

# Pflanzliche Naturstoffe mit einer Nitrogruppe. I. Die Konstitution der Aristolochiasäure\* \*\*

Von

M. Pailer, L. Belohlav und E. Simonitsch

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien

Mit 5 Abbildungen

(Eingelangt am 25. Februar 1956)

Es wird über die Konstitutionsermittlung der Aristolochiasäure, einer gelben Substanz von der Formel  $C_{17}H_{11}O_7N$  berichtet, welche aus *Aristolochia clematitis* L. isoliert wurde. Diese Verbindung findet sich auch, wie aus der Literatur ersichtlich ist, in anderen Aristolochiaarten und war schon vielfach Gegenstand von Untersuchungen. Über den Aufbau des Naturstoffes konnten bisher allerdings keine Aussagen gemacht werden. Nunmehr wurde festgestellt, daß der Aristolochiasäure die Konstitution einer 3,4-Methylenedioxy-8-methoxy-10-nitrophenanthren-carbonsäure-1 zukommt. Diese Verbindung ist vor allem deswegen interessant, weil bisher in der Natur nur ganz wenige Nitroverbindungen aufgefunden wurden.

Derzeit kennt man ungefähr 180 Aristolochiaarten (Fam. Aristolochiaceae), von denen zwanzig in Europa, und zwar vornehmlich im Mittelmeergebiet heimisch sind<sup>1</sup>. In Österreich kommen nur *Aristolochia clematitis* L., *Aristolochia rotunda* und *Aristolochia pallida* vor. Vereinzelt findet man auch, vor allem als Zierpflanze, die in Nordamerika beheimatete *Aristolochia siphon*. Von diesen ist die *Aristolochia clematitis* oder „Gemeine Osterluzei“, im Volksmund auch „Wolfskraut“ genannt, bei uns am

\* Herrn Prof. Dr. A. Wacek zum 60. Geburtstag gewidmet.

\*\* In einer kurzen, vorläufigen Mitteilung haben wir Teilergebnisse dieser Arbeit bereits veröffentlicht. Mh. Chem. 86, 676 (1955). Außerdem wurde darüber (M. P.) auf dem XIV. internat. Kongreß für reine und angewandte Chemie in Zürich (Juli 1955) auszugsweise berichtet.

<sup>1</sup> G. Hegi, Flora von Mitteleuropa, 3. Bd., S. 162. München: J. F. Lehmanns Verlag.

weitesten verbreitet. Wir verwendeten daher für unsere Untersuchungen, über die wir im folgenden berichten wollen, die Rhizome und Wurzeln der *Aristolochia clematidis*, die wir in den Donauauen um Wien sammelten.

Die Osterluzei wurde früher viel und wird auch heute noch vereinzelt, vor allem in den östlichen Ländern, in der Volksmedizin verwendet<sup>2</sup>. Sie diente als Wundheilmittel und, wie der Name schon sagt, als wehenfördernde Droge. Unangenehme Nebenerscheinungen, wie Erbrechen, Durchfall, hämorrhagische Nephritis, Leberverfettung usw., ließen die Droge wieder in Vergessenheit geraten<sup>2</sup>. Erst in neuerer Zeit wird sie wieder als Wundheilmittel<sup>3</sup> und als menstruationsfördernde Droge empfohlen<sup>4</sup>. Daneben wurde die Pflanze schon im Altertum gegen Schlangenbiß angewendet. Auch andere *Aristolochia*-arten dienen in Mexiko, Indien und Brasilien demselben Zweck.

Durch die wirksameren exotischen *Aristolochia*-arten wurde die Osterluzei in Europa nach und nach verdrängt. Einzelne dieser Drogen sind heute noch in den Vereinigten Staaten, Brasilien und Großbritannien officinell.

Verhältnismäßig früh beschäftigte man sich mit experimentellen Untersuchungen der Wirksamkeit dieser interessanten Pflanzen. So konnte bereits *Murray* (1793)<sup>5</sup> feststellen, daß Schlangen vor der „betäubend riechenden“ *Aristolochia anguicida* L. fliehen. Ein bis zwei Tropfen des Wurzelsaftes genügen, um die Tiere zu betäuben, mehrere Tropfen töten sie. *Orfila* (1818)<sup>6</sup> prüfte die Wirkung der Wurzeln der Osterluzei an Hunden und stellte leichte Entzündungen der Organe fest, mit welchen sie in Berührung kamen. *Frickhinger* (1851)<sup>7</sup> beschrieb einen Selbstversuch mit der Wurzel von *Aristolochia clematidis*. Ekel, Erbrechen, Schüttelfrost und vor Müdigkeit gelähmte Glieder waren die Folge. In neuerer Zeit prüften *Lalanne* und *Mathou* (1934)<sup>8</sup> Extrakte von *Aristolochia eurystoma* *Duckartre* an Meerschweinchen. Diese *Aristolochia*-art wird von den Eingeborenen als Emmenagogum und Abortivum verwendet. Die Autoren konnten keine spezifisch uteruserregenden Stoffe feststellen, die Droge wirke nur durch die starke Kongestion und die drastische Purgierwirkung als Abortivum.

Mit Beginn des 19. Jahrhunderts wurden die ersten chemischen Untersuchungen an *Aristolochia*-arten durchgeführt. Nach *Bucholz* (1807)<sup>9</sup> analysierte *Chevallier* (1820)<sup>10</sup> die *Aristolochia serpentaria*. Er beschreibt erstmalig einen gelben Bitterstoff, den er neben einem ätherischen Öl und anderen indifferenten Stoffen isolierte. *Sobral*<sup>11</sup> fand in der *Aristolochia cymbifera*

<sup>2</sup> R. Kobert, Historische Studien, 1. Bd., S. 173. Halle. 1889.

<sup>3</sup> H. Diehl und H. Moser, Münch. med. Wschr. 81, 473 (1934).

<sup>4</sup> F. Mattauch, Wien. med. Wschr. 90, 70 (1940).

<sup>5</sup> A. Murray, Apparatus medicaminum, 1. Bd., S. 502. Göttingen. 1793.

<sup>6</sup> M. P. Orfila, Allgemeine Toxicologie, 3. Bd., S. 307. Berlin. 1818.

<sup>7</sup> A. Frickhinger, Buchners Repert. Pharmacie (3), 7, 1 (1851).

<sup>8</sup> P. Lalanne und Th. Mathou, Bull. sci. pharmacol. 41, 460 (1934).

<sup>9</sup> Bucholz, Berl. Jahrb. 1807, 129.

<sup>10</sup> A. Chevallier, J. Pharmacie 6, 565 (1820).

<sup>11</sup> Th. R. Sobral, J. Coimbra Nr. 36, 196.

ein „der Quassia, Gentiana u. dgl. sehr ähnliches Bitter“. Ebenso beschreiben *Brandes* (1835)<sup>12</sup> und *Wittstein* (1836)<sup>13</sup> eine gelbe Substanz, die sie aus *Aristolochia grandiflora* und *Aristolochia anihysierica* isolierten.

Über die chemische Natur dieses gelben Bitterstoffes wurde bis dahin nichts ausgesagt. Man hatte auch nur uneinheitliche, amorphe Substanzen in der Hand. *Winckler* (1849)<sup>14</sup> machte sich als erster die sauren Eigenschaften des gelben Bitterstoffes zunutze. Er extrahierte die vorher mit Wasserdampf behandelten und getrockneten Wurzeln von *Aristolochia clematidis* mit verd. Alkali und fällte daraus mit Schwefelsäure eine amorphe, gelbbraune Substanz.

*Frickhinger* (1851)<sup>7</sup> beschreibt einen aus der *Aristolochia clematidis* erhaltenen gelben, kristallisierten Bitterstoff von saurer Natur, den er als „Aristolochiagelb“ bezeichnete. *Walz* (1853)<sup>15</sup> erhielt aus der *Aristolochia clematidis* eine amorphe gelbe Substanz, die er „Aristolochiabitter“ nannte und für die er die Formel  $C_9H_{10}O_6$  aufstellte. *Peckolt* (1884)<sup>20</sup> fand in den Wurzeln der *Aristolochia cymbifera genuina* *Masters* einen Bitterstoff, den er als „Aristolochin“ bezeichnete. Ein gelber Bitterstoff wurde ferner von *Maisch* (1885)<sup>16</sup> aus *Aristolochia fragrantissima* *Ruiz et Pavon* und von *Ferguson* (1887)<sup>17</sup> aus *Aristolochia reticulata* isoliert. In der *Aristolochia indica* fanden *Dymock* und *Warden* (1891)<sup>18</sup> neben einem Alkaloid eine amorphe gelbe Säure.

*Pohl* (1892)<sup>19</sup> hat erstmalig eingehende Untersuchungen angestellt. Er isolierte sowohl aus den Samen der *Aristolochia clematidis* als auch aus den Wurzeln der *Aristolochia rotunda* und *Aristolochia longa* eine stickstoffhaltige saure Verbindung, die er als „Aristolochin“ bezeichnete. Er stellte die Bruttoformel  $C_{32}H_{22}O_{13}N_2$  auf. Die Verbindung lieferte bei der Reduktion mit Zn-Staub in Eisessig eine in kalten Alkalien kaum lösliche hellgelbe Substanz. *Pohl* interessierte sich auch für die pharmakologische Wirkung des Aristolochins und stellte fest, daß die Substanz für die Wirkung der Droge auf Warmblüter verantwortlich ist, während die „Schlangengiftigkeit“ einem ätherischen Öl zuzuschreiben ist.

*Hesse* (1895)<sup>21</sup> isolierte aus *Aristolochia argentina* neben einem Alkaloid, das er „Aristolochin“ nannte, drei gelbe Säuren:

1. Aristinsäure: Schmp. 275° (Zers.),  $C_{18}H_{13}O_7N$ , 1,5%  $OCH_3$  (*Zeisel*), bei der Kalischmelze wurde  $NH_3$  abgespalten.

2. Aristidinsäure: Schmp. 260°,  $C_{16}H_{13}O_7N$ . 1  $OCH_3$ -Gruppe.

3. Aristolsäure: Schmp. 260 bis 270°,  $C_{15}H_{11}O_7N$ .

*Hesse* hielt das *Pohlsche* „Aristolochin“, für das er den Namen Aristolochiasäure vorschlug, für nahe verwandt mit seinen drei Säuren und glaubte, daß ihm die Formel  $C_{17}H_{11}O_7N$  zuzuschreiben sei. Aus den Wurzeln der *Aristolochia sipo* isolierte *Castille* (1922)<sup>22</sup> in 1% Ausbeute eine Substanz,

<sup>12</sup> *R. Brandes*, Buchners Repert. Pharmacie 50, 365 (1835).

<sup>13</sup> *G. Ch. Wittstein*, Buchners Repert. Pharmacie 57 (2. Reihe), 145 (1836).

<sup>14</sup> *F. L. Winckler*, Jahrb. prakt. Pharmacie 19, 71 (1849).

<sup>15</sup> *G. F. Walz*, Jahrb. prakt. Pharmacie 24, 65 (1852).

<sup>16</sup> *H. C. C. Maisch*, Amer. J. Pharmacie 57, 602 (1885).

<sup>17</sup> *J. A. Ferguson*, Amer. J. Pharmacie 59, 481 (1887).

<sup>18</sup> *W. Dymock* und *C. J. H. Warden*, Pharmaceut. J. Transact. (3), 22, 245 (1891).

<sup>19</sup> *J. Pohl*, Arch. exper. Pathol. Pharmakol. 29, 282 (1892).

<sup>20</sup> *Th. Peckolt*, Pharmazeut. Rdsch., New York 11, 181 (1893).

<sup>21</sup> *O. Hesse*, Arch. Pharmaz. 233, 684 (1895).

<sup>22</sup> *A. Castille*, J. Pharmacie Belgique 4, 125, 141, 569 (1922).

die sich mit dem „Aristolochin“ von *Pohl* identisch erwies und die er daher nach dem Vorschlag von *Hesse* als Aristolochiasäure bezeichnete. Er konnte auch die von *Hesse* vorgeschlagene Formel  $C_{17}H_{11}O_7N$  bestätigen. Durch Bildung eines Silbersalzes, Titration und Molgewichtsbestimmung konnte er feststellen, daß die Aristolochiasäure einbasisch ist. Durch Reduktion mit Zn-Staub in Eisessig erhielt er einen hellgelben Stoff, welcher in organischen Lösungsmitteln eine starke blaugrüne Fluoreszenz zeigte und am besten der Formel  $C_{17}H_{13}O_4N$  entsprach. Durch Methylierung der Aristolochiasäure mit Dimethylsulfat und Alkali erhielt *Castille* den Methyl-ester vom Schmp. 260 bis 261° (Zers.), der sich durch Alkalien in der Hitze leicht wieder verseifen ließ. Er nahm auf Grund der Analysen (C, H, N) an, daß 2 Methylgruppen eingetreten waren. Bei der Kalischmelze entwich der Stickstoff in Form von  $NH_3$ , und aus dem Rückstand isolierte er einen mit Brom fällbaren phenolischen Körper sowie eine Verbindung, die die Eigenschaften der Anthrachinone zeigte. Auf Grund dieser Ergebnisse nahm *Castille* an, daß das Grundgerüst der Aristolochiasäure ein Anthrachinon-kern sei und der Stickstoff in tertiärer Bindung vorliegt.

*P. R. Krishnaswamy* und Mitarbeiter (1935)<sup>23</sup> isolierten aus der *Aristolochia indica* neben ätherischen Ölen, Fetten und Zuckern ein Alkaloid  $C_{17}H_{19}O_3N$  und eine Säure  $C_{17}H_{11}O_7N$ , Schmp. 275° (Zers.), die sie Isoaristolochiasäure nannten. Die Säure besitzt dieselbe Bruttoformel wie die Aristolochiasäure von *Castille* bzw. das Aristolochin von *Pohl* und zeigte auch ähnliche Eigenschaften. Da aber *Pohl* für seine Verbindung Schmp. 215° angab, nahmen die Autoren an, daß ihre Säure mit der *Pohl*-schen isomer sei. Sie stellten aktiven Wasserstoff nach *Zerewitinoff* fest, fanden keine Methoxyl- und keine Methylendioxygruppe, keine Reaktion mit Ketonreagentien und keine Bildung eines Jodmethylates. Weder siedende 50% KOH noch Kochen mit Essigsäureanhydrid veränderte die Substanz. Mit Dimethylsulfat ließ sich ein neutrales, geschmackloses Methyl-derivat  $C_{18}H_{13}O_7N$ , Schmp. 267° (Zers.), erhalten, das sich auch durch mehrstündiges Kochen mit 1 n methylalkohol. KOH nicht verseifen ließ. Durch Einwirkung von Benzoylchlorid und Alkali wurde in schlechter Ausbeute ein neutraler Stoff der Formel  $C_{24}H_{15}O_3N$  erhalten. Auf Grund dieser Ergebnisse vermuteten die Autoren, daß die Isoaristolochiasäure keine Carboxylgruppe, sondern eine Enolgruppe enthält. Durch Oxydation der Isoaristolochiasäure mit  $H_2O_2$  ließ sich in geringer Ausbeute eine weiße, kristallisierte Dicarbonsäure  $C_{16}H_{13}O_9N$  isolieren.

In einer ausführlichen Veröffentlichung über die Aristolochiasäure geben *H. Rosenmund* und *T. Reichstein* (1943)<sup>24</sup> eine weit umfassendere Referierung der älteren Literatur, als dies von uns hier geschehen konnte. Die Schweizer Autoren isolierten aus den Wurzeln der *Aristolochia siphonifera* eine gelbe, kaliumbicarbonatlösliche Substanz, die sie durch Umlösen aus Dioxan reinigten. Der Schmp. lag zwischen 274 und 278° (Zers.) und die Analysen stimmten auf die Formel  $C_{17}H_{11}O_7N$ . Die Methoxyl-

<sup>23</sup> *P. R. Krishnaswamy, B. L. Manjunath und S. Venkata Rao*, J. Indian Chem. Soc. 12, 476, 494 (1935); 14, 39 (1937).

<sup>24</sup> *H. Rosenmund und T. Reichstein*, Pharmaceut. Acta Helv. 18, 243 (1943).

bestimmung gab einen Wert von 1,3%, während für eine  $\text{OCH}_3$ -Gruppe 9,09% berechnet waren. Nun wurde angenommen, daß die geringe Menge  $\text{CH}_3\text{J}$ , welche bei der Methoxylbestimmung erhalten wurde, nicht, wie *Pohl* erklärte, von einer Verunreinigung stammt, sondern von einem leicht spaltbaren N-Methyl. Man konnte dann auch tatsächlich bei der Methylimidbestimmung genau eine N-Methylgruppe feststellen. Durch Veresterung mit Diazomethan wurde ein Methyl ester erhalten, der nach Sublimation im Hochvakuum Schmp. 280 bis 282° (Zers.) hatte. Dieser Ester ließ sich nur durch mehrstündiges Kochen mit einem großen Überschuß alkoholischer Kalilauge verseifen. Bei der Oxydation der Aristolochiasäure mit  $\text{KMnO}_4$  konnten nur undefinierte Produkte erhalten werden. Die Chromsäureoxydation führte ebenfalls zu keinem Ergebnis.

Die Hydrierung des Methyl esters mit  $\text{PtO}_2$  in Eisessig lieferte einen in organischen Lösungsmitteln blaugrün fluoreszierenden Körper, welcher sich nur sehr schwer reinigen ließ. Die hellgelbe Substanz schmolz bei 312 bis 315° (Zers.) und war in verd.  $\text{NaOH}$  löslich. Die Autoren stellten für diese Verbindung auf Grund ihrer Analysenergebnisse die Formel  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{N} \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$  auf. Durch Acetylierung des hydrierten Methyl esters der Aristolochiasäure erhielten sie eine bei 306 bis 308° schmelzende, gut kristallisierte Verbindung. Auf Grund der C-, H-, N-Analyse wurde die Formel  $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{O}_6\text{N}$  bzw.  $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{N}$  errechnet und (ohne Acetylbestimmung) das Vorliegen einer Diacetylverbindung angenommen. Daraus schlossen die beiden Autoren auf zwei Oxygruppen im Molekül der hydrierten Aristolochiasäure.

Um festzustellen, ob die Aristolochiasäure tatsächlich eine Carboxylgruppe enthält oder ob die sauren Eigenschaften auf eine Enolgruppierung zurückzuführen sind, wie dies *Pohl* sowie *Krishnaswamy* und Mitarbeiter annahmen, führten *Rosenmund* und *Reichstein* Decarboxylierungsversuche durch. Beim Erhitzen mit Cu-Pulver in Chinolin ließ sich glatt 1 Mol  $\text{CO}_2$  abspalten und es bildete sich ein bei 206 bis 212° schmelzender Neutralstoff, dessen Analysen ungefähr auf die Formel  $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_5\text{N}$  stimmten. Schließlich versuchten sie noch die Aristolochiasäure, den Methyl ester und das Decarboxylierungsprodukt mit Ketonreagenzien (Hydroxylamin, Semicarbazid) sowie mit Essigsäureanhydrid in Pyridin zur Reaktion zu bringen. In allen Fällen wurde das Ausgangsmaterial unverändert zurückgewonnen. Ferner wurde noch das Spektrum des Methyl esters und der daraus durch reduktive Acetylierung erhaltenen Verbindung aufgenommen. Eine eindeutige Schlußfolgerung konnten die Schweizer Autoren nach ihren Angaben nicht ziehen, sie erklären aber, daß die Resultate darauf hindeuten, daß möglicherweise eine chinoide Gruppierung vorhanden sei, die durch Reduktion in ein empfindliches Phenol übergeht.

*Rosenmund* und *Reichstein* schreiben ferner, daß sie, ohne einen direkten Beweis angeben zu können, der Vermutung Ausdruck geben möchten, daß das „Aristolochiagelb“ von *Frickhinger*<sup>7</sup>, das „Aristolochin“ von *Pohl*<sup>19</sup>, die „Aristinsäure“ von *Hesse*<sup>21</sup>, die „Aristolochiasäure“ von *Castille*<sup>22</sup> und die „Isoaristolochiasäure“ von *Krishnaswamy* und Mitarbeitern<sup>23</sup> alle ein und dieselbe Substanz darstellen, die sie nach *Hesses* Vorschlag als Aristolochiasäure bezeichnen. Durch Vergleich der bisher angegebenen Schmelzpunkte und Analysenwerte begründen die beiden Autoren ihren Vorschlag.

Inzwischen hat sich am hiesigen Institut *W. Reifschneider*<sup>25</sup> mit der Konstitutionsermittlung der Aristolochiasäure beschäftigt und dabei Ergebnisse erzielt, die für unsere Arbeit sehr förderlich waren und auf die wir im Laufe der weiteren Besprechung hinweisen werden.

Zusammenfassend ergab sich also aus den bisher zitierten Arbeiten folgendes Bild für die Aristolochiasäure: Eine einbasische<sup>19, 23, 24</sup> Carbonsäure<sup>24</sup> der Formel  $C_{17}H_{11}O_7N^{21-24}$  mit einer N-Methyl-, keiner Methoxyl-<sup>21, 23, 24</sup> und keiner Methylendioxygruppe<sup>23</sup>. Die Verbindung enthält nur einen aktiven Wasserstoff<sup>23</sup>. Es ließen sich weder acetylierbare Oxygruppen noch reaktive Ketogruppen nachweisen<sup>23, 24</sup>. Über die Funktion der restlichen fünf Sauerstoffe ließ sich nichts aussagen. Die Aristolochiasäure bzw. ihr Methylester lassen sich reduzieren<sup>19, 22, 24</sup>, wobei sich die Anzahl der Sauerstoffe von sieben auf vier verringert. Für die reduzierte Säure fand *Castille*<sup>22</sup> die Formel  $C_{17}H_{13}O_4N$ , für den hydrierten Ester fanden *Rosenmund* und *Reichstein*<sup>24</sup>  $C_{18}H_{11-13}O_4N$  bzw. für den reduktiv acetylierten Ester  $C_{22}H_{15-17}O_6N$ , was einem Diacetylprodukt der Säure  $C_{17}H_{11-13}O_4N$  entsprechen würde.

Bis zur Drucklegung dieser Arbeit sind inzwischen noch folgende Veröffentlichungen über Inhaltsstoffe aus Aristolochiaarten erschienen. Chemische Untersuchungen der Aristolochiasäure wurden jedoch keine durchgeführt.

*F. H. Shaw* (1947)<sup>26</sup> isolierte Alkaloide aus *Aristolochia elegans*. *C. Barnard* (1949)<sup>27</sup> fand, daß Extrakte von *Aristolochia elegans* positive c-mytotische Wirksamkeit aufweisen. *F. Iannello* (1952)<sup>28</sup> untersuchte die Wirkung des H<sub>2</sub>O-Auszuges von *Aristolochia clematitidis* auf den isolierten Uterusmuskel. *O. Gonçalves De Lima* und Mitarbeiter (1952)<sup>29</sup> fanden in der „Raiz de Indio“ genannten Droge (*Aristolochia* spp.) zwei antibiotisch wirksame Substanzen. *H. Gänshirt* (1953)<sup>30</sup> untersuchte

<sup>25</sup> *W. Reifschneider*, Dissertation Universität Wien (1953).

<sup>26</sup> *F. H. Shaw*, Australas. J. Pharm. 28, 857 (1947).

<sup>27</sup> *C. Barnard*, Austral. J. Sci. 12, 30 (1949).

<sup>28</sup> *F. Iannello*, Boll. Soc. ital. Biol. 28, 474 (1952).

<sup>29</sup> *O. Gonçalves De Lima*, *C. Larios*, *M. Zapata* und *U. Dziendzielewsky*, Ciencia (Mex.) 12, 31 (1952).

<sup>30</sup> *H. Gänshirt*, Naturwiss. 40, 247 (1953); Pharm. Ind. 15, 177 (1953).

wasserdampfvlüchtige Öle im Petrolätherauszug von *Aristolochia clematitidis* und konnte die Aristolochiasäure in den Samen von *Aristolochia clematitidis* mittels einer Farbreaktion lokalisieren. C. A. Kind und V. D. Celentano (1953)<sup>31</sup> identifizierten zwei Steroide im Petrolätherauszug von *Aristolochia serpentaria*. A. Green, C. H. Eugster und P. Karrer (1954)<sup>32</sup> isolierten aus *Aristolochia cymbifera* neben anderen Stoffen eine Säure mit der wahrscheinlichen Formel  $C_{20}H_{32}O_2$ , die sie Aristolochia-cymbiferasäure nannten. J. B. Stenlake und W. D. Williams (1954)<sup>33</sup> fanden im Petrolätherauszug von *Aristolochia reticulata* neben verschiedenen anderen Stoffen ein kristallisiertes Laktone  $C_{15}H_{20}O_2$ , das sie als „Aristolaktone“ bezeichnen.

Wir haben nun bei dem vorher referierten Stand der bisherigen Untersuchungsergebnisse über die Aristolochiasäure mit den Arbeiten zu deren Konstitutionsermittlung begonnen. Als Drogenmaterial für die Isolierung des Naturstoffes verwendeten wir, wie bereits anfangs erwähnt wurde, die Rhizome und Wurzeln der *Aristolochia clematitidis* L. Die getrockneten und fein gemahlenden Wurzeln wurden mit Petroläther entfettet und dann mit Alkohol extrahiert. Nach Aufarbeitung dieses Extraktes wurden die bikarbonatlösliehen Bestandteile, wie im experimentellen Teil näher beschrieben ist, abgetrennt und daraus ein Gemisch gelber Säuren isoliert, in welchem die Aristolochiasäure weitgehend angereichert war. Durch oftmaliges Umlösen aus Dimethylformamid-Alkohol wurde die Verbindung schließlich rein erhalten. Sie hatte im Vak. getrocknet Schmp. 281—286° (Zers.), je nach der Anheizzeit, und die Analysen entsprachen der Formel  $C_{17}H_{11}O_7N$ . Wir haben uns durch eingehende Untersuchungen davon überzeugt, daß wir tatsächlich eine einheitliche und reine Verbindung in Händen hatten. Der Vergleich der Analysenwerte, aber auch die sonstigen Abbauergebnisse aller bisherigen Bearbeiter zeigten uns, daß sie zweifellos Gemische oder zumindest unreine Verbindungen untersucht haben.

Über die genaue Aufarbeitung des sauren Extraktionsanteiles und die Isolierung weiterer Substanzen werden wir demnächst ausführlich berichten.

Die Aristolochiasäure gab mit Diazomethan einen Methylester vom Schmp. 281° und ließ sich mit Cu-Pulver in Chinolin, wie dies bereits *Rosenmund* und *Reichstein* beschrieben haben, decarboxylieren.

Die so erhaltene Verbindung (I) hatte die erwartete Bruttoformel  $C_{16}H_{11}O_5N$  und schmolz bei 212° (R. u. R. geben 206 bis 212° an).

<sup>31</sup> C. A. Kind und V. D. Celentano, J. Org. Chem. 18, 1473 (1953).

<sup>32</sup> A. Green, C. H. Eugster und P. Karrer, Helv. Chim. Acta 37, 1717 (1954).

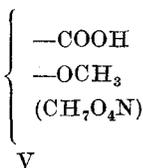
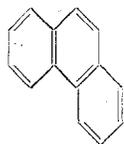
<sup>33</sup> J. B. Stenlake und W. D. Williams, J. Pharm. Pharmacol. 6, 1005 (1954).

Damit war die Carbonsäurenatur der Aristolochiasäure, die ja ebenfalls gelegentlich angezweifelt worden war, bewiesen.

Über die Funktion der restlichen fünf Sauerstoffe im Molekül der Aristolochiasäure war bisher nichts bekannt. Es wurde nur von verschiedenen Autoren behauptet, daß die Verbindung keine Methoxyl-<sup>21, 23, 24</sup> und keine Methylendioxygruppe enthält<sup>23</sup>. Der Naturstoff lieferte bei der üblichen Methoxylbestimmung nach *Zeisel* eine geringe Menge  $\text{CH}_3\text{J}$ , die 1,5% Methoxyl entsprach (ber. für 1  $\text{OCH}_3$  9,09%). Man erklärte dies einerseits durch die nicht genügende Reinheit der Substanz<sup>21</sup>, anderseits mit einer leicht abspaltbaren N-Methylgruppe<sup>24</sup>. Bei der Methylimidbestimmung konnte man dann auch tatsächlich ein Mol  $\text{CH}_3\text{J}$  feststellen.

Wir haben uns mit der eindeutigen Klärung der Frage — Methoxylgruppe oder nicht (bzw. N-Methyl oder nicht) — eingehend beschäftigt. Durch geringe Modifizierung der Methoxylbestimmungsmethode, wobei auf die schlechte Löslichkeit der Aristolochiasäure besonders Bedacht genommen wurde, konnten wir bei sonst gleichen Reaktionsbedingungen für die Säure eindeutig ein Methoxyl und für den Methylester 2 Methoxyle feststellen. Da wir bei einer N-freien Abbauverbindung (II) noch immer ein  $\text{OCH}_3$  fanden und die Kalischmelze der Aristolochiasäure nicht  $\text{NH}_2\text{CH}_3$ , sondern  $\text{NH}_3$  lieferte (*W. Reifschneider*<sup>25</sup> hat das  $\text{NH}_3$  als Pikrat charakterisiert), erscheint auch an dieser Stelle unserer Arbeit die Behauptung bereits gerechtfertigt, daß die Aristolochiasäure eine Methoxyl- und keine N-Methylgruppe enthält. Damit ergab sich für die

Verbindung folgende Formel:  $\text{C}_{15}\text{H}_7\text{O}_4\text{N} \left\{ \begin{array}{l} \text{—COOH} \\ \text{—OCH}_3 \end{array} \right.$  (III), die das Vorhandensein eines mehrfach kondensierten Ringsystems wahrscheinlich machte. Die Zinkstaubdestillation der Aristolochiasäure ergab nun tatsächlich Phenanthren, das sich eindeutig durch Schmp., Mischprobe und das UV-Spektrum identifizieren ließ. Daß das Phenanthrengerüst bereits im Naturstoff vorhanden war und nicht erst nachträglich durch die energischen Bedingungen der Zinkstaubdestillation gebildet wurde, konnten wir durch die weitgehende Ähnlichkeit der UV-Absorptionskurven der decarboxylierten Verbindung (I) und eines anderen Abbauproduktes (IV) mit entsprechenden Phenanthrenderivaten (siehe Abb. 1 und 2) sowie durch weitere Abbauergebnisse, die wir nachfolgend beschreiben werden, beweisen. Damit ergibt sich für die Aristolochiasäure die vorläufige Formel V.



Wir haben dann die Aristolochiasäure in Eisessig katalytisch hydriert, und zwar sowohl mit  $\text{PtO}_2$  als auch mit Pd-Tierkohle als Katalysatoren. Dabei wurden 3 Mole Wasserstoff aufgenommen und unter Austritt von

3 Molen Wasser eine Verbindung (VI)  $C_{17}H_{11}O_4N$  vom Schmp.  $319^\circ$  gebildet. Diese Substanz zeigte weder basische noch saure Eigenschaften (kein aktiver Wasserstoff nach *Zerewitinoff*).

Unter denselben Bedingungen haben wir auch den Aristolochiasäuremethylester hydriert, wieder 3 Mole Wasserstoff verbraucht, und schließlich eine Verbindung isoliert, die sich mit der Substanz (VI), die wir bei

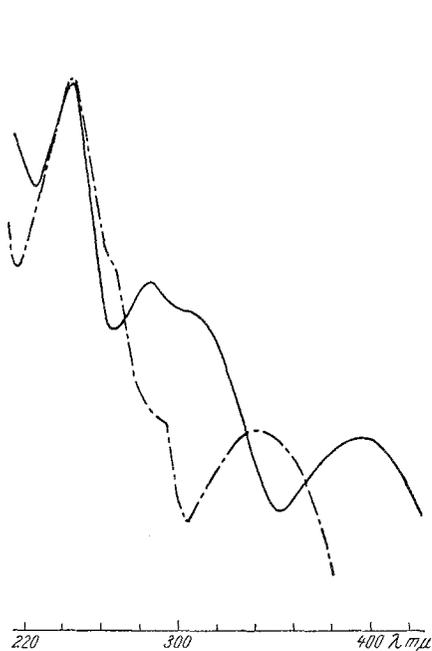


Abb. 1\*. Decarboxylierte Aristolochiasäure (I) —; 9-Nitrophenanthren\*\* - - -; in Äthanol

\* Die UV-Aufnahmen wurden mit einem Beckman-DU-Quarz-Spektrophotometer hergestellt.

\*\* Hergestellt nach *J. Schmidt* und *E. Heinle*, Ber. dtsch. chem. Ges. **44**, 1494 (1911).

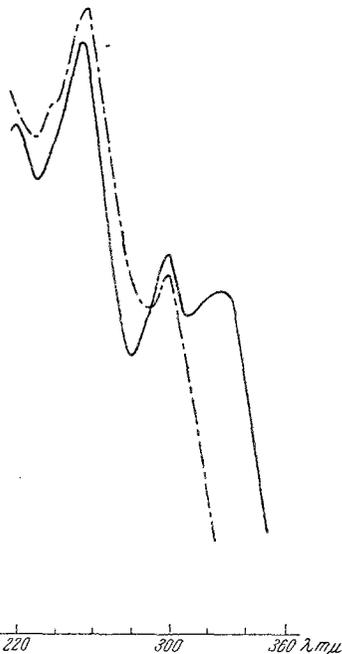


Abb. 2. Acetylderivat (IV) —; 9-Acetylaminophenanthren\* - - -; in Äthanol

\* Hergestellt nach *J. Schmidt* und *M. Strobel*, Ber. dtsch. chem. Ges. **34**, 1465 (1901).

der Hydrierung der Aristolochiasäure erhalten hatten, identisch erwies. Wenn wir nun als unwahrscheinlich annehmen, daß unter der Bedingung der Hydrierung der Ester verseift wird (wir weisen hier auf die besonders schwere Verseifbarkeit des Esters hin), bleibt nur der Schluß, daß die Verbindung zuerst 3 Mole Wasserstoff unter Austritt von 2 Molen Wasser aufnimmt und diese neue Gruppierung nun mit der Estergruppe unter Abspaltung von  $CH_3OH$  bzw. bei der Säure mit der Carboxylgruppe unter Wasserabspaltung reagiert.

Bei der katalytischen Hydrierung der decarboxylierten Aristolochiasäure (I) konnten wir ebenfalls die Aufnahme von 3 Molen Wasserstoff

beobachten. Es wurden hier allerdings nur 2 Mole Wasser abgespalten und eine Verbindung (VII)  $C_{16}H_{13}O_3N$  gebildet, die Schmp.  $170^\circ$  hatte. Diese Verbindung war sehr labil und mußte unter besonderen Vorsichts-

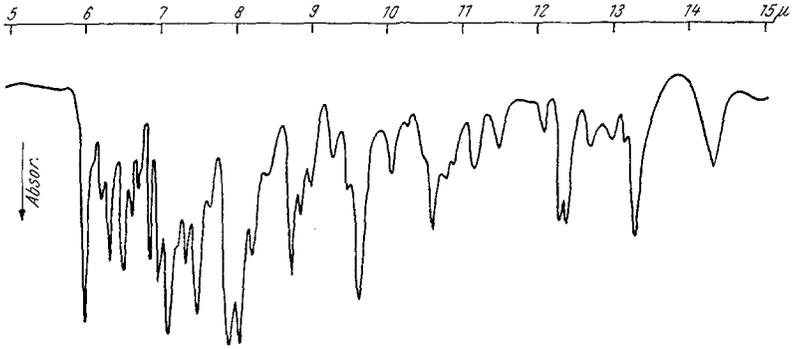


Abb. 3\*. Aristolochiasäure (in KBr)\*\*; Carboxylgruppe: (C=O Valenz.)\*\*\* 5,97,  
Nitrogruppe: 6,48 und 7,45

\* Aufgenommen auf Perkin-Elmer 12 C mit NaCl Prisma und teilweise mit einem double-pass-Gerät.

\*\* Wegen der schlechten Löslichkeit konnten die Verbindungen nur im festen Zustand gemessen werden.

\*\*\* Zuordnung der Banden nach *L. J. Bellamy*, Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution.

maßregeln isoliert werden. Sie war eindeutig basisch, denn sie ließ sich aus ätherischer Lösung mit verdünnten Säuren ausschütteln, und beim Einleiten von trockenem HCl-Gas in die Lösung der Substanz in absolutem

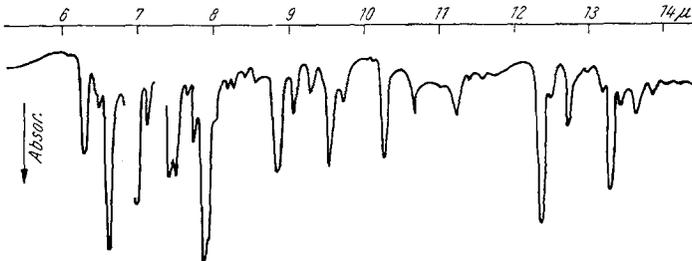


Abb. 4. Decarboxylierte Aristolochiasäure (I) (in Nujol): keine C=O-Bande.  
Nitrogruppe: 6,60 und 7,47; 7,41 (aufgespalten)

Benzol fiel ein weißes Chlorhydrat aus. Mit Essigsäureanhydrid in Benzol wurde ein Acetylderivat gebildet, das wir auch direkt bei der reduktiven Acetylierung der decarboxylierten Aristolochiasäure (I) erhalten konnten.

Diese Befunde ließen sich nur mit dem Vorhandensein einer Nitrogruppe erklären, die bei der Reduktion mit der Carboxylgruppe bzw. der Estergruppe sofort das Laktam (VI) der entsprechenden Aminosäure

liefert. In den UR-Spektren fanden sich nun tatsächlich die für eine Nitrogruppe charakteristischen Banden stark ausgebildet (Abb. 3, 4). Die Base (VII) zeigte die  $\text{NH}_2$ -Banden und ihr Acetylderivat (IV) die  $-\text{CO}-\text{NH}$ -Banden (Abb. 5). Die decarboxylierte Säure und das daraus hergestellte Amin haben keine CO-Banden.

Nach den bisherigen Befunden war die Aufstellung der teilweisen Strukturformel (VIII) möglich, wenn wir alle C-Atome des Phenanthrens mit den bereits identifizierten Gruppen und den restlichen Wasserstoffatomen besetzten.

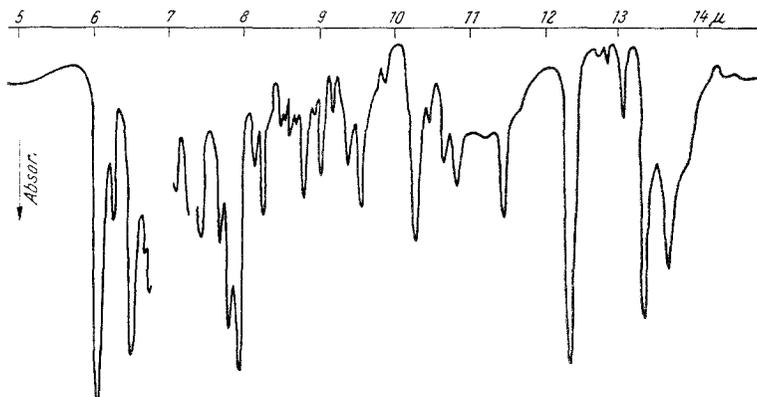
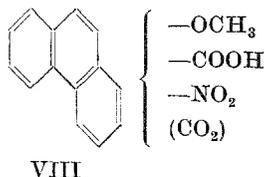


Abb. 5. Acetylderivat (IV) (in Nujol), Amidbande I ( $\text{C}=\text{O}$  Valenz.): 6,05\*, Amidbande II: 6,48. Außerdem hier nicht mehr abgebildet, eine mittelstarke Bande bei 3,11 ( $\text{NH}$ -Valenz.)

\* Ein O-Acetyl müßte diese Bande um 5,70 aufweisen!

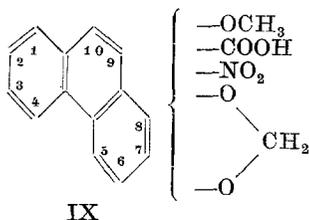
Es verblieben also noch ein C und zwei O, die sich theoretisch in verschiedenen Gruppierungen formulieren lassen, von denen aber alle bis auf eine mit den bisherigen Ergebnissen nicht in Einklang zu bringen sind. Obwohl die Anwesenheit einer Methylendioxygruppe von früheren Bearbeitern verneint wurde<sup>23</sup>, ergab sich aus unseren Überlegungen nur mehr diese Möglichkeit. Die Aristolochiasäure liefert nun mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  allein bereits Grünfärbung, eine Reaktion, die von *Gänshirt*<sup>30</sup> zum Nachweis der Aristolochiasäure in Zellschnitten verwendet wurde. Dies entspricht aber der Nachweisreaktion des Phenanthrens mit Schwefelsäure und Formaldehyd<sup>34</sup>. Auf direktem Wege war daher die Methylendioxygruppe nicht nachweisbar, und wir haben nach einer eindeutigen Methode gesucht, die bei



<sup>34</sup> A. L. Le Rosen, R. T. Moravek und J. K. Carlton, *Analyt. Chem.* **24**, 1335 (1952).

gefärbten Substanzen bzw. bei Phenanthrenderivaten den Nachweis der Methylendioxygruppe gestattet. Die Methode von *Pavolini* und *Malatesta*<sup>35</sup> erwies sich dazu besonders geeignet. Durch Erhitzen der Aristolochiasäure, aber auch des Esters und der decarboxylierten Aristolochiasäure (I) mit  $H_3PO_4$  ließ sich Formaldehyd abspalten und im Destillat nachweisen. Einige Milligramm der Substanz wurden mit 2 bis 3 ml 80%  $H_3PO_4$  versetzt und einige Tropfen abdestilliert. Das Destillat gab in 72%  $H_2SO_4$  mit Chromotropsäure die für Formaldehyd charakteristische Violettfärbung<sup>36</sup>. Dieses Ergebnis fanden wir dadurch bestätigt, daß sich bei einer Abbauverbindung (II), die das Phenanthrengerüst nicht mehr enthält, die Methylendioxygruppe mit der klassischen Methode (Farbreaktion)<sup>37</sup> eindeutig nachweisen ließ.

Damit waren die funktionellen Gruppen der Aristolochiasäure bestimmt und es ergab sich die Formel (IX).



Zur genauen Festlegung des Sitzes der einzelnen Gruppen am Phenanthrengerüst haben wir die decarboxylierte Aristolochiasäure (I) zu einer Diphensäure abgebaut. Bei der Oxydation in Tetrahydrofuran mit Perhydrol wurde in guten Ausbeuten eine farblose Dicarbonsäure (II) erhalten, die noch alle C-Atome des Ausgangsmaterials

enthielt und in der sich noch die Methoxyl- und Methylendioxygruppe bestimmen ließ. Diese Abbausäure (II) hatte die Bruttoformel  $C_{16}H_{12}O_7$  (Schmp. 243°) und lieferte mit Diazomethan einen Dimethylester  $C_{18}H_{16}O_7$  vom Schmp. 114° mit drei  $OCH_3$ -Gruppen.

Dieses Abbauergebnis war ein weiterer Beweis für das Phenanthrengerüst, zeigte aber vor allem, daß die Nitrogruppe am Kohlenstoffatom 9 oder 10 haftet. Da die Aristolochiasäure und der Ester bei der Reduktion ein Laktam gibt, muß also die  $COOH$ -Gruppe an einem geeigneten, benachbarten Kohlenstoffatom sitzen. Dafür kommen nur die Kohlenstoffatome 1 bzw. 8 in Frage.

Bei Behandlung der Abbausäure mit konz.  $HCl$  im Rohr, bei Anwesenheit von Resorcin zur Bindung des Formaldehyds<sup>37</sup>, wurden die Äthergruppen gespalten, und wir konnten nach der Aufarbeitung eine Verbindung (X)  $C_{13}H_8O_4$  vom Schmp. 204° isolieren. Die Analysen und das chemische Verhalten dieser Substanz ließen das Vorliegen von zwei  $OH$ - und einer Laktongruppe an einem Diphenylrest sehr wahrscheinlich erscheinen. In methanolischer Lösung konnte durch Einwirkung von Diazomethan der Dimethyläther (XI), Schmp. 198°, erhalten werden.

<sup>35</sup> *T. Pavolini* und *A. Malatesta*, Ann. Chim. applic. **37**, 495 (1947).

<sup>36</sup> *E. Egegrüwe*, Z. analyt. Chem. **110**, 22 (1937).

<sup>37</sup> *E. Späth* und *H. Quietensky*, Ber. dtsch. chem. Ges. **60**, 1883 (1927).

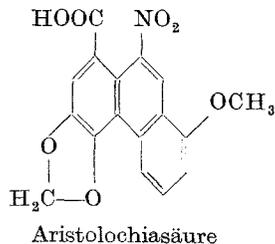
der sich aus Äther mit verd. Lauge nicht ausschütteln ließ, sich aber beim Behandeln mit verd. NaOH in der Wärme langsam löste.

Zur Klärung der Konstitution des Laktons (X) haben wir diesen Dimethyläther (XI) unter Aufspaltung des Laktonringes in verd. Lauge gelöst und dann bei einem pH 8 mit  $\text{KMnO}_4$  oxydiert. Als Oxydationsprodukt erhielten wir o-Methoxyphthalsäure (XII), die wir als Anhydrid charakterisierten. Dieses hatte Schmp.  $160^\circ$  und gab mit einem synthetischen Produkt keine Schmelzpunktsdepression. Somit ergaben sich für die Konstitution des Dihydroxylaktons (X) nur mehr zwei Möglichkeiten (Xa, Xb). Die Entscheidung, ob Formel (Xa) oder (Xb) dem Abbau-lakton entspricht, konnten wir durch Synthese erbringen. Wir haben zuerst das Lakton der 3,2',3'-Trihydroxy-2-biphenylcarbonsäure (Xa) als das wahrscheinlichere Isomere synthetisiert, weil im Falle der anderen Formel (Xb) bei den Bedingungen der Ätherspaltung wahrscheinlich ein Dilaktone entstanden wäre.

1,5,6-Trimethoxy-phenanthren-carbonsäure-10 (XIII), welche auf einem für die Stellung der Methoxylgruppen eindeutigen Weg hergestellt wurde<sup>38</sup>, haben wir mit Natriumbichromat zum 1,5,6-Trimethoxy-phenanthrenchinon-9,10 (XIV) oxydiert. Dieses lieferte dann bei weiterer Oxydation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  die 5,6,3'-Trimethoxy-2,2'-biphenyl-dicarbon-säure (XV). Als wir diese Substanz zur Spaltung der Äthergruppen mit HCl im Einschlußrohr erhitzten, erhielten wir ein Laktone, das der beim Abbau erhaltenen Verbindung (Xa) entsprach. Auch der daraus hergestellte Dimethyläther (XI) war mit dem entsprechenden, aus der Abbauverbindung dargestellten identisch.

Damit ergibt sich nun für die Diphensäure, welche wir bei der Oxydation der decarboxylierten Aristolochiasäure (I) erhalten hatten, die Formel (II). Die beiden Carboxylgruppen dieser Dicarbonsäure entsprechen den Kohlenstoffatomen 9 und 10 des Phenanthrenringes im Naturstoff, von denen eines nach den bisher geschilderten Ergebnissen Träger der Nitrogruppe sein muß. Da die Nitrogruppe bei der Reduktion mit der Carboxylgruppe ein Laktone gibt, kommt also für die Carboxylgruppe als Platz am Phenanthrengerüst nur das Kohlenstoffatom 1 oder 8 in Frage. Das Kohlenstoffatom 8 ist aber mit der Methoxylgruppe besetzt, es kann daher die Carboxylgruppe nur am Kohlenstoffatom 1 haften, und die Aristolochiasäure ist somit eine 3,4-Methylenedioxy-8-methoxy-10-nitro-phenanthren-carbonsäure-(1).

Dieses Ergebnis erscheint vor allem deshalb besonders interessant, weil man bisher nur ganz wenige Stoffe in der Natur auffinden konnte, welche eine Nitrogruppe enthalten.



<sup>38</sup> R. Pschorr und H. Busch, Ber. dtsh. chem. Ges. 40, 2001 (1907).



Wir haben bei eingehender Durchsicht der uns zugänglichen Literatur noch folgende Stoffe mit einer Nitrogruppe feststellen können, möchten uns aber nicht für die Vollständigkeit der Zitate verbürgen.

Als erster Naturstoff mit einer Nitrogruppe wurde das Chloromyceetin erkannt, das 1947 von *J. Ehrlich* und Mitarbeitern<sup>39</sup> im Substrat eines Erdpilzes isoliert wurde. 1949 konnten *C. L. Carter* und *W. J. McChesney*<sup>40</sup> feststellen, daß die Hiptagensäure aus dem Hydrolysat der beiden stereomeren Glucoside Hiptagin aus der Rinde des Baumes *Hiptage mandoblada* und Karakin aus den Beeren des Baumes *Corynocarpus laevigata* mit  $\beta$ -Nitro-propionsäure identisch ist. Diese beiden Glucoside sind damit die ersten Nitroverbindungen aus höheren Pflanzen. 1951 fanden *M. T. Bush* und Mitarbeiter<sup>41</sup> die  $\beta$ -Nitro-propionsäure auch frei im Substrat eines Stammes von *Aspergillus flavus*.

### Experimenteller Teil

#### *Isolierung und Reindarstellung der Aristolochiasäure*

Das fein gemahlene und gut getrocknete Wurzelpulver wurde durch Extraktion mit Petroläther entfettet und mit Äthanol erschöpfend extrahiert. Der Alkohol wurde im Vak. abgedampft und der harzige Rückstand mit verd. Sodalösung und Äther behandelt. Nach Abtrennen der Ätherlösung wurde die Sodalösung mit HCl angesäuert, wobei die rohe Säure in braunen Flocken ausfiel. Die trockene Rohsäure wurde 3mal mit wenig Alkohol am Rückfluß ausgekocht. Der Rückstand wurde nun mehrmals mit verd.  $\text{KHCO}_3$ -Lösung digeriert, bis nichts mehr in Lösung ging. Diese Lösungen wurden nicht vereinigt, sondern einzeln angesäuert, dabei gab die erste Lösung eine braune Fällung, die zusammen mit den alkohol. Auszügen aufgearbeitet wurde. Die rein gelb ausfallenden Niederschläge der weiteren angesäuerten  $\text{KHCO}_3$ -Auszüge wurden vereinigt. Sie enthielten Gemische von Säuren, in welchen die Aristolochiasäure weitgehend angereichert war. Durch oftmalige Kristallisation aus Dimethylformamid-Alkohol 1 : 6 wurde sie schließlich rein erhalten und bildete dann besonders lange, orangerote Fäden, während die ersten Kristallisate in Form gelber Nadeln ausfielen. In Dimethylformamid gelöst und mit heißem Wasser versetzt, fällt die Säure in schönen bernsteinfarbenen, durchsichtigen Tafeln aus. Bei 140° im Vak. getrocknet, hatte die Aristolochiasäure Schmp.<sup>42</sup> 281—286° (Zers.) (abhängig von der Anheizzeit).

$\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{O}_7\text{N}$ . Ber. C 59,82, H 3,25, N 4,11,  $\text{OCH}_3$  9,09,  
Gef. C 59,57, 59,73, H 3,23, 3,28, N 4,41,  $\text{OCH}_3$  9,06, 9,01.

<sup>39</sup> *J. Ehrlich, Q. R. Bartz, R. M. Smith* und *D. A. Joslyn*, Science **106**, 417 (1947).

<sup>40</sup> *C. L. Carter* und *W. J. McChesney*, Nature **164**, 576 (1949).

<sup>41</sup> *M. T. Bush, O. Touster* und *J. E. Brockman*, J. Biol. Chem. **188**, 685 (1951).

<sup>42</sup> Die Schmelzpunkte sind nach *Kofler* unter dem Mikroskop bestimmt und bis 250° auf  $\pm 1^\circ$  genau korrigiert.

*Aristolochiasäuremethylester*

100 mg Aristolochiasäure wurden in 10 ml reinem Dioxan unter Erwärmen gelöst und nach dem Erkalten mit 10 ml äther. Diazomethanlösung, die einem starken Überschuß entsprach, versetzt. Es schieden sich sehr bald Kristalle des gebildeten Esters aus. Nach 2 Stdn. wurde das Lösungsmittel im Vak. vertrieben, der Rückstand in Chloroform aufgenommen und mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung ausgeschüttelt. Das Chloroform wurde dann noch mit Wasser gewaschen, mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und weitgehend eingeeengt. Beim Versetzen dieser Lösung mit heißem Methylalkohol kristallisierte der Aristolochiasäuremethylester in durchsichtigen orangegelben Stäbchen aus. Für die Analyse wurde die Substanz im Hochvak. bei 220 bis 230° sublimiert<sup>43</sup>. Schmp. 281°.

$\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{O}_7\text{N}$ . Ber. C 60,85, H 3,68, N 3,94, 2  $\text{OCH}_3$  17,46.

Gef. C 60,62, 60,73, 60,87, H 3,79, 3,68, 3,65, N 4,06, 4,21,  $\text{OCH}_3$  17,75.

*Decarboxylierte Aristolochiasäure (I)*

100 mg Aristolochiasäure wurden in 16 ml reinem Chinolin mit 100 mg Kupferpulver 10 Min. zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wurde mit Äther aufgenommen, filtriert und mit verd. HCl und dann mit Wasser ausgeschüttelt. Schließlich wurde noch mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und Wasser behandelt, der Äther mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und abgedampft. Der Rückstand wurde in Benzol aufgenommen und diese Lösung über eine kurze  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Säule laufen gelassen. Das Eluat wurde eingedampft und der Rückstand aus  $\text{CHCl}_3$ - $\text{CH}_3\text{OH}$  umgelöst. Ausbeute 74% (bei Aufarbeitung der Mutterlaugen 96%). Die Substanz ließ sich im Hochvak. bei 200° unzersetzt sublimieren. Orangegelbe Stäbchen, Schmp. 212°.

$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_5\text{N}$ . Ber. C 64,65, H 3,73, N 4,71,  $\text{OCH}_3$  10,44.

Gef. C 64,31, H 3,85, N 4,90,  $\text{OCH}_3$  10,07.

*Hydrierung der Aristolochiasäure und des Aristolochiasäuremethylesters*

Die Hydrierung erfolgte in der Mikrohydrierungsapparatur nach *H. Bretschneider* und *G. Burger*<sup>44</sup>. Als Lösungsmittel wurde Eisessig (20 ml) und als Katalysator  $\text{PtO}_2$  nach *Adams* verwendet. Die Lösung der reduzierten Verbindung zeigt eine intensive, blaugrüne Fluoreszenz. Vom Katalysator wurde abfiltriert, das Lösungsmittel im Vak. vertrieben und der Rückstand aus  $\text{CHCl}_3$ - $\text{CH}_3\text{OH}$  (oder Eisessig) umgelöst. Sublimation im Hochvak. bei 230 bis 240° ergab grüngelbe, kleine Nadeln. Schmp 319°.

Für die Säure:

*Verbrauch:* Für 8,20 mg Subst. (22,2°, 739 mm) unter Berücksichtigung des Dampfdruckes des reinen Lösungsmittels ..... 1,832 ml  $\text{H}_2$   
Ber. für 3  $\text{H}_2$  ( $M = 314,27$ ) ..... 1,845 „ „

Für den Ester:

*Verbrauch:* Für 5,94 mg Subst. (21,3°, 746 mm) (Berücksichtigung des Lösungsmitteldruckes wie oben) ..... 1,305 ml  $\text{H}_2$   
Ber. für 3  $\text{H}_2$  ( $M = 355,29$ ) ..... 1,284 „ „

<sup>43</sup> Alle Sublimationen wurden im Kugelrohr durchgeführt; es wird dabei die Temperatur des Luftbades angegeben.

<sup>44</sup> *H. Bretschneider* und *G. Burger*, Chem. Fabrik 11/12, 124 (1937).

$C_{17}H_{13}O_4N$ . Ber. C 69,62, H 3,78, N 4,78,  $OCH_3$  10,58.  
 H-Säure. Gef. C 69,60, H 3,72, N 4,86,  $OCH_3$  10,53.  
 H-Ester. Gef. C 69,67, H 3,84, N 4,65,  $OCH_3$  10,58.

*Hydrierung der decarboxylierten Aristolochiasäure*

Die Hydrierung erfolgte in der bereits erwähnten Apparatur in 20 ml Alkohol mit Pd-Tierkohle als Katalysator. Die anfangs orangegelbe Lösung der Substanz war nach dem Ende der Wasserstoffaufnahme farblos mit intensiv blauer Fluoreszenz. Nach Filtration zur Entfernung des Katalysators wurde unter Durchleiten von gereinigtem Stickstoff im Vak. eingeeengt, bis die ersten weißen Kristalle erschienen. Durch Wasserzusatz wurde die Substanz nun vollkommen ausgefällt, abgesaugt und bei Zimmertemp. im Vak. getrocknet. Für die Analyse wurde ein kleiner Teil im Hochvak. schmelmiert. Bei 160° gingen prismenförmige Kristalle über, die bei 170° schmolzen.

*Verbrauch:* Für 8,01 mg Subst. (14,4°, 749 mm) ..... 1,972 ml  $H_2$   
 Ber. für 3  $H_2$  ( $M = 297,26$ ) ..... 1,960 „ „

$C_{16}H_{13}O_3N$ . Ber. C 71,89, H 4,90, N 5,24.  
 Gef. C 71,94, H 4,87, N 5,21.

*Reduktive Acetylierung der decarboxylierten Aristolochiasäure*

90 mg der Verbindung (I) wurden in 5 ml Essigsäureanhydrid gelöst, mit 0,1 g Natriumacetat und 0,2 g Zinkstaub versetzt und bis zur vollständigen Entfärbung erwärmt. Dann wurde vom Zinkstaub abgessogen und in Wasser aufgenommen. Nachdem alles Essigsäureanhydrid zerstört wurde, fiel die Substanz in Flocken aus. Diese wurden abgesaugt, mit Wasser gewaschen und nach dem Trocknen aus wenig Alkohol umgelöst. Weiße Stäbchen, die im Hochvak. bei 200° sublimieren. Schmp. 274°.

Diese Substanz gab mit der bei direkter Acetylierung der Base (VII) mit Essigsäureanhydrid in Benzol erhaltenen Verbindung keine Depression des Schmp.

$C_{18}H_{15}O_4N$ . Ber.  $COCH_3$  13,9. Gef.  $COCH_3$  12,9<sup>45</sup>.

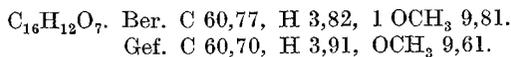
*Zinkstaubdestillation*

Die Aristolochiasäure wurde in Portionen von 20 mg mit einem Überschuß Zinkstaub fein vermahlen und in Glasröhrchen unter Durchleiten von Wasserstoff mit freier Flamme erhitzt, bis das Rohr dunkle Rotglut zeigte. Die geringe Menge an langsam erstarrendem Öl, die sich an den kalten Rohrteilen kondensierte, wurde mit Äther herausgelöst. Die Ausbeuten von 20 Destillationen wurden gesammelt, der Äther vertrieben und der Rückstand bei 10 Torr destilliert. Die Hauptmenge, die bei 150° übergang, wurde in Benzol gelöst und über  $Al_2O_3$  chromatographiert. Unter der UV-Lampe war die Wanderung einer breiten, intensiv blau fluoreszierenden Zone zu beobachten. Die eluierte Substanz wurde noch mehrmals destilliert und schmolz dann wie Phenanthren bei 99°. Mischprobe gab keine Depression, UV-Spektren waren identisch.

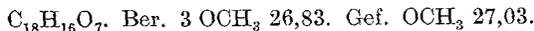
<sup>45</sup> Erst nach 3 Stdn. Verseifungszeit (1 n methanol. NaOH und Pyridin), bei 2 Stdn. Verseifungszeit wurden nur 3,47% gefunden.

*Oxydativer Abbau der decarboxylierten Aristolochiasäure (I)*

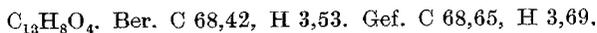
580 mg decarboxylierte Aristolochiasäure wurden in einem Dreihalskolben mit Rührer, Tropftrichter und Rückflußkühler am Wasserbad in 50 ml reinem Tetrahydrofuran gelöst. 25 ml 33%  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurden zugegeben und dann vorsichtig unter Rühren so viel 20%  $\text{NaOH}$ , daß die Lösung stark alkalisch war. Es trat unter Aufschäumen Bildung von zwei Phasen ein. Das Reaktionsgemisch wurde nun unter ständigem Rühren gerade im Sieden erhalten, wozu nur geringes Anheizen nötig war. Bei laufender Zugabe von 33%  $\text{H}_2\text{O}_2$  färbte sich die wäßr. Phase zuerst gelb und dann rot. Durch die Löslichkeit des Tetrahydrofurans in Wasser nahm die organische Schicht mit Zunahme der wäßrigen rasch ab, um schließlich zu verschwinden. Die wäßr. Lösung wurde alkalisch gehalten und die Zugabe von Perhydrol so reguliert, daß keine Ausscheidung der zu oxydierenden Substanz eintrat. (Diese müßte durch Zugabe von Tetrahydrofuran wieder in Lösung gebracht werden.) Insgesamt wurden in 6 Stdn. 450 ml Perhydrol zugetropft, wobei die Färbung der Lösung schließlich hellocker war. Bei längerem Erwärmen auf dem Wasserbad mit absteigendem Kühler zersetzte sich das restliche  $\text{H}_2\text{O}_2$  und gleichzeitig destillierte der größte Teil des Tetrahydrofurans ab. Nun wurde mehrmals mit Äther ausgeschüttelt, die alkalische Lösung mit  $\text{HCl}$  angesäuert und wieder erschöpfend mit Äther extrahiert. Die Ätherlösung wurde mit Wasser gewaschen, mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und bis auf wenige Milliliter eingengt. Nach dem Versetzen mit Chloroform und Vertreiben des restlichen Äthers schieden sich beim Erkalten schöne Kristalle (300 mg) aus, die sich leicht absaugen und aus  $\text{CH}_3\text{OH}\text{-CHCl}_3$  umlösen ließen. Für die Analyse wurde die Substanz (II) im Hochvak. bei  $240^\circ$  vorsichtig sublimiert. Schmp.  $243^\circ$ .



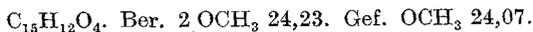
*Dimethylester:* Die Säure (II) wurde in  $\text{CH}_3\text{OH}$  gelöst und mit Diazomethan methyliert. Beim Destillieren im Hochvak. ging bei  $190$  bis  $200^\circ$  ein zähes Öl über, das beim Anreiben mit Äther Kristalle vom Schmp.  $114^\circ$  lieferte.

*Ätherspaltung der Abbausäure (II)<sup>37</sup>*

Die Abbausäure (II) wurde mit 3 Gewichtsteilen Resorzin und 100 Teilen konz.  $\text{HCl}$  im Bombenrohr 3 Stdn. auf  $130^\circ$  erhitzt. Die Lösung färbte sich zuerst grün, dann rot, und schließlich schied sich ein braunrotes, harziges Produkt aus. Die Lösung wurde nach Öffnen des erkalteten Bombenrohres im Vak. zur Trockene gebracht und der Abdampfrückstand im Hochvak. destilliert. Bis  $110^\circ$  ging das Resorzin über, und bei  $160^\circ$  sublimierte die Abbaubindung (Xa). Diese wurde aus Methylalkohol umgelöst und mehrmals sublimiert. Schmp.  $204^\circ$ , Ausbeute 65%.



*Dimethyläther der Verbindung (Xa):* 65 mg der Verbindung (Xa) wurden in  $\text{CH}_3\text{OH}$  gelöst und mit äther. Diazomethanlösung methyliert. Nach Verdampfen des Lösungsmittels ließ sich die Substanz (XI) im Hochvak. zwischen  $170$  und  $180^\circ$  sublimieren. Schmp.  $198^\circ$ , Ausbeute 63 mg.



*Oxydation des Dimethoxylaktons (XI)*

14 mg des Dimethoxylaktons (XI) wurden in 10 ml 1 n NaOH suspendiert und auf dem Wasserbad unter gelegentlichem Umschütteln erwärmt. Nach 1 Std. war vollständige Lösung eingetreten. Durch Zugabe von verd. HCl wurde auf pH 8 gebracht und bei 25° unter Umschütteln eine verd. KMnO<sub>4</sub>-Lösung zugetropft. Das KMnO<sub>4</sub> wurde rasch verbraucht, wobei sich bis zu einer Zugabe von 5 Oxydationsäquivalenten die Lösung orangerot färbte. Nach Zugabe eines weiteren Äquivalentes wurde die Lösung farblos, auch bei längerer Einwirkung wurde kein Oxydationsmittel mehr verbraucht. Das überschüssige KMnO<sub>4</sub> wurde mit Methanol zerstört, der Braunstein durch Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> und Schwefelsäure in Lösung gebracht und die mit NaCl gesättigte Lösung erschöpfend mit Äther extrahiert. Die durch Schütteln mit Wasser gewaschene und mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknete Lösung wurde eingedampft und der Rückstand im Kugelrohr sublimiert. Das Sublimat wurde 3mal aus Äther unter Druck umgelöst. Die kleinen Prismen schmolzen bei 160° und zeigten im Gemisch mit o-Methoxyphthalsäureanhydrid<sup>46</sup> keine Schmp.-Depression.

*Zur Methoxylbestimmung*

Die Methoxylbestimmung wurde mit der Apparatur von A. Elek<sup>47</sup> durchgeführt. Die Einwaagen, die zwischen 3 und 5 mg lagen, wurden mit 0,3 ml Propionsäureanhydrid im Reaktionskölbchen in der Wärme gelöst und nach dem Erkalten mit 2 ml konstant siedender HJ und 0,5 ml HJ der Dichte 1,96 versetzt. Die Zugabe der höherkonzentrierten HJ war zum Ausgleich der Konzentrationsverminderung durch die relativ große Lösungsmittelmenge notwendig. Auf diese Weise erhielten wir unter Anwendung der üblichen Reaktionsbedingungen bei 45 Min. bis 1 Std. Kochzeit sowohl bei der Aristolochiasäure als auch bei deren Derivaten [Methylester, decarboxylierte Verbindung (I)] die entsprechenden richtigen Analysenwerte.

*Synthese des Laktons der 3,2',3'-Trihydroxy-2-biphenylcarbonsäure (Xa)*

1,5,6-Trimethoxy-phenanthrenchinon-9,10 (XIV): 1 g 1,5,6-Trimethoxyphenanthren-carbonsäure-(10) (XIII) wurde in 30 ml Eisessig bei 100° gelöst und mit einer heißen Lösung von 2 g Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> in 1 ml H<sub>2</sub>O und 2 ml Eisessig langsam versetzt. 1/2 Std. wurde bei 100° belassen, dann mit Wasser versetzt, abgekühlt und mehrmals mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformlösung wurde mit verd. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Sodalösung und Wasser gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und eingedampft. Der orangerote Rückstand ließ sich aus Benzol-Petroläther umlösen. Ausbeute 590 mg (60%). Für die Analyse wurde ein kleiner Teil im Hochvak. bei 160° sublimiert, orange-gelbe Stäbchen vom Schmp. 167°.

C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>. Ber. C 68,45, H 4,73, OCH<sub>3</sub> 31,21.

Gef. C 68,52, H 4,95, OCH<sub>3</sub> 31,36.

5,6,3'-Trimethoxy-2,2'-biphenyldicarbonsäure (XV): 600 mg 1,5,6-Trimethoxyphenanthrenchinon-9,10 (XIV) wurden in 25 ml Methylalkohol gelöst, mit 1,5 ml 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt und die Lösung mit 2 ml 20% NaOH alkalisch gemacht. Bei vorsichtigem Anwärmen war nach kurzer Zeit die

<sup>46</sup> Hergestellt nach A. Corbellini und M. Rossi, Gazz. chim. ital. 61, 281 (1931).

<sup>47</sup> A. Elek, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. 11, 174 (1939).

gelbe Farbe des Ausgangsmaterials verschwunden, worauf mit 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und das  $\text{CH}_3\text{OH}$  im Vak. vertrieben wurde. Die wäßr. Lösung wurde mehrmals mit Äther ausgeschüttelt und hierauf angesäuert, wobei die Säure in gelblichen Flocken ausfiel. Aus Methylalkohol umgelöst und im Hochvak. bei  $250^\circ$  sublimiert, hatte die Säure (XV) Schmp.  $261^\circ$ .

$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_7$ . Ber. C 61,44, H 4,85, 3  $\text{OCH}_3$  28,02.

Gef. C 61,13, H 4,57,  $\text{OCH}_3$  27,90.

*Lakton der 3,2',3'-Trihydroxy-2-biphenylcarbonsäure (Xa)*: 200 mg Trimethoxydiphensäure (XV) wurden mit 75 ml konz. HCl im Bombenrohr 3 Stdn. auf  $130^\circ$  erhitzt. Die Reaktionslösung wurde im Vak. eingedampft und der Rückstand im Hochvak. bei 160 bis  $170^\circ$  sublimiert (120 mg). Nach 2maligem Umlösen aus  $\text{CH}_3\text{OH}$  und nochmaliger Sublimation lag der Schmp. bei  $203^\circ$ . Im Gemisch mit der Abbaubindung (X) zeigte dieses synthetische Produkt keine Depression.

Der Dimethyläther des synthetischen Laktons (Xa) hatte wie der Dimethyläther der Abbaubindung Schmp.  $198^\circ$  und gab im Gemisch mit diesem ebenfalls keine Schmp.-Depression.

Wir danken der Österreichischen Akademie der Wissenschaften für eine finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und den Herren Dr. G. Kainz für die Ausführung der Mikroanalysen und F. Grass für die Aufnahme und Interpretation der UR-Spektren.