

0.604×10^{-3} $\Delta\epsilon$ (nm): -0.033 (335), -0.066 (330), -0.165 (325), -0.325 (320), -0.630 (315), -0.688 (310), -0.847 (305), -0.902 (302), -0.891 (300), -0.858 (295), -0.731 (290), -0.583 (285), -0.429 (280), -0.313 (275), -0.198 (270), -0.116 (265), -0.044 (260), -0.033 (255), -0.022 (250).

8 β ,14 α -Diacetoxy-26,27-bisnoronocerane-3,21-dione (12)⁸⁾—CD ($c=0.174 \times 10^{-3}$) $\Delta\epsilon$ (nm): -0.11 (320), -0.18 (315), -0.18 (311), 0 (309), 0.17 (300), 0.48 (295), 0.70 (290), 0.85 (285), 0.96 (280), 0.92 (275), 0.79 (270), 0.61 (265), 0.46 (260), 0.42 (255), 0.26 (250), 0.18 (245), 0.13 (240).

[Chem. Pharm. Bull.]
28(10)3137-3139(1980)]

Chemische und chemotaxonomische Untersuchungen von Filices. XXXII.¹⁾
Chemische Untersuchungen der Inhaltsstoffe von
***Plenasium banksiifolium* (Pr.) Pr.**

TAKAO MURAKAMI, HIROSHI WADA, NOBUTOSHI TANAKA,^{2a)} TAKASHI YAMAGISHI,^{2b)}
YASUHISA SAIKI,^{2c)} und CHIU-MING CHEN^{2d)}

*Pharmaceutical Institute, Science University of Tokyo,^{2a)} Hokkaido Institute of Public Health,^{2b)} Department of Pharmaceutical Sciences, Kobe Gakuin University^{2c)}
und Department of Chemistry, National Tsing Hua University^{2d)}*

(Eingegangen am 24. Mai 1980)

The fronds of *Plenasium banksiifolium* (Pr.) Pr. contain stigmastan-3 β ,5 α -diol-6-one and its C₂₈-homolog, which are previously unreported in nature, together with the known compounds, ecdysone, ecdysterone, astragalol, stigmastan-3 β ,5 α ,6 β -triol and its C₂₈-homolog.

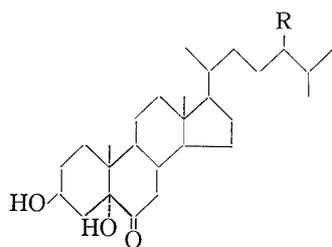
Keywords—*Plenasium banksiifolium*; fern; chemotaxonomy; phytoecdysones; flavonol-glucoside; phytosterols; GLC-MS-coupling

Nach H. Hikino und Mitarb. besitzt *Plenasium banksiifolium* (Pr.) Pr. (jap. Name: Shiroyama-zenmai) eine starke Häutungshormonaktivität.³⁾ In Fortsetzung unserer chemischen und chemotaxonomischen Untersuchungen von Filices wurde *P. banksiifolium* auf die Inhaltsstoffe untersucht. Die oberirdischen Teile enthalten neben Ecdyson,⁴⁾ Ecdysteron,⁵⁾ und Astragalol (Kaempferol 3-O- β -D-glukosid)⁶⁾ zwei weitere Sterine I und II, die nur als Homologen-Gemische isoliert wurden.

I, Schmp. 242—245°, wurde durch den Vergleich mit dem synthetischen Produkt aus β -Sitosterin (begleitet von 10% Campesterin) als Stigmastan-3 β ,5 α ,6 β -triol (III)⁷⁾ mit Beimengung des C₂₈-Homologen (20%) identifiziert.

- 1) XXXI Mittel: N. Tanaka, H. Maehashi, S. Saito, T. Murakami, Y. Saiki, C.-M. Chen, und Y. Iitaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3070 (1980).
- 2) Adresse: a) *Funakawara-machi, Shinjuku-ku, Tokyo, 162, Japan*; b) *Kita 12, Nishi 12, Kita-ku, Sapporo, 060, Japan*; c) *Arise, Igawatani-machi, Tarumi-ku, Kobe, 673, Japan*; d) *Kuang Fu Road, Hsinchu, Taiwan, China*.
- 3) H. Hikino, T. Okuyama, H. Jin, und T. Takemoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 2292 (1973).
- 4) P. Karlson, H. Hoffmeister, W. Hoppe, und R. Huber, *Ann. Chem.*, **662**, 1 (1963); H. Hoffmeister, C. Ruber, H.H. Keller, H. Schairer, und P. Karlson, *Chem. Ber.*, **98**, 2361 (1965); P. Karlson, H. Hoffmeister, H. Hummel, P. Hocks, und G. Spittler, *ibid.*, 2394; H. Hikino, T. Okuyama, C. Konno, und T. Takemoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 125 (1975).
- 5) H. Hoffmeister und H.F. Grützmaier, *Tetrahedron Lett.*, **1966**, 4017; H. Hoffmeister, H.F. Grützmaier, und K. Dünnebeil, *Z. Naturforsch.* **22b**, 66 (1967); H. Hikino und Y. Hikino, "Fortschritte der Chemie org. Naturstoffe," Herausgegeben von W. Herz, H. Griesebach, und A.I. Scott, XXVIII, S. 256, Springer-Verlag, Wien und New York, 1970 (dort weitere Literaturen).
- 6) T. Nakabayashi, *J. Agr. Chem. Soc.*, **26**, 539 (1952).
- 7) S.S. Deshmane und S. Dev, *Tetrahedron*, **27**, 1109 (1971).

II, das aus C_{29} -Sterin ($C_{29}H_{50}O_3$) und C_{28} -Sterin ($C_{28}H_{48}O_3$) im Verhältnis von 4:1 besteht, stellt farblose Nadeln vom Schmp. 242—244° und $[\alpha]_D^{25} -2.9^\circ$ ($c=0.35$, Pyridin) dar und liefert ein Monoacetat vom Schmp. 249—251°, das noch eine freie Hydroxygruppe besitzt. Das IR-Spektrum von II zeigt die Bande bei 3350 (OH) und 1705 cm^{-1} (CO) und Jones-Oxydation von II ergab ein Gemisch aus Stigmastan-3,6-dion-5 α -ol (IV) und Campestan-3,6-dion-5 α -ol (V), das durch Jones-Oxydation von I ebenfalls gewonnen wurde. Also liegt den Sterinen von II jeweils Stigmastan- und Campestan-5 α -ol zugrunde und in beiden Fällen befindet sich die



VI: R = CH_2CH_3
VII: R = CH_3

zweite Hydroxygruppe entweder an C-3 oder an C-6. Aus dem PMR-Spektrum, in dem das Signal für das Carbinylproton an C-6 fehlt, das in dem von I bei 4.15 erscheint, geht hervor, daß es sich bei II um ein Gemisch der 6-Oxo-derivate handelt. Der Vergleich mit einem NBS-Oxydationsprodukt⁸⁾ von I zeigt, daß II aus Stigmastan-3 β ,5 α -diol-6-on (VI) und dem C_{28} -Homologen (VII) besteht. Das Vorkommen von Stigmastan-3 β ,5 α -diol-6-on und dem C_{28} -Homologen ist unseres Wissens erstmalig im Pflanzenreich nachgewiesen worden, jedoch ist ein synthetisches Cholestan-3 β ,5 α -diol-6-on schon bekannt.⁸⁾

Experimenteller Teil

Betreffend Geräte und Technik, siehe frühere Mitteilungen dieser Reihe.¹⁾ Eine endgültige Identifizierung der einzelnen Sterine erfolgte mittels der Kombination Gaschromatographie-Massenspektrometrie (Shimadzu-Gerät LKB-9000, Glas-Kolonnen 2 m \times 3 mm (I.D.), 2% Silikongummi OV-1 auf Chromosorb WAW/DMCS, Ionisationsenergie 70 eV). Ein Sterin galt eindeutig identifiziert, wenn das Massenspektrum mit dem von einer synthetischen Probe erhaltenen übereinstimmte und wenn gaschromatographisch identisches Verhalten festgestellt wurde.

Isolierung der Inhaltsstoffe—1.7 kg oberirdische Teile von *Plenasium banksiifolium* (Pr.) Pr., die im Juli 1976 auf dem Berg Moroishi/Miyazaki Präfektur gesammelt worden waren, wurden mit MeOH (61 \times 4) heiß extrahiert. Der auf 12 l eingengte Extrakt wurde zwischen Äther (24 l) und H₂O (12 l) aufgeteilt. Der Eindampfrückstand der oberen Schicht wurde über Aktivkohle (100 g) mit MeOH (10 l) und CHCl₃/MeOH (3:7, 5 l) eluiert. Die Eluate wurden nach Eindampfen an Kieselgel (100 g) mit CHCl₃ in steigender Polarität chromatographiert. Die mit CHCl₃/MeOH (9:1) eluierten Fraktionen wurden nochmals an Kieselgel (20 g) mit CHCl₃/Äther chromatographiert. Die mit CHCl₃/Äther (1:1) eluierten Fraktionen ergaben 25 mg II und die mit Äther eluierten Fraktionen ergaben 150 mg I. Der Eindampfrückstand der unteren Schicht wurden wieder zwischen MeOH (2 l), CHCl₃ (2 l) und H₂O (1.5 l) aufgeteilt. Der Eindampfrückstand der oberen Schicht wurden an Kieselgel (300 g) mit CHCl₃/MeOH in steigender Polarität säulenchromatographiert. Die mit CHCl₃/MeOH (4:1—7:3) eluierten Fraktionen wurden durch Säulenchromatographie an Polyamid (38 g) mit MeOH und anschließende präparative Dünnschichtchromatographie mit CHCl₃/MeOH (5:2) aufgetrennt. Es wurden 18 mg Ecdyson, 450 mg Ecdysteron und 30 mg Astragalin erhalten.

Ecdysteron—Aus Äthylalkohol/*n*-Hexan farblose Nadeln vom Schmp. 244—245° und $[\alpha]_D^{20} +66.0^\circ$ ($c=1.0$, MeOH). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3400, 2960, 1650, 1385, 1145, 1055. PMR (60 MHz, C₅D₅N) δ : 6.14 (1H, d, $J=2.5$ Hz), 4.12 (1H, m), 4.05 (1H, m), 3.78 (1H, m), 3.48 (1H, m), 2.85 (1H, m), 1.48 (3H, s), 1.29 (6H, s), 1.11 (3H, s), 0.98 (3H, s). MS m/e : 462 (M⁺-H₂O), 444 (M⁺-2H₂O), 426 (M⁺-3H₂O), 408 (M⁺-4H₂O), 363, 345 (363-H₂O, Basis-Pik), 327 (363-2H₂O), 117, 99 (117-H₂O), 81 (117-2H₂O). Es stimmt in MS- und PMR-Spektren mit den Literatur-Angaben⁵⁾ überein und wurde dünnschichtchromatographisch durch Vergleich mit authent. Material nachgewiesen. (Kieselgel, CHCl₃/MeOH, 5:2, R_f : 0.5).

Ecdyson—Aus CHCl₃/MeOH farblose Nadeln vom Schmp. 237—239° und $[\alpha]_D^{25} +61.1^\circ$ ($c=0.9$, MeOH). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3400, 2960, 2920, 1650, 1440, 1380, 1145, 1045. PMR (60 MHz, C₃D₅N) δ : 6.15 (1H, d, $J=2.5$ Hz), 4.18 (1H, m), 4.05 (1H, m), 3.51 (1H, m), 2.99 (1H, m), 1.36 (6H, s), 1.27 (3H, d), 1.05 (3H, s), 0.74 (3H, s). MS m/e : 446 (M⁺-H₂O), 428 (M⁺-2H₂O), 410 (M⁺-3H₂O), 395 (M⁺-3H₂O-CH₃), 348, 330 (348-H₂O), 300, 279, 250, 127, 126, 109, 108. ¹³C-NMR (C₅D₅N) δ : 203.5 (s), 165.6 (s), 121.5 (d), 83.8 (s), 74.0 (d), 69.7 (s), 68.0 (d), 51.4 (d), 48.3 (d), 47.6 (s), 43.0 (d), 42.5 (t), 38.7 (s), 38.0 (t), 34.6 (d), 32.4 (t), 31.9 (t), 31.4 (t), 30.2 (q), 30.1 (q), 26.7 (t), 25.6 (t), 24.5 (q), 21.1 (t), 15.9 (q), 13.7 (q). Es stimmt in MS-PMR- und ¹³C-NMR-Spektren mit den Literatur-Angaben⁴⁾ überein und wurde dünnschichtchromatographisch durch Vergleich mit authent. Material nachgewiesen. (Kieselgel, CHCl₃/MeOH, 5:2, R_f : 0.6).

8) L.F. Fieser und S. Rajagopalan, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 3938 (1949).

Astragalin—Aus MeOH hellgelbe Nadeln vom Schmp. 208.5—210° und $[\alpha]_D^{21} -20.0^\circ$ ($c=1.6$, MeOH). UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 267.5 (4.31), 351.5 (4.24). $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}+\text{NaOMe}}$ nm (log ϵ): 275.5 (4.45), 327 (4.19), 4.01 (4.44). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3300, 2850, 1650, 1600, 1500, 1355, 1172. MS m/e : 286 (Genin, Basis-Pik), 258, 193, 108. PMR des Trimethylsilyläthers (60 MHz, CDCl₃) δ : 8.07 (2H, d, $J=9$ Hz), 7.02 (2H, d, $J=9$ Hz), 6.63 (1H, d, $J=2.5$ Hz), 6.33 (1H, d, $J=2.5$ Hz), 6.04 (1H, d, $J=8$ Hz), 3.1—3.9 (6H, m). Die enzymatische Hydrolyse ergab Kaempferol und D-Glukose.

I—Farblose Nadeln vom Schmp. 242—245° und $[\alpha]_D^{22} \sim 0^\circ$ ($c=1.0$, C₅H₅N). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3400, 2925, 2860, 1460, 1375, 1035. PMR (100 MHz, C₅D₅N) δ : 4.84 (1H, m), 4.15 (1H, br.s), 2.94 (2H, t, $J=12$ Hz), 1.64 (3H, s), 1.08—0.75 (3H \times 5). MS m/e 448.3936 (M⁺ für C₂₉H₅₂O₃, ber. 448.3917) und m/e 434.3784 (M⁺ für C₂₈H₅₀O₃, ber. 434.3760). GC-MS (Kolonnentemp.: 270°, Flußgeschwindigkeit des Trägergases: 40 ml/min) des Trimethylsilyläthers: t_R 23.4 (C₂₉-Sterin, m/e 520 (M⁺), 502 (M⁺-H₂O), 487 (M⁺-H₂O-CH₃), 484 (M⁺-2H₂O), 473 (M⁺-2CH₃-OH), 431 (M⁺-TMSO), 417 (431-CH₃+1), 412 (M⁺-TMSOH-H₂O), 397 (412-CH₃), 359 (M⁺-161), 229), 18.9 (C₂₈-Sterin, m/e 506 (M⁺), 488 (M⁺-H₂O), 473 (M⁺-H₂O-CH₃), 470 (M⁺-2H₂O), 459 (M⁺-2CH₃-OH), 417 (M⁺-TMSO), 398 (M⁺-TMSOH-H₂O), 383 (398-CH₃), 345 (M⁺-161), 229. C₂₉-(III) und C₂₈-Sterin waren im GC und nach den Massenspektren identisch mit den entsprechenden synthetischen Produkten⁷⁾ aus β -Sitosterin (begleitet von 10% Campesterin).

II—Aus CHCl₃/MeOH farblose Nadeln vom Schmp. 242—244° und $[\alpha]_D^{22} -2.9^\circ$ ($c=0.35$, Pyridin). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3350, 2930, 2860, 1702, 1465, 1378. PMR (100 MHz, C₅D₅N) δ : 4.58 (1H, m), 3.09 (1H, t, $J=12$ Hz), 1.05—0.80 (3H \times 5), 0.66 (3H, s). MS m/e 446.3741 (M⁺ für C₂₉H₅₀O₃, ber. 446.3760) und m/e 432.3584 (M⁺ für C₂₈H₄₈O₃, ber. 432.3604). GC-MS (Kolonnentemp. 270°, Flußgeschwindigkeit des Trägergases: 30 ml/min) des Trimethylsilyläthers: t_R 14.6 (C₂₉-Sterin, m/e 518 (M⁺), 503 (M⁺-CH₃), 500 (M⁺-H₂O), 485 (500-CH₃), 428 (M⁺-TMSOH), 410 (428-H₂O), 400 (428-CO), 346 (M⁺-172), 12.3 (C₂₈-Sterin, m/e 504 (M⁺), 489 (M⁺-CH₃), 486 (M⁺-H₂O), 414 (M⁺-TMSOH), 396 (414-H₂O), 396 (414-CO), 332 (M⁺-172). C₂₉-(VI) und C₂₈-Sterin (VII) waren im GC und nach den Massenspektren identisch mit den entsprechenden synthetischen Produkten aus I. II wurde mit Essigsäureanhydrid und Pyridin acetyliert. Aus EtOH farblose Nadeln vom Schmp. 249—251°. IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3380, 2950, 1735, 1710, 1465, 1370, 1275, 1245, 1045.

Jones-Oxydation von II—Die Lösung von 40 mg II in 25 ml Aceton wurde mit Jones-Reagenz bis zur Orangefärbung versetzt und danach in 80 ml H₂O gegeben. Sodann wurde es in Äther aufgenommen und neutral gewaschen. Nach dem Eindampfen kristallisierte man aus EtOH/CHCl₃. Es wurden 20 mg Nadeln vom Schmp. 240—241° (Zers.) erhalten. IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3335, 2940, 2865, 1710, 1465, 1380. GC-MS (Kolonnentemp. 270°, Flußgeschwindigkeit des Trägergases: 40 ml/min): t_R 7.0 (C₂₉-Sterin, m/e 426 (M⁺-H₂O), 398 (M⁺-H₂O-CO), 243), 4.7 (C₂₈-Sterin, m/e 412 (M⁺-H₂O), 384 (M⁺-H₂O-CO), 243). C₂₉-(IV) und C₂₈-Sterin (V) waren im GC und nach den Massenspektren identisch mit den entsprechenden Oxydationsprodukten von I.

NBS-Oxydation von I—Die Lösung von 50 mg I in 2 ml Dioxan wurde mit 0.3 ml H₂O und 21 mg NBS versetzt und über Nacht stehengelassen. Die angefallenen Kristalle wurden aus CHCl₃/MeOH umkristallisiert. Farblose Nadeln vom Schmp. 240—244° und $[\alpha]_D^{22} -10.0^\circ$ ($c=1.2$, Pyridin). Durch GC-MS-Analyse erwies sich die Identität mit dem Naturstoff (II).

Danksagung Wir danken Herrn Prof. H. Hikino, Tohoku Universität, für die freundliche Ausführung von DC und Überlassung der Phytoecdysone sowie für die wertvollen Ratschläge.