probe zeigte keine Erniedrigung, das IR-Spektrum stimmte mit dem der authentischen Probe überein. Ausbeute 50 mg.

Chalepensisin (IV)—Weißes Blättchen aus Hexan, Schmp. 87—87,5° [Lit. Schmp. 89—90°]. IR_{\max}^{Nujol} cm^{-1} : 1730 (C=O); 1625 (C=C); 1590, 1490 (aromatische Ring). $UV_{\max}^{\text{ÄtOH}}$ $m\mu$ (log ϵ): 206 (4.39); 247 (4.40); 293 (4.10); 330 (3.94). Ber. für $C_{16}H_{14}O_3$: C, 75.57; H, 5.55; Mol. Gew., 254.27. Gef.: C, 75.53; H, 5.72; Mol. Gew. (Mass.), 254. Das KMR-Datum stimmte mit dem in der Literatur beschriebene Datum überein. Ausbeute 1.5 g.

Rutamarin (V)—Schwach gelbes Nadelchen aus Hexan/ÄtOAc, Schmp. 111—112°, $[\alpha]_{578}^{12} + 20.5^\circ$ ($c=0.34$, $CHCl_3$) [Lit. Schmp. 107—108°, $[\alpha]_{578}^{25} + 19.6^\circ$ ($c=0.056$, $CHCl_3$)], Mol. Gew. (Mass.), 356. IR_{\max}^{Nujol} cm^{-1} : 1750, 1710 (C=O); 1630 (C=C); 1590, 1490 (aromatische Ring). ORD ($c=0.34$, $CHCl_3$) $[\alpha]^{12}$ ($m\mu$): +20.5° (589); +20.5° (578); +29.4° (500); +26.5° (420); +5.9° (400); +0.0° (394); -11.7° (390); -41.2° (380); -94.2° (374); -176.5° (369); -29.4° (360). ORD ($c=0.20$, MeOH) $[\alpha]^{12}$ ($m\mu$): -9.9° (500); -19.9° (450); -99.5° (400); -179.1° (380); -318.4° (370); -368.2° (366); -228.8° (360). Das KMR-Spektrum stimmte mit dem in der Literatur beschriebene Spektrum überein. Ausbeute 69 mg.

Daphnoretin (VII)—Schwach gelbes Nadelchen aus MeCOÄt, Schmp. 249—250° [Lit. Schmp. 244—247° und 256—258°]. IR_{\max}^{Nujol} cm^{-1} : 3350 (OH); 1720 (C=O); 1620, 1580, 1500 (aromatische Ring). $UV_{\max}^{\text{ÄtOH}}$ $m\mu$ (log ϵ): 228 (4.23); 268 (3.87); 325 (4.28); 346 (4.32). Ber. für $C_{19}H_{12}O_7$: C, 64.77; H, 3.43; Mol. Gew., 352.3. Gef.: C, 64.68; H, 3.57; Mol. Gew. (Mass.), 352. Die IR- und KMR-Spektren stimmten mit den in der Literatur beschriebene Spektren überein. Ausbeute 1.56 g.

VII-Acetat—500 mg VII wurde in 4 ccm Ac_2O bei Gegenwart 400 mg AcONa 1.5 Stdn. zum Sieden erhitzt. Das Gemisch wurde in H_2O gegossen und nach einigen Stunden ausgeschiedene Kristalle filtriert. Durch Umlösung aus Aceton bildeten sie weißes Nadelchen vom Schmp. 240—242° [Lit. Schmp. 235—237°]. Ber. für $C_{21}H_{14}O_8$: C, 63.96; H, 3.58; Mol. Gew., 394.3. Gef.: C, 63.83; H, 3.70; Mol. Gew. (Mass.), 394. Ausbeute 510 mg.

Ozonspaltung von VII—In eine Lösung von 500 mg VII in 100 ccm $CHCl_3$ wurde bei 0° ozonhaltiger Sauerstoff (2.5 Vol-% O_3) mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 1000 ccm/Min. 2 Stdn. eingeleitet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vak. hydrolysierte man das Ozonid durch Versetzen mit 50 ccm H_2O und 18 stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur. Die rotbraune Lösung wurde noch 20 Min. auf 70° erwärmt und dann mit Ät₂O extrahiert. Aus der Ätherlösung erhielt man durch Eindampfen einen größtenteils kristallisierten Rückstand. Durch Säulenchromatographie des Rückstands an Kieselgel wurden mit Hexan/ÄtOAc IX (30 mg), VI (45 mg) und VII (85 mg) erhielt.

β -Resorcinaldehyd (IX)—Schwach gelbes Nadelchen aus Hexan/ÄtOAc, Schmp. 136—137°, der Mischschmelzpunkt mit der authentischen Probe zeigte keine Erniedrigung, das IR-Spektrum stimmte mit dem der authentischen Probe überein.

Ozonspaltung von VII-Acetat—400 mg VII-Acetat wurde bei 0° in 100 ccm $CHCl_3$ wie VII ozonisiert. Aus dem Reaktionsgemisch erhielt man durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Hexan/ÄtOAc VI (48 mg), IX (20 mg) und X (35 mg).

2-Hydroxy-4-acetoxy-5-methoxy-benzaldehyd (X)—Schwach gelbes Nadelchen aus Hexan/ÄtOAc vom Schmp. 89—90°, der Mischschmelzpunkt mit der authentischen Probe zeigte keine Erniedrigung, das IR-Spektrum stimmte mit dem der authentischen Probe überein.

Dankesworte Wir danken Frau Magister H. Takeda in unserem Institut für die Durchführung der Mikroanalysen und Herrn Dr. A. Numata und Herrn Dr. S. Matsunaga in unserem Institut für die Aufnahme der KMR- und Mass-Spektren.