

## ÜBER DIE MONOTERPENGLUCOSIDE UND VERWANDTE NATURSTOFFE—XIV<sup>1,2</sup>\*

### DIE STRUKTUR DER BEIDEN STARK BITTER SCHMECKENDEN GLUCOSIDE AMAROGENTIN UND AMAROSWERIN AUS *SWERTIA JAPONICA*

H. INOUE und Y. NAKAMURA

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

(Received in Germany 7 November 1970; Received in the UK for publication 18 November 1970)

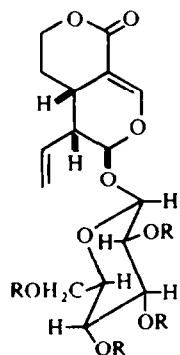
**Zusammenfassung**—Die Struktur der beiden stark bitter schmeckenden Glucoside Amarogentin (IV) und Amaroswerin (V) wurde jeweils als Swerosid- und Swertiamarin-2'-3'',5'',3'''-trihydroxydiphenyl-2''-carbonsäureester aufgeklärt. Daneben wurde auch die Biogenese der 3.5.3'-Trihydroxydiphenyl-2-carbonsäure (XX) diskutiert.

**Abstract**—The structure of two strongly bitter glucosides, amarogentin (IV) and amaroswerin (V), have been established as sweroside- and swertiamarin-2'-3'',5'',3'''-trihydroxydiphenyl-2''-carboxylic acid ester. The biogenesis of 3.5.3'-trihydroxydiphenyl-2-carboxylic acid (XX) is discussed.

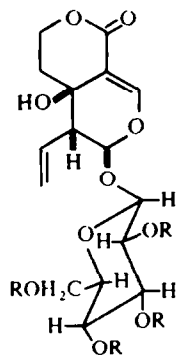
FRÜHER haben wir aus *Swertia japonica* Makino (jap. Name, Semburi) 5 Bitterstoffe, Swerosid (I), Swertiamarin (II), Gentiopicrosid (III), Amarogentin (IV) und Amaroswerin (V), isoliert und die Struktur der ersten 3 Stoffe aufgeklärt.<sup>3,4</sup> Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Strukturaufklärung der letzteren 2 Stoffe, Amarogentin und Amaroswerin, die die Hauptrolle als Amara dieser Pflanze spielen. Dabei wird auch die Biogenese der Trihydroxydiphenylcarbonsäure erörtert, die in den beiden Glucosiden als Ester gebunden ist. Während das Amarogentin zuerst von Korte<sup>5</sup> aus einer Gentiana- sowie einer Swertiaart isoliert worden war, wurde unsere Substanz von ihm als IV identifiziert. Amaroswerin stellt einen neuen Stoff dar. Es handelt sich bei den beiden Substanzen um die bisher bittersten bekannten Stoffe, die noch in einer Verdünnung von 10<sup>-6</sup> bitter schmecken.

A Die Struktur des Amarogentins. Amarogentin (IV) kristallisiert in farblosen Nadeln, C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>O<sub>13</sub>·H<sub>2</sub>O, vom Schmp. 229–230° sowie  $[\alpha]_D^{20} -116.6^\circ$  (MeOH). IV zeigt im UV Absorptionen bei 230, 266 und 306 nm (log  $\epsilon$  4.46, 4.07 und 3.68) und im IR (Nujol) Banden bei 3250, 1680, 1655, 1610, 1580, 980 sowie 900 cm<sup>-1</sup>. Die Signale seines NMR-Spektrums werden zusammen mit denen seiner Abkömmlinge in der Tabelle 1 dargestellt. UV-Absorptionen, die IR-Banden bei 1655 und 1580 cm<sup>-1</sup>, NMR-Signale bei  $\tau$  2.66–3.87 (6 Protonen) und die positive Gibbs'sche Reaktion weisen zusammen mit den Befunden, die im folgenden erwähnt werden, darauf hin, dass die Substanz IV ein Phenolcarbonsäureester ist. IV liefert bei der Acetylierung mit Essigsäureanhydrid-Pyridin ein weisses Pulver und zwar das Hexaacetat (VI), C<sub>41</sub>H<sub>42</sub>O<sub>19</sub>·2H<sub>2</sub>O. VI zeigt im IR Banden bei 1750, 1700, 1620, 1605 und 1580 cm<sup>-1</sup> und im NMR-Spektrum (CDCl<sub>3</sub>) Signale von je 3 Acetylprotonen bei  $\tau$  7.68–7.72

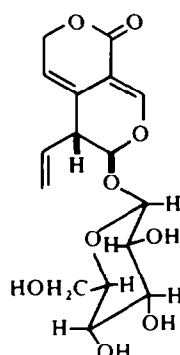
\* Herrn Professor Dr. Kurt Mothes zum 70. Geburtstag gewidmet.



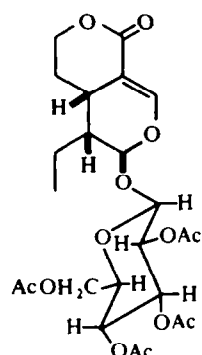
I: R = H  
X: R = Ac



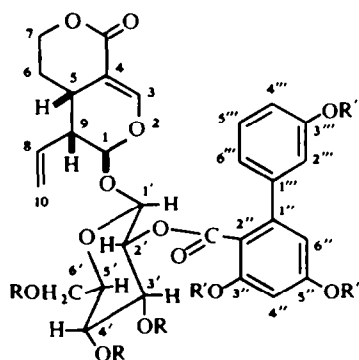
II: R = H  
XXII: R = Ac



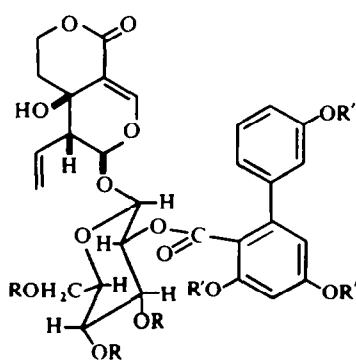
III



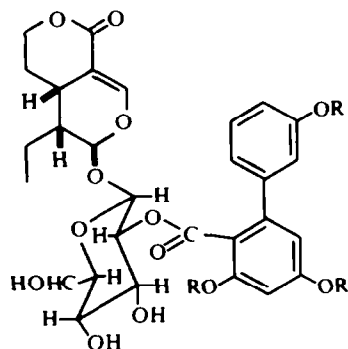
XVII



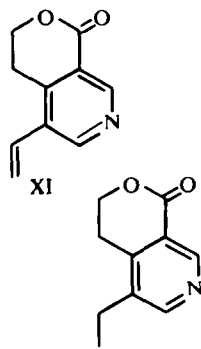
IV: R = R' = H  
VI: R = R' = Ac  
VII: R = H, R' = CH<sub>3</sub>



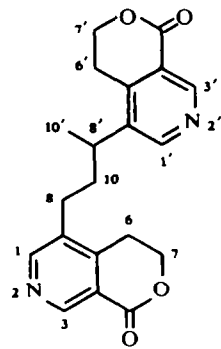
V: R = R' = H  
XXI: R = H, R' = CH<sub>3</sub>



VIII: R = H  
IX: R = CH<sub>3</sub>



XVI



XII

und bei  $\tau$  7.95–8.02. IV ergibt weiter bei der Methylierung mit Diazomethan ein weisses Pulver nämlich den Trimethyläther (VII),  $C_{32}H_{36}O_{13} \cdot H_2O$ . Sein NMR-Spektrum zeigt Signale von 3  $OCH_3$ -Gruppen bei  $\tau$  6.15–6.20. Diese Befunde sprechen für das Vorhandensein von 3 phenol. OH-Gruppen in Amarogentin (IV). IV ergibt ferner bei der katalytischen Hydrierung über Pd-Kohle Dihydroamarogentin (VIII),  $C_{29}H_{32}O_{13} \cdot H_2O$ , vom Schmp. 177–179°. In seinem NMR-Spektrum fehlen die Signale von drei Vinylprotonen bei  $\tau$  4.56–4.77, die sich im Spektrum von IV beobachten lassen, dafür erscheint jedoch das Multipllett der Gruppe  $-CH_2CH_3$  bei  $\tau$  9.03. Diese Daten sprechen eindeutig dafür, dass die Verbindung (IV) genauso wie Swerosid (I) eine Endvinylgruppe besitzt.

VII liefert bei der katalytischen Hydrierung über Pd-Kohle Dihydroamarogentin-trimethyläther (IX),  $C_{32}H_{38}O_{13}$ , der auch im NMR-Spektrum das Multipllett der Methylgruppe bei ungefähr  $\tau$  9.00 zeigt. Die Bande bei  $1655\text{ cm}^{-1}$ , die im IR-Spektrum von IV und VIII beobachtet wird, fehlt im Spektrum von VII und IX, statt dessen erscheint darin eine Bande bei  $1720\text{ cm}^{-1}$ . Diese Erscheinung, die auch bei der Überführung von IV in sein Acetat beobachtet wird, lässt sich damit leicht erklären, dass die Chelatbildung zwischen der Ester bildenden Carboxylgruppe und einer phenolischen Hydroxylgruppe durch Methylierung sowie Acetylierung der letzteren nicht mehr möglich ist, und folglich, dass eine phenol. Hydroxylgruppe der Carboxylgruppe benachbart ist.

Im Hinblick auf die Tatsache, dass IR- sowie NMR-Spektrum von IV und VI teilweise denen des Swerosids (I) sowie seines Acetats (X) sehr ähnlich sind, und auch auf die obigen Befunde, ist die Annahme naheliegend, dass es sich beim Amarogentin (IV) um einen Phenolcarbonsäureester des Swerosids handelt. Andererseits hat Amarogentin (IV) aber eine als Glucosid unverständliche Eigenschaft. Es widersteht sehr stark einer Hydrolyse durch Mineralsäure und lässt sich kaum durch  $\beta$ -Glucosidase verseifen.

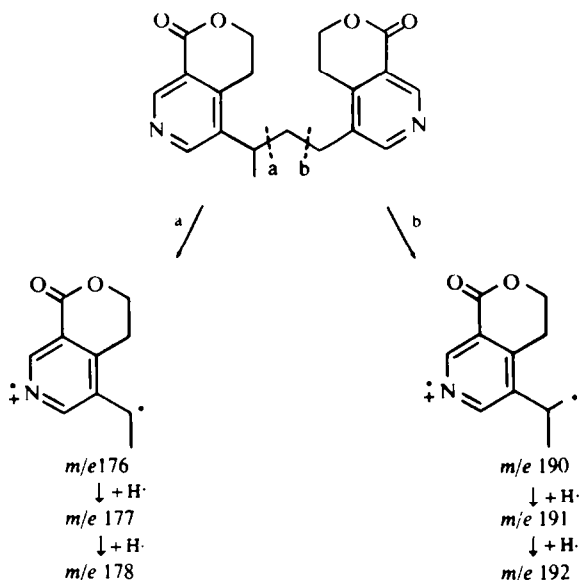
Auf Grund der Angaben von Kubota und seinen Mitarbeitern,<sup>6</sup> dass Swertiamarin und Gentiopicrosid bei der Einwirkung von Ammoniak, gefolgt von Salzsäure, Gentianin liefern, haben wir nun versucht, Amarogentin (IV) und Dihydroamarogentin (VIII) auf diese Weise aufzuarbeiten. Dabei erhielt man aus IV zweierlei Basen XI,  $C_{10}H_9NO_2$ , vom Schmp. 83.5–85° sowie XII,  $C_{20}H_{20}N_2O_4$  (MS:  $M^+$  352), vom Schmp. 158–160° und dreierlei Phenole XIII,  $C_{14}H_{12}O_5$  (MS:  $M^+$  260), vom Schmp. 138–138.5°, XIV,  $C_{12}H_{10}O_3$  (MS:  $M^+$  202), vom Schmp. 182–183° und XV,  $C_{13}H_{11}NO_4$  (MS:  $M^+$  245), vom Schmp. 92–93°, ferner aus VIII eine einzige Base XVI,  $C_{10}H_{11}NO_2$ , vom Schmp. 75–76° und die oben genannten Phenole XIII, XIV und XV. Unter diesen Produkten wurde XI als Gentianin und XVI als Dihydrogentianin identifiziert. Andererseits ergibt Swerosid-tetraacetat (X) bei derselben Reaktion neben sehr kleinen Mengen Gentianin die Base (XII) und Dihydroswerosid-tetraacetat (XVII) Dihydrogentianin (XVI). Die Tatsache, dass Amarogentin (IV) dieselben Basen wie Swerosid (I) und Dihydroamarogentin (VIII) Dihydrogentianin (XVI) liefert, macht sehr wahrscheinlich, dass IV wenigstens den Agluconteil des Swerosids als Strukturbestandteil besitzt.

Das IR-Spektrum ( $CHCl_3$ ) der neuen Base XII, die aus I bzw. IV gebildet wird, ist mit dem von XVI sehr ähnlich und zeigt die Banden bei 1725, 1590, 1125 und  $955\text{ cm}^{-1}$ . Es fehlt aber die Bande bei  $1630\text{ cm}^{-1}$  für die Vinylgruppe, die sich im Spektrum des Gentianins beobachten lässt. Das Massenspektrum von XII zeigt

TABELLE I. NMR-SIGNALE VON AMAROGENTIN (IV), AMAROSWERIN (V) UND IHREN DERIVATEN

	H-1	H-3	H-5	H-6	H-7	H-8	H-10	H-9	H-1'	H-2'	H-6'	H-4'', 6''	H-2''', 4''', 6'''	H-5''''	OOCCH <sub>3</sub>	--OCH <sub>3</sub>
IV (CD <sub>3</sub> OD)	4.62 d J = 1:5	2.57 d J = 2	7.20 ~ 7.55	8.17 ~ 8.53	5.58 ~ 5.85	4.56 ~ 4.75	7.20 ~ 7.55	5.72 d J = 8	5.25 t J = 8	6.16 ~ 6.38 J = 8	3.69 ~ 3.84 jeweils d J = 2.5	3.12 ~ 3.37	2.82 t J = 8			
V (CD <sub>3</sub> OD)	4.40 d J = 1:5	2.58 s	—	8.10 ~ 8.38	5.22 ~ 5.82	4.55 ~ 4.84	7.00 ~ 7.35	5.73 d J = 8	5.30 t J = 8	6.16 ~ 6.40 jeweils d J = 2.5	3.68, 3.81 jeweils d J = 2.5	3.10 ~ 3.35	2.78 t J = 8			
VI (CDCl <sub>3</sub> )	4.70	2.55 d J = 2	7.00 ~ 7.50	8.15 ~ 8.50	~	4.70 b.s.	7.00 ~ 7.50	~	~	~	2.82 ~ 3.07		7.68 8.02			
VII (CD <sub>3</sub> OD)	4.49 d J = 1	2.53 d J = 2	7.20 ~ 7.50	8.16 ~ 8.50	5.60 ~ 5.90	4.55 ~ 4.85	7.20 ~ 7.50	~	~	~ 6.32	3.30, 3.53 jeweils d J = 2	2.98 ~ 3.20	2.72 t J = 8			6.15 ~ 6.20
VIII (CD <sub>3</sub> OD)	4.49 d J = 1	2.62 d J = 2.5	7.15 ~ 7.47	8.10 ~ 8.43	5.57 ~ 5.78	8.45 ~ 8.93	8.10 ~ 8.93	5.37 d J = 8	5.27 t J = 8	6.15 ~ 6.37 jeweils d J = 8	3.69, 3.83 jeweils d J = 2.5	3.12 ~ 3.38	2.82 t J = 8			
IX (CD <sub>3</sub> OD)	4.40 d J = 1:5	2.61 d J = 2	7.00 ~ 7.43	8.10 ~ 8.50	~	8.55 ~ 8.90	8.90 ~ 9.20	~	~	~ 6.33	3.42, 3.55 jeweils d J = 2.5	2.94 ~ 3.30	2.73 t J = 8			6.17 ~ 6.19
XXI (CD <sub>3</sub> OD)	4.27 d J = 1:5	2.48 s	—	8.10 ~ 8.40	~	4.53 ~ 4.78	7.05 ~ 7.27	~	~	~ 6.33	3.41, 3.55 jeweils d J = 2	2.58 ~ 3.31	6.12 ~ 6.20			

zwischen dem Moleküllionenpeak ( $m/e$  352) und dem Basispeak ( $m/e$  176) nur fünf nennenswerte Peaks bei  $m/e$  177, 178, 190, 191 und 192. Diese Befunde dürften wohl der Beweis dafür sein, dass das Molekül von XII zwei Gentianinteile als Strukturbestandteile enthält. Die Fragmentierung in die obigen Peaks dürfte dabei wohl wie im Schema 2 veranschaulicht erläutert werden.



SCHEMA 2

TABELLE 2. NMR-SIGNALE DER GENTIANINDERIVATE

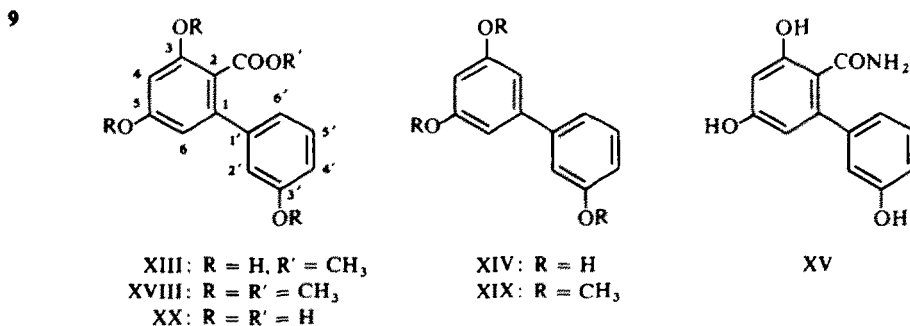
	H-1 evtl. 1'	H-3 evtl. 3'	H-6 evtl. 6'	H-7 evtl. 7'	H-8 evtl. 8'	H-10	H-10'
XI (CDCl <sub>3</sub> ) s	1·15	0·85	6·90	5·42	3·17	4·20	4·40
		s	t	t	q	q	q
			$J = 6$	$J = 6$	$J_{8,10a} = 18$ $J_{8,10c} = 11$	$J_{10a,8} = 18$ $J_{10,10} = 1$	$J_{10c,8} = 11$ $J_{10,10} = 1$
XII (CDCl <sub>3</sub> ) jeweils s	1·25 u. 1·50	0·85 u. 0·90	6·98 u. 7·05	5·42 u. 5·45	7·15 ~ 7·50	7·70 ~ 8·23	8·59
	jeweils s	jeweils s	jeweils t	jeweils t			d
			$J = 6$	$J = 6$			$J = 7$
XVI (CDCl <sub>3</sub> ) s	1·40	0·88	6·95	5·43	7·28	8·73	
	s	s	t	t	q	t	
			$J = 6$	$J = 6$	$J = 7$	$J = 7$	

Das NMR-Spektrum von XII spricht auch für den dimeren Charakter der Verbindung XII. Wie man aus der Tabelle 2 ersehen kann, erscheinen die Signale der Protonen dieser Substanz—meistens als Doppelfiguren—bei etwa gleichen Feldern wie die Signale der entsprechenden Protonen der Basen (XI) bzw. (XVI). Im Spektrum der Substanz (XII) erscheinen aber die Signale der drei Protonen an C-8 sowie C-8'

und die der beiden Protonen an C-10 jeweils als Multiplett bei  $\tau$  7.15–7.50 und  $\tau$  7.70–8.23. Ferner treten die drei Protonen der 10'-Methylgruppe als Dublett ( $J = 7$  Hz) bei  $\tau$  8.59 auf. Daraus kann man den Schluss ziehen, dass die beiden Teile dieser Base an C-8' und C-10 verknüpft sind, und somit, dass ihr die Struktur XII zukommt.

Die phenolische Substanz (XIII) zeigt im UV Absorptionen bei 216, 226, 265 und 300 nm ( $\log \epsilon$  4.29, 4.24, 4.10 sowie 3.90) und im IR ( $\text{CHCl}_3$ ) Banden bei 3480, 3200, 1655, 1605, 1580, 1438 und  $855 \text{ cm}^{-1}$ . Im NMR-Spektrum ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) zeigt es weiter Signale von 6 arom. Protonen bei  $\tau$  2.67–3.80 und das Signal einer  $\text{COOCH}_3$ -Gruppe bei  $\tau$  6.55. XIII lieferte weiter bei der Methylierung mit Diazomethan Trimethyläther (XVIII),  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_5$  (MS:  $\text{M}^+$  302). XVIII zeigt im IR ( $\text{CHCl}_3$ ) Banden bei 1715, 1595 und  $1580 \text{ cm}^{-1}$  und im NMR-Spektrum ( $\text{CDCl}_3$ ) Signale von 6 arom. Protonen bei  $\tau$  2.65–3.50, Singulette von drei  $\text{OCH}_3$ -Gruppen bei  $\tau$  6.15–6.18 und ein Singulett einer  $\text{COOCH}_3$ -Gruppe bei  $\tau$  6.38. Daraus kann man vermuten, dass XIII ein Diphenylcarbonsäuremethylester mit 3 phenol. Hydroxylgruppen ist.

Verbindung XIV zeigt im Carbonylbereich des IR keine Bande und liefert mit Diazomethan den Trimethyläther (XIX).  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$  (MS:  $\text{M}^+$  244). In dessen NMR-Spektrum fehlt das Signal der  $\text{COOCH}_3$ -Gruppe, es erscheinen aber 7 arom. Protonen. Daraus geht hervor, dass es sich bei XIX um den decarboxylierten Körper von XVIII und folglich bei XIV um denjenigen von XIII handelt.



SCHEMA 3

Die Struktur von XIX als 3,5,3'-Trimethoxydiphenyl wurde zuerst durch die Analyse des Doppelresonanzspektrums\* (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) erbracht. So erscheinen die beiden äquivalenten Protonen an C-2 und C-6 in je einer meta-Kopplung mit dem Proton an C-4 als Dublett ( $J = 2$  Hz) bei  $\tau$  3.27, während das letztere als Triplet ( $J = 2$  Hz) bei  $\tau$  3.53 auftritt. Andererseits vom anderen Benzolring tritt das Proton am C-4' als Multiplett bei  $\tau$  3.12 auf, indem es in ortho-Kopplung mit dem Proton an C-5' ( $\tau$  2.65, Triplet,  $J = 7$  Hz) und in meta-Kopplung mit denen an C-2' sowie C-6' verbunden ist.

Die Lage der  $\text{COOCH}_3$ -Gruppe in den Verbindungen XVIII bzw. XIII wurde weiter folgenderweise abgeleitet. Die Verschiebung der IR-Bande bei  $1655 \text{ cm}^{-1}$  von XIII zu  $1715 \text{ cm}^{-1}$  in XVIII, die auch bei der Überführung von IV in sein Acetat

\* Gemessen mit einem Varian-HA-100-Spektrometer mit Tetramethylsilan als internem Standard.

TABELLE 3. NMR-SIGNALE DER TRIHYDROXYDIPHENYLDERIVATE

	H-2	H-4,6	H-5'	H-2', 4', 6'	—OCH <sub>3</sub>	—COOCH <sub>3</sub>
XIII (CD <sub>3</sub> OD)	—	3.66, 3.75 jeweils d J = 2.5	2.83 t J = 8	3.15 ~ 3.42	—	6.55 s
XV (CD <sub>3</sub> OD)	—	3.67, 3.81 jeweils d J = 2.5	2.75 t J = 8	3.07 ~ 3.25	—	—
XVIII (CDCl <sub>3</sub> )	—	3.05 s	2.65 2.85	2.95 ~ 3.20	6.15 - 6.18	6.38 s
	H-2,6	H-4	H-5'	H-2', 6'	H-4'	—OCH <sub>3</sub>
XIV (CDCl <sub>3</sub> )	3.45 d J = 2	3.70 t J = 2	2.74 t J = 8	2.90 ~ 3.03	3.13 ~ 3.35	—
XIX (CDCl <sub>3</sub> )	3.27 d J = 2	3.53 t J = 2	2.65 t J = 7	2.75 ~ 2.93	3.00 ~ 3.23	6.17

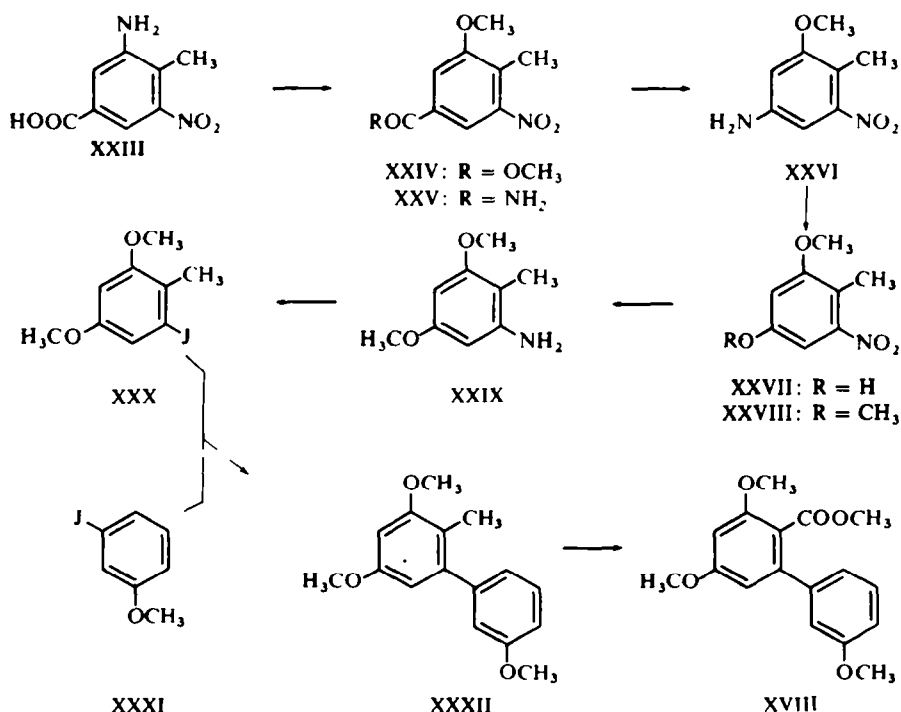
(VI) bzw. Trimethyläther (VII) beobachtet wurde, deutet daraufhin, dass die COOCH<sub>3</sub>-Gruppe in XIII einer Hydroxyl-Gruppe benachbart ist. Unter den so für diese Gruppe wahrscheinlich gewordenen Stellungen 2 (=6), 4, 2' und 4' werden die Stellen 2' und 4' ausgeschlossen, da die Signale der zwei Protonen im NMR-Spektrum von XIII als Folge der meta-Kopplung als AB-Quartett ( $J = 2.5$  Hz) bei  $\tau$  3.66 und 3.75 erscheinen. Befände sich aber die COOCH<sub>3</sub>-Gruppe an Stelle 4, müssten die Protonen an den C-Atomen 2 und 6 äquivalent sein und als Singulett erscheinen. Da dies aber nicht der Fall ist, kann man ihr die Stellung 2 und der Substanz (XIII) die Struktur des 3,5,3'-Trihydroxydiphenyl-2-carbonsäure-methylesters zuschreiben. Diese Schlussfolgerung wurde, wie später erwähnt werden wird, durch Synthese des Trimethyläthers (XVIII) von XIII erwiesen.

Verbindung XV zeigt im NMR-Spektrum (CD<sub>3</sub>OD) das AB-Quartett ( $J = 2$  Hz) der Protonen an C-4 und C-6 bei  $\tau$  3.67 und 3.81, das Triplett ( $J = 8$  Hz) des Protons an C-5' bei  $\tau$  2.75 und Multiplette der Protonen an C-2', 4' und 6' bei  $\tau$  3.07–3.25. Es zeigt weiter im IR Banden der CONH<sub>2</sub>-Gruppe bei  $1665\text{ cm}^{-1}$ . Aus diesen Befunden ergibt sich, dass die Verbindung XV das Amid der Carbonsäure (XIII) ist.

Auf Grund der obigen Resultate kann man nun folgern, dass es sich bei Amarogentin sehr wahrscheinlich um einen Swerosidester der 3,5,3'-Trihydroxydiphenyl-2-carbonsäure (XX) handelt. So versuchten wir durch Hydrolyse des Glucosids mit methanol. Baritlösung die beiden Bestandteil I und XX zu gewinnen. Während dieser Versuch mit dem Glucosid selbst wegen der Niederschlagbildung des Bariumphenolat-Salzes fehlgeschlagen war, resultierte die Hydrolyse von Amarogentin-trimethyläther (VII) und anschließende Methylierung sowie Acetylierung erwartungsgemäss in der Bildung des Trimethyldiphenylcarbonsäure-methylesters (XVIII) und Swerosid-tetraacetats (X).

Dieses Ergebnis und die Tatsache, dass Amarogentin-hexaacetat (VI) 3 phenol. Acetyl- sowie 3 alkohol. Acetylgruppen besitzt, führt zur Schlussfolgerung, dass die Phenolcarbonsäure (XX) in Amarogentin (IV) mit einer Hydroxylgruppe des Zuckerteils des Swerosids esterartig gebunden ist. Die Verknüpfungsstelle der Säure im Zuckerteil wurde wieder durch Doppelresonanzversuche klargestellt. So erscheint im NMR-Spektrum von IV das Proton an C-1' als Dublett ( $J = 8$  Hz) bei  $\tau$  5.72, das mit einem Proton in Kopplung steht, dessen Signal als Triplet bei  $\tau$  5.25 auftritt. Somit lässt sich folgern, dass es sich bei dem letzteren Proton um das mit demjenigen an C-1' in trans-axialer Beziehung stehende Proton an C-2' handelt. Die Verschiebung dieses Protons zu einem so niedrigen Feld ist nur durch die Esterbildung der OH-Gruppe an betreffendem C-Atom mit einer Säure erklärbar. Für diese Erklärung sprechen auch die Resultate der Perjodat-Oxydation von IV und VII, wobei nur ein Mol Perjodat verbraucht wird. Der Widerstand des Amarogentins (IV) gegen Hydrolyse ist auch damit erklärbar. Somit wurde dem Amarogentin die absolute Struktur (IV) zuerteilt.

**B Die Struktur des Amaroswerins.** Amaroswerin (V) ist ein weisses Pulver,  $C_{29}H_{30}O_{14} \cdot H_2O$  vom  $[\alpha]_D^{20} -13^\circ$  (MeOH). Es zeigt im UV (MeOH) Absorptionen bei 227, 271 und 307 nm ( $\log \epsilon$  4.46, 4.03 und 3.65) und im IR (Nujol) Banden bei 3300, 1685, 1640, 1610, 1585, 995 und 900  $cm^{-1}$ . Die NMR-Signale von V sind zusammen mit denen seiner Abkömmlinge in Tabelle 1 dargestellt. Die Spektren von V scheinen sehr ähnlich wie diejenigen von IV aus. Auffallend ist nur der Unter-



SCHEMA 4



schied zwischen den NMR-Spektren der beiden Substanzen, und zwar dass das Signal des Protons an C-3 beim Amaroswerin (V) als Singulett bei  $\tau$  2.58, dagegen beim Amarogentin (IV) als Dublett erscheint. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass an C-5 des Secoiridoidteils von V kein Proton vorliegt. Methylierung von V mit Diazomethan resultiert in der Bildung eines weissen Pulvers, des Trimethyläthers (XXI),  $C_{32}H_{36}O_{14} \cdot H_2O$ . XXI zeigt im IR Banden bei 1720, 1705, 1620, 1598, 1580 sowie  $995\text{ cm}^{-1}$  und im NMR-Spektrum die Singulette der drei  $OCH_3$ -Gruppen bei  $\tau$  6.13, 6.18 und 6.22.

Vergleicht man diese Befunde über Amaroswerin (V) und seinen Methyläther (XXI) mit denen über Amarogentin (IV) und seinen Derivaten, so ergibt sich, dass Amaroswerin (V) wie beim Fall von IV ein Trihydroxydiphenylcarbonsäure (XX)-Ester von Secoiridoidglucosid und zwar des Swertiamarins (II) ist.

In der Tat liefert V bei der Behandlung mit methanol. Ammoniak, gefolgt von Kochen mit Salzsäure, als eine einzige Base, Gentianin und als Phenole, die drei Substanzen XIII, XIV und XV. Weiter erhielt man bei der Behandlung des Trimethyläthers (XXI) mit methanol. Baritlösung, anschliessender Methylierung sowie Acetylierung Trimethoxydiphenylcarbonsäure-methylester (XVIII) und Swertiamarin-tetraacetat (XXII). Somit wurde festgestellt, dass das Amaroswerin nichts anderes als ein Swertiamarinester der 3,5,3'-Trihydroxydiphenyl-2-carbonsäure (XX) ist.

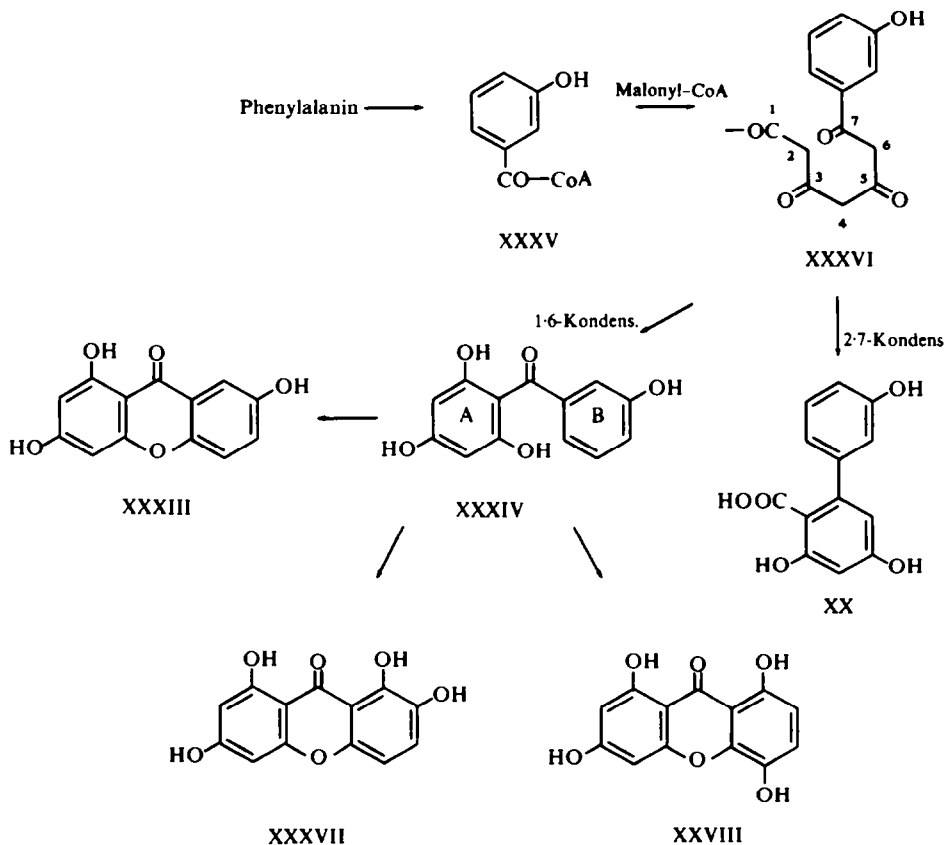
Der Beweis für die Bindungsstelle der beiden Elemente in Amaroswerin—C-2' in Glucoseteil—wurde weiter auch bei diesem Fall durch Doppelresonanzversuche und Perjodatoxydation erbracht. So ist im Spektrum ( $CD_3OD$ ) von V das bei  $\tau$  5.73 als Dublett ( $J = 8\text{ Hz}$ ) auftretende Proton an C-1' mit demjenigen an C-2' gekoppelt, das seinerseits als Triplett bei  $\tau$  5.30 erscheint. Ferner verbraucht auch Amaroswerin (V) nur 1 Mol Perjodat. Somit wurde die absolute Struktur V für Amaroswerin hinreichend bewiesen.

*C Synthese des 3,5,3'-Trimethoxydiphenyl-2-carbonsäure-methylesters (XVIII).* Die aus *p*-Toluylsäure abgeleitete 3-Amino-5-nitro-*p*-Toluylsäure (XXIII) liefert bei der Diazotierung und der folgenden Behandlung mit konz. Schwefelsäure 3-Hydroxy-5-nitro-*p*-toluylsäure. Sie liefert weiter bei der Methylierung ohne weiteres mit Dimethylsulfat und Kaliumcarbonat den 3-Methoxy-5-nitro-*p*-toluylsäuremethylester (XXIV),  $C_{10}H_{11}NO_5$ , vom Schmp.  $75^\circ$ , der weiter bei der Behandlung mit methanol. Ammoniak in das Amid (XXV),  $C_9H_{10}N_2O_4$ , vom Schmp.  $198^\circ$  übergeführt wird. Hofmannsche Umlagerung von XXV gibt 3-Methoxy-5-nitro-*p*-toluidin (XXVI), das ohne weiteres über 3-Methoxy-5-nitro-*p*-kresol (XXVII) in 2,4-Dimethoxy-6-nitrotoluol XXVIII,  $C_9H_{11}NO_4$ , vom Schmp.  $96^\circ$  übergeführt werden kann. XXVIII ergibt bei der Reduktion mit Eisen und Essigsäure das Amin (XXIX), dessen salzsaures Salz,  $C_9H_{13}NO_2 \cdot HCl$ , farblose Nadeln vom Schmp.  $185^\circ$  darstellt. Die nochmalige Diazotierung von diesem Amin (XXIX), gefolgt von der Behandlung mit Kaliumjodid, resultiert in der Bildung des farblosen Öls von 2-Methyl-3,5-Dimethoxyjodbenzols (XXX),  $C_9H_{11}O_2J$ .

Durch Ullmannsche Reaktion von hier gewonnenem XXX mit *m*-Methoxyjodbenzol (XXXI) erhielten wir, wenn auch in einer ganz schlechten Ausbeute, ein farbloses Öl des 2-Methyl-3,5,3'-trimethoxydiphenyls (XXXII), MS:  $M^+ 258$ . Es zeigt im IR Banden bei 1574 und  $1450\text{ cm}^{-1}$  und im NMR-Spektrum ( $CDCl_3$ ) folgende Signale: Multiplette, die von den Protonen an C-2', 4', 5' und 6' herrühren, bei

$\tau$  2.53–3.21, Dublette (mit je  $J = 2$  Hz) der Protonen an C-6 sowie C-4 jeweils bei  $\tau$  3.52 und 3.58, drei Singulette der  $\text{OCH}_3$ -Gruppen bei  $\tau$  6.17, 6.18 und 6.22 sowie das Singulett der Methylgruppe bei  $\tau$  7.95. XXXII ergibt durch Oxydation mit Permanganat in Pyridin und anschließende Methylierung mit Diazomethan ein farbloses Öl,  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_5$ , (MS:  $\text{M}^+$  302), das sich mit der aus den Naturstoffen abgeleiteten Verbindung XVIII identifizieren lässt. Somit wurde die Struktur von XVIII und folglich auch von XIII synthetisch erwiesen.

D Die Biogenese der 3,5,3'-Trihydroxydiphenyl-2-carbonsäure. In *Gentiana lutea*, die Amarogentin enthält, kommen einige Xanthone wie Gentisein (XXXIII) und seine Methylätherabkömmlinge vor. Durch Applikationsversuche mit verschiedenen markierten Phenylalanin,  $^{14}\text{C}$ -Acetat sowie  $^{14}\text{C}$ -2,4,6,3'-Tetrahydroxybenzophenon (XXXIV) haben J. E. Atkinson *et al.*<sup>7</sup> vor einigen Jahren bewiesen, dass die Xanthone in dieser Pflanze via Phenylalanin (Shikimisäure) und Acetat gebildet werden, und darüber hinaus, dass der Ring A dabei vom Acetat und der Ring B von Phenylalanin her stammt.



SCHEMA 5

Die Biogenese der oben erwähnten 3,5,3'-Trihydroxydiphenyl-2-carbonsäure (XX), die eine für einen Naturstoff ungewöhnliche Struktur hat, dürfte wohl folgenderweise durch den Weg über die gemeinsamen Vorstufen wie bei den Xanthonen erklärt werden (Schema 5): Das von Phenylalanin herstammende *m*-Hydroxybenzoyl-Co A (XXXV) dürfte durch Kondensation mit drei Mol. Malonyl-Co A das *m*-Hydroxybenzoyltriketid (XXXVI) ergeben. Während XXXVI ferner beim Ringschluss zwischen Stellen 1 und 6 den Benzophenonkörper (XXXIV) ergäbe, könnte es sich durch Ringschluss zwischen Stellen 2 und 7 in Verbindung XX verwandeln.

Die Xanthone, Norswertinin (XXXVII), Desmethylbellidifolin (XXXVIII) und ihre Methylätherderivate<sup>8</sup>, die in *Swertia japonica* vorkommen, könnten auch via gemeinsame Vorstufen (XXXIV) durch oxydative Kopplung in die beiden Richtungen und weitere Hydroxylierung an Benzolring entstanden sein. Somit kann man in diesem Biosyntheseweg eine hinreichende Erklärung für das gemeinsame Auftreten der Xanthone und der Säure (XX) in den gleichen Pflanzen geben. Als Beispiel der Naturstoffe der Shikimisäure-Abstammung, die eine *m*-Hydroxyphenyl-Teilstruktur haben, sind ausserdem Volucrisporin<sup>9</sup>, Glucoclepiramin<sup>10</sup> usw. bekannt.

Versuche zur Bestätigung des Bildungswegs von XX sind im Gange.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert und wurden auf dem Mikroheizapparat nach Dr. Hozumi (Yanagimoto-Seisakusho, Kyoto) bestimmt. Die NMR-Spektren wurden, soweit nicht anders angegeben, mit einem Varian-A-60-Spektrometer mit TMS als internem Standard gemessen. Die Massenspektren wurden mit einem Hitachi-Massenspektrometer, Modell RMU 6D, aufgenommen. Zur Dünnschichtchromatographie (DC) diente Silicagel G nach Stahl (E. Merck). Die Sichtbarmachung wurde durch Bedampfen der Platte mit Jod durchgeführt. Zur Säulenchromatographie diente Silicagel (Mallinckrodt) und Aluminiumoxid (Woelm, neutral).

Über die Isolierung und die Eigenschaften der beiden Glucoside IV und V wurde, wie oben erwähnt, schon anderwärts Bericht erstattet.<sup>3</sup>

*Versuche zur Hydrolyse von Amarogentin (IV) bzw. Amaroswerin (V) mittels Mineralsäure oder  $\beta$ -Glucosidase.* Eine Suspension von 50 mg IV in 50 ml Acetatpufferlösung (pH 4.9; 0.1 M) wurde mit 20 mg  $\beta$ -Glucosidase (Emulsion aus Aprikosenkernen) versetzt und 2 Tage bei 37° umgerührt. Die Reaktionslösung zeigte bei der Dünnschichtchromatographie (CHCl<sub>3</sub>—MeOH (8:2)) nur den Fleck von Ausgangsmaterial bei *R<sub>f</sub>* 0.42.

20 mg IV wurden dann mit 5 ml 5%iger HCl 3 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt und die Reaktionslösung ebenso wie oben dünn-schichtchromatographisch untersucht, wobei ausser dem Hauptfleck (0.43) von IV drei sehr schwache Flecke bei 0.50, 0.45 und 0.10 beobachtet werden.

Die Versuche, V auf dieselbe Weise wie oben enzymatisch oder mit Mineralsäure zu hydrolysieren, sind fehlgeschlagen.

*Acetylierung des Amarogentins (IV).* 1.0 g IV wurde in je 10 ml Ac<sub>2</sub>O und Pyridin über Nacht bei Raumtemp. stehengelassen. Nach der Aufarbeitung in üblicher Weise wurde das rohe Produkt an einer Silicagelsäule (50 mg) mit CHCl<sub>3</sub>—MeOH (99:1) chromatographiert (zu je Fraktion 40 ml). Die Frak. 2–8 lieferten 0.93 g weisses Pulver von VI;  $[\alpha]_D^{25} - 68.9^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, *c* = 1); IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3} \text{ cm}^{-1}$ : 1750, 1700, 1620, 1605 (Sch.), 1580, 990 und 900; UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  286 nm (log  $\epsilon$  3.61). (C<sub>41</sub>H<sub>42</sub>O<sub>19</sub>·2H<sub>2</sub>O (874.82). Ber.: C, 56.28; H, 5.30. Gef.: C, 56.34; H, 5.27%).

*Methylierung des Amarogentins (IV) mit Diazomethan.* 2.0 g IV wurde in MeOH mit einem grossen Überschuss an Diazomethan bei Raumtemp. über Nacht stehengelassen. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand an einer Silicagelsäule (200 g) mit CHCl<sub>3</sub>—MeOH (98:2) chromatographiert, wobei man Fraktionen von je 50 ml auffing. Der aus den vereinigten Frak. 28–48 erhaltene Rückstand wurde in *t*-BuOH gelöst, mit Aktivkohle behandelt und lyophilisiert, wobei 1.1 g weisses Pulver von VII hinterblieb. DC: CHCl<sub>3</sub>—MeOH (9:1) *R<sub>f</sub>* 0.40.  $[\alpha]_D^{25} - 50.2^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, *c* = 1); IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3} \text{ cm}^{-1}$ : 3500, 3400, 1720, 1700, 1618, 1597, 1580, 980 und 900; UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  292 nm (log  $\epsilon$  3.98). (C<sub>32</sub>H<sub>36</sub>O<sub>13</sub>·H<sub>2</sub>O (646.65). Ber.: C, 59.44; H, 5.92. Gef.: C, 59.99; H, 6.00%).

*Katalytische Hydrierung des Amarogentins (IV).* 1.2 g IV in 50 ml MeOH wurden über Pd-Kohle (bereitet aus 6 ml 5%iger PdCl<sub>2</sub>-Lösung und 0.6 g Norit) katalytisch hydriert. Nach Aufnahme von ca. 1 Mol.-Äq. H<sub>2</sub> wurde die Lösung durch Filtrieren vom Katalysator getrennt und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand lieferte aus MeOH-Benzol 0.5 g weisse Nadeln des Dihydrokörpers (VIII) vom Schmp. 177–179°. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> –77.5° (MeOH, c = 1); IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 3300, 1685, 1655, 1610, 1580 und 965; UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  229, 265 und 306 nm (log  $\epsilon$  4.48, 4.06 und 3.82). (C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>O<sub>13</sub> · H<sub>2</sub>O (606.59). Ber.: C, 57.42; H, 5.65. Gef.: C, 57.20; H, 5.86%).

*Katalytische Hydrierung des Amarogentrimethyläthers (VII).* 0.15 g VII in 30 ml MeOH wurde über Pd-Kohle (bereitet aus 2.0 ml 5%iger PdCl<sub>2</sub>-Lösung und 0.1 g Norit) bis zur Aufnahme von 1 Mol.-Äq. H<sub>2</sub> hydriert. Das Filtrat wurde i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde in t-BuOH aufgelöst, mit Aktivkohle behandelt und lyophilisiert, wobei 0.14 g weisses Pulver von IX hinterblieb. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> –67.0° (CHCl<sub>3</sub>, c = 1); IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  cm<sup>-1</sup>: 3400, 1720, 1700, 1620, 1600, 1580 und 965; UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  291 nm (log  $\epsilon$  3.77). (C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>O<sub>13</sub> (630.65). Ber.: C, 60.95; H, 6.07. Gef.: C, 60.72; H, 5.99%).

*Behandlung des Amarogentins (IV) mit methanol Ammoniak.* 1.0 g IV in 100 ml MeOH wurde mit 100 ml 28%igem wässr. Ammoniak 7 Tage bei Raumtemp. stengelassen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels i. Vak. wurde der Rückstand mit 200 ml 5%iger HCl 4 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen wurde die Lösung ammoniakalkalisch gemacht, mit CHCl<sub>3</sub> und dann mit AcOÄt ausgezogen. Die Chloroformschicht wurde mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde an einer Silicagelsäule (30 g) mit 500 ml CHCl<sub>3</sub>-MeOH (99:1) und 500 ml CHCl<sub>3</sub>-MeOH (97:3) chromatographiert. Aus dem Eluat mit dem ersten Lösungsmittelgemisch erhielt man durch Umlösen aus Äther-Petroläther 7 mg farblose Nadeln des Gentianins (XI) vom Schmp. 83.5–85°, die durch Mischschmelzpunkt und IR mit einer authentischen Probe identifiziert wurde; IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  cm<sup>-1</sup>: 1730, 1630, 1583 und 1125; UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  219 und 286 (Sch.) nm (log  $\epsilon$  4.41 und 3.08). (C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub> (175.18). Ber.: C, 68.56; H, 5.18; N, 8.00. Gef.: C, 68.65; H, 5.39; N, 7.94%).

Aus dem Eluat mit dem letzteren Lösungsmittelgemisch erhielt man durch Umlösen aus Äther 46 mg farblose Nadeln des Bisgentianins (XII) vom Schmp. 158–160°. IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  cm<sup>-1</sup>: 1725, 1590, 1125 und 955; UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  273 nm (log  $\epsilon$  3.54). (C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (352.38). Ber.: C, 68.17; H, 5.72; N, 7.95. Gef.: C, 68.01; H, 5.96; N, 7.91%). DC von XI und XII: CHCl<sub>3</sub>-MeOH (95:5) R<sub>f</sub> 0.65 (XI), 0.44 (XII).

Die AcOÄt-Schicht wurde an einer Silicagelsäule, CHCl<sub>3</sub>-MeOH (93:7) als Elutionsmittel, chromatographiert, wobei man Fraktionen von je 20 ml auffing. Die Frak. 2–6 hinterliessen beim Einengen 38 mg Rückstand. Durch Umlösen aus Benzol erhielt man daraus farblose Prismen von XIII, Schmp. 138–138.5°. IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  cm<sup>-1</sup>: 3480, 3200, 1655, 1605, 1580, 1438 und 855; UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  216, 226 (Sch.) 265 und 300 nm (log  $\epsilon$  4.29, 4.24, 4.10 und 3.90). ((C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub> (260.24). Ber.: C, 64.61; H, 4.65. Gef.: 65.16; H, 4.97%).

Die Frak. 17–21 hinterliessen beim Einengen 54 mg XV, der aus Benzol-Äther in farblosen Blättern vom Schmp. 92–93° kristallisierte; IR  $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$  cm<sup>-1</sup>: 3450, 3350, 1665, 1610 und 1590; UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  262 und 299 nm (log  $\epsilon$  3.74 und 3.57). (C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub> (245.23). Ber.: C, 63.67; H, 4.52; N, 5.71. Gef.: C, 63.85; H, 4.55; N, 5.78%).

Die Frak. 26–29 ergaben ferner 49 mg Rückstand, der aus Benzol-Äther farblose Prismen von XIV lieferte. Schmp. 182–183°. (C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub> (202.20). Ber.: C, 71.28; H, 4.99. Gef.: C, 71.05; H, 5.09%).

DC von XIII, XIV und XV: CHCl<sub>3</sub>-MeOH (9 = 1) R<sub>f</sub> 0.58 (XIII), 0.44 (XV) und 0.32 (XIV).

*Behandlung des Dihydroamarogentins (VIII) mit methanol Ammoniak.* 0.4 g VIII in 40 ml 28%igem wässr. Ammoniak 7 Tage bei Raumtemp. stengelassen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels i. Vak. wurde der Rückstand mit 50 ml 5%iger HCl 4 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen wurde die Reaktionslösung ammoniakalkalisch gemacht, mit CHCl<sub>3</sub> und anschliessend mit AcOÄt ausgezogen. Die CHCl<sub>3</sub>-Schicht wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und abgedampft. Der Rückstand gab aus n-Hexan 10 mg farblose Nadeln von XVI, Schmp. 75–76°. IR  $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$  cm<sup>-1</sup>: 1725, 1590, 1125, 985 und 955; UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  228 und 277 nm (log  $\epsilon$  3.89 und 3.38). (C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub> (177.20). Ber.: C, 67.78; H, 6.26; N, 7.91. Gef.: 68.00; H, 6.30; N, 8.00%).

Die AcOÄt-Schicht ergab bei Aufarbeitung genauso wie bei IV die folgenden Substanzen: 21 mg rohes XIII, das aus Benzol in farblosen Prismen vom Schmp. 138–139° kristallisierte; 21 mg rohes XV, das aus Benzol-Äther farblose Platten vom Schmp. 92–93° lieferte; 18 mg rohes XIV, das aus Benzol-Äther farblose Prismen vom Schmp. 182–183° lieferte.

*Aufarbeitung des Swerosid-tetraacetats (X) mit methanol Ammoniak.* 0.2 g X in 20 ml MeOH wurde mit 20 ml 28%igem wässr. Ammoniak 4 Tage bei Raumtemp. stengelassen. Nach Einengen i. Vak. wurde der Rückstand mit 50 ml 5%iger HCl 4 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt und nach Abkühlen mit CHCl<sub>3</sub> geschüttelt. CHCl<sub>3</sub>-Schicht wurde dann genauso wie bei IV aufgearbeitet. Dabei erhielt man 2 mg farblose Nadeln (XI) vom Schmp. 80° und 10 mg farblose Nadeln (XII) vom Schmp. 158–160°. Das erste wurde

durch Mischschmelzpunkt und IR mit einer aus Gentiopicrosid abgeleiteten Probe identifiziert und das letztere auch ebenso mit einer aus IV hergestellten Probe.

*Aufarbeitung des Dihydrosverosid-tetraacetats (XVII) mit methanol Ammoniak.* 0.2 g XVII wurde genauso wie in 6 und 8 mit methanol. Ammoniak und anschliessend mit HCl behandelt und in der gleichen Weise aufgearbeitet. Dabei erhielt man 7 mg farblose Prismen (XVI) vom Schmp. 75–76°, die sich auch durch IR mit einer auth. Probe identifizieren liessen.

*Methylierung des 3.5.3'-Trihydroxydiphenyl-2-carbonsäure-methylesters (XIII).* 12 mg XIII in MeOH wurde mit einem grossen Überschuss an Diazomethan über Nacht im Kühlschrank stengelassen. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand an einer Silicagelsäule (5 g) mit Benzol chromatographiert, wobei 10 mg farbloses Öl von XVIII erhalten wurden; IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$   $\text{cm}^{-1}$ : 1715, 1595, 1580, 1455 und 835. ( $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_5$  (302.31). Ber: C, 67.54; H, 6.00. Gef: C, 67.32; H, 5.98%).

*Methylierung des Trihydroxydiphenyls (XIV).* 20 mg XIV wurde in Äther mit einem Überschuss an Diazomethan über Nacht im Kühlschrank stengelassen und danach das Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand gab nach Chromatographie an einer Aluminiumoxidsäule (5 g). Äther als Elutionsmittel, 18 mg farbloses Öl von XIX; IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$   $\text{cm}^{-1}$ : 1595, 1580, 1460 und 835. ( $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$  (244.28). Ber: C, 73.75; H, 6.60. Gef: C, 73.90; H, 6.55%).

*Behandlung des Amarogentin-trimethyläthers (VII) mit methanol Baritlösung.* 0.37 g VII in 10 ml MeOH wurde mit 30 ml gesättigter methanol. Baritlösung 7 Tage bei Raumtemp. stengelassen. Nach Neutralisieren mit IR-120 (H-Form) wurde die Lösung i. Vak. abgedampft. Der Rückstand wurde gleichzeitig mit  $\text{H}_2\text{O}$  und Äther ausgeschüttelt.

Die Ätherschicht wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, abgedampft und an einer Aluminiumoxidsäule (20 g). Äther-Benzol (1:9) als Elutionsmittel, chromatographiert. Dabei erhielt man 90 mg farbloses Öl, das durch IR und NMR-Spektrum als die oben erhaltene Verbindung XVIII identifiziert wurde.

Die Wasserschicht wurde i. Vak. völlig eingedampft und der Rückstand mit je 2 ml  $\text{Ac}_2\text{O}$  und Pyridin über Nacht bei Raumtemp. stengelassen. Der bei Eingiessen der Reaktionslösung ausgeschiedene Rückstand wurde dann an einer Silicagelsäule (10 g) mit  $\text{CHCl}_3$  chromatographiert. Frak. 3–4 (je 10 ml) gaben 63 mg Rückstand, der aus ÄtOH 13 mg farblose Prismen vom Schmp. 163–165° lieferte. Diese Substanz wurde durch Mischprobe, IR und NMR-Spektrum als X identifiziert.

*Titration von Amarogentin (IV), Amaroswerin (V) und Amarogentin-trimethyläther (VII) mittels Perjodat.* Die Titration von IV, V und VII mittels Perjodat wurde im Vergleich mit Asperulosid und Aucubin durchgeführt, wobei das verbrauchte Perjodat nach Fleury-Lange<sup>11</sup> bestimmt wurde. Alle Versuche wurden in einem Lösungsmittelgemisch von MeOH und  $\text{H}_2\text{O}$  (1:3) bei 25° durchgeführt.

Substanz	Mole verbrauchtes $\text{NaJO}_4$ pro Mol Probe			
	$\frac{1}{2}$ Std.	1 Std.	2 Std.	6 Std.
IV	0.51	0.67	0.87	1.34
V	0.79	0.87	0.94	1.06
VII	0.04	0.13	0.34	0.80
Aucubin	0.70	0.94	1.34	1.94
Asperulosid	0.76	0.92	1.40	2.20

*Methylierung des Amaroswerins (V) mit Diazomethan.* 0.5 g V in 10 ml MeOH wurde mit einem grossen Überschuss an Diazomethan in der Kälte über Nacht stengelassen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der resultierte Rückstand an einer Silicagelsäule (100 g) mit  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (97:7) chromatographiert. Es wurden Fraktionen von je 80 ml aufgefangen. Der Rückstand aus den Frak. 8–11 wurde in MeOH gelöst, mit Aktivkohle behandelt und das Lösungsmittel abdestilliert. Dabei erhielt man 0.125 g weisses Pulver des XXI;  $[\alpha]_D^{25}$   $-7.8^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 1$ ), IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3500, 1720, 1705, 1620, 1598, 1580, 995 und 900; UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  292 nm ( $\log \epsilon$  3.75). ( $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{O}_{14} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (662.62). Ber: C, 58.00; H, 5.78. Gef: C, 58.31; H, 5.93%).

*Behandlung des Amaroswerins (V) mit methanol Ammoniak.* 1.0 g V gelöst in 100 ml MeOH wurde mit

20%igem wässr. Ammoniak 7 Tage bei Raumtemp. stehengelassen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels i. Vak. wurde der Rückstand mit 200 ml HCl 4 Stdn. auf dem Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen wurde die Reaktionslösung mit Ammoniak alkalisch gemacht, mit  $\text{CHCl}_3$  und darauf mit  $\text{AcOÄt}$  ausgezogen. Die  $\text{CHCl}_3$ -Schicht wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und abgedampft. Der Rückstand ergab aus Äther-Benzol 53 mg farblose Nadeln von Schmp.  $81^\circ$ , die durch Mischprobe, IR und NMR-Spektrum mit authentischem Gentianin (XI) identifiziert wurde.

Der aus der  $\text{AcOÄt}$ -Schicht erhaltene Rückstand wurde an einer Silicagelsäule (50 g) mit  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (97:3) chromatographiert. Es wurden Fraktionen von 20 ml aufgefangen. Die Fr. 11–13 hinterliessen 44 mg rohe Kristalle von XIII, die aus Benzol farblose Prismen vom Schmp.  $138$ – $139^\circ$  ergaben. Die Fr. 17–20 hinterliessen 38 mg kristalline Masse von XV, die aus Benzol-Ät<sub>2</sub>O farblose Platten vom Schmp.  $92$ – $93^\circ$  ergaben. Die Fr. 29–35 lieferten 28 mg rohe Kristalle von XIV, die aus Benzol-Äther farblose Prismen vom Schmp.  $182$ – $183^\circ$  bildeten.

*Behandlung des Amarogentin-trimethyläthers (XXI) mit methanol Baritlösung.* 0.2 g XXI wurden in 50 ml gesättigter methanol. Barit-Lösung gelöst und 4 Tage bei Raumtemp. stehengelassen. Nach Neutralisieren mit IR-120 (H-Form) wurde die Lösung i. Vak. abgedampft. Der Rückstand wurde dann in wenig MeOH gelöst, durch Zugabe von ätherischer Diazomethanlösung methyliert und abgedampft. Der Rückstand wurde gleichzeitig mit  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{CHCl}_3$  ausgeschüttelt.

Der aus der  $\text{CHCl}_3$ -Schicht erhaltene Rückstand wurde an einer Aluminiumoxidsäule (5 g) mit Benzol chromatographiert. Fr. 2–5 (je 10 ml) ergaben bei Abdestillieren des Lösungsmittels 30 mg farbloses Öl, das durch IR und NMR-Spektrum als XVIII identifiziert wurde.

Die  $\text{H}_2\text{O}$ -Schicht wurde i. Vak. völlig eingedampft, der Rückstand in je 2 ml  $\text{Ac}_2\text{O}$  und Pyridin über Nacht bei Raumtemp. stehengelassen. Nach Einengen der Reaktionslösung in Eiswasser wurde die ganze Masse i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde an einer Aluminiumoxidsäule (5 g) mit  $\text{CHCl}_3$  chromatographiert, wobei man Fraktionen von je 10 ml auffing. Der Rückstand aus Frak. 4 ergab aus ÄtOH farblose Nadeln vom Schmp.  $189$ – $191^\circ$ . Sie wurden durch Mischprobe und IR als XXII charakterisiert.

*3-Methoxy-5-nitro-p-toluylsäure-methylester (XXIV).* 20 g XXIII wurden heiss in einer Lösung von 30 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Die Lösung wurde auf unter  $10^\circ$  abgekühlt und eine Lösung von 8 g  $\text{NaNO}_2$  in 30 ml  $\text{H}_2\text{O}$  wurde portionsweise zugetropft. Dieses Reaktionsgemisch wurde anschliessend langsam der heissen Lösung von 100 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  sowie 70 ml  $\text{H}_2\text{O}$  zugesetzt. Die Lösung wurde dann in Eiswasser gegossen. Der ausgeschiedene Niederschlag kristallisierte aus MeOH in hellgelben Nadeln vom Schmp.  $219$ – $220^\circ$ . Ausbeute 16 g.

Diese Kristalle (10 g) wurden zusammen mit 3 g wasserfreiem  $\text{K}_2\text{CO}_3$  in 90 ml Xylol unter Rückfluss erhitzt, allmählich mit 18 ml  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$  versetzt und 3 Stdn. unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde dann mit viel Wasser versetzt und mit Äther ausgezogen. Aus der organischen Schicht blieb bei Einengen i. Vak. 8.6 g kristalliner Rückstand zurück, der aus ÄtOH in hellgelben Nadeln (XXIV) vom Schmp.  $75^\circ$  kristallisierte; IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$   $\text{cm}^{-1}$ : 1720, 1615, 1580, 1525 und 1360. NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\tau$ : 1.97 sowie 2.33 (jeweils d,  $J = 2$  Hz, 2 arom. H), 6.03 (s,  $2 \times \text{OCH}_3$ ) und 7.60 (s,  $-\text{CH}_3$ ). ( $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_5$  (225.20). Ber: C, 53.33; H, 4.92; N, 6.22. Gef: C, 53.41; H, 5.09; N, 6.18%).

*3-Methoxy-5-nitro-p-toluylsäureamid (XXV).* Zu eine Lösung von 32 g XXIV in 300 ml MeOH wurden 200 ml 28%iges Ammoniak zugesetzt und die Reaktionslösung 7 Tage bei Raumtemp. stehengelassen. Die dabei ausgeschiedenen Kristalle wurden abgesaugt und das Filtrat i. Vak. eingengt, wobei sich noch weitere Kristalle abschieden. Man erhielt insgesamt 28 g rohe Kristalle, die aus MeOH hellgelbe Nadeln (XXV) vom Schmp.  $198^\circ$  bildeten; IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3400, 3280, 3180, 1660, 1628, 1615 (Sch.), 1528 und 1360; NMR ( $d_6$ -DMSO)  $\tau$ : 2.02 sowie 2.25 (jeweils d,  $J = 1.5$  Hz, 2 arom. H), 6.03 (s,  $-\text{OCH}_3$ ) und 7.70 (s,  $-\text{CH}_3$ ). ( $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$  (210.19). Ber: C, 51.42; H, 4.80; N, 13.33. Gef: C, 51.40; H, 4.77; N, 13.36%).

*3-Methoxy-5-nitro-p-toluidin (XXVI).* Zu eine auf  $0^\circ$  abgekühlte Lösung von 12 g NaOH in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  wurden 9.6 g  $\text{Br}_2$  und darauf 10.5 g XXV zugesetzt. Die Lösung wurde dann 1.5 Stdn. bei Raumtemp. umgerührt, langsam bis auf  $80^\circ$  erwärmt und weiter  $\frac{1}{2}$  Stdn. auf dieser Temperatur gehalten. Bei Abkühlen der Reaktionslösung schieden sich 9 g Kristalle ab, die aus MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  in orangefarbenen Nadeln (XXVI) vom Schmp.  $125$ – $126^\circ$  kristallisierten; IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3420, 3350, 1625, 1580, 1515 und 1350; NMR ( $d_6$ -DMSO)  $\tau$ : 3.35 sowie 3.45 (jeweils d,  $J = 2$  Hz, 2 arom. H), 4.47 (s,  $-\text{NH}_2$ , durch Zugabe von  $\text{D}_2\text{O}$  verschwunden), 6.20 (s,  $-\text{OCH}_3$ ) und 7.91 (s,  $-\text{CH}_3$ ). ( $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$  (182.18). Ber: C, 52.74; H, 5.53; N, 15.38. Gef: C, 52.74; H, 5.70; N, 15.55%).

*3-Methoxy-5-nitro-p-kresol (XXVII).* 9.19 g XXVI wurden genauso wie bei XXIII diazotiert und mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zu entsprechendem Phenol umgewandelt. Die Reaktionslösung wurde mit Äther geschüttelt und die Ätherschicht mit 10%iger Natronlauge ausgezogen. Die alkalische Lösung wurde mit 5%iger HCl angesäuert und wiederum mit Äther ausgezogen. Die Ätherschicht wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und abgedampft.

Der Rückstand wurde an einer Aluminiumoxidsäule mit Äther chromatographiert. Dabei erhielt man 1.5 g hellgelbe kristalline Masse (XXXVII), die sich dünnschichtchromatographisch einheitlich erwies ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (97:3)  $R_f$  0.53). Sie wurden ohne weiteres den nächsten Reaktionen unterworfen; IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3500-3200, 1620, 1595, 1530 und 1360; NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\tau$ : 3.22 sowie 3.38 (jeweils d,  $J = 2$  Hz, 2 arom. H), 5.11 (breites s. —OH, verschwunden durch Zugabe von  $\text{D}_2\text{O}$ ), 6.17 (s. — $\text{OCH}_3$ ) und 7.83 (s. — $\text{CH}_3$ ).

2,4-Dimethoxy-6-nitrotoluol (XXVIII). 2.2 g rohes XXVII in 20 ml MeOH wurden mit einem Überschuss an Diazomethan über Nacht im Kühlschrank stehengelassen. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man aus MeOH 2.1 g hellgelbe Prismen (XXVIII) vom Schmp.  $96^\circ$ ; IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 1620, 1585, 1525 und 1330; NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\tau$ : 3.08 sowie 3.38 (jeweils d,  $J = 2$  Hz, 2 arom. H), 6.15 (s. — $\text{OCH}_3$ ), 6.18 (s. — $\text{OCH}_3$ ) und 7.72 (s. — $\text{CH}_3$ ). ( $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_4$  (197-18). Ber.: C, 54.82; H, 5.62; N, 7.10. Gef.: C, 54.49; H, 5.83; N, 7.06%).

3,5-Dimethoxy-o-toluidin (XXIX). 1.0 g XXVIII in 15 ml AcOH wurde mit 1.5 g Eisenpulver unter Umrühren 1 Std. auf  $100$ - $110^\circ$  erhitzt. Nach Zugabe von 25 ml  $\text{H}_2\text{O}$  wurde die Reaktion noch 1 Std. fortgesetzt. Die Reaktionslösung wurde mit Äther extrahiert, die Ätherschicht über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und abgedampft. Der Rückstand wurde an einer Silicagelsäule (30 g) mit  $\text{CHCl}_3$  chromatographiert. Es wurden Fraktionen von je 20 ml aufgefangen. Die Frak. 3-4 lieferten 0.58 g rohes Produkt (XXIX). Ein Teil dieses Produkts wurde in das HCl-Salz umgewandelt und aus MeOH umgelöst, wobei sich farblose Nadeln vom Schmp.  $185^\circ$  erhalten ließen; IR vom HCl-Salz  $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 2700, 2600, 2000, 1640, 1595, 1580 und 835; NMR von der freien Base ( $\text{CDCl}_3$ )  $\tau$ : 4.03 sowie 4.12 (jeweils d,  $J = 2$ , 2 arom. H), 6.27, 6.32 (jeweils s. — $\text{OCH}_3$ ) und 8.07 (s. — $\text{CH}_3$ ). ( $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$  (203-68). Ber.: C, 53.04; H, 6.93; N, 6.88. Gef.: C, 53.36; H, 7.12; N, 6.84%).

2-Methyl-3,5-dimethoxyjodbenzol (XXX). 0.77 g XXIX wurden genauso wie bei XXIII diazotiert. Dazu wurde eine Lösung von 0.83 g KJ in 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  in der Kälte hinzugefügt und  $1\frac{1}{2}$  Stdn. umgerührt. Die Lösung wurde mit Benzol ausgeschüttelt und die Benzolschicht mit 10%iger Natronlauge und darauf mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand an einer Aluminiumoxidsäule (30 g) mit Benzol chromatographiert, wobei 0.70 g farbloses Öl von XXX erhalten wurde. DC: Benzol  $R_f$  0.62; IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$   $\text{cm}^{-1}$ : 1595, 1560, 1460 und 1035; NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\tau$ : 3.06 sowie 3.63 (jeweils d,  $J = 2$  Hz, 2 arom. H), 6.25 (s,  $2 \times$  — $\text{OCH}_3$ ) und 7.33 (s. — $\text{CH}_3$ ). ( $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_2$   $J$  (278-10). Ber.: C, 38.87; H, 3.99. Gef.: C, 38.93; H, 4.26%).

2-Methyl-3,5,3'-Trimethoxydiphenyl (XXXII). 0.4 g XXX, 0.8 g XXXI, 0.4 g Kupferpulver und 0.2 g  $\text{Cu}_2\text{O}$  wurden unter Umrühren 3 Stdn. auf  $230$ - $250^\circ$  erhitzt. Nach Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch mit  $\text{CHCl}_3$  ausgeschüttelt und Chloroformschicht abgedampft. Der Rückstand wurde an einer Silicagelsäule (15 g) mit Benzol-n-Hexan (1:1) chromatographiert. Es wurden Fraktionen von je 10 ml aufgefangen. Die Frak. 13-15, die dünnschichtchromatographisch zwei Flecken zeigten (Benzol-n-Hexan (8:2)  $R_f$  0.43 und 0.50), lieferten 0.12 g Rückstand. Er wurde nochmals an einer Aluminiumoxidsäule (20 g) mit Benzol chromatographiert. Die Frak. 8-16 (je 5 ml) ergaben 16 mg farbloses Öl von XXXII. DC mit demselben Laufmittel wie oben  $R_f$  0.50. IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$   $\text{cm}^{-1}$ : 1574, 1450, 1150 und 1040.

3,5,3'-Trimethoxydiphenyl-2-carbonsäure-methylester (XVIII). 60 mg XXXII in je 5 ml Pyridin und  $\text{H}_2\text{O}$  wurde das Filtrat i. Vak. eingengt und mit AcOÄt extrahiert. Die AcOÄt-Schicht wurde mit 5%iger HCl Zugabe von 0.1 g  $\text{KMnO}_4$  wurde das Erhitzen unter Rückfluss weitere 3 Stdn. fortgesetzt. Nach Abfiltrieren wurde das Filtrat i. Vak. eingengt und mit AcOÄt extrahiert. Die AcOÄt-Schicht wurde mit 5%iger HCl sowie mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und eingengt. Der Rückstand wurde in MeOH gelöst, mit einem Überschuss an Diazomethan 1 Std. stehengelassen und das Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand wurde an einer Aluminiumoxidsäule (10 g) mit 100 ml Benzol und darauf mit 100 ml Benzol-Äther (8:2) chromatographiert. Das letztere Lösungsmittel eluierte 48 mg farbloses Öl, das durch IR, MS- sowie NMR-Spektrum mit der aus dem Naturstoff abgeleiteten Verbindung XVIII identifiziert wurde; IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$   $\text{cm}^{-1}$ : 1715, 1595, 1580, 1450 und 835. ( $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_5$  (302-31). Ber.: C, 67.54; H, 6.00. Gef.: C, 67.26; H, 6.19%).

Danksagung--Herrn Professor Dr. F. Korte, Universität Bonn, sind wir für die Identifizierung unseres Stoffes mit seinem authentischen Amarogentin sehr dankbar. Wir danken Herrn Dr. K. Hozumi und seinen Mitarbeiterinnen des Mikroanalysezentrums der Universität Kyoto für die Durchführung der Mikroanalysen und Herrn Dr. T. Shingu, Frl. M. Okawa und Herrn A. Kato von unserer Fakultät für die Messung der NMR- sowie Massenspektren. Ebenso danken wir Herrn E. Mizuta der Takeda Chemical Industries, Osaka für die Durchführung der Doppelresonanzversuche mit 100-MHz-Spektrometer.

Für die finanzielle Beihilfe sind wir ferner der Stiftung des Kultusministeriums zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung zu Dank verpflichtet.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> XIII. Mitteil.: H. Inouye, S. Ueda und Y. Takeda. *Chem. & Pharm. Bull.* **19**, 587 (1971)
- <sup>2</sup> Ein Teil dieser Arbeit wurde als vorläufige Mitteilung in *Tetrahedron Letters*, 4919 veröffentlicht (1968)
- <sup>3</sup> H. Inouye, S. Ueda und Y. Nakamura, *Chem. & Pharm. Bull.* **18**, 1856 (1970); *Tetrahedron Letters* 5229 (1966)
- <sup>4</sup> H. Inouye, T. Yoshida, Y. Nakamura und S. Tobita. *Chem. & Pharm. Bull.* **18**, 1889 (1970); *Tetrahedron Letters* 4429 (1968)
- <sup>5</sup> F. Korte. *Chem. Ber.* **88**, 704 (1955); *Ibid.* **89**, 2404 (1956)
- <sup>6</sup> T. Kubota und Y. Tomita. *Tetrahedron Letters* 453 (1961); T. Kubota und T. Kamikawa. *Bull. Soc. Chem. Japan* **35**, 1046 (1962)
- <sup>7</sup> J. E. Atkinson, P. Gupta und J. R. Lewis. *Chem. Comm.* 1386 (1968).
- <sup>8</sup> M. Komatsu, T. Tomimori und N. Mikuriya, *Chem. & Pharm. Bull.* **17**, 155 (1969)
- <sup>9</sup> G. Read und L. C. Vining. *Chem. & Ind.* 1547 (1959)
- <sup>10</sup> P. Friis und A. Kjaer. *Acta Chem. Scand.* **17**, 1515 (1963)
- <sup>11</sup> P. F. Fleury und J. Lange. *J. Pharm. Chim.* **17**, 107, 196 (1933)