

and the absorbancy at 280 nm was determined. The fractions corresponding to the main peak (tube Nos. 30—41) were collected and the solvent was removed by lyophilization. The residue dissolved in H₂O (5 ml) was applied to a column of CM-cellulose (2.0 × 12 cm), which was eluted successively with H₂O and 0.01 M ammonium acetate buffer (pH 6.9, 130 ml) and then with a gradient formed from 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 6.9, 400 ml) through a mixing flask containing 0.01 M ammonium acetate buffer (pH 6.9, 150 ml). Individual fractions (5 ml each) were collected and the absorbancy at 280 nm was determined. The fractions corresponding to the main peak (tube Nos. 83—106) were collected and the eluate was applied to a column of Amberlite XAD-II (3.0 × 3.0 cm) for desalting. The desired compound was then eluted with 70% aqueous MeOH. The solvent was evaporated off *in vacuo* and the residue was dissolved in H₂O (5 ml). The solution, after addition of 2-mercaptoethanol (0.4 ml), was incubated under N₂ at 50° for 72 hr. During this period, the substance with *R_f* 0.20 disappeared and a substance with *R_f* 0.33 was detected on TLC. The solution was applied to a column of Sephadex G-10 (3.0 × 84 cm) and fractions eluted with 3% AcOH (tube Nos. 26—44; 7 ml each) were collected. The solvent was removed by lyophilization to give a white fluffy powder: yield 70 mg (overall yield 36.1%). *R_f* 0.33, *R_f* (cellulose)^{2b)} 0.43, *R_f* (cellulose) 0.69. $[\alpha]_D^{20}$ -30.7° (*c* = 0.49, 1% AcOH). Lit.⁴⁾ $[\alpha]_D^{23}$ -33.4° (*c* = 1, 1% AcOH). Amino acid ratios in 4 N MSA hydrolysate: Tyr_{0.85}Val_{0.85}Met_{0.93}Gly_{2.00}His_{1.04}Phe_{1.99}Arg_{2.03}Trp_{0.93}Asp_{1.01} (recovery of Gly, 92.4%). *Anal.* Calcd for C₇₄H₉₉N₂₁O₁₆S·3AcOH·3H₂O: C, 52.23; H, 6.53; N, 16.30. Found: C, 52.90; H, 6.58; N, 16.85.

b) III (150 mg) was treated with 1 M TFMSA-thioanisole in TFA (4 ml) at 0° for 2 hr, then dry ether was added. The resulting precipitate (positive to Met test) was collected by filtration, washed with ether and dissolved in H₂O (10 ml). The solution was treated with Amberlite CG-400 (acetate form) for 30 min, then filtered, and the filtrate was lyophilized. The crude product (positive to Met test) was purified by column chromatography on CM-cellulose essentially in the manner described above: yield 25 mg (overall yield 20.1%). *R_f* 0.33, *R_f* (cellulose) 0.43, *R_f* (cellulose) 0.69. $[\alpha]_D^{20}$ -30.0° (*c* = 0.5, 1% AcOH). Amino acid ratios in 4 N MSA hydrolysate: Tyr_{0.89}Val_{0.85}Met_{0.89}Gly_{2.00}His_{1.03}Phe_{1.85}Arg_{2.10}Trp_{1.01}Asp_{0.97} (recovery of Gly, 89.5%). *Anal.* Calcd for C₇₁H₉₉N₂₁O₁₆S·3AcOH·6H₂O: C, 51.69; H, 6.67; N, 15.82. Found: C, 51.67; H, 6.46; N, 15.71.

Acknowledgement The authors wish to thank the staff of the Analysis Center of Kyoto University for elemental analysis.

22) purchased from Merck.

[Chem. Pharm. Bull.]
28(9)2843—2845(1980)]

Chemische und chemotaxonomische Untersuchungen von Filices. XXX.¹⁾
Chemische Untersuchungen der Inhaltsstoffe von
***Dennstaedtia scandens* (BLUME) MOORE**

NOBUTOSHI TANAKA, SACHIKO NAGASE, KYOKO WACHI, TAKAO MURAKAMI,^{2a)}
YASUHISA SAIKI,^{2b)} und CHIU-MING CHEN^{2c)}

Pharmaceutical Institute, Science University of Tokyo,^{2a)} Department of Pharmaceutical Sciences, Kobe Gakuin University^{2b)} and Department of Chemistry, National Tsing Hua University^{2c)}

(Eingegangen am 30 April, 1980)

From the fronds of *Dennstaedtia scandens* (BLUME) MOORE a new acylglucose was isolated and identified as 1,4-di-*O-p*-coumaroyl-β-D-glucose. As further extractives, the following compounds were isolated: *p*-hydroxybenzoic acid, methyl *p*-coumarate, pinocembrin-7-*O*-β-D-glucoside, vitexin and isovitexin.

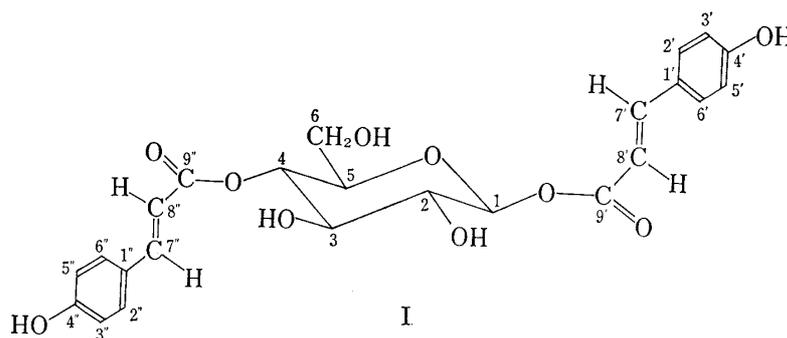
1) XXIX. Mitteil.: N. Tanaka, T. Kimura, T. Murakami, Y. Saiki, und C.-M. Chen, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 2185 (1980).

2) Adresse: a) Funakawara-machi, Shinjuku-ku, Tokyo, 162, Japan; b) Arise, Igawatani-machi, Tarumi-ku, Kobe, 673, Japan; c) Kuang Fu Road, Hsinchu, Taiwan, China.

Keywords—*Dennstaedtia scandens*; fern; chemotaxonomy; diacylglucose; phenolic acids; O-glucosylflavanone; C-glucosylflavones

In Fortsetzung unserer chemischen und chemotaxonomischen Untersuchungen von Filices wurde *Dennstaedtia scandens* (BLUME) MOORE (jap. Name: Tsurukaguma) auf die Inhaltsstoffe untersucht. Die oberirdischen Teile enthalten neben *p*-Hydroxybenzoesäure, *p*-Cumarsäuremethylester und den bekannten Flavonoiden (Pinocembrin-7-O- β -D-glukosid,³⁾ Vitexin⁵⁾ und Isovitexin⁵⁾ eine neue Acylglukose (I). Pinocembrin, das für Gymnospermen charakteristisch ist,⁶⁾ kommt bei den Farnen bisher nur in *D. wilfordii* MOORE vor³⁾ und C-Glykosylflavone sind nur in Arten von *Cyathea* (Vitexin),^{4a)} *Sphenomeris* (Vitexin und Orientin)^{4b)} und *Lindsaea* (Vitexin)^{4c)} nachgewiesen worden. In der vorliegenden Mitteilung wird über die Struktur der neuen Verbindungen berichtet.

Die Verbindung (I) kristallisierte als farblose Nadeln vom Schmp. 235–236° und $[\alpha]_D^{25} -7.1^\circ$ ($c=0.4$, MeOH). Das IR-Spektrum zeigt die Bande bei 3440 (OH), 1705, 1700 (Schwinger) (Ester-Carbonyl), 1630 (konjugierte Doppelbindung), 1600, 1515 und 825 cm^{-1} (*p*-di-substituiertes Aromat). Im PMR-Spektrum ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) sind die Signale bei δ 4.2–5.6 (5H), 5.9 (1H, t, $J=9$ Hz) und 6.56 (1H, d, $J=10$ Hz, anom. Proton) ersichtlich, die den Protonen des Zucker-Anteils zugeordnet werden können. Außerdem erscheinen acht Protonen der *p*-di-substituierten Aromate als zwei Dubletten (je 4H, $J=8$ Hz) bei δ 7.16 und 7.56 sowie vier Protonen der *trans*-di-substituierten Doppelbindungen als zwei Dubletten (je 2H, $J=16$ Hz) bei 6.60 und 7.98. Das UV-Spektrum weist die Absorptionsmaxima bei 230 und 319 nm auf, deren Lage mit denen des *p*-Cumarsäureesters gleich sind. Im Massenspektrum treten die charakteristischen Fragmente für *p*-Cumarsäure bei m/e 164, 147 und 119 auf. Bei der sauren Hydrolyse lieferte I D-Glukose und bei der alkalischen Hydrolyse *p*-Cumarsäure. Diese Befunde sprechen für das Vorliegen einer Di-O-*p*-cumaryl- β -D-glukose. Die Verknüpfungsstellen der beiden *p*-Cumarsäuren konnten dem Vergleich der ^{13}C -NMR-Verschiebungen von I mit denen der 1-O-Acyl- β -D-glukose⁷⁾ (siehe experimentellen Teil) entnommen werden. Die Verschiebungen von C-1, C-2 und C-6 sind annähernd gleich, aber C-3 und C-5 sind um 1.7–3 ppm nach höheren Feldern und C-4 um 0.9 ppm nach niedrigeren Feldern verschoben. Damit handelt es sich bei dem Naturstoff um 1,4-Di-O-*p*-cumaryl- β -D-glukose (I). 1,4-Di-O-*p*-cumaryl- β -D-glukose ist unseres Wissens erstmals in den Pflanzen aufgefunden worden.⁸⁾



- 3) Y. Akabori und M. Hasegawa, *Bot. Mag. Tokyo*, **81**, 263 (1970).
- 4) a) A. Ueno, N. Oguri, K. Hori, Y. Saiki, und T. Harada, *Yakugaku Zasshi*, **83**, 420 (1963); b) Dissertation von Y. Akabori, Tokyo Metropolitan University, 1970; c) T. Satake, T. Murakami, Y. Saiki, und C.-M. Chen, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 2600 (1978).
- 5) R.M. Horowitz und B. Gentli, *Chem. Ind.*, **1964**, 498; T.J. Marby, K.R. Markham, und M.B. Thomas, "The Systematic Identification of Flavonoids," Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1970.
- 6) T. Swain und G. Cooper-Driver, "The Phylogeny and Classification of the Ferns," herausgegeben von A.C. Jermy, J.A. Crabbe, und B.A. Thomas, Academic Press, London, 1973.
- 7) K. Yamasaki, H. Kohda, T. Kobayashi, R. Kasai, und O. Tanaka, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 1005.
- 8) K. Herrman, "Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe," herausgegeben von W. Herz, H. Griesebach, und G.W. Kirby, Vol. 35, S. 73, Springer-Verlag, Wien-New York, 1978.

Experimenteller Teil

Betreffend Geräte und Technik, siehe frühere Mitteilungen dieser Reihe.¹⁾ ¹³C-NMR-Spektren wurden mit einem JEOL-Gerät JNM-FX-100S (in C₅D₅N mit Tetramethylsilan als innerer Standard) bei 25 MHz und 25° aufgenommen (Spektrale Breite: 6 kHz, Pulswinkel: 45°, Wartezeit: 0.4 s, Datenpunkt: 8192, Repetitionszeit: 1.5 s).

Isolierung der Inhaltsstoffe—1.6 kg der getrockneten oberirdischen Teile von *D. scandens* (BLUME) MOORE, die im Dezember 1978 in Wulai/Taiwan/China gesammelt worden waren, wurden mit heißem MeOH (31 × 3) extrahiert. Der konzentrierte MeOH-Extrakt (1.5 l) wurde über Aktivkohle (110 g) mit MeOH (10 l) und MeOH/CHCl₃ (7:3, v/v; 10 l) eluiert. Die mit MeOH eluierten Fraktionen wurden zur Trockne gebracht und an Kieselgel (100 g) mit CHCl₃/MeOH in steigender Polarität säulenchromatographisch aufgetrennt. Die mit CHCl₃ eluierten Fraktionen ergaben nach Rechromatographie (Kieselgel 30 g, CHCl₃) 20 mg *p*-Cumarsäuremethylester und die mit CHCl₃/MeOH (9:1, v/v) eluierten Fraktionen nach präparativer DC (Kieselgel, Laufmittel: CHCl₃/MeOH (5:1, v/v)) 6 mg *p*-Hydroxybenzoesäure. Aus den mit CHCl₃/MeOH (4:1, v/v) und CHCl₃/MeOH (7:3, v/v) eluierten Fraktionen fielen 40 mg Vitexin aus. Das Filtrat wurde an Kieselgel (30 g) rechromatographiert, wobei die mit CHCl₃/MeOH (9:1, v/v) eluierten Fraktionen 100 mg Pinocembrin-7-O-β-D-glukosid und 15 mg Di-O-*p*-cumaryl-β-D-glukose (I) ergaben. Die bei der Aktivkohle-Säulenchromatographie mit MeOH/CHCl₃ (7:3, v/v) eluierten Fraktionen wurden zur Trockne gebracht und an Kieselgel (80 g) mit CHCl₃/MeOH in steigender Polarität zweimal chromatographiert. Die mit CHCl₃/MeOH (4:1, v/v) eluierten Fraktionen ergaben 70 mg Isovitexin.

***p*-Cumarsäuremethylester**—Aus Benzol Nadeln vom Schmp. 138°. IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3370, 1685, 1635, 1600, 1585, 1515, 1435, 1200, 1170, 985 und 835. Im Mischschmelzpunkt und IR-Spektrum war es mit *p*-Cumarsäuremethylester identisch.

***p*-Hydroxybenzoesäure**—Aus CH₃COOC₂H₅ Nadeln vom Schmp. 219°. IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3370, 1675, 1610, 1595, 1510, 1245, 855. Im Mischschmelzpunkt und IR-Spektrum war es mit *p*-Hydroxybenzoesäure identisch.

Pinocembrin-7-O-β-D-glukosid—Aus MeOH Nadeln vom Schmp. 138–140° und $[\alpha]_D^{25} - 89.0^\circ$ (*c*=0.2, MeOH). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3350, 1635, 1575, 1500, 1445, 1290, 1175, 1075, 1025, 765, 700. PMR (C₅D₅N, 100 MHz) δ : 2.87 (1H, dd, *J*=18 Hz und 4 Hz), 3.21 (1H, dd, *J*=18 Hz und 12 Hz), 3.8–4.6 (6H), 5.47 (1H, dd, *J*=12 Hz und 4 Hz), 5.76 (1H, d, *J*=7 Hz), 6.63 (2H, br.s), 7.3–7.6 (5H, m). Es stimmte mit den Literaturangaben überein.³⁾

Vitexin—Aus MeOH Nadeln vom Schmp. 261° und $[\alpha]_D^{25} - 12.4^\circ$ (*c*=0.89, Pyridin). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3150–3400, 1640, 1600, 1565, 1500, 1175, 1090, 825. PMR von TMS-Vitexin (CCl₄, 60 MHz) δ : 3.5–4.8 (6H), 5.14 (1H, d, *J*=9 Hz, anom. Proton), 6.51 (1H, s), 6.79 (1H, s), 7.20 (2H, d, *J*=8 Hz), 8.08 (2H, d, *J*=8 Hz). Es stimmte in allen Eigenschaften mit Vitexin überein.

Isovitexin—Aus MeOH Nadeln vom Schmp. 231–232° und $[\alpha]_D^{25} + 27.2^\circ$ (*c*=3.0, MeOH). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3150–3400, 1650, 1610, 1570, 1500, 1175, 1090, 830. PMR von TMS-Isovitexin (CDCl₃, 60 MHz) δ : 3.3–4.1 (6H), 4.86 (1H, d, *J*=9 Hz, anom. Proton), 6.48 (1H, s), 6.53 (1H, s), 6.95 (2H, d, *J*=9 Hz), 7.77 (2H, d, *J*=9 Hz). 5 mg in 5 ml 2 N HCl wurden 5 h auf 100° erwärmt. Nach Abdampfen der Reaktionslösung konnte man dünnschichtchromatographisch (Avicel SF, Laufmittel: 15 proz. CH₃COOH) neben Isovitexin auch Vitexin durch Vergleich mit authent. Material nachweisen. *Rf*: 0.39, 0.17 (Isovitexin 0.39, Vitexin 0.17). Es stimmte in allen Eigenschaften mit Isovitexin überein.

1,4-Di-O-*p*-cumaryl-β-D-glukose (I)—Aus MeOH Nadeln vom Schmp. 235–236° und $[\alpha]_D^{25} - 7.1^\circ$ (*c*=0.4, MeOH). *Anal.* Ber. für C₂₄H₂₂O₁₀: C, 61.27; H, 4.72. Gef.: C, 60.95, H, 4.51. MS *m/e*: 308, 164, 147, 119. PMR (C₅D₅N, 60 MHz) δ : 4.2–5.6 (5H, m), 5.9 (1H, t, *J*=9 Hz), 6.56 (1H, d, *J*=10 Hz), 6.60 (2H, d, *J*=16 Hz), 7.98 (2H, d, *J*=16 Hz), 7.16 (4H, d, *J*=8 Hz), 7.56 (4H, d, *J*=8 Hz). ¹³C-NMR (C₅D₅N) δ : 167.1, 166.3 (je s, C-9', C-9''), 161.7, 161.5 (je s, C-4', C-4''), 146.6, 145.8 (je d, C-2', C-6', C-2'', C-6''), 130.8 (d, C-7', C-7''), 126.0, 125.8 (je s, C-1', C-1''), 116.8 (d, C-8', C-8''), 114.8, 114.3 (je d, C-3', C-5', C-3'', C-5''); Zucker-Anteil: 95.7 (d, C-1), 77.3, 76.0 (je d, C-3, C-5), 74.3 (d, C-2), 72.0 (d, C-4), 61.9 (t, C-6). Literaturangaben von 1-O-Acyl-β-D-glukose:⁷⁾ 95.7 (C-1), 79.0 (C-3, C-5), 74.0 (C-2), 71.1 (C-4), 62.1 (C-6).

Saure Hydrolyse von I—9 mg I wurden in 5 ml 5 proz. HCl 3 h auf dem Wasserbad erwärmt. Nach üblicher Aufarbeitung wurden 2.5 mg Öl von $[\alpha]_D^{20} + 37.0^\circ$ (*c*=0.25, H₂O) erhalten, das nach Trimethylsilylierung gaschromatographisch identifiziert wurde. *t_R*: 9.8, 14.0 (D-Glukose *t_R*: 9.8, 14.0) (Kolonnen (2.6 (I.D.) × 2000 mm) mit 1.5 proz. SE-30 auf Chromosorb W, Kolonnentemp. 170°, Trägergas: N₂, Durchfluß-Geschwindigkeit: 60 ml/min, Detektor-Temp. 190°).

Alkalische Hydrolyse von I—5 mg I wurden in 3 ml ethanolischer KOH-Lösung (3 proz.) 1 h zum Sieden erhitzt. Nach Zugabe von H₂O wurde angesäuert, mit Äther extrahiert und eingengt. Der Rückstand wurde aus MeOH/H₂O kristallisiert. 1 mg farblose Nadeln vom Schmp. 210°, die im IR-Spektrum mit *p*-Cumarsäure identisch waren.