

**Über die Isolierung und Charakterisierung von vier neuen
Aristolochiasäuren (aus *Aristolochia clematitis* L.)**
Pflanzliche Naturstoffe mit einer Nitrogruppe, 4. Mitt.*

Von

M. Pailer, P. Bergthaller und G. Schaden

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 10. März 1965)

In den sauren Anteilen des Wurzelextraktes von *Aristolochia clematitis* L. konnten neben den bekannten Aristolochiasäuren-I und -II geringe Mengen von vier neuen ähnlichen Säuren nachgewiesen werden. Durch Methylierung, Äthylierung und Decarboxylierung des Säuregemisches und Trennung der Umsetzungsprodukte mit Hilfe der Säulen- und der Dünnschichtchromatographie konnten Abbauprodukte aller vier Säuren isoliert und charakterisiert werden. Massenspektrometrische Untersuchungen, IR-Spektroskopie und chemische Methoden zeigten, daß die neuen Verbindungen den Aristolochiasäuren-I und -II weitgehend entsprechen. Zwei Verbindungen sind phenolisch, die beiden anderen deren Methyläther.

In addition to the already known aristolochic acids I and II, small amounts of four new acids of this class have been detected in the acidic fractions of extracts from the roots of *Aristolochia clematitis* L. Derivatives of all four acids have been isolated by methylation, ethylation and decarboxylation of the mixture of acids, and separation of the products by column and thin layer chromatography. Mass spectrometric investigation, IR spectra and chemical methods showed the new compounds to be very similar to the aristolochic acids I and II. Two of the compounds are phenols and the other two the corresponding methyl ethers.

Vor einigen Jahren haben wir uns¹⁻⁵ mit den sauren Inhaltsstoffen der Wurzel der Osterluzei, *Aristolochia clematitis* L., beschäftigt, aus

* Herrn Prof. Dr. O. Hromatka zum 60. Geburtstag gewidmet.

¹ Dissertation W. Reijtschneider, Universität Wien 1953.

² M. Pailer, L. Belohlav und E. Simonitsch, Mh. Chem. **86**, 676 (1955).

³ M. Pailer, L. Belohlav und E. Simonitsch, Mh. Chem. **87**, 249 (1956).

⁴ M. Pailer und A. Schleppnik, Mh. Chem. **88**, 367 (1957); **89**, 175 (1958).

⁵ M. Pailer, Fortschr. Chem. org. Naturst. **18**, 66 (1960).

dem Säuregemisch die Aristolochiasäure-I und die Aristolochiasäure-II isoliert und die Struktur dieser beiden Säuren aufklären können. Die Aristolochiasäure-I (AS-I)^{2, 3} konnte durch Abbau als 3,4-Methylen-dioxy-8-methoxy-10-nitrophenanthrencarbonsäure-(1) charakterisiert werden, die Aristolochiasäure-II⁴ (AS-II) erwies sich als 3,4-Methylen-dioxy-10-nitrophenanthrencarbonsäure-(1).

Auf Einzelheiten dieser Arbeiten soll hier nicht näher eingegangen werden. Schon damals ergab sich die gut begründete Vermutung, das Rohsäuregemisch enthielte noch weitere Substanzen vom Typ der Aristolochiasäure. Diese Säuren sollten sich möglicherweise nur durch Zahl, Anordnung und Natur der funktionellen Sauerstoffatome an den Ringen A und C unterscheiden.

A. *Schleppnik*⁶ konnte einen direkten Hinweis auf die Anwesenheit phenolischer Säuren im Rohsäuregemisch finden:

Er trennte aus dem Gemisch der rohen Decarboxylierungsprodukte die phenolischen Anteile ab, acetylierte sie und isolierte durch Säulenchromatographie 2 definierte, neutrale, braungelbe Produkte, die unter Zersetzung schmolzen. Die genauere Charakterisierung dieser Substanzen unterblieb, weil sie dem eigentlichen Ziel der Arbeit nicht entsprach. In ähnlicher Weise konnte er bei der Chromatographie der Methylester und der neutralen Decarboxylierungsprodukte aus dem Rohsäuregemisch nachlaufende, intensiver gefärbte Zonen feststellen. Er vermutete dort Umsetzungsprodukte anderer Aristolochiasäuren, fand allerdings immer nur Spuren dieser Substanzen und verzichtete auf deren Isolierung.

Inzwischen haben wir besonders durch Anwendung der Massenspektrometrie die Möglichkeit erhalten, auch mit minimalen Substanzmengen, wie sie bei einer weiteren Bearbeitung dieses Naturstoffkomplexes zu erwarten waren, zu befriedigenden Ergebnissen zu gelangen.

Wir extrahierten käufliches, zerkleinertes Wurzelmaterial von *Aristolochia clematitis* L. in üblicher Weise; zuerst entzogen wir dem Extraktionsgut mit Benzin die lipoidlöslichen Anteile, dann mit Methanol die polaren Substanzen, unter ihnen die erwarteten Aristolochiasäuren. Den methanolischen Auszug arbeiteten wir so auf, daß wir mit möglichst geringen Verlusten an labilen und von vornherein nur in Spuren vorhandenen phenolischen Säuren rechnen konnten. Wir erhielten aus dem dunkelbraunen Auszug ein braunes Rohsäuregemisch, das sich zu einem ockerfarbigen, erdigen Produkt trocknen ließ, und dieses untersuchten wir auf neue Aristolochiasäuren.

Auf die an sich naheliegende Isolierung der Säuren selbst, etwa durch fraktionierte Kristallisation und chromatographische Methoden, verzichteten wir nach — wenig ermutigenden — Vorversuchen. Wir beschränkten uns daher vorerst auf chromatographische Trennungen der durch Umsetzung mit Diazo-

⁶ Dissertation A. *Schleppnik*, Universität Wien 1958.

methan und -äthan erhaltenen Rohester und der rohen Decarboxylierungsprodukte⁶.

Zur raschen und sicheren Kontrolle aller Anreicherungsversuche benützten wir die Dünnschichtchromatographie der Methylester auf Aluminiumoxid-G unter Verwendung von Benzol als Laufmittel. Die Methylester treten dabei als gelbe, scharf begrenzte Flecken auf, die im UV bei 350 m μ rosa bis orange fluoreszieren und noch bei sehr geringen Substanzmengen klar erkennbar sind. Wir fanden schon beim ersten Versuch zwischen 12 und 15 anderen blau, resedagrün oder lila fluoreszierende Substanzen eine Gruppe von 3 nahe beieinanderliegenden Flecken mit rötlicher Fluoreszenz, die im sichtbaren Licht gelb gefärbten Aristolochiasäureestern entsprachen. Die R_f -Werte hängen bei dieser Trennung stark von der Aktivität der Al₂O₃-G-Schicht ab, sind also nicht streng reproduzierbar. Wir konnten die Chromatographie durch mehrmaliges Lauflassen der Platten immer so führen, daß die Flecken deutlich abgegrenzt waren und durch Vergleich eindeutig zugeordnet werden konnten.

Wie erwartet, lief der *AS*-II-methylester vor dem *AS*-I-methylester, dem *AS*-I-ester folgte ein weiterer schwacher Fleck, dem der Methylester einer neuen „Aristolochiasäure-III“ (*AS*-III-*Me*) entsprechen konnte.

Mit Hilfe dieser Kontrollchromatographie fanden wir, daß sich der Großteil der Aristolochiasäuren-I und -II durch einmaliges Umlösen der braunen Rohsäuren aus Dimethylformamid (*DMF*) unter Zusatz von etwa 1/10 der Menge Wasser abtrennen ließ, ohne daß merkliche Mengen an *AS*-III verloren gingen.

Die weiteren Versuche in größerem Maßstab, nämlich die „präparative“ Methylierung und die anschließende Säulenchromatographie der Methylester, konnten wir deshalb mit einer Rohsäure unternehmen, aus der ein Großteil der beiden Hauptsäuren (I und II) bereits entfernt war. Wir kristallisierten also die Rohsäure aus *DMF*-Wasser (10:1) um und methylierten die Säuren aus der Mutterlauge mit ätherischer Diazomethanlösung. Der dunkelbraune Abdampfrückstand wurde in CHCl₃ gelöst, von unlöslichen harzigen Produkten abgetrennt, über eine kurze Al₂O₃-Säule filtriert und die Lösung der Kristallisation überlassen. Der ausgeschiedene Kristallbrei enthielt fast ausschließlich die Methylester der beiden Hauptsäuren, in der Mutterlauge befanden sich alle fluoreszierenden Substanzen, eingeschlossen die Ester aller Aristolochiasäuren. Die Mutterlauge wurde im Vakuum eingedampft und, wie von *A. Schleppnik* beschrieben, chromatographiert. Der *AS*-II-methylester ließ sich dabei recht gut als gelbe Bande vom *AS*-I-*Me* trennen. Dieser lief dahinter als breites, dunkler gefärbtes, orangegelbes Band von der Säule ab. In den letzten Fraktionen des *AS*-I-*Me* tritt dann der *AS*-III-*Me* auf, ständig vom Ester der *AS*-I überlagert. Diese Trennung ist zwar nicht vollständig, läßt aber in einer Stufe zumindest starke Anreicherung bis auf ein Verhältnis von etwa 1:1 der beiden Ester zu. Wir haben die Chromatographie mehrmals wiederholt, kleine Mengen fast reinen *AS*-III-*Me* erhalten und diesen aus Aceton umkristallisieren können. Er bildete dann feine hellgelbe Nadeln, die bei 270—272° schmolzen und auf der Dünnschichtplatte einheitlich waren.

In den letzten Fraktionen des *AS*-III-Esters konnten wir dünn-schichtchromatographisch einen weiteren Aristolochiasäureester feststellen. Wir

ordneten diesen Fleck, der im Dünnschichtchromatogramm nach den Estern der *AS*-II, *AS*-I und *AS*-III als vierte, ganz ähnliche, aber nicht so intensive rote Fluoreszenz auftritt, dem Methylester einer „Aristolochiasäure-IV“ (*AS*-IV-*Me*) zu.

Aus der Al_2O_3 -Säule läuft der *AS*-IV-ester fast gleichzeitig mit drei scharf begrenzten, orange bis rot gefärbten Ringen aus. Wir konnten diese Ringe aber allein schon auf Grund ihres Verhaltens auf der Dünnschichtplatte Substanzen zuschreiben, die kaum als Verbindungen vom Typ der Aristolochiasäuren angesprochen werden können*. Zur Auftrennung dieser „nachlaufenden Fluoreszenzen“ haben wir eine eigene dünnschichtchromatographische Methode entwickelt; uns aber vorerst mit diesen Substanzen nicht weiter beschäftigt.

In reiner Form haben wir durch Chromatographie, Kristallisation und Sublimation die Methylester der *AS*-I, *AS*-II, *AS*-III und *AS*-IV erhalten können. Der gleiche Habitus der UV-Absorptionskurven der Methylester von *AS*-I, *AS*-II, *AS*-III und *AS*-IV bewies das Vorhandensein des Phenanthrenringsystems auch in *AS*-III und *AS*-IV.

Wir haben reinen Aristolochiasäure-I-methylester (Schmp. 284—286°), reinen Aristolochiasäure-II-methylester (Schmp. 276—277°), reinen Aristolochiasäure-III-methylester (Schmp. 277°) und — wie sich erwies — nicht vollständig reinen Aristolochiasäure-IV-methylester (Schmp. 238—240°) massenspektrometrisch untersucht.

Das Massenspektrum des *AS*-III-*Me* ist mit dem des *AS*-I-methylesters identisch, der *AS*-III-*Me* ist also ebenfalls ein Methylenedioxy-methoxynitrophenanthrencarbonsäuremethylester (Mol.-Gewicht 355). Er kann sich vom *AS*-I-*Me* nur durch die geänderte Position eines oder mehrerer Substituenten unterscheiden.

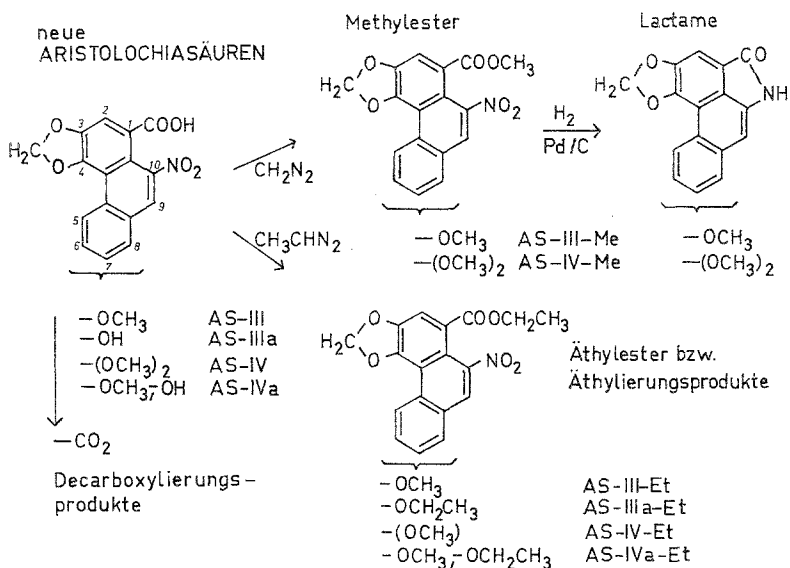
Der *AS*-IV-*Me* zeigt ein Molekölion bei der *MZ* 385 und analoge Spaltungen. Er enthält also eine zusätzliche Methoxylgruppe.

Wir hatten damit schon sehr wesentliche Anhaltspunkte, konnten aber noch nichts darüber aussagen, ob die Methoxylgruppen schon im Molekül der Säuren selbst vorhanden waren oder erst durch die Methylierung phenolischer OH-Gruppen eingeführt wurden. Um diese Frage, also die Anwesenheit phenolischer Aristolochiasäuren zu klären, haben wir eine kleine Menge (1 g) Rohsäure mit Diazoäthan genau analog der Methylierung äthyliert, die Äthylester vorgereinigt, auf einer Al_2O_3 -Säule chromatographiert und die einzelnen Fraktionen dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Wir erhielten so *AS*-II-äthylester (*AS*-II-*Et*, Schmp. 197—198°) und die wichtigeren Äthylester der Aristolochiasäuren-I, -III und -IV. Der *AS*-I-äthylester (Schmp. [nach Umlösen aus

* Sie wandern als scharfe Zonen knapp hinter den Estern und fluoreszieren blaßlila bis resedagrün.

Aceton] 277—280°) war massenspektrometrisch, abgesehen von einer geringen Verunreinigung durch *AS*-II-äthylester, einheitlich. Das Moleküllion liegt bei der *MZ* 369, bei 383 wurde keine Spitze gefunden. Diese Spitze hätte dem Äthylierungsprodukt einer *AS*-I (*AS*-Ia) entsprochen, bei der die Methoxylgruppe durch eine OH-Gruppe ersetzt wäre. Trotzdem konnten wir die Anwesenheit eines derartigen phenolischen Analogen der *AS*-I erst dann mit Sicherheit ausschließen, als wir die

FORMELÜBERSICHT 1



phenolischen Decarboxylierungsprodukte untersucht und auch dort keine entsprechende Substanz gefunden hatten. Der „Aristolochiasäure-III-äthylester“ schmilzt nach dünn-schichtchromatographischer Isolierung und Kristallisation aus Aceton unscharf von 187—200°. Auf der Dünnschichtplatte erscheint er einheitlich. Das Massenspektrum des „*AS*-III-*Et*“ ist mit dem des *AS*-I-*Et* identisch, zusätzlich aber treten um 14 nach höheren Massenzahlen verschobene Spitzen auf, die das Vorhandensein geringer Mengen des Äthylierungsproduktes einer phenolischen Aristolochiasäure-IIIa beweisen (*AS*-IIIa-*Et*).

Analog liegen die Verhältnisse beim *AS*-IV-äthylester, nur zeigte der entsprechende Fleck auf der Dünnschichtplatte bei mehrmaligem Lauflassen schwache Aufspaltung. Die Substanz sintert bei 155° C und schmilzt dann bei 195°. Sie zeigt im Massenspektrum zwei Spitzen mit den *MZ* 399 und 413, letztere als Hauptmenge. Das Auftreten einheitlicher Methylester (*AS*-III-*Me*, *AS*-IV-*Me*) nach der Methylierung des

Säuregemisches und das Vorhandensein von jeweils zwei entsprechenden Äthylierungsprodukten beweist, daß ursprünglich je zwei Säuren vorliegen, nämlich eine Methoxy-methylendioxy-nitrophenanthrencarbonsäure (*AS-III*) und die entsprechende Hydroxy-methylendioxy-nitrophenanthrencarbonsäure (*AS-IIIa*) bzw. eine Dimethoxymethylendioxy-nitrophenanthrencarbonsäure (*AS-IV*) und eine ihr entsprechende Hydroxy-methoxy-methylendioxy-nitrophenanthrencarbonsäure (*AS-IVa*). Daß die Methoxyl- und die Hydroxylgruppen bei *AS-III* und *AS-IIIa* bzw. *AS-IV* und *AS-IVa* an den gleichen Positionen des Ringsystems sitzen, ist durch die chromatographische Einheitlichkeit und den scharfen Schmp. der Methylester (Methylierungsprodukte) bereits weitgehend gesichert. Einen weiteren Beweis fanden wir später in der Identität der methylierten phenol. Decarboxylierungsprodukte mit den neutralen Decarboxylierungsprodukten von *AS-III* und *AS-IV* (*D-III*, *D-IV*).

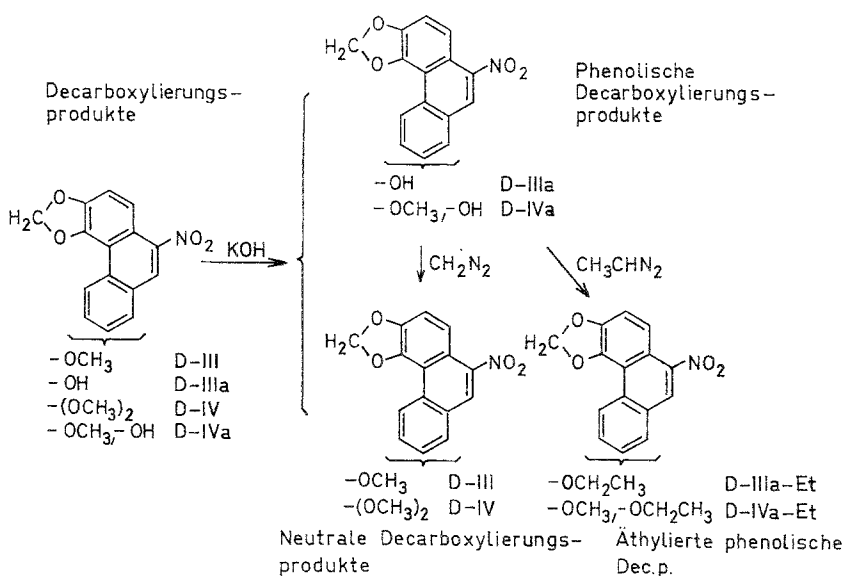
Da wir die vier neuen Aristolochiasäuren *AS-III* und *AS-IIIa*, *AS-IV* und *AS-IVa* über ihre Ester nur schwierig fassen und nicht befriedigend charakterisieren konnten, und da wir für weitere Untersuchungen bequemer zugängliche Derivate in größeren Mengen herstellen wollten, haben wir die von A. *Schleppnik* entwickelte Methode der direkten Decarboxylierung der Rohsäuren und der anschließenden Säulenchromatographie der Decarboxylierungsprodukte mit geringfügigen Änderungen auf unser Problem übertragen. Wir decarboxylierten also die braune Rohsäure wie üblich mit Naturkupfer C in Chinolin und isolierten die neutralen und phenolischen Produkte.

Die neutralen Verbindungen, die in Form von braunen, stark riechenden, öligen Eindampfrückständen anfielen, reinigten wir grob durch Chromatographie und Auskochen mit Benzin. Dabei fiel schließlich ein tief orange gefärbtes, kristallines Produkt an. Wir chromatographierten auf einer Al_2O_3 -Säule (Akt. 1—2 nach *Brockmann*). Das Chromatogramm wurde mit Benzin und steigenden Anteilen Benzol entwickelt. Dabei konnte die decarboxylierte *AS-II* (*D-II*) glatt abgetrennt werden. Nach einer kurzen Zwischenfraktion lief die decarboxylierte *AS-I* (*D-I*) als breite, unscharf endende Bande aus der Säule ab. Ebenso unscharf trat danach, von den letzten Resten überlagert, eine weitere Bande auf.

Alle Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch kontrolliert (Aluminiumoxid-G, Benzol—Benzin, 2 : 3). In den letzten Fraktionen von *D-I* ließ sich eine neue, ganz ähnliche, tiefer gefärbte Substanz feststellen. Sie sei im folgenden als Decarboxylierungsprodukt *III* (*D-III*) bezeichnet. Die auf der Säule nachlaufende breite, orange Substanz, dem Decarboxylierungsprodukt *IV* (*D-IV*). Beide neuen Substanzen ließen sich durch weitere Chromatographien feiner reinigen. Versuche, sie durch fraktionierte Kristallisation vom Decarboxylierungsprodukt *I* abzutrennen,

blieben erfolglos, wie die dünnschichtchromatographische Kontrolle zeigte.

Das orange gefärbte Decarboxylierungsprodukt III (*D*-III) schmilzt nach Umkristallisieren aus Methylenchlorid—Benzin und Sublimation (140—160°, 0,002 Torr) bei 215—218° C. Wir nahmen auf Grund des Schmelzpunktintervalls das Vorhandensein schwer abtrennbarer Verunreinigungen an, doch konnten wir auch nach mehrmaliger Wiederholung von Chromatographie, Umlösen und Sublimation immer wieder den glei-



chen Schmelzbereich feststellen. Auf der Dünnschichtplatte gaben alle Proben immer nur einen Fleck. IR-Spektrum und Massenspektrum bewiesen, daß das Decarboxylierungsprodukt III (*D*-III) dem *AS*-III-*Me* entsprach und daher von der *AS*-III stammte.

Die derberen zinnoberroten Kristalle des Decarboxylierungsproduktes IV (*D*-IV), schmelzen nach Kristallisation aus Tetrachlorkohlenstoff oder besser aus Methylenchlorid—Benzin und nachfolgender Sublimation (140—160°, 0,002 Torr) scharf bei 270—272°. Dünnschichtchromatographisch ist *D*-IV einheitlich. Wir konnten es spektroskopisch (IR-, Massenspektrum) dem Aristolochiasäure-IV-methylester und daher der *AS*-IV zuordnen.

Die Massenspektren der dünnschichtchromatographisch isolierten Äthylester hatten eindeutig die Anwesenheit zweier phenolischer Aristolochiasäuren im ursprünglichen Extrakt erwiesen und die Zuordnung dieser Säuren zu den nichtphenolischen Säuren *AS*-III und *AS*-IV er-

möglichst. Die Anwesenheit einer zur *AS-I* analogen phenolischen Aristolochiasäure in Spuren, in der die Methoxylgruppe am C-8 durch eine OH-Gruppe ersetzt wäre (*AS-Ia*), konnte allein auf Grund der Massenspektren nicht ausgeschlossen werden. Mit Sicherheit konnte eine derartige Entscheidung durch die Alkylierung der phenolischen Decarboxylierungsprodukte getroffen werden. Wir haben einen Teil dieses Gemisches mit Diazomethan methyliert, einen anderen mit Diazoäthan äthyliert. Die entstandenen Substanzen ließen sich wie die neutralen Decarboxylierungsprodukte trennen und reinigen. Es wurden jeweils nur zwei Verbindungen isoliert. Die beiden Methylierungsprodukte entsprachen den neutralen Decarboxylierungsverbindungen *D-III* und *D-IV*. Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt waren identisch (215—217° bzw. 269—272°). Eine weitere Bestätigung für die Identität (*D-IIIa-Me* = *D-III* bzw. *D-IVa-Me* = *D-IV*) ergaben die Infrarotspektren.

Damit war der Beweis erbracht, daß alle Substituenten der neuen phenolischen und nichtphenolischen Aristolochiasäuren (*AS-III* und *AS-IIIa* bzw. *AS-IV* und *AS-IVa*) am Phenanthrenring die gleichen Positionen besetzen.

Die Äthylierungsprodukte waren den neutralen Decarboxylierungsprodukten in ihren Eigenschaften sehr ähnlich. Die Massenspektren zeigten die erwarteten Moleküllionen und Bruchstücke. Die Schmelzpunkte lagen erwartungsgemäß etwas tiefer: *D-IIIa-Et*, Schmp. 190—192°, *D-IVa-Et*, Schmp. 260—262°.

Über die Position der Carboxyl- und der Nitrogruppe am Phenanthrenring ließen sich durch die Hydrierung der Ester Aussagen machen. Wir erhielten bei der Hydrierung eines Methylestergemisches von *AS-III-Me* und *AS-IV-Me* eine intensiv gelbgrün fluoreszierende Lösung. Durch Dünnschichtchromatographie an $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-G}$ mit Benzol—Methylenchlorid 2 : 1 als Laufmittel, konnten in der alkoholischen Lösung mindestens vier vorlaufende, stark fluoreszierende Begleitsubstanzen festgestellt werden. Der ebenfalls stark fluoreszierende Fleck des Hauptproduktes (Lactamgemisch) blieb am Start hängen, wanderte auch mit Methylenchlorid allein nur unwesentlich und konnte erst nach Zusatz von einigen Prozenten Methanol zum Laufen gebracht werden. Die Bedingungen für die dünn-schichtchromatographische Trennung des Lactamgemisches ließen sich direkt auf die Säule übertragen. Nach der Chromatographie auf einer kleinen Aluminiumoxidsäule konnten wir das Hydrierungsprodukt der beiden Ester massenspektrometrisch als Lactamgemisch identifizieren. Carboxyl- und Nitrogruppe müssen demnach in der dafür sterisch günstigen peri-Stellung vorliegen. Als wahrscheinlichste Möglichkeit kann für *AS-III* und *AS-IV* die Formulierung als entsprechend substituierte 10-Nitrophenanthrencarbonsäure-(1) gelten, also der Typus der beiden Hauptsäuren, Aristolochiasäure-I und -II.

Auch biogenetische Überlegungen lassen sowohl die umgekehrte Formulierung als 1-Nitrophenanthrencarbonsäure-(10) als auch die Struktur einer 4-Nitrophenanthrencarbonsäure-(5) sehr unwahrscheinlich erscheinen. Beide Strukturen sind aber allein auf Grund der bisherigen Untersuchungen nicht mit Sicherheit auszuschließen. Die endgültige Sicherung der Formel wird erst durch chemischen Abbau möglich sein.

Die vollkommene Analogie aller untersuchten Verbindungen läßt es auch sehr wahrscheinlich erscheinen, daß die Methylendioxygruppe wie bei den beiden Hauptsäuren die 3,4-Position des Phenanthrenringes besetzt, einen exakten Beweis dafür besitzen wir aber noch nicht.

Demnach ergeben sich für die vier neuen Aristolochiasäuren als wahrscheinlichste Teilstrukturen die in der nebenstehenden Formelübersicht 1 angegebenen Formeln. Für die *AS*-III und *AS*-IIIa scheidet allerdings das C-8 als Sitz der Methoxyl- bzw. Hydroxylgruppe aus. Die Formel mit der Methoxylgruppe am C-8 entspricht der *AS*-I.

S. Sasagawa hat in einigen Arbeiten⁷⁻⁹ über Inhaltsstoffe der chinesischen Droge Fang-Chi, die aus Rhizomen der *Aristolochia debilis* besteht, über das Auftreten zweier Aristolochiasäuren berichtet, die nicht mit der *AS*-I identisch sind. Eine dieser Säuren, die „Aristolochiasäure-C“ konnte er durch Umwandlung in ein Methylendioxy-methoxy-phenanthren als 3,4-Methylendioxy-6-hydroxy-10-nitrophenanthrencarbonsäure-(1) charakterisieren. Diese Säure gibt, wie er beschreibt, nach Diazomethanmethylierung ein Produkt vom Schmp. 260°. Nach Decarboxylierung und Methylierung entsteht aus der Säure eine Verbindung mit dem Schmp. 293—295°.

Die Aristolochiasäure-C aus der *Aristolochia debilis* scheint also mit unserer Aristolochiasäure-IIIa nicht identisch zu sein.

Im nachfolgenden Teil werden wir die spektrographischen Befunde im Detail besprechen.

Diskussion der Massenspektren

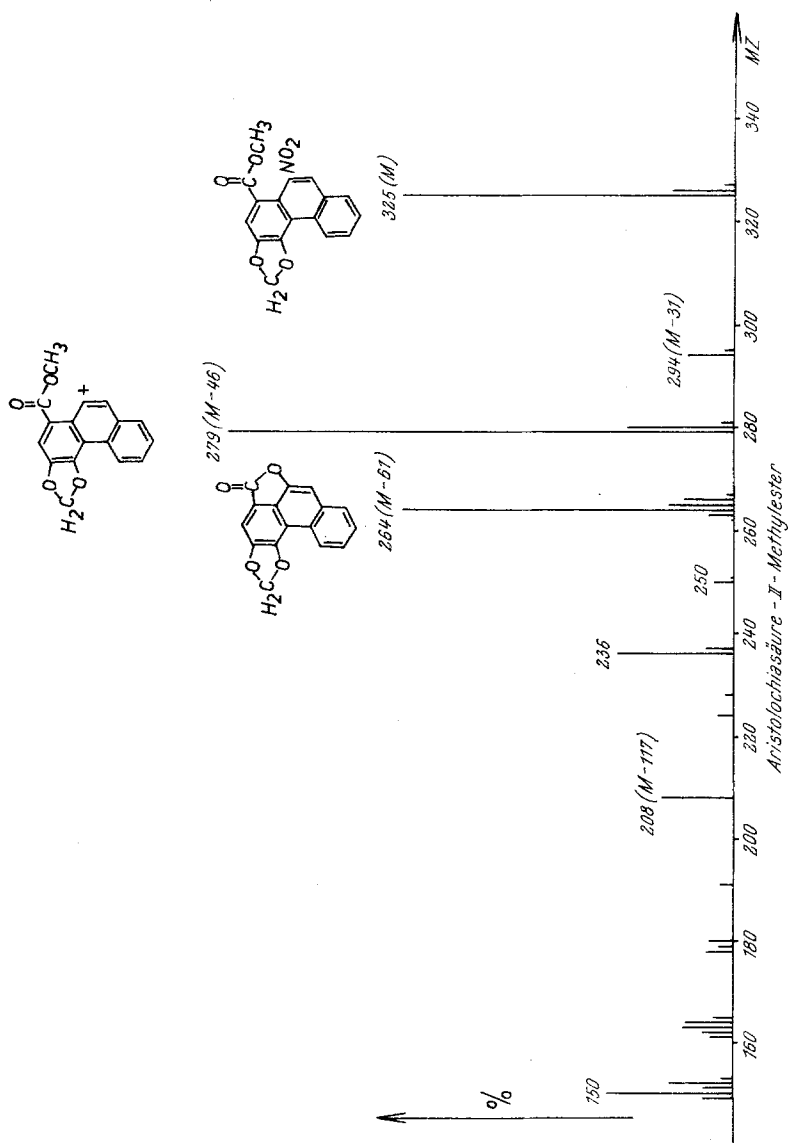
Die Massenspektren der *AS*-methylester zeigen zwei Spaltungsrichtungen. Als Hauptspaltungsreaktion findet vom stark ausgeprägten Molekölion die Eliminierung der Nitrogruppe zum Hauptbruchstück der *MZ* *M*—46 statt. Dieses bildet unter Abspaltung der Methylgruppe das Ion der *MZ* *M*—61, für das eine cyclische Formulierung möglich erscheint. Dies läßt die zweimalige Abspaltung eines Radikals leichter erklären, die durch

⁷ *Masao Tomita* und *Sadayo Sasagawa*, *Yakugaku Zasshi* **79**, 973 (1959); *Chem. Abstr.* **53**, 21841 d.

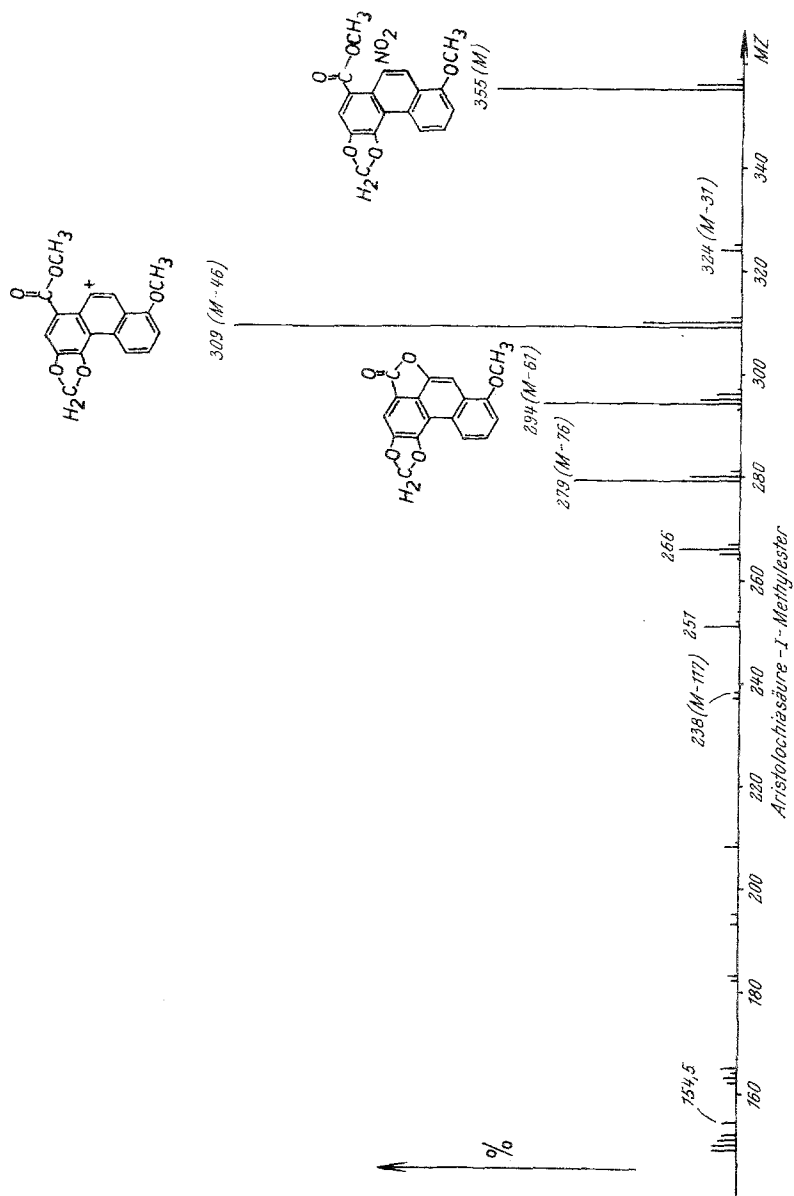
⁸ *Masao Tomita* und *Sadayo Sasagawa*, *Yakugaku Zasshi* **79**, 1470 (1959); *Chem. Abstr.* **54**, 6688 i.

⁹ *Sadayo Sasagawa*, *Yakugaku Zasshi* **82**, 921 (1962); *Chem. Abstr.* **59**, 1552 g.

metastabile Peaks bei den *MZ* 250 (ber. 249,8) in *AS-II-Me*, 280 (ber. 279,7) in *AS-I-Me* und *AS-III-Me* und 310 (ber. 309,7) in *AS-IV-Me* gesichert



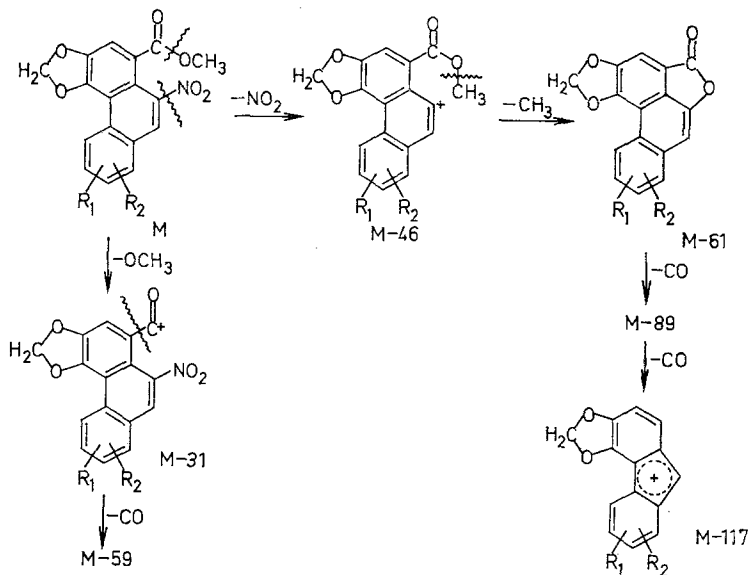
scheint. Die folgende zweimalige Abspaltung von 28 *ME* führt unter Ringverengung zum Ion der *MZ* *M*-117. Als Nebenreaktion tritt mit geringer Intensität die Spaltung der Estergruppe auf (*MZ*: *M*-31, *M*-59).



Bei Vorhandensein einer Methoxylgruppe im Ring C tritt ein zusätzliches Fragment *M*—76 auf. Dies kann einer Abspaltung von CH_2O vom Hauptbruchstück *M*—46, wie sie zum Beispiel bei Anisol¹⁰ beobachtet

¹⁰ C. S. Barnes und J. L. Occolowitz, Austral. J. Chem. **16**, 219 (1963).

wurde, entsprechen. Es wäre aber auch eine Abspaltung der Methylgruppe von Fragment *M*—61 in Erwägung zu ziehen, da unter unseren Bedingungen schwache metastabile Peaks bei 265 (ber. 264,8) in *AS-I-Me* und *-III-Me* bzw. bei 295 (ber. 294,7) in *AS-IV-Me* auftraten, die den Übergängen 294 → 279 bzw. 324 → 309 entsprechen würden. Da diese schwachen metastabilen Peaks von stabilen Ionen hoher Intensität überlagert werden, ist ihr Erkennen schwierig, und eine sichere Deutung des Fragments



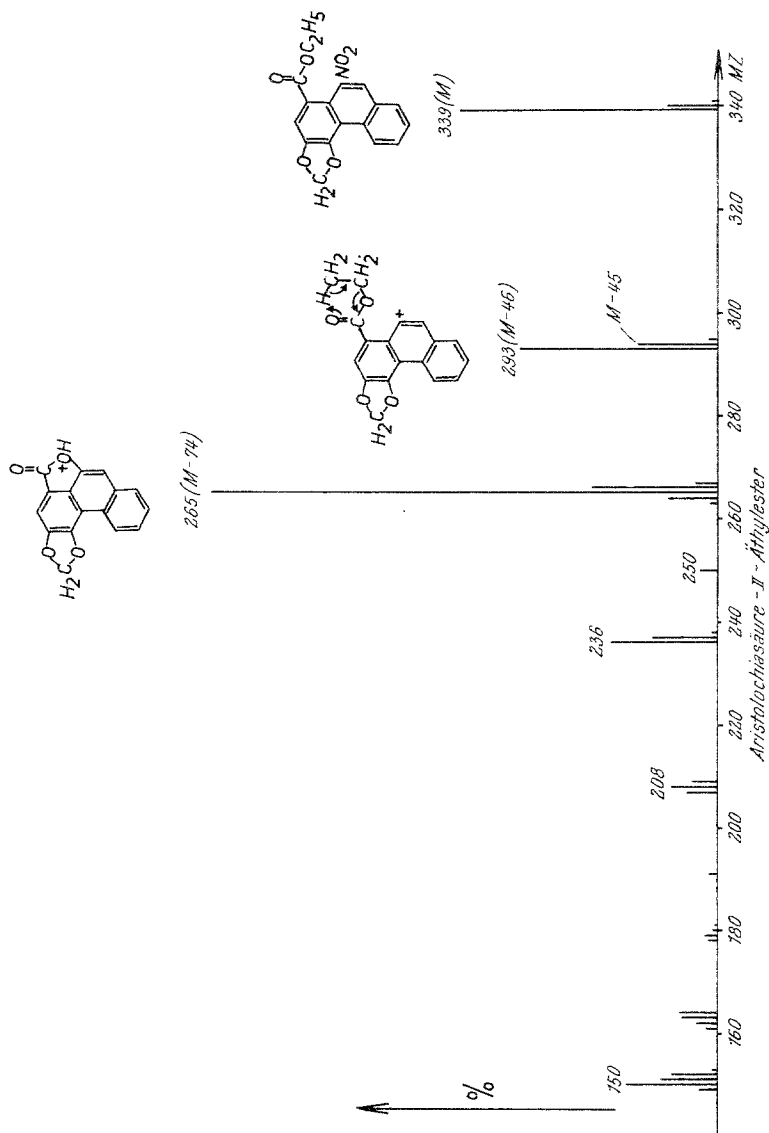
M—76 scheint nur durch Markierung der phenolischen *AS*-III a mit CD_2N_2 oder durch Aufnahme eines Spektrums mit einem hochauflösenden Gerät möglich.

Die Hauptspaltungsrichtung der Äthylester beginnt mit einer Abspaltung der Nitrogruppe zum Ion der *MZ* *M*—46, die durch einen metastabilen Peak bei der *MZ* 254 (ber. 253,2) in *AS-II-Et* belegt ist. Die nachfolgende Eliminierung von Äthylen ist ebenfalls von einem metastabilen Peak (*MZ* 240, ber. 239,7 in *AS-II-Et*) begleitet. Das entstehende Ion bei der *MZ* 265 scheint wieder durch Bildung eines fünfgliedrigen Ringes, ähnlich dem Ion 149 in Phthalsäureestern¹¹ stabilisiert zu sein. Die nachfolgende Abspaltung von 28 bzw. 29 *ME* dürfte CO bzw. CHO entsprechen.

Bei den Spektren der Decarboxylierungsprodukte ist Bruchstückbildung nur mehr mit sehr geringer Intensität zu beobachten. Bei *D*-II, *D*-III und *D*-III a-*Et* tritt Abspaltung der Nitrogruppe mit ca. 20% relativer

¹¹ E. M. Emery, Anal. Chem. **32**, 1495 (1960).

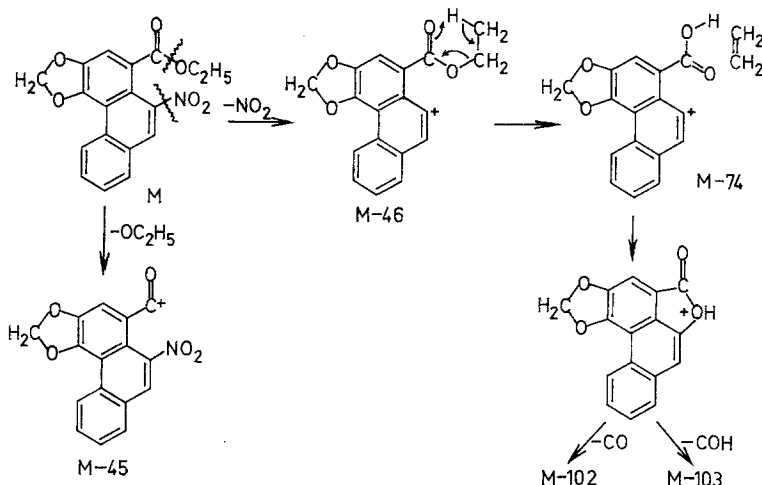
Intensität vom Molekülion auf. Diese Abspaltung fehlt bei den analogen Produkten *D*-I, *D*-IV und *D*-IV a-*Et* vollständig. Eine Abspaltung der Me-



thylgruppe, wie sie bei o- und p-Dimethoxybenzol mit großer Intensität beobachtet wurde¹⁰, tritt bei uns nicht auf. Die Eliminierung von neutralem oder geladenem NO, wie sie sonst bei aromatischen Nitroverbindungen

auftritt¹², konnten wir bei den Decarboxylierungsprodukten, wie auch bei den Estern nie feststellen. Es haben also die Methoxygruppen einen dirigierenden Einfluß auf die Abspaltung der Nitrogruppe. Ähnliche Erscheinungen wurden auch bei anderen Verbindungen, wie zum Beispiel Dinitrophenylhydrazonen bemerkt¹³. Mangels genügend Vergleichssubstanzen erscheint es uns jedoch voreilig, daraus Schlüsse auf die Positionen der Methoxygruppen zu ziehen.

Das Lactam der *AS-I* zeigt im Massenspektrum vom Molekölion als höchster Spitze starke Abspaltung von 15 *ME*, begleitet von einem meta-



stabilen Peak *MZ* 264 (ber. 263,8), danach von 28 *ME*. Dies entspricht dem normalen Verhalten von Phenol-methyläthern¹⁴. Im Gemisch der Hydrierungsprodukte aus *AS-III-Me* und *AS-IV-Me* war das Spektrum wieder zu finden, außerdem zeigte es sich in etwa gleicher Intensität nochmals, u. zw. um 30 *ME* nach höheren Massenzahlen hin verschoben. Gleiches Intensitätsverhältnis der Bruchstücke zueinander sowie das Nichtauffinden eines Molekölions bei den *MZ* 312 und 342, deuten darauf hin, daß keine Aminophenanthrencarbonsäure vorliegt, die durch den Orthoeffekt Wasser abspalten würde, sondern nur ein Gemisch der Lactame der Aristolochiasäuren III und IV.

Die Massenspektren wurden auf einem Massenspektrometer Typ CH4 der Firma Atlas MAT Bremen aufgenommen. Die Proben wurden unter Verwendung der Vakuumschleuse in die TO4-Ionenquelle eingeführt.

¹² J. H. Beynon, R. A. Saunders und A. E. Williams, Ind. Chim. Belg. **29**, 311 (1964).

¹³ G. Spiteller, unveröffentlicht.

¹⁴ H. Budzikiewicz, C. Djerassi und D. H. Williams, Interpretat. mass spectra org. compounds, Holden Day 1964, S. 174ff.

Die Verdampfungstemperatur betrug etwa $120\text{--}130^{\circ 15}$, die Elektronenenergie 70 eV.

Herrn Doz. Dr. G. Spiteller und Fr. Dr. M. Spiteller-Friedmann danken wir für ihre reiche Hilfe bei der Aufnahme und Interpretation der Spektren. Dem Österreichischen Forschungsrat danken wir für die Überlassung des Gerätes.

IR-Spektren

Von allen isolierten *AS*-Methylestern und Decarboxylierungsprodukten wurden die Infrarotspektren aufgenommen, um die massenspektrometrischen Zuordnungen durch zusätzliche Beweise zu stützen und möglicherweise weitere Hinweise auf die Natur unserer neuen Verbindungen zu erhalten.

Die IR-Spektren der neutralen Decarboxylierungsprodukte *D*-III und *D*-IV stimmen mit denen der entsprechenden methylierten phenolischen Decarboxylierungsprodukte nach Lage und Intensität der Banden vollkommen überein.

Die Spektren der Methylester zeigen im Gebiet zwischen 1410 und 1640 cm^{-1} große Ähnlichkeit mit denen der jeweiligen Decarboxylierungsprodukte.

Zwischen 1640 und 1580 cm^{-1} zeigt sich ein sehr charakteristisches Bandensystem. Eine weitere Bandengruppe von 1560 bis 1500 cm^{-1} wird von der asymmetrischen Valenzschwingung der Nitrogruppe ($1520\text{--}1540\text{ cm}^{-1}$) überlagert, ist daher nicht ganz charakteristisch.

Durch ihr sehr spezifisches Bild konnte eine zusammenhängende Bandenfolge von 1480 bis 1410 cm^{-1} als wertvolles Argument zur Zuordnung der Decarboxylierungsprodukte zu den jeweiligen Estern verwendet werden.

Diese drei breiten Absorptionsbereiche bestätigen die massenspektrometrisch gesicherte Zugehörigkeit von *D*-III zu *AS*-III-*Me* und von *D*-IV zu *AS*-IV-*Me*.

Die symmetrische Valenzschwingung der Nitrogruppe konnte in allen Fällen zwischen 1340 und 1360 cm^{-1} als intensive Bande festgestellt werden.

Eine scharfe, sehr intensive Bande zwischen 1040 und 1060 cm^{-1} tritt bei allen untersuchten *AS*-Derivaten auf. Sie entspricht wahrscheinlich CO-Valenzschwingungen der Sauerstoffatome in den Äthergruppierungen.

Völlig lagekonstant ließ sich bei 940 cm^{-1} eine scharfe Bande mittlerer Intensität in den Spektren aller untersuchten Substanzen auffinden. Am ehesten läßt sich diese Bande als CH_2 -Deformationsschwingung der Methylenedioxygruppe deuten.

¹⁵ G. Spiteller und M. Spiteller-Friedmann, Mh. Chem. **94**, 742 (1963).

Die IR-Spektren wurden auf einem Gerät des Typs Perkin Elmer Modell 237 nach der Kaliumbromidmethode aufgenommen.

Experimenteller Teil

Alle Schmelzpunkte wurden am Heizmikroskop nach *Kofler* bestimmt, alle Destillationen (Sublimationen) wurden im Kugelrohr durchgeführt. Die dabei angegebenen Temperaturen beziehen sich auf das Luftbad.

Isolierung der Rohsäuren

4,9 kg zerkleinerte, trockene Wurzeln von *Aristolochia clematitis* L. wurden in einem Extraktor mit Benzin (Sdp. 60°) entfettet und anschließend mit Methanol extrahiert. Nach Verdampfen des Methanols blieben 900 g zäher, brauner Sirup, dessen Trockengewicht zu etwa 550 g ermittelt wurde, das sind ungefähr 11%, bezogen auf trockene Wurzeln.

Je ein Drittel des Rohextraktes wurde mit 500 ml 15proz. NaHCO_3 -Lösung unter Erwärmen behandelt, dann 250 ml H_2O zugesetzt und die entstandene Suspension mit CHCl_3 extrahiert. Durch Absaugen der wäßrigen Lösung über eine Celit-Schicht konnten noch unlösliche, schwarze Flocken abgetrennt werden. Die klare, dunkle Lösung ergab nach Ansäuern mit HCl gelbbraune, schmierige Rohsäuren. Diese wurden über Celit filtriert, der Filterkuchen im Wasserbad mit 15proz. Bicarbonatlösung digeriert und die braunorange gefärbte Lösung vom Celit abgesaugt. Die vereinigten Filtrate wurden in der Kälte vorsichtig mit Salzsäure bis zur deutlich sauren Reaktion (pH 2—2,5) versetzt. Die Säuren fielen in ockerfarbigen Flocken aus und ließen sich nach Stehen über Nacht leicht abfiltrieren. Die Rohsäuren wurden zuerst im Vakuumexsiccator über CaCl_2 und dann bei 100° im Vak. getrocknet. Ausb. 33 g (gelbliche, krümelige Masse).

Fraktionierte Kristallisation der Rohsäuren

10 g Rohsäure wurden in der ausreichenden Menge *DMF* in der Hitze gelöst, dann $\frac{1}{10}$ des Volumens warmes Wasser zugesetzt und die Lösung zur Kristallisation stehen gelassen. Nach zwei Tagen wurden die Kristalle abfiltriert, mit *DMF*—Wasser 1:10 gewaschen und getrocknet. Sie bestanden zum Großteil aus *AS-I* und *AS-II*. In der Mutterlauge befanden sich noch immer große Mengen der beiden Säuren, daneben aber die anderen *Aristolochiasäuren* und Verunreinigungen. Die Mutterlauge wurde im Vak. eingedampft und der Rückstand (7 g) direkt methyliert.

Diazomethan-Methylierung und Grobreinigung des Methylestergemisches

7 g Eindampfrückstand aus den Mutterlaugen der Rohsäurekristallisation wurden in 25 ml *DMF* in der Wärme gelöst, mit 10 ml Methanol verdünnt und in mehreren Portionen in 500 ml äther. Diazomethanlösung (5—10facher Überschuß) eingegossen. Das Reaktionsgemisch trübte sich sofort unter Gasentwicklung und es schieden sich im Verlauf von ca. 20 Min. von Verunreinigungen herrührende, braunschwarze, harzige Produkte aus. Die Ätherlösung wurde filtriert und eingedampft. Der nach Vertreiben der Lösungsmittelreste im Vak. zurückbleibende braune, harzige Rückstand wurde mehrmals mit CHCl_3 ausgekocht und dieses noch heiß filtriert. Die erkaltete Lösung wurde über eine Al_2O_3 -Säule laufen gelassen. Beim Einengen des gelbbraunen

Eluates kristallisierte ein Teil der Rohester aus. Dünnschichtchromatographisch ließ sich feststellen, daß diese Esterfraktion fast ausschließlich aus den Estern der *AS-I* und *AS-II* bestand. Der *AS-III-Me* ließ sich darin nur in Spuren nachweisen. Bei der weiteren Untersuchung konnte daher auf diese Fraktion (1,2 g) verzichtet werden. Der Abdampfrückstand der Mutterlauge wurde noch einmal mit Benzol— CHCl_3 (1:1) auf einer kurzen Al_2O_3 -Säule chromatographiert und die Lösung dann eingedampft (1,64 g).

Säulenchromatographie der Methylester

Die Chromatographiesäule wurde bis zu einer Höhe von 60 cm mit dem Adsorbens gefüllt (Al_2O_3 nach *Brockmann*, Akt. 1—2). Der Eindampfrückstand des Estergemisches (1,64 g), eine gelbbraune Masse aus Kristallen und öligen Substanzen, wurde in CH_2Cl_2 in der Wärme gelöst und mit 30 g Al_2O_3 versetzt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels im Vak. war das Estergemisch noch nicht vollständig adsorbiert. Die letzten kristallisierten Reste ließen sich durch Zusatz von weiteren 20 g frischem Al_2O_3 und Aufkochen mit Benzol auf dem Adsorbens niederschlagen. Nach Eindampfen und 2stdg. Trocknung im Vak. bei 100° konnte das mit dem Estergemisch beladene Al_2O_3 auf den Säulenkopf aufgebracht werden. Dann wurde das Chromatogramm zuerst mit Benzol, dann mit Benzol + 2% CH_2Cl_2 und später mit immer steigenden Anteilen der polaren Komponente entwickelt. Nach Durchlauf von etwa 10 Litern des Lösungsmittelgemisches trat der *AS-II-Me* als erste gelbe Substanz im Eluat auf. Wir nahmen von da an Fraktionen von unterschiedlichem Volumen ab, meist 750—1000 ml, bis die letzte gelbe Zone aus der Säule eluiert war. Dann wurde die Säule mit Benzol— CH_2Cl_2 durchgewaschen. Dünnschichtchromatographische Kontrolle der aufgefundenen Fraktionen auf 0,25 mm dicken Al_2O_3 -G-Schichten mit Benzol als Laufmittel, ergab folgendes Bild.

Fraktionen vor den <i>AS</i> -Ethern (10 Liter)		blaue, vorlaufende Fluoreszenzen	
2 Fraktionen (zusammen 4 l)	340 mg	<i>AS</i> -II- <i>Me</i> und wenig fluoreszierende Verunreinigungen	
1 Fraktion	} (13 Liter)	135 mg	Gemisch von <i>AS</i> -II- <i>Me</i> und <i>AS</i> -I- <i>M</i>
6 Fraktionen		523 mg	<i>AS</i> -I- <i>Me</i>
1 Fraktion		26 mg	Gemisch von <i>AS</i> -I- <i>Me</i> und <i>AS</i> -III- <i>Me</i>
3 Fraktionen		22 mg	Gemisch, in dem <i>AS</i> -III- <i>Me</i> überwiegt, Spuren von <i>AS</i> -IV- <i>Me</i> , fluoreszierende Verunreinigungen
3 Fraktionen		43 mg	Gemisch von <i>AS</i> -I- <i>Me</i> , <i>AS</i> -III- <i>Me</i> , <i>AS</i> -IV- <i>Me</i> , größere Mengen an fluoreszierenden Verunreinigungen
Nachlauf: Benzol—CH ₂ Cl ₂		Spuren <i>AS</i> -IV- <i>Me</i> , Spuren <i>AS</i> -I- <i>Me</i> , Substanzen aus roten Ringen	

Die vor dem Auftreten der *AS*-Methylester aufgefundenen Fraktionen enthielten eine Reihe von blau fluoreszierenden Substanzen. Derartige Stoffe überlagerten das Chromatogramm in allen Fraktionen. Sie bestanden aus Ölen, die sich leicht durch Umlösen von den Estern abtrennen ließen.

Die rohen Methylester der *AS-I* und *AS-II* wurden aus *DMF* umgelöst und im Vak. sublimiert. So konnten 450 mg reiner *AS-I-Me* und 324 mg reiner *AS-II-Me* erhalten werden. Aus den drei Fraktionen, die den *AS-III-Me* als Hauptmenge enthielten, ließen sich durch fraktionierte Kristallisation aus Aceton 7 mg reiner *AS-III-Me* vom Schmp. 270—272° isolieren.

Durch eine einzige derartige Säulenchromatographie konnten nur geringe Mengen an *AS-IV-Me* isoliert werden. Die *AS-IV-Me*-Fraktion war außerdem so stark durch Ester der *AS-I* und *AS-III* und durch ölige Substanzen verunreinigt, daß fraktionierte Kristallisation aussichtslos erschien. Nach mehrmals wiederholter Säulenchromatographie fielen schließlich 8 mg einer Esterfraktion an, die zum Großteil aus *AS-IV-Me* bestand. Die noch vorhandenen öligen Nebenprodukte ließen sich als Vorlauf bei der Kugelrohrdestillation (140—160°, 0,002 Torr) übertreiben, der Ester selbst ging dann zwischen 180 und 210° über.

Aus CH_2Cl_2 und wenig Benzin kristallisierten neben feinen Nadeln gelbe, derbe Prismen aus (2 mg). Die Nadeln erwiesen sich dünnschichtchromatographisch als Gemisch von *AS-III-Me* und *AS-IV-Me*, die Mutterlauge enthielt *AS-III-Me*, *AS-IV-Me* und Spuren an fluoreszierenden Substanzen. Die derben Kristalle zeigten bei der Dünnschichtchromatographie nur einen einheitlichen Fleck, den des *AS-IV-Me*. Im Massenspektrum war allerdings auch in dieser Substanz noch eine Verunreinigung mit der *MZ* 355 (*AS-I-Me* oder *AS-III-Me*) nachweisbar. Nach Sublimation im Vak. (180—210°, 0,002 Torr): Schmp. 238—240°.

Äthylierung mit Diazoäthan und Chromatographie der Äthylester

Eine Lösung von 1 g Rohsäure in 10 ml *DMF* und 5 ml Äthanol wurde in Portionen zu einer äther. Diazoäthanlösung (100 ml) gegossen. Nach 10 Min. wurde das überschüssige Diazoäthan mit wenig Eisessig zerstört, die äther. Lösung mit 10proz. KOH ausgeschüttelt, getrocknet und eingedampft. Das Rohestergemisch ließ sich aus Aceton umkristallisieren. Die anfallenden Kristalle (250 mg) bestanden zum Großteil aus *AS-I-Et*, sie enthielten nur wenig *AS-II-Et* und nur Spuren *AS-III*-Äthylierungsprodukt. Der Abdampfrückstand der Mutterlauge, in CHCl_3 gelöst und über eine kurze Al_2O_3 -Säule gereinigt, ergab nach dem Eindampfen 300 mg schmieriges Kristallisat. Ein Teil davon (120 mg) wurde auf wenig Al_2O_3 als Träger niedergeschlagen und trocken auf eine Säule (Al_2O_3 nach Brockmann, Akt. 1—2, Füllung $1,1 \times 13$ cm) aufgetragen. Das Chromatogramm konnte wie bei den Methylestern mit Benzol entwickelt werden; als der *AS-II-Et* bis auf geringe Reste aus der Säule gelaufen war und die ersten Spuren des *AS-I-Et* im Eluat auftraten, wurde die Chromatographie unterbrochen, die Füllung aus der Säule gestoßen und nach der Farbintensität des Adsorbens in 4 Zonen geteilt: eine stark gelb gefärbte Kopfzone, eine schwächer gefärbte Zwischenzone, die stark gelb gefärbte Hauptzone des *AS-I*-esters und eine schwach gelbliche Zone knapp vor dem Säulenboden. Die einzelnen Fraktionen wurden mit CH_2Cl_2 eluiert und durch Dünnschichtchromatographie auf 0,25 mm dicken Al_2O_3 -G-Schichten mit Benzol als Laufmittel auf ihre Zusammensetzung geprüft.

Die „Kopfzone“ und die „Zwischenzone“ enthielten die Äthylierungsprodukte der neuen Säuren *AS-III*, *AS-IV* und, wie sich später massenspektrometrisch zeigen ließ, *AS-IIIa* und *AS-IVa*.

Aus den mit Benzol eluierten ersten Esterfraktionen konnte der *AS-II-Et* durch Kristallisation aus Aceton und Sublimation (180—200°, 0,002 Torr) in reiner Form isoliert werden. Schmp. 197—198°.

Aus der Hauptzone ließ sich mit CH_2Cl_2 der *AS-I-Et* neben wenig *AS-II-Et* eluieren und durch Kristallisation aus Aceton reinigen. Schmp. 277—280°.

Zwischenzone und Kopfzone wurden nach dem oben beschriebenen, dünn-schichtchromatographischen Verfahren weiter aufgetrennt. Die Dünnschichtchromatogramme der Äthylester zeigten das gleiche Aussehen wie die der Methylester und ließen analoge Verunreinigungen erkennen. Nach dreimaligem Lauf (Laufstrecke 15 cm) waren die etwa 5 mm breiten Zonen der Äthylierungsprodukte um jeweils 10—15 mm voneinander getrennt. Die einzelnen Zonen wurden von den Platten abgeschabt, die Substanzen mit CH_2Cl_2 aus dem Adsorbens eluiert und erneut dünn-schichtchromatographisch gereinigt. Nach R_f -Werten geordnet, tritt auf der Dünnschichtplatte zuerst der *AS-II-Et* auf, dahinter wandert, gut abgetrennt, *AS-I-Et*, knapp darauf folgt das chromatographisch einheitliche *AS-III-Äthylierungsprodukt*. Schmp. und Massenspektrum bewiesen seine Uneinheitlichkeit. Es bestand aus dem *AS-III-Et* und dem Äthylierungsprodukt der phenolischen *AS-IIIa* (*AS-IIIa-Et*).

Als letzte Zone tritt, deutlich vom *AS-III-äthylierungsprodukt* getrennt, das *AS-IV-Äthylierungsprodukt* auf, ebenfalls laut Massenspektrum und Schmp. uneinheitlich. Von den beiden Gemischen konnten je 1—1,5 mg erhalten werden (*AS-III-Et* und *AS-IIIa-Et*, *AS-IV-Et* und *AS-IVa-Et*). Beide Gemische wurden nach Trocknung bei 100° und 0,005 Torr zur massenspektrometrischen Untersuchung verwendet. Schmp. der *AS-III-Äthylierungsprodukte* nach chromatographischer Reinigung: 187—200°. Schmp. der *AS-IV-Äthylierungsprodukte* nach chromatographischer Reinigung: 155—195°.

Decarboxylierung der Rohsäuren

14,5 g braune Rohsäure wurden, gelöst in 300 ml frisch destilliertem Chinolin, nach Zusatz von 6 g Naturkupfer-C im Luftbad bis zum Aufbrausen erhitzt. Nach schwachem Sieden (10 Min.) wurde auf Zimmertemp. abgekühlt, mit 200 ml Äther verdünnt und filtriert. Das Filter wurde 2mal mit je 200 ml Äther nachgewaschen. Die vereinigten Ätherlösungen wurden unter Kühlung 3mal mit je 300 ml 4*n*-HCl ausgeschüttelt. Die Salzsäurephase wurde noch 4 Stdn. mit Äther extrahiert und dieser der Ätherlösung zugefügt. Auch der braune Schlamm, der nach Abfiltrieren des Kupferpulvers am Filter geblieben war, enthielt noch beachtliche Mengen an Decarboxylierungsprodukten. Er wurde daher mehrmals mit CHCl_3 ausgekocht und diese Lösung mit der Ätherlösung vereinigt. Die CHCl_3 -Ätherlösung wurde durch Schütteln mit Wasser und NaHCO_3 -Lösung gewaschen und dann 6mal mit 15proz. KOH ausgeschüttelt. Die kirschroten, alkalischen Lösungen wurden sofort mit HCl angesäuert und mit CHCl_3 ausgeschüttelt. Die Lösung der phenolischen Decarboxylierungsprodukte wurde getrocknet, im Vak. eingedampft und der Rückstand unter Verschuß bei tiefer Temp. aufbewahrt (60 mg).

Die neutralen Substanzen fielen nach Verdampfen des Lösungsmittels als braunorange gefärbte, ölige, von Kristallen durchsetzte Masse an. Diese wurde in Benzol- CHCl_3 aufgenommen und auf einer Al_2O_3 -Säule chromatographiert. Am Säulenkopf blieben große Mengen braun gefärbter Substanzen zurück, das Eluat war nur mehr schwach braun und ergab beim Einengen reichlich Kristalle. Diese wurden abfiltriert und mit Benzin gewaschen. Der ölige Rückstand nach Verdampfen der Mutterlauge wurde in Benzin aufgenommen und über Nacht stehen gelassen. Es fielen erneut schöne Kristalle aus, die abgesaugt, mit Benzin gewaschen und mit dem Erstkristallisat vereinigt wurden. Insgesamt wurden 7 g neutrale Decarboxylierungsprodukte erhalten.

Säulenchromatographie der neutralen Decarboxylierungsprodukte

Die Chromatographiesäule wurde mit Al_2O_3 (Akt. 1—2, Säulenfüllung $35 \times 4,3$ cm) trocken gefüllt und 7 g der rohen Decarboxylierungsprodukte, die auf 70 g Al_2O_3 adsorbiert waren, aufgebracht. Unter diesen Bedingungen muß die Säule als stark überladen angesehen werden, trotzdem ließen sich die decarboxylierten *AS-I* und *AS-II* (*D-I*, *D-II*) leicht voneinander trennen. Das Chromatogramm wurde mit Benzin und steigenden Anteilen Benzol entwickelt. Die letzten Fraktionen (*D-IV*) wurden mit reinem Benzol aus der Säule eluiert.

Es wurden 14 gefärbte Fraktionen zu je 1000 ml aufgefangen und ihre Zusammensetzung dünn-schichtchromatographisch geprüft. Die ersten hellgelben Fraktionen enthielten reines *D-II* und dieses wurde aus Benzol umkristallisiert (Schmp. $172-174^\circ$). Dann folgte als Zwischenzone ein Gemisch von *D-II* und *D-I*, das nicht weiter untersucht wurde. Die folgenden Fraktionen, die reines *D-I* enthielten, wurden vereinigt und das *D-I* nach Verdampfen der Lösungsmittel aus CCl_4 umkristallisiert (Schmp. $210-212^\circ$). In den letzten Eluatn der breiten, orange gefärbten Zone des *D-I* tritt das Decarboxylierungsprodukt der *AS-III* (*D-III*) auf. *D-III* und Reste von *D-I* liefen gleichzeitig von der Säule ab. Nach diesen Eluatn konnten noch einige schwächer gelb gefärbte Fraktionen gesammelt werden, die *D-IV* neben Spuren von *D-III* und *D-I* enthielten.

Alle Fraktionen, die *D-III* in verwertbaren Mengen enthielten, wurden vereinigt und erneut auf einer Al_2O_3 -Säule (20×2 cm) mit Benzin—Benzol chromatographiert. Nach 3maliger Wiederholung dieser Trennung wurden 34 mg an dünn-schichtchromatographisch reinem *D-III* erhalten. Nach 2maligem Umkristallisieren aus CH_2Cl_2 —Benzin und Sublimation im Vak. ($140-160^\circ$, 0,002 Torr) hatte *D-III* den Schmp. $215-218^\circ$.

Das zinnoberrote *D-IV* konnte aus den drei Fraktionen, in denen es festgestellt worden war, nach 2maliger Chromatographie auf einer kleinen Al_2O_3 -Säule als Reinstoff isoliert werden. Nach Kristallisation aus CH_2Cl_2 —Benzin und Sublimation ($140-160^\circ$, 0,002 Torr) schmilzt *D-IV* bei $270-272^\circ$; Ausb. 15 mg.

Methylierung und Äthylierung der phenolischen Decarboxylierungsprodukte

Die Umsetzung der phenol. Decarboxylierungsprodukte mit Diazomethan und Diazoäthan erfolgte in gleicher Weise, die Auftrennung wurde wie bei den neutralen Decarboxylierungsprodukten durchgeführt.

Für die Methylierung wurde ein Drittel der Substanz (20 mg) in Tetrahydrofuran gelöst, mit Methanol versetzt und in 100 ml äther. Diazomethanlösung gegossen. Nach einigem Stehen wurde das Lösungsmittel abgedampft, der Rückstand in Benzol aufgenommen und die Lösung über eine kurze Al_2O_3 -Säule filtriert. Beim Einengen der Lösung schieden sich Kristalle ab, die analog der Trennung der neutralen Decarboxylierungsprodukte isoliert werden konnten.

So wurden 2 Methylierungsprodukte erhalten: Schmp. $215-218^\circ$ bzw. Schmp. $270-272^\circ$.

Bei der Äthylierung ergaben sich ebenfalls zwei definierte Substanzen: *D-III a-Et*, orange gefärbte Kristalle mit dem Schmp. $190-192^\circ$ und *D-IV a-Et* zinnoberrote Kristalle vom Schmp. $260-262^\circ$.

Von jeder dieser Substanzen wurden 4—5 mg erhalten.

Katalytische Hydrierung des Methylestergemisches der Aristolochiasäuren III und IV (AS-III-Me, AS-IV-Me)

4,5 mg eines Methylestergemisches, das durch fraktionierte Kristallisation erhalten worden war und *AS-III-Me* und *AS-IV-Me* in ungefähr gleichen Teilen enthielt, wurde in Äthanol mit 10proz. Pd-Tierkohle und Wasserstoff hydriert (Apparatur nach *H. Bretschneider* und *G. Burger*¹⁶). Nach Aufnahme von etwas mehr als 3 Molen H_2 war die Hydrierung beendet. Die fluoreszierende Lösung wurde filtriert, das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand im Vak. destilliert (210—230°, 0,002 Torr).

Das Destillat wurde in CH_2Cl_2 aufgenommen und auf einer kleinen Al_2O_3 -Säule chromatographiert. Fluoreszierende Verunreinigungen wurden mit CH_2Cl_2 aus der Säule eluiert, während das Hauptprodukt am Säulenkopf haften blieb und erst durch Zusatz von 20% CH_3OH wanderte. Das Lösungsmittel dieser Fraktion wurde verdampft und der Rückstand, das Gemisch der beiden Lactame III und IV, im Vak. bei 100° getrocknet.

¹⁶ *H. Bretschneider* und *G. Burger*, Chem. Fabrik **11/12**, 124 (1937).