

ZWEI STARK BITTERE GLUCOSIDE AUS SWERTIA JAPONICA MAKINO:  
AMAROGENTIN UND AMAROSWERIN

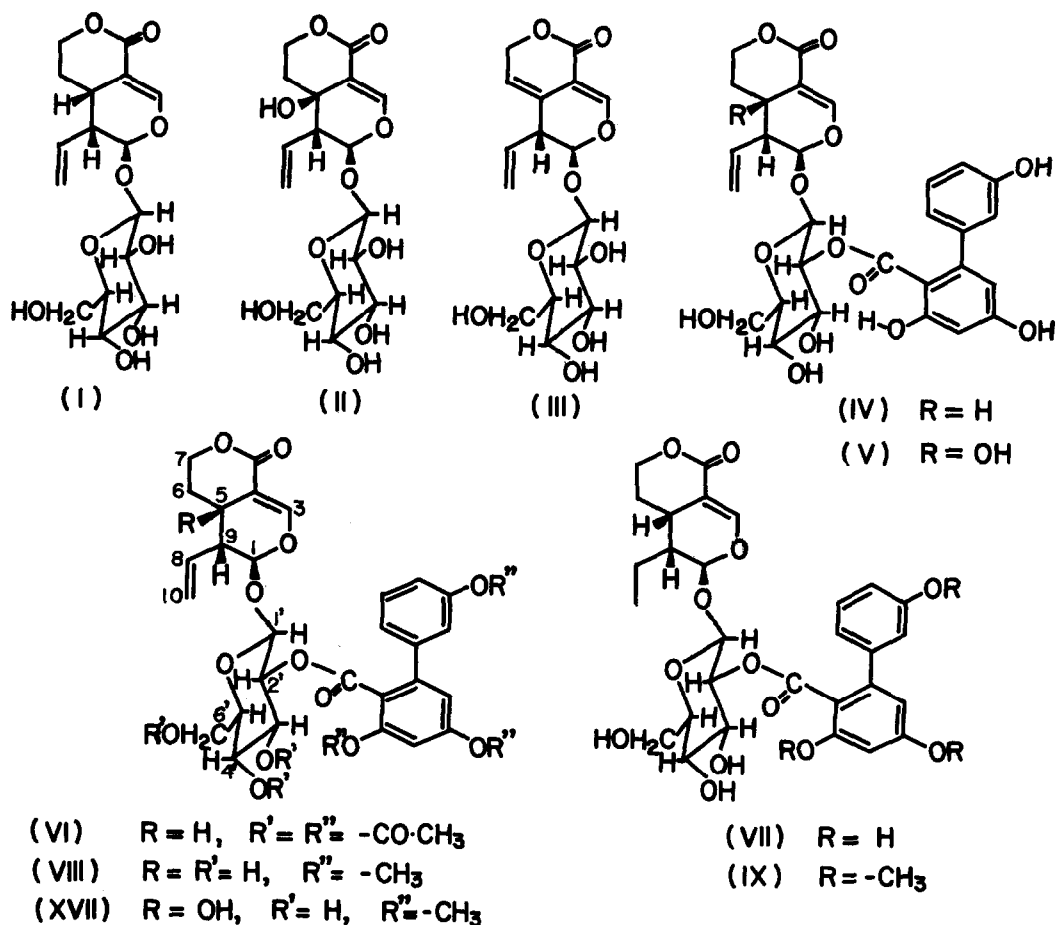
Hiroyuki Inouye und Yushin Nakamura

Pharmazeutische Fakultät der Universität Kyoto, Sakyo-ku, Kyoto, Japan

(Received in Germany 20 August 1968; received in UK for publication 26 August 1968)

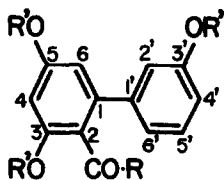
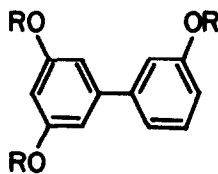
Beim Studium der Bitterstoffe aus *Swertia japonica* Makino (japanischer Name Semburi) konnten wir neben den schon berichteten Secoiridoidglucosiden<sup>1)</sup>, Swerosid (I), Swertiamarin (II) und Gentiopicrosid (III), zwei weitere stark bittere Glucoside isolieren, die noch in einer Verdünnung von  $10^{-6}$  bitter schmecken: das Amarogentin (IV), das früher von Korte<sup>2)</sup> aus *Gentiana*- sowie *Swertia*-Arten isoliert worden war, und ein neues (V), das Amaroswerin benannt wurde.

Amarogentin (IV),  $C_{29}H_{30}O_{13} \cdot H_2O$ , stellt farblose Nadeln vom Schmp. 229-230° und  $(\alpha)_D^{20} -116,6^\circ$  (MeOH) dar. Das UV-Spektrum mit den Absorptionen bei 230, 266 und 306 m $\mu$  ( $\log \epsilon$  4,46, 4,07 u. 3,68), IR-Banden bei 1655 sowie 1580  $cm^{-1}$ , die NMR-Signale für 6 arom. Protonen bei 2,66-3,87  $\tau$  und die positive Gibbs'sche Reaktion deuten darauf hin, dass es als Teilstruktur einen Phenolcarbonsäureester hat. Die IR-Banden bei 1680 sowie 1610  $cm^{-1}$  und das NMR-Signal bei 2,57  $\tau$  (d, J= 2 Hz), die den Iridoid- sowie den Secoiridoidglucosiden charakteristisch sind, liefern weiter den Hinweis für das Vorliegen des Carboxydhidropyranrings. (IV) ergibt bei der Acetylierung das Hexaacetat (VI) ( $C_{41}H_{42}O_{19} \cdot 2H_2O$ ; NMR ( $CDCl_3$ ): 7,68-7,72  $\tau$  (3  $\times$  aliph.  $-OCOCH_3$ ), 7,95-8,02  $\tau$  (3  $\times$  phenol.  $-OCOCH_3$ )) und liefert bei katalytischer Hydrierung mit Pd-Kohle den Dihydrokörper (VII) ( $C_{29}H_{32}O_{13} \cdot H_2O$ ; Schmp.: 177-179°; NMR ( $CDCl_3$ ): um 9,03  $\tau$  (m,  $-CH-CH_2-CH_3$ )). (IV) ergibt weiter bei der Methylierung mit  $CH_2N_2$  den Trimethyläther (VIII),  $C_{32}H_{36}O_{13} \cdot H_2O$ , der weiterhin durch katalytische Hydrierung über Pd-Kohle den Dihydrotrimethyläther (IX),  $C_{32}H_{38}O_{13} \cdot H_2O$ , liefert. Statt der Bande bei 1655  $cm^{-1}$ , die im Spektrum von (IV) und (VII) auftritt, findet man im IR von (VIII) und (IX) eine neue Bande

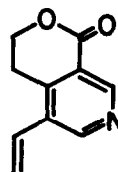


bei  $1720\text{ cm}^{-1}$ . Diese Verschiebung der Bande, die man auch bei der Acetylierung von (IV) sieht, lässt sich dadurch erklären, dass die Chelatisierung zwischen einer phenol. OH- und der benachbarten Estergruppe durch die Methylierung (evtl. Acetylierung) aufgehoben ist.

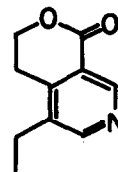
Auf Grund der oben erwähnten Befunde und der Tatsache, dass das IR- sowie das NMR-Spektrum von (IV) bzw. (VI) denen des Swerosids (I) bzw. seines Acetats teilweise sehr ähnlich sind, kann man folgern, dass es sich beim Amarogentin (IV) um einen Phenolcarbonsäureester von (I) handelt. Da das Amarogentin jedoch der Hydrolyse durch Mineralsäure und  $\beta$ -Glucosidase widersteht, versuchten wir nach den Beispielen des Swertiamarins (II) und des Gentiopicrosids (III)<sup>3)</sup> diesen Stoff (IV) und dessen Dihydroderivat (VII) mit methanol. Ammoniak stehenzulassen und darauf mit HCl zu kochen. Dabei erhielten wir aus (IV) als Base in sehr

(XI) R = -OCH<sub>3</sub>, R' = H(XIII) R = -NH<sub>2</sub>, R' = H(XV) R = -OCH<sub>3</sub>, R' = -CH<sub>3</sub>

(XII) R = H

(XVI) R = -CH<sub>3</sub>

(X)



(XIV)

geringer Menge Gentianin (X) und als nichtbasische Substanzen die drei Stoffe (XI), (XII) sowie (XIII), ferner aus (VII) das Dihydrogentianin (XIV) und die oben erwähnten drei nichtbasischen Stoffe. Auf der anderen Seite wurde bestätigt, dass das Swerosid (I) bei dieser Reaktion auch in sehr geringer Menge das (X) und das Dihydroswerosid das (XIV) liefert. Damit war annähernd bewiesen, dass das Amarogentin den Genanteil des Swerosids (I) als Teilstruktur hat.

Aus den spektralen Daten der Verbindung (XI) (C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>; MS: M<sup>+</sup>260; Schmp.: 138-138,5°; UV: λ<sub>max</sub><sup>MeOH</sup> 216, 226 (Schulter), 265 und 300 mμ (log ε 4,29, 4,24, 4,10 sowie 3,90); NMR (CD<sub>3</sub>OD): 2,67-3,80 τ (6 arom. Protonen) und 6,55 τ (-OCOCH<sub>3</sub>)), die durch die Methylierung mit CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> den Trimethyläther (XV), C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>, liefert, liegt es nun nahe, dass es sich bei der Substanz (XI) um eine Diphenylverbindung mit 3 phenol. OH- sowie einer COOCH<sub>3</sub>-Gruppe handelt. Im NMR-Spektrum der Substanz (XII) (C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>; MS: M<sup>+</sup> 202; Schmp.: 182-183°), die auch bei der Methylierung den Trimethyläther (XVI), C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>, ergibt, findet man die Signale der 7 Benzolprotonen, während das der COOCH<sub>3</sub>-Gruppe fehlt. So lässt sich folgern, dass es sich bei der Substanz (XII) (od. (XVI)) um ein Produkt handelt, das aus (XI) (od. (XV)) durch Abspaltung einer COOCH<sub>3</sub>-Gruppe entstanden ist.

Die Struktur des 3,5,3'-Trimethoxydiphenyls für das (XVI) ergibt sich aus der Analyse des Doppelresonanzspektrums: So erscheinen die Protonen an C-2 und C-6 in meta-Kopplung mit dem Proton an C-4 bei 3,27 τ (d, J = 2 Hz), während das letztere bei 3,53 τ (t, J = 2 Hz) auftritt. Andererseits steht das Proton an C-4', das bei 3,12 τ als Multiplett (J<sub>4',5'</sub> = 7 Hz, J<sub>4',2'</sub> = J<sub>4',6'</sub> = 1,5 Hz) erscheint, in ortho-Kopplung mit dem Proton an C-5' (2,65 τ, t, J = 7 Hz) und in meta-Kopplung mit denen an C-2' sowie C-6'.

Einen endgültigen Beweis für diese Struktur lieferte schliesslich die Synthese der Verbindung (XVI) ( $C_{15}H_{16}O_3$ ; MS:  $M^+$  244) durch Kondensation des 3,5-Dimethoxy-jodbenzols mit 3-Methoxy-jodbenzol.

Die Lage der  $COOCH_3$ -Gruppe in den Verbindungen (XI) und (XV) wird nun aus den folgenden Gründen gefolgert: Die Verschiebung der IR-Bande bei  $1650\text{ cm}^{-1}$  von (XI) zu  $1715\text{ cm}^{-1}$  in (XV), die schon bei der Überführung von (IV) zu seinem Trimethyläther (VIII) (evtl. Hexaacetat (VII)) beobachtet wurde, weist darauf hin, dass die  $COOCH_3$ -Gruppe in (XI) einer OH-Gruppe benachbart ist. Unter den so für diese Gruppe möglich gewordenen Stellungen 2, (=6), 4, 2' und 4' kommen nun nur die Stellen 2 (=6) und 4 in Frage und zwar aus den NMR-Befunden von (XI), die zeigen, dass die Signale der 2 Protonen bei  $3,66\tau$  und  $3,75\tau$  als Folge der meta-Kopplung als AB-Quartett ( $J = 2,5\text{ Hz}$ ) erscheinen. Befände sich diese  $COOCH_3$ -Gruppe dabei in Stellung 4, müssten die Protonen an C-Atomen 2 und 6 äquivalent sein und als Singulett erscheinen. Da es aber nicht der Fall ist, kann man ihr die Stellung 2 und der Substanz (XI) die Struktur des 3,5,3'-Trihydroxydiphenyl-2-carbonsäure-methylesters zuschreiben. Auf Grund dieser Struktur kann man auch der Substanz (XIII) ( $C_{13}H_{11}O_4N$ ; Schmp.:  $93-95^\circ$ ; MS:  $M^+$  245) die Struktur als das entsprechende Säureamid zuerkennen.

Aus den oben erwähnten Tatsachen geht hervor, dass es sich beim Amarogentin um einen Ester der 3,5,3'-Trihydroxydiphenyl-2-carbonsäure mit dem Swerosid oder dessen Verwandten handeln muss.

So haben wir zunächst die Verseifung des Trimethylamarogentins (VIII) mittels  $Ba(OH)_2$  versucht, wobei die Hydrolysate je nach der anschliessenden Methylierung bzw. Acetylierung den Ester (XV) bzw. das Swerosid-tetraacetat ergaben. Auf Grund dieser Tatsache und der oben erwähnten Befunde, dass das Amarogentin-hexaacetat (VI) 3 alkohol. sowie 3 phenol. Acetylgruppen besitzt, liegt es nahe, dass die Phenolcarbonsäure im Amarogentin mit einer OH-Gruppe des Zuckerteils des Swerosids (I) verestert ist.

Die Verknüpfungsstelle der Phenolcarbonsäure im Zuckerteil ergibt sich wieder aus den Doppelresonanzversuchen: Im NMR-Spektrum des (IV) erscheint ein einem Proton entsprechendes Triplett ( $J = 8\text{ Hz}$ ) bei  $5,25\tau$ , das mit einem Proton in Kopplung steht, dessen Signal bei  $5,72\tau$  auftritt. Da sich aus dieser Kopplungs-

konstante folgern lässt, dass die beiden Protonen in trans-diaxialer Stellung stehen, und da das letztere Signal dem Proton an C-1' der Glucoside zuzuschreiben ist<sup>\*)</sup>, sollte das erstere dem Proton an C-2' entstammen. Die Verschiebung des Protons an C-2' zu einem so niedrigen Feld kann nur durch die Esterbildung der OH-Gruppe am betreffenden C-Atom mit einer Säure zustandekommen. Für diese Annahme spricht auch das Resultat der Perjodat-Oxydation des (IV) und des (VIII), wobei nur ein Mol Perjodat verbraucht wird. Der Widerstand des Glucosids gegen Hydrolyse ist auch damit erklären. Auch im Hinblick auf die kürzlich von uns klargestellte Absolutstruktur des Swerosids<sup>4)</sup> schlagen wir daher für Amarogentin die absolute Struktur (IV) vor.

Amaroswerin (V),  $C_{29}H_{30}O_{14} \cdot H_2O$ , stellt ein farbloses amorphes Pulver mit  $(\alpha)_D^{20} -13,0^\circ$  (MeOH) dar. Sein UV-, sein IR- und sein NMR-Spektrum zeigt, wie man im folgenden sieht, eine grosse Ähnlichkeit mit dem jeweiligen Spektrum des Amarogentins (IV): UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  227, 271 u. 307 m $\mu$  ( $\log \epsilon$  4,46, 4,03 u. 3,65); IR (Nujol): 1685, 1640, 1610, 995 sowie 900  $\text{cm}^{-1}$ ; NMR ( $CD_3OD$ ): 2,58  $\tau$  (s,  $-\overset{\text{COO}}{\text{C}}=\text{CH}-\text{O}-$ ) u. 2,62-3,82  $\tau$  (6 Benzolprotonen).

Der einzige wichtige Unterschied zwischen den NMR-Spektren der beiden Substanzen ist, dass das Signal des Protons an C-3 beim Amaroswerin (V) als Singulett bei 2,58  $\tau$ , dagegen beim Amarogentin (IV) als Dublett erscheint. Diese Tatsache führt zur Annahme, dass an C-5 des Secoiridoidteils von (V) kein Proton vorhanden ist. Amaroswerin (V) liefert weiter bei der Behandlung mit methanol. Ammoniak, gefolgt von Kochen mit HCl, als Base das Gentianin (X) und als nicht-basische Substanzen die Verbindungen (XI), (XII) und (XIII). Auch unter Berücksichtigung seiner Zusammensetzung liegt es folglich nahe, dass es sich bei diesem Stoff um einen Ester des Swertiamarins (II) mit der 3,5,3'-Trihydroxydiphenyl-2-carbonsäure handelt. Diese Vermutung wurde wieder durch Hydrolyse des Trimethylamaroswerins (XVII) mit  $Ba(OH)_2$  bewiesen, wobei sich durch die Aufarbeitung genauso wie oben beim Amarogentin das Swertiamarin-tetraacetat und der Trimethoxydiphenylcarbonsäure-methylester (XV) erhalten liessen.

Die Bindungsstelle der Acylgruppe im Zucker wurde auch aus der Erwägung der Daten des NMR-Spektrums und dem Ergebnis der Perjodat-Oxydation des (V) als am C-2' bewiesen.

So erteilen wir auf Grund der Absolutstruktur des Swertiamarins<sup>4)</sup> dem Amaroswerin die Struktur (V).

Herrn Professor Korte von der Universität Bonn sind wir für die Identifizierung unserer Substanz mit seinem authentischen Amarogentin sehr dankbar. Wir danken den Herren Dr. K. Hozumi und Dr. T. Shingu von unserer Fakultät für die Durchführung der Mikroanalysen und für die Aufnahme der NMR-Spektren. Für die finanzielle Beihilfe sind wir ferner der Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung des japanischen Kultusministeriums zu Dank verpflichtet.

#### LITERATUR UND ANMERKUNG

- 1) H. Inouye, S. Ueda und Y. Nakamura: *Tetrahedron Letters* 1966, 5229.
- 2) F. Korte: *Chem. Ber.* 88, 704 (1955); *ibid.* 89, 2404 (1956).
- 3) T. Kubota und Y. Tomita: *Bull. Soc. Chem. Japan* 34, 1345 (1961); T. Kubota und T. Kamikawa: *ibid.* 35, 1046 (1962).
- \* ) Beim Swerosid erscheint das Signal des Protons an C-1' bei 5,10  $\tau$ .
- 4) H. Inouye, T. Yoshida, Y. Nakamura und Y. Tobita: *Tetrahedron Letters* 1968, im Druck.