

Ein neues Catechinglykosid aus *Polypodium vulgare*

A New Catechin Glycoside from *Polypodium vulgare*

Christian Karl, Gerhard Müller und Peter Alsted Pedersen

Weleda AG, D-7070 Schwäbisch Gmünd

Z. Naturforsch. **37 c**, 148–151 (1982); received November 23, 1981

Polypodium vulgare L., Polypodiaceae, Catechin 7-O-D-apioside, Polydine, Kaempferol 3-O-(4 or 5-rhamnosyl)arabinoside

From acetone extracts of fresh aerial parts of *Polypodium vulgare* L. 9 phenolic compounds were isolated. Two of them, catechin 7-O-D-apioside and kaempferol 3-O-(4 or 5-rhamnosyl)arabinoside, were found for the first time in nature. Furthermore it was shown that polydine is catechin, 7-O- α -L-arabinofuranoside. The other components were rutin, hyperin, kaempferol-3-O-glucoside and -arabinoside-7-O-rhamnoside and the C-glycosides schaftoside and isoschaftoside.

In den getrockneten Wedeln von *Polypodium vulgare* wurden bis heute folgende phenolischen Inhaltsstoffe nachgewiesen: Zimtsäurederivate [1], Leukoanthocyane [2], Chlorogensäure [3] und die Flavonoide Quercetin, Rutin, Nicotiflorin und ein Quercetin-3-O-triosid [3]. Im Zuge unserer Untersuchungen einheimischer Polypodiaceen interessierte uns, ob das in den Rhizomen vorkommende Polydin, dessen Struktur von Weinges und Wild [4] als Catechin-7-O-L-arabinosid aufgeklärt wurde, auch in den Wedeln vorhanden ist.

Ergebnisse und Diskussion

Aus den frischen Wedeln wurden zwei Catechinglykoside A und B isoliert, von denen sich A nach Hydrolyseversuchen, spektroskopischen Befunden und Vergleich mit authentischer Substanz als Polydin erwies. B ergab bei saurer Hydrolyse Catechin und (+)-D-Apiose. Um Aufschluß über die Substitutionsstelle des Zuckers zu erhalten, methylierten und hydrolysierten wir beide Glykoside. Nach den EI-Massenspektren entstand in beiden Fällen ein Trimethoxycatechin mit gleichem Massenabbau. Auch chromatographisch ließ sich zwischen beiden kein Unterschied feststellen, und ihr Mischschmelzpunkt zeigte keine Depression. Das PMR-Spektrum von B (s. Tab. I) stimmte mit dem des Polydins weitgehend überein. Die Zurordnung des Signals für H-3 erfolgte nach [5]. Das Signal des anomeren Zuckerprotons

liegt bei δ 5,52 ppm mit $J=3,0$ Hz, das des H-2'' folglich bei 4,22 ppm. Wagner und Demuth [6] fanden ähnliche Werte für die entsprechenden Protonen eines D-Apiofuranosids, auch die übrigen Signale der Zuckerprotonen stimmen bis auf das Singlett damit überein. Bei einem Apiobiosid wurde jedoch ein Zwei-Protonen-Singlett bei δ 3,89 ppm beobachtet [7], das von einer CH_2 -Gruppe stammte. Erwartungsgemäß zeigt das PMR-Spektrum von B wie das des Polydins in Aceton im Bereich 7,9–8,3 ppm drei Signale, drei H entsprechend, die nach Zusatz von D_2O verschwinden. Daraus folgt, daß eine phenolische OH-Gruppe glykosidiert ist. Ein Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren beider Substanzen mit dem des Catechins (s. Tab. II) bestätigt eindeutig, daß eine Glykosidierung nur in 5- oder 7-Stellung möglich ist. Die Verschiebungen der Signale in A und B gegenüber denen des Catechins zeigen gute Übereinstimmung mit den für Flavonoid-7-O-glykosiden bekannten [8].

Anzumerken ist, daß B in Pflanzenmaterial verschiedenen Ursprungs nachgewiesen werden konnte und wie Polydin im Rhizom in höherer Konzentration vorhanden ist.

Weinges und Wild [4] nahmen aufgrund der Spaltung des Polydins mit einem Enzymgemisch an, daß es sich bei diesem um ein β -L-Arabinosid handele. Vergleicht man jedoch die chemischen Verschiebungen der Zucker-C-Atome im ^{13}C -NMR-Spektrum des Polydins mit den Angaben [9, 10] für Methyl- α bzw. β -L- oder -D-arabinofuranoside (C-1 der α -Verbindungen δ 109 ppm, der β -Verbindungen 103 ppm) und Methyl- α -L- oder -D-arabinopyranosid (C-5 δ 67,3 ppm), so ergibt sich eindeutig, daß

Tab. I. PMR-Daten von Polydin (A) und Catechin-7-apiosid (B) in Aceton + D₂O (ppm (J_{Hz})).

Subst.	Aromat. Protonen					Zuckerprotonen	
	A-Ring	B-Ring	H-2	H-3	H-4	H-1''	übrige
A	6,24 d (2) 6,10 d (2)	6,92 p 6,79 m	4,63 d (7,6)	3,97 m	2,94 dd (5,5, 16) 2,56 dd (8,5, 16)	5,49 d (1,8)	4,24 – 3,73 m
B	6,23 d (2,4) 6,08 d (2,4)	6,92 m 6,79 m	4,63 d (7,6)	3,93 m	2,94 dd (5,5, 16) 2,56 dd (8,5, 16)	5,52 d (3,0)	4,22 d (3,0) 3,93 3,66 s (2H)

p.: ein perturbiertes Singlett.

Polydin als α -Arabinofuranosid vorliegen muß. Bestätigt wird dies weiter durch die Kopplungskonstante des anomeren Protons im PMR-Spektrum ($J_{1,2}$ für Methyl- α -L-arabinofuranosid 1,2 Hz, für die β -Verbindung 4,0 Hz [11]). Daß L-Arabinose vorlag, hatte sich aus der optischen Drehung des durch Hydrolyse gewonnenen Zuckers bestätigt. Demnach ist Polydin (+)-Catechin-7-O- α -L-arabinofuranosid.

Bei der Isolierung der Catechinglykoside fielen außerdem noch Rutin, Kämpferol-3-O-glucosid, Hyperosid (Hyperin) und in geringer Menge zwei weitere Flavonglykoside C und D an, die bei saurer Hydrolyse jeweils Kämpferol, Arabinose und Rhamnose im Verhältnis 1:1:1 lieferten. Aufgrund der UV-Spektren war C in 3- und 7-Stellung, D in 3-Stellung substituiert. C ließ sich im Gegensatz zu D mit Soja-Remanase NOVO stufenweise hydrolysieren. Das Zwischenprodukt E erwies sich als Kämpferol-7-O-rhamnosid. Also war C Kämpferol-3-O-arabinosid-7-O-rhamnosid, eine Verbindung, die vor kurzem in einem anderen Farn, *Asplenium trichomanes*, gefunden wurde [12].

Von D wurden die Methylalditolacetate hergestellt und gc-ms [13] untersucht. Wir erhielten 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylrhamnitol und 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3-di-O-methylarabitol. Es handelte sich bei D also um Kämpferol-3-O-(rhamnosyl (1→4))-arabinopyranosid oder Kämpferol-3-O-(rhamnosyl (1→5))-arabinofuranosid, von denen keines bisher als Naturstoffe bekannt sind. Weitere Untersuchungen wie ¹³C-NMR konnten bei beiden Glykosiden wegen Substanzmangel nicht durchgeführt werden.

Mengenmäßig überwogen jedoch zwei Flavonglykoside F und G, die aus dem Butanol-Extrakt gewonnen wurden. Bei Behandlung mit Säure ließen sie sich nicht hydrolysieren, sondern wurden offensichtlich ineinander übergeführt, eine Erscheinung wie sie bei mit verschiedenen Zuckern substituierten

Flavon-6,8-di-C-glykosiden beobachtet wird (Wesely-Moser-Umlagerung). Bei beiden Glykosiden ließ sich nach HI-Reduktion Apigenin, nach Oxydation mit FeCl₃ Glucose und Arabinose nachweisen. Vergleich mit authentischer Substanz bestätigte, daß F Schaftosid und G Isoschaftosid war.

Experimentelles

Geräte: UV, MS vgl. [14]. NMR-Spektren wurden auf einem Jeol FX 90 Q mit TMS als innerem Standard (¹³C-NMR bei 22,53 MHz) registriert.

Pflanzenmaterial: Eigener Anbau und Wildsammlung Westerwald.

Isolierung: 10 kg frische Wedel wurden eine Woche mit 40 kg Aceton mazeriert. Nach Filtration wurde am Rotavap bei 45° zur Sirupdicke eingengt. Chlorophyll wurde durch Filtration und Extraktion mit CCl₄ entfernt, danach wurde mit Lösungsmitteln steigender Polarität (Ethylether bis *n*-BuOH) fraktioniert extrahiert. Die Ethylacetat-Fraktion (8,9 g) wurde sc an Sephadex LH 20 mit Ethanol 95% vorgetrennt. Man erhielt drei Fraktionen I–III. Aus I wurden nach mehrmaliger SC an Sephadex LH 20 mit MeOH/CHCl₃-Gemischen Rutin, Kämpferol-3-O-glucosid und zwei weitere Flavonglykoside C und D isoliert. Aus Fraktion II wurden auf gleiche Weise Hyperosid und Substanz A, aus Fraktion III Substanz B erhalten. A und B wurden weiter sc an Sephadex LH 20 mit Aceton und anschließend mit Ethylacetat/MeOH-Gemischen gereinigt.

Ausbeute: A 650 mg, B 150 mg.

Aus 10,1 kg frischen Rhizomen des gleichen Pflanzenmaterials wurden 2,9 g A und 1,3 g B isoliert.

Aus der *n*-BuOH-Fraktion (36,2 g) wurden nach mehrfacher SC an Cellulose MN 2100 mit HOAc 1% die Flavonglykoside F (570 mg) und G (730 mg) erhalten.

Tab. II. ^{13}C -NMR-Daten von Polydin (A), Catechin-7- α -apiosid (B) und Catechin (H) in MeOH (ppm).

	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'
A	82,8	68,6	28,5	157,9 ^a	97,7 ^b	157,4 ^b	97,1 ^b	156,8 ^a	103,3	132,1	115,3	146,2	146,2	116,1	120,0
B	82,8	68,6	28,3	158,0 ^a	97,3 ^b	157,4 ^a	96,9 ^b	156,8 ^a	103,3	132,1	115,2	146,2	146,2	116,1	120,0
H	82,6	68,7	28,3	157,4 ^a	93,3 ^b	157,6 ^a	95,6 ^b	156,7 ^a	100,9	132,1	115,2	146,0	146,0	116,1	120,0

^{a, b} Zuordnungen mit denselben Buchstaben sind austauschbar.

Tab. II. (Fortsetzung – Zuckerprotonen)

	C-1''	C-2''	C-3''	C-4''	C-5''
A	107,8	83,7	78,3	86,0	62,8
B	108,7	78,3	80,3	75,4	65,0

Vergleichssubstanzen: (+)-Catechin, Fa. C. Roth, Karlsruhe; (+)-L-Arabinose, Fa. E. Merck; (+)-D-Apiose isoliert aus Apiin.

Hydrolysen

a) sauer: 1 mg Glykosid wurde in 1 ml N HCl gelöst. Die Lösung wurde 2 h bei 100° gehalten. Nach dem Abkühlen wurden die Aglyka mit Diethylether extrahiert. Die wäßrige Phase wurde mit Ag_2CO_3 versetzt. Nach Beendigung der Gasentwicklung wurde filtriert und eingengt. Aus dieser Lösung erfolgte der Nachweis der Zucker.

b) mit Soja-Remanase (Fa. NOVO, Kopenhagen): 1 mg Glykosid wurde in 1 ml Wasser gelöst und mit einer kleinen Spatelspitze Enzympulver versetzt. Man inkubierte über Nacht bei 37° und gab die Lösung anschließend auf eine kurze Polyamidsäule. Man eluierte mit Wasser, dann mit MeOH. Der Nachweis der Zucker erfolgte aus dem eingengten wäßrigen, der der Aglyka aus dem methanolischen Eluat.

Spaltungen der Flavon-C-glykoside

a) reduktiv mit HI: nach [15].

b) oxydativ mit FeCl_3 : nach [16].

Chromatographie (DC): System I Kieselgel, CHCl_3 :HOAc: H_2O 55:45:10, System II Cellulose, HOAc 15%, System III Kieselgel, Ethylacetat: $\text{HCOOH}:\text{H}_2\text{O}$ 70:14:21, System IV Kieselgel, Toluol: $\text{HCOOH}:\text{Ameisensäureethylester}$ 5:1:4. Für Zucker: Kieselgel, Aceton:*n*-BuOH: H_2O 70:15:15 und Kieselgel, *n*-Propanol: EtOH: H_2O 70:20:10.

Catechin-7-O- α -L-arabinofuranosid, Polydin (A): Schmp. 189–91° (188–89° nach [17]). DC (R_f -Werte): I 0,15, III 0,65. Hydrolysen, sauer und enzymatisch: Catechin und (+)-L-Arabinose. UV λ_{max} nm (MeOH): 282. FD-MS m/z : 423 ($M+1$).

Catechin-7-O-D-apiofuranosid (B): Schmp. 171–74° (Übergang zur klaren Schmelze ist schleppend). DC (R_f -Werte): I 0,12, III 0,66. Hydrolysen, sauer und enzymatisch: Catechin und (+)-D-Apiose. UV λ_{max} nm (MeOH): 280. FD-MS m/z 423 ($M+1$).

5,3',4'-Trimethoxycatechin: Herstellung aus A und B nach [4]. Schmp. 256–58°, Misch-Schmp. 256–58°. DC (R_f -Wert): IV 0,35. FD-MS m/z : 332 (M^+). EI-MS m/e (rel. Intensität): 332 (40), 181 (12), 180 (92), 165 (20), 153 (100), 152 (20), 151 (28), 137 (7), 123 (6), 97 (10), 95 (8), 71 (13), 69 (13), 58 (8), 57 (21), 44 (19), 43 (28).

Kämpferol-3-O-arabinosid-7-O-rhamnosid (C): DC (R_F -Werte): I 0,35, III 0,63. Hydrolysen, sauer: Kämpferol, Arabinose, Rhamnose; enzymatisch: Kämpferol-7-O-rhamnosid, Arabinose. UV λ_{\max} nm: MeOH 267, 302, 351; MeONa 273, 355, 392; NaOAc 267, 395; H₃BO₃ 267, 352; AlCl₃ 274, 302, 358, 400; AlCl₃/HCl 275, 300, 351, 396.

Kämpferol-7-O-rhamnosid (E): 10 mg C, gelöst in 2 ml H₂O, wurden bei Raumtemperatur 10 min mit Soja-Remanase hydrolysiert. Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von MeOH unterbrochen und die Lösung am Rotavap zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in wenig MeOH gelöst, auf eine kurze Sephadex LH 20-Säule gegeben und mit MeOH eluiert. Ausbeute: 3 mg.

DC (R_F -Wert): III 0,87, unter UV₃₆₅ gelbe Fluoreszenz. Hydrolyse, sauer und enzymatisch: Kämpferol, Rhamnose. UV λ_{\max} nm: MeOH 266, 327, 368; MeONa 268, 427; NaOAc 263, 411; H₃BO₃ 264, 371; AlCl₃ 267, 301, 360, 428; AlCl₃/HCl 267, 301, 358, 428.

Kämpferol-3-O-(rhamnosyl)-arabinosid (D): DC (R_F -Werte): I 0,31, III 0,63. Hydrolyse, sauer: Kämpferol, Arabinose, Rhamnose. UV λ_{\max} nm: MeOH 267, 313, 351; MeONa 274, 326, 398; NaOAc 274, 321, 391; H₃BO₃ 267, 305, 352; AlCl₃ 274, 304, 357, 398; AlCl₃/HCl 276, 302, 349, 395. Die MS-Daten

der Methylaldditolacetate stimmen mit denen der Literatur [13] überein.

Schaftosid (F): DC (R_F -Werte): I 0,18, II 0,45, III 0,24. Spaltung mit FeCl₃: Glucose, Arabinose; mit HI: Apigenin. UV λ_{\max} nm: MeOH 275, 340; MeONa 283, 336, 405; NaOAc 284, 310, 342, 400; H₃BO₃ 284, 324, 355, 400; AlCl₃ 282, 306, 357, 384; AlCl₃/HCl 283, 306, 350, 380. FD-MS m/z 565 (M + 1).

Isoschaftosid (G): DC (R_F -Werte): I 0,19, II 0,33, III 0,24. Spaltung mit FeCl₃: Glucose, Arabinose; mit HI: Apigenin. UV λ_{\max} nm: MeOH 274, 336; MeONa 283, 336, 403; NaOAc 283, 310, 339, 399; H₃BO₃ 285, 323, 354, 415; AlCl₃ 282, 306, 356, 382; AlCl₃/HCl 282, 305, 349, 380. FD-MS m/z 565 (M + 1).

Dank

Für Vergleichssubstanzen danken wir Herrn Prof. Dr. J. Chopin (Villeurbanne) und Herrn Dr. J. Jizba (Prag), für die Aufnahme der Gas-Chromatogramme und Massenspektren Herrn Dipl. Ing. E. Larsen und Herrn H. Egsgaard, AEK Risø. Wir danken ferner dem Chemischen Laboratorium II der Universität Kopenhagen für die Aufnahme der NMR-Spektren. Das entsprechende Gerät wurde von „Statens Naturvidenskabelige Forskningsraad“ zur Verfügung gestellt.

- [1] B. Voirin, C. R. Acad. Sci., Ser. D **264**, 665 (1967).
- [2] B. A. Bohm u. R. M. Tryon, Can. J. Bot. **45**, 585 (1967).
- [3] J. Grzybek, Acta Biol. Cracov., Ser. Botan. **19**, 69 (1976).
- [4] K. Weinges u. R. Wild, Ann. Chem. **734**, 46 (1970).
- [5] S. Y. Islambekov, A. K. Karimdzhanov, A. J. Ismailov, F. G. Kamaev u. A. S. Sadykov, Khim. Prir. Soedin. **1976**, 46 bzw. Chem. Natur. Compounds **11**, 39 (1976).
- [6] H. Wagner u. G. Demuth, Tetrahedron Lett. **1972**, 5013.
- [7] D. A. Hart u. P. K. Kindel, Biochem. **9**, 2190 (1970).
- [8] K. R. Markham, B. Ternai, R. Stanley, H. Geiger u. T. J. Mabry, Tetrahedron **34**, 1389 (1978).
- [9] P. A. J. Gorin u. M. Mazurek, Can. J. Chem. **53**, 1212 (1975).

- [10] R. G. S. Ritchie, N. Cyr, B. Korsch, H. J. Koch u. A. S. Perlin, Can. J. Chem. **53**, 1424 (1975).
- [11] K. Horitsu u. P. A. J. Gorin, Agric. Biol. Chem. **41**, 1459 (1977).
- [12] F. Imperato, Experientia **35**, 1134 (1979).
- [13] P. E. Jansson, L. Kenne, H. Liedgren, B. Lindberg u. J. Lönngren, A Practical Guide to the Methylation Analysis of Carbohydrates, Chem. Commun. Univ. Stockholm 1976, No. 8, 74 S.
- [14] C. Karl, G. Müller u. P. A. Pedersen, Planta Med **41**, 96 (1981).
- [15] S. Iseda, Bull. Chem. Soc. Japan **30**, 625 (1957).
- [16] B. H. Koeppen u. D. G. Roux, Biochem. J. **97**, 444 (1965).
- [17] L. Fischer u. E. V. Lynn, J. Am. Pharm. Assoc. **22**, 1225 (1933).