

Josef Jizba\*, Ladislav Dolejš\*, Vlastimil Herout\*, František Šorm\*,  
Hans-Wolfram Fehlhaber\*\*, Günther Snatzke\*\*, Rudolf Tšesche\*\*  
und Günter Wulff\*\*

## Polypodosaponin, ein neuer Saponintyp aus *Polypodium vulgare* L.

Aus dem Institut für Organische Chemie und Biochemie der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Prag\*, und dem Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn\*\*

(Eingegangen am 3. Dezember 1970)

Aus *Polypodium vulgare* L. wurde ein Saponin, das Polypodosaponin (**1**), isoliert. Es geht bei der Isolierung mit Methanol leicht in das 26-*O*-Methyl-polypodosaponin (**2**) über, an dem vorwiegend die Konstitution aufgeklärt wurde. Dem zugehörigen Aglykon (26-*O*-Methyl-polypodogenin) konnte die Struktur eines 3 $\beta$ -Hydroxy-26 $\xi$ -methoxy-22 $\xi$ .26 $\xi$ -epoxy-6-oxo-5 $\alpha$ -cholestens-(7) (**4**) zugeordnet werden. Im Saponin **2** ist die 3 $\beta$ -Hydroxygruppe an einen  $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-Rest gebunden. **2** besitzt typische Saponineigenschaften und stellt eine neue Variante der Steroidsaponine dar.

### Polypodosaponin, a New Type of Saponin from *Polypodium Vulgare* L.

From *Polypodium vulgare* L. a saponin, polypodosaponin (**1**), was isolated. It is easily converted into 26-*O*-methyl-polypodosaponin (**2**) during the isolation with methanol. The structure elucidation was mainly made with **2**. The corresponding aglykon (26-*O*-methyl-polypodogenin) has been shown to have the structure of a 3 $\beta$ -hydroxy-26 $\xi$ -methoxy-22 $\xi$ .26 $\xi$ -epoxy-6-oxo-5 $\alpha$ -cholest-7-ene (**4**). In the saponin **2**, the 3 $\beta$ -hydroxy group is attached to an  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety. **2** shows the typical properties of a saponin, and it is representing a new type of steroid saponins.

Vor einiger Zeit berichtete unsere Prager Arbeitsgruppe über die Isolierung einer Reihe von Verbindungen aus dem polaren Anteil des Extraktes der Rhizome von *Polypodium vulgare* L. (Tüpfelfarn oder Engelsüß)<sup>1)</sup>, sowie über die Identifizierung bzw. Strukturaufklärung von einigen dieser Verbindungen<sup>1-4)</sup>. Überraschenderweise gehörte ein Teil der Substanzen zum Typ der Ecdyson-Analogen<sup>3,4)</sup>.

Wir haben nun die Struktur zweier weiterer Inhaltsstoffe, Polypodosaponin (**1**) und 26-*O*-Methyl-polypodosaponin (**2**) (früher<sup>1)</sup> als „Saponin B“ bzw. „Saponin A“

1) J. Jizba und V. Herout, Collect. czechoslov. chem. Commun. **32**, 2867 (1967).

2) N. I. Uvarova, J. Jizba und V. Herout, Collect. czechoslov. chem. Commun. **32**, 3075 (1967).

3) J. Jizba, V. Herout und F. Šorm, Tetrahedron Letters [London] **1967**, 1689.

4) J. Jizba, V. Herout und F. Šorm, Tetrahedron Letters [London] **1967**, 5139.

bezeichnet) aufgeklärt. Beide Verbindungen zeichnen sich in wäßriger Lösung durch starkes Schaumvermögen aus. 26-O-Methyl-polypodosaponin zeigt außerdem hämolytische Aktivität, eine weitere charakteristische Saponineigenschaft. Mit gewaschenen Erythrozyten erhält man bei einer Konzentration von 10  $\gamma$ /ccm vollständige Hämolyse, entsprechend einem hämolytischen Index mit Vollblut von etwa 1 : 40000 bis 1 : 100000.

Die Strukturaufklärung wurde hauptsächlich an dem leichter zugänglichen **2** vorgenommen. Durch Spaltung mit einem Enzymgemisch aus *Aspergillus wentii*<sup>5)</sup> erhielt man daraus neben zwei Monosacchariden das Aglykon 26-O-Methyl-polypodogenin (**4**). Die Methoxygruppe in diesen Verbindungen ist nicht genuin, sondern entsteht erst während der Extraktion und Aufarbeitung mit Methanol. Bei Verwendung von Äthanol erhielt man — nach enzymatischer Spaltung — 26-O-Äthyl-polypodogenin (**5**) anstelle von **4**. Durch enzymatische Spaltung von reinem Polypodosaponin (**1**) ließ sich auch das genuine Aglykon **3** (Polypodogenin) gewinnen.

### Die Strukturaufklärung des Aglykons

Da wir aus der gleichen Pflanze bereits Ecdysteron und  $\beta$ -Hydroxy-ecdysteron isoliert hatten<sup>3,4)</sup>, konnte für das Polypodogenin aus biogenetischen Gründen ein ähnlicher Strukturtyp in Erwägung gezogen werden. Mit Hilfe physikalisch-chemischer Untersuchungen am Aglykon **4** sowie einer Reihe von Derivaten ließ sich zeigen, daß es sich um 3 $\beta$ .26 $\xi$ -Dihydroxy-22 $\xi$ .26 $\xi$ -epoxy-6-oxo-5 $\beta$ -cholesten-(7) (**3**) handelt.

Durch Elementaranalyse und hochauflösende Massenspektrometrie wurde für **4** die Summenformel C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub> bestimmt. Das IR-Spektrum weist neben einer Hydroxylbande Absorptionen für ein konjugiertes Keton bei 1675 und 1624/cm auf. Aus der Lage des UV-Absorptionsmaximums bei 245 m $\mu$  ließ sich auf das Vorliegen eines  $\Delta^7$ -En-6-ketons<sup>6)</sup> schließen.

Die Stereochemie an C-5 läßt sich aus dem Circular dichroismus abschätzen. Bei 14 $\alpha$ -Hydroxy- $\Delta^7$ -en-6-ketonen ist der Cotton-Effekt um 338 m $\mu$  bei 5 $\alpha$ -Konfiguration etwa doppelt so groß wie für die 5 $\beta$ -Isomeren<sup>7)</sup>. Der Substituent an C-14 ist aber ebenfalls von Einfluß auf Größe und Lage des CD. Für 3 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -cholesten-(7)-on-(6)<sup>8)</sup> und 3 $\beta$ -Acetoxy-14-methyl-5 $\alpha$ -cholesten-(7)-on-(6)<sup>8)</sup> fanden wir nämlich im Bereich der  $n \rightarrow \pi^*$ -Bande (329 m $\mu$ ) einen CD von +3.94 bzw. +2.76. Der CD innerhalb der  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Bande ist stark negativ (−20.3 bzw. −13.03 bei 241 m $\mu$ ). Für 26-O-Methyl-polypodosaponin (**2**) und sein Aglykon **4** fanden wir ähnliche Werte (vgl. Versuchsteil), während der CD von Polypodogenin (**3**) nur etwa halb so groß ist. **2** und **4** haben danach die 5 $\alpha$ -Konfiguration, in **3** dagegen sind die Ringe A/B wahrscheinlich *cis*-verknüpft. Ob beide Stereoisomere nativ vorkommen, oder ob während der Hydrolyse eine säurekatalysierte Epimerisierung an C-5 stattgefunden hatte bleibt noch ungeklärt.

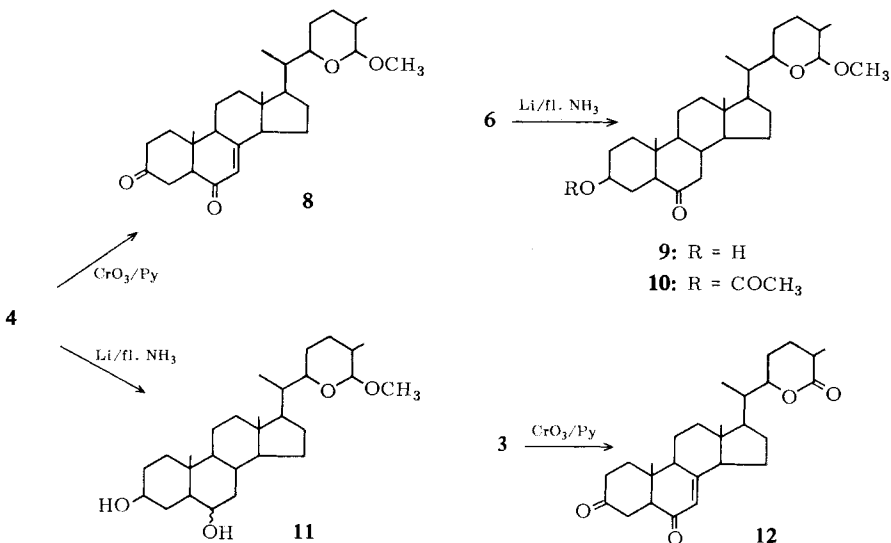
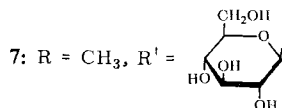
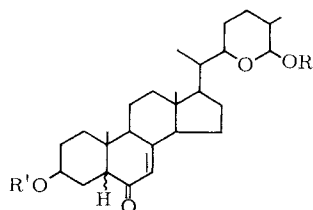
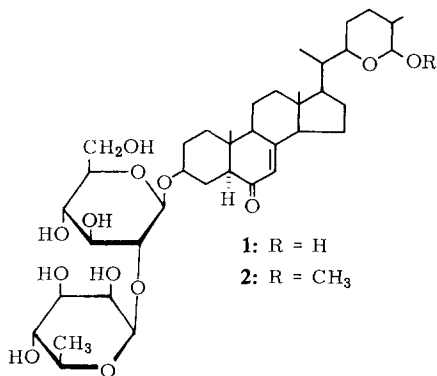
5) G. Legler, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **348**, 1359 (1967).

6) H. Hoffmeister, C. Rufer, H. H. Keller, H. Schairer und P. Karlson, Chem. Ber. **98**, 2361 (1965).

7) K. Nakanishi, M. Koreeda, S. Sasaki, M. L. Chang und H. Y. Hsu, Chem. Commun. [London] **1967**, 3191; M. Koreeda und K. Nakanishi, ebenda **1970**, 351.

8) J. C. Knight und G. R. Pettit, J. org. Chemistry **33**, 1684 (1968).

Die Anwesenheit einer Methoxygruppe in **4** ließ sich nach Zeisel ermitteln. Daß sie im NMR-Spektrum zwei Signale bei 3.34 und 3.45 ppm in etwa gleichem Intensitätsverhältnis liefert, deutet auf das Vorliegen der beiden möglichen C-26-epimeren Methoxyderivate hin. Die Signale für zwei tertiäre Methylgruppen (0.65 und 0.86 ppm), zwei sekundäre Methylgruppen (bei 0.98 ppm zusammenfallend, d,  $J=7.0$  Hz), ein Hydroxylproton (1.87 ppm; das Signal verschwindet nach Austausch mit  $D_2O$ ), ein olefinisches Proton (5.7 ppm) und für drei Oxymethingruppen (3.34–4.05 ppm) stehen mit Formel **4** in Einklang.



**4** ergab bei der Acetylierung ein Monoacetat **6**, dessen IR-Spektrum keine OH-Bande mehr aufweist. Es ist also nur eine freie Hydroxylgruppe vorhanden, die im

Saponin für die Bindung der Zuckerkette verantwortlich sein muß. Einen Beweis hierfür sowie für die Tatsache, daß es sich um eine  $\beta$ -OH-Gruppe am Steroidgerüst handelt, erbrachte eine enzymatische Glucosidierung. Sie wurde mit einem Enzym aus den Knollen von *Solanum tuberosum* L. durchgeführt, das eine spezifische Glucosidierung von  $\beta$ -Hydroxy-steroiden erlaubt<sup>9)</sup>. Das aus **4** erhaltene Glucosidierungsprodukt erwies sich aufgrund eines dünn-schichtchromatographischen Vergleichs als identisch mit dem durch enzymatische Spaltung des Saponins **2** gewonnenen Desrhamno-26-O-methyl-polypodosaponin (**7**).

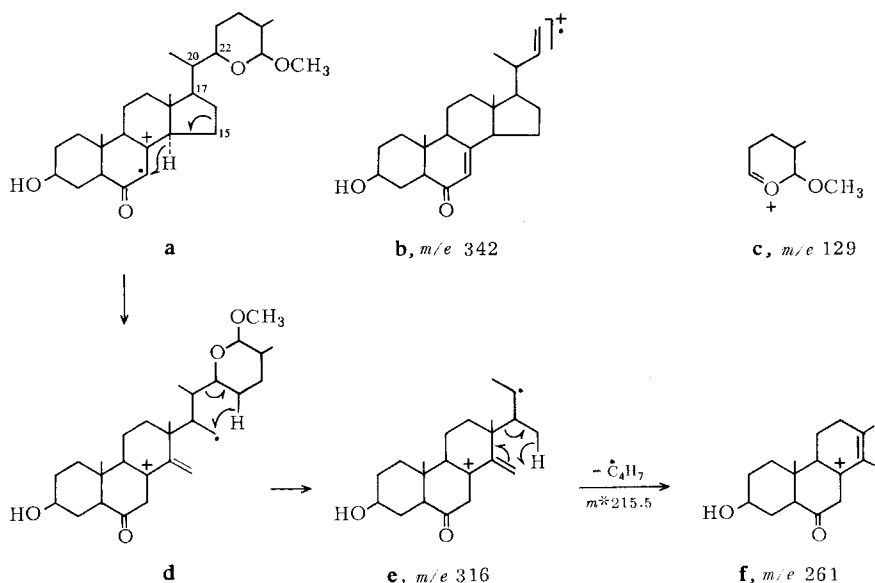
Durch Oxydation von **4** mit Chromtrioxid in Pyridin erhielt man ein Diketon **8**, aus dessen IR-Spektrum sich die Anwesenheit einer ungesättigten (1661 und 1621/cm) und einer gesättigten (1711/cm) Ketogruppe ableiten ließ. Die schwierig zu hydrierende  $\Delta^7$ -Doppelbindung konnte durch Reduktion mit Lithium in flüssigem Ammoniak abgesättigt werden. Ausgehend vom Monoacetat **6** erhielt man nebeneinander das acetylierte Dihydroderivat **10** und dessen Verseifungsprodukt **9**. Reduzierte man dagegen 26-O-Methyl-polypodogenin selbst (**4**), so trat zusätzlich eine Reduktion der 6-Ketogruppe zum Tetrahydro-Derivat **11** ein.

Die massenspektrometrische Fragmentierung von **4** wird bestimmt durch eine Reihe charakteristischer Zerfallsreaktionen der Seitenkette, die aufgrund des völlig analogen Verhaltens des Acetylderivats **6** sowie durch hochauflösende Massenspektrometrie zu klären waren. Neben der Abspaltung eines Methoxyradikals findet Eliminierung von Methanol statt, gefolgt von einem stufenweisen Abbau des Acetalringes unter Verlust von Kohlenmonoxid und Propen (**b**). Durch Bruch der Bindung C-20/22 entsteht das resonanzstabilisierte Carbonium-Ion **c**, das aufgrund seiner großen relativen Häufigkeit — es liefert den *Basispeak* — die Anknüpfung des Äthersauerstoffs an C-22 beweist. Die Anwesenheit der Methoxygruppe in **c** wird durch Methanol-Eliminierung zu einem Fragment *m/e* 97 (*m\** 72.9) bewiesen.

Der zweitstärkste Peak im Massenspektrum von **4** entspricht einem Fragment *m/e* 316, das durch Verlust des Acetalringes, und zwar unter Wasserstoffübertragung auf den Steroidkern, entsteht; in einer Folgereaktion spaltet es ein  $C_4H_7$ -Radikal ab zu *m/e* 261. Die Bildung dieser Bruchstücke hängt offensichtlich mit der Enon-Gruppierung im Ring B zusammen, denn sie fehlt beim Tetrahydroderivat **11** (die Eliminierung des Acetalringes ist hier mit einer entgegengesetzten Wasserstoffverschiebung verbunden). Messungen an Vergleichsproben zeigten, daß beide Fragmente auch beim  $\beta$ -Hydroxy-cholesten-(7)-on-(6)<sup>8)</sup> auftreten, nicht aber bei seinem  $\beta$ -Acetoxy-14 $\alpha$ -methyl-Analogen<sup>8)</sup>. Dies legt den Schluß nahe, daß der Wasserstoff von C-14 an der Reaktion beteiligt ist, etwa durch eine Verschiebung nach C-7 und gleichzeitige Spaltung der Bindung C-15/16 (**a**) zu dem resonanzstabilisierten Allylkation **d**. Nachfolgende Wasserstoffübertragungen nach den üblichen Sechs-Zentren-Mechanismen würden dann eine plausible Erklärung für den stufenweisen Zerfall zu den Fragmenten **e** und **f** liefern<sup>10)</sup>. Neben der bei Steroiden üblichen Abspaltung der gesamten Seitenkette (*m/e* 287) beobachtet man bei **4** und seinen Derivaten in starkem Maße den zu-

<sup>9)</sup> Ž. Procházka, Collect. czechoslov. chem. Commun., im Druck.

<sup>10)</sup> Beim Ecdyson, das ein zu **e** analoges Fragment liefert<sup>11)</sup>, müssen wegen der 14 $\alpha$ -OH-Gruppe Bildung und Struktur des Bruchstücks anders als im vorliegenden Fall sein; es fehlt hier auch ein dem Ion **f** entsprechendes Fragment.



sätzlichen Verlust zweier H-Atome ( $m/e$  285). Da diese Reaktion typisch für Steroide mit ungesättigter Seitenkette ist<sup>12)</sup>, dürfte sie auf eine vorgelagerte Olefinbildung, z. B. durch die Methanol-Eliminierung, zurückzuführen sein.

Daß die Methoxyfunktion Teil einer Acetalgruppierung ist, ließ sich durch gegenseitiges Überführen von *O*-Methyl-polypodogenin (**4**) und Polypodogenin (**3**) zeigen: Behandelte man **4** mit Salzsäure in wäßrigem Aceton, so ließ sich im Reaktionsgemisch dünn-schichtchromatographisch **3** nachweisen, und mit methanolischer Salzsäure konnte **3** in **4** umgewandelt werden. Durch Oxydation von Polypodogenin (**3**) mit Chromsäure in Pyridin erhielt man das Lacton **12**, dessen IR-Spektrum neben den Carbonylabsorptionen des Enons (1678/cm) und des 3-Ketons (1713/cm) eine auf ein  $\delta$ -Lacton zurückzuführende Bande bei 1718/cm aufwies. Damit war geklärt, daß die Seitenkette im Polypodogenin (**3**) als sechsgliedriges Cyclohalbacetal vorliegt.

### Die Strukturaufklärung des Saponins

Durch salzsaure Hydrolyse von 26-*O*-Methyl-polypodosaponin (**2**) erhielt man neben mehreren Zersetzungsprodukten des Aglykons ein Zuckergemisch, das laut Papierchromatogramm aus Glucose und Rhamnose bestand. Nach präparativer chromatographischer Auftrennung konnte durch Messung der optischen Drehung die Glucose der D- und die Rhamnose der L-Reihe zugeordnet werden. Mittels quantitativer Gaschromatographie<sup>13)</sup> der silylierten Methylglykoside wurde das Verhältnis beider

<sup>11)</sup> P. Karlson, H. Hoffmeister, H. Hummel, P. Hocks und G. Spittler, Chem. Ber. **98**, 2394 (1965).

<sup>12)</sup> S. G. Wyllie und C. Djerassi, J. org. Chemistry **33**, 305 (1968).

<sup>13)</sup> G. Wulff, J. Chromatogr. [Amsterdam] **18**, 285 (1965).

Zucker zu 1 : 1 ermittelt. Aus einer Molekulargewichtsbestimmung für das Saponin **2** ergab sich, daß je ein Molekül D-Glucose und L-Rhamnose im Saponin vorhanden sind.

Durch Spaltung von **2** mit einem Enzymgemisch aus *Aspergillus wentii* konnte unter geeigneten Bedingungen neben dem Aglykon **4** auch das Desrhamno-26-O-methyl-polypodosaponin **7** erhalten werden, das bei einer nachfolgenden Säurehydrolyse als Zucker lediglich Glucose lieferte. Hieraus folgt, daß die Glucose direkt an das Aglykon gebunden sein muß. Nach Permethylierung und saurer Hydrolyse lieferte **2** ein Methylzuckergemisch, das laut Dünnschicht- und Papierchromatographie aus 2.3.4-Tri-O-methyl-L-rhamnose und 3.4.6-Tri-O-methyl-D-glucose bestand. Die Rhamnose ist also endständig und in 2-Stellung an die Glucose geknüpft, die ihrerseits glykosidisch mit der  $\beta$ -Hydroxylgruppe des Aglykons verbunden ist.

Da das zur Spaltung des Glykosids verwendete Enzym nur  $\beta$ - und keine  $\alpha$ -Glucosidasen enthielt<sup>5)</sup>, muß die Glucose  $\beta$ -glykosidisch gebunden sein. Dies ergibt sich ebenfalls mit Hilfe der Klyneschen Regel<sup>14)</sup> aus den Molrotationen des Aglykons **4**, des Glucosids **7** und des Saponins **2** (s. Tab.). Für die L-Rhamnose folgt daraus eine  $\alpha$ -glykosidische Verknüpfung. Das 26-O-Methyl-polypodosaponin (**2**) hat demnach die Struktur eines 3-O-[ $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]- $\beta$ -hydroxy-26 $\xi$ -methoxy-22 $\xi$ ,26 $\xi$ -epoxy-6-oxo-5 $\alpha$ -cholestens-(7). In der Pflanze selbst liegt jedoch, wie eingangs diskutiert, die Halbacetalform **1** vor.

Vergleich des molaren Drehungsvermögens  $M_D$  (in Methanol)

26-O-Methyl-polypodosaponin ( <b>2</b> ):	-105.4°	} $\Delta M_D = -22^\circ$	} $\Delta M_D = -119^\circ$
Desrhamno-26-O-methyl-polypodosaponin ( <b>7</b> ):	-127.3°		
26-O-Methyl-polypodogenin ( <b>4</b> ):	-246.8°		
Methyl- $\beta$ -D-glucosid:	-68°		
Methyl- $\alpha$ -D-glucosid:	+309°		
Methyl- $\alpha$ -L-rhamnosid:	-111°		
Methyl- $\beta$ -L-rhamnosid:	+170°		

Die Verbindungen **1** und **2** zeigen typische Saponineigenschaften, so daß sie diesen zugerechnet werden müssen. Wahrscheinlich sind sie mit den von Barasić-Paljak<sup>15)</sup> aus *Polypodium vulgare* isolierten, aber nicht näher charakterisierten, hämolytisch aktiven Saponinen identisch. Es handelt sich um einen neuen Steroidsaponintyp, der eine gewisse Verwandtschaft zu den bekannten Spirostanolderivaten aufweist. Bemerkenswert ist, daß die Struktur des Aglykons von den in der Pflanze vorkommenden freien Steroiden, dem Ecdysteron und dem  $\beta$ -Hydroxy-ecdysteron, geringfügig abweicht.

O-Methyl-polypodosaponin (**2**) zeigt eine starke Hemmwirkung gegen Pilze (*Neurospora crassa* und *Pythium debaryanum*): 100  $\gamma$ /ccm reduzieren das Wachstum um ca. 80%. Gegen Bakterien (*Bac. subtilis*) war nur eine schwache Wirkung erkennbar.

<sup>14)</sup> W. Klyne, Biochem. J. **47**, xli (1950).

<sup>15)</sup> N. Barasić-Paljak, Farm. Glas. **23**, 225 (1967); C. A. **67**, 94038 (1967).

Herrn Dr. G. Legler danken wir für die Überlassung der  $\beta$ -Glucosidase, Herrn Prof. Dr. R. Pettit für Vergleichsproben, Herrn Dr. E. Schlösser für die Bestimmung der hämolytischen Aktivität, Herrn Prof. Dr. F. Schönbeck für die mikrobiologischen Tests, Herrn Dipl.-Ing. O. Sedmera für seine Hilfe bei der Interpretation von NMR-Spektren, dem Landesamt für Forschung beim Ministerpräsidenten des Landes Nordrhein-Westfalen für finanzielle Unterstützung und dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die Erteilung eines Stipendiums an J. J.

## Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Mikroskop-Heiztisch nach Weygand bestimmt, die optischen Drehungen mit dem Spektralphotometer ORD/UV-5 von Jasco gemessen. Die Elementaranalysen wurden zum Teil in der Analytischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie und Biochemie der Akademie in Prag (Leitung Dr. J. Horáček), zum Teil im Mikrochemischen Laboratorium Dr. F. Pascher (Bonn) ausgeführt. — Zur Aufnahme der Spektren dienten folgende Geräte: Perkin-Elmer 221 und Zeiss UR-10 (IR), Optica CF-4 (UV; Frau Dipl.-Ing. J. Smolková), Dichrograph 185 von Roussel-Jouan (CD; Dr. J. Hrbek jr.), Varian A-60 und HA-100 (NMR: Fräulein L. Winterfeld und Dipl.-Ing. O. Sedmera), MCH 1303, Varian-MAT CH-4 und MS-9 von AEI (MS; Frau Vokáčová, Frau U. Lander und Herr H. Rindermann).

Zur Gaschromatographie diente ein Perkin-Elmer F-11 mit FID und einer Kolonne von 2 m<sup>l</sup>-Länge und 2.2 mm Durchmesser (2.5% Silikon-Elastomer E-301 auf säuregewaschenem und silanisierendem Chromosorb G der Korngröße 100–200 mesh) bei einer Temperatur von 200° und einem N<sub>2</sub>-Durchfluß von 24.5 cm/Min. (Dipl.-Ing. V. Lukeš). Zur Dünnschichtchromatographie verwendete man Kieselgel G (Merck), zur Papierchromatographie die Sorten 2043 b (Schleicher & Schüll) oder Whatman Nr. 1, für die Säulenchromatographie ungesiebtes Kieselgel (Gebr. Hermann, Köln), oder nach Pitra und Šterba<sup>16)</sup> vorbehandeltes Kieselgel. Folgende Lösungsmittelgemische fanden für die Chromatographie Verwendung: A: n-Butanol/Pyridin/Wasser (6:4:3); B: Chloroform/Äthanol/Wasser (65:35:10); C: Chloroform/Methanol/Wasser (65:35:10); D: Chloroform/Methanol (10:1); E: Chloroform/Methanol (20:1); F: Essigester/Pyridin/Wasser (3.6:1:1.15).

26-O-Methyl-polypodosaponin (2): 11 g Rohglykosidgemisch<sup>1)</sup>, das noch Polyphenolkörper enthielt, wurden an 1.63 kg Kieselgel chromatographiert. Zunächst wurde mit 720 ccm Chloroform/Äthanol/Wasser (65:25:10) gewaschen, anschließend eluierte man mit dem Gemisch C (etwa 2l) 1.3 g rohes 2, das aus Methanol/Wasser kristallisiert wurde. Schmp. 198–201°,  $[\alpha]_D^{20}$ : –14.0° (c = 0.30, Methanol).

C<sub>40</sub>H<sub>64</sub>O<sub>13</sub> (752.9) Ber. C 63.80 H 8.57 O 27.63 l OCH<sub>3</sub> 4.12  
 Gef. C 63.74 H 9.06 O 27.33 OCH<sub>3</sub> 4.78  
 Mol.-Gew. 778 (Dampfdruckbest.)

UV (Äthanol):  $\lambda_{\max}$  246 m $\mu$  (log  $\epsilon$  = 4.06).

CD (Dioxan) in m $\mu$  ( $\Delta\epsilon$ ): 358 (+0.98), 342 (+2.19), 329 (+2.39), 317 i (+1.53), 306 i (+0.55), 286 (–0.28), 240 (–10.55).

IR (Nujol): 3450, 1711, 1675 und 1624/cm.

Bestimmung der Zucker in 2: a) Qualitativ: Nach Hydrolyse mit wäßr.-methanol. HCl wurden in der neutralisierten wäßr. Phase nach Ausschüteln mit Chloroform papierchromatographisch Glucose und Rhamnose nachgewiesen (System F: R<sub>F</sub> 0.58 und 0.70). Zur präparativen Gewinnung wurde auf Kieselgel mit dem System C chromatographiert. D-Glucose  $[\alpha]_D^{20}$ : +17.5° (c = 1.62, Wasser); L-Rhamnose  $[\alpha]_D^{20}$ : +8.6° (c = 5.80, Wasser).

<sup>16)</sup> J. Pitra und J. Šterba, Chem. Listy 56, 544 (1962).

b) *Quantitativ*: 21 mg **2** wurden mit *methanol. HCl* hydrolysiert und die erhaltenen Methylglykoside 1 Stde. mit einer Mischung von 0.5 ccm Trimethylsilylchlorid, 0.5 ccm Hexamethyldisilazan und 1 ccm Pyridin auf 70° erhitzt. Eine gaschromatographische Bestimmung, ausgeführt nach l. c.<sup>13)</sup>, ergab 52% *Rhamnose* und 48% *Glucose*.

c) *Nach Permethylierung von 2*: 660 mg rohes **2** wurden mit 500 mg Natriumhydrid, 10 ccm Dimethylsulfoxid und 10 ccm *Methaljodid* 24 Stdn. erhitzt. Da nach einer dünn-schichtchromatographischen Kontrolle kein unverändertes **2** mehr vorhanden war, versetzte man mit Chloroform, wusch die Chloroform-Lösung neutral und chromatographierte an Kieselgel im System C. Die Fraktion geringster Polarität wurde durch Erhitzen mit 5proz. *methanol. HCl* hydrolysiert. Die Hydrolyselösung wurde eingeeengt und mit Dowex-3 entsäuert. Durch papierchromatographischen Vergleich mit authent. Verbindungen wurden in dieser Lösung 3.4.6-Tri-O-methyl-glucose und 2.3.4-Tri-O-methyl-rhamnose identifiziert ( $R_F$ -Werte im System D: 0.41 und 0.74).

*Polypodogenin (3)*: 900 mg einer Glykosidfraktion<sup>1)</sup>, die nach dem Dünnschichtchromatogramm nur *Polypososaponin (1)* enthielt (System C:  $R_F$  0.58), wurden in 20 ccm Methynol mit Wasser auf etwa das zwanzigfache Volumen verdünnt und nach Zugabe einer Enzym-lösung aus *Aspergillus wentii*<sup>5)</sup> 24 Stdn. bei 36° belassen. Man extrahierte mit Chloroform, wusch und trocknete die organische Phase und chromatographierte das Rohgenin anschließend auf Kieselgel im System D. Aus Methanol erhielt man 180 mg kristallines *Polypodogenin (3)* vom Schmp. 162--164°.  $[\alpha]_D^{25}$ : + 6.6° ( $c = 0.50$ , Methanol).

$C_{27}H_{42}O_4$  (430.6) Mol.-Gew. gef. 430 (MS)

NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 0.57$  (s,  $CH_3$ -18), 0.75 (s,  $CH_3$ -19), 3.34 (breites m, 2 CHOR), 4.15 (d,  $J = 6.5$  Hz, CHOH), 4.54 und 6.11 (breites m bzw. d mit  $J = 6.5$  Hz, 2 OH; die Signale verschwanden nach Zugabe von  $CD_3CO_2D$ ) und 5.54 ppm (m,  $C=CH$ ).

*26-O-Methyl-polypodogenin (4)*: Die Lösung von 500 mg *Saponin 2* in 7 ccm Methanol wurde mit 300 ccm Wasser verdünnt, eine Enzym-lösung aus *Aspergillus wentii*<sup>5)</sup> hinzugefügt und 24 Stdn. bei 36° stehengelassen. Durch Ausschütteln mit Chloroform erhielt man nach dem üblichen Aufarbeiten 320 mg rohes Aglykon, das an Kieselgel chromatographiert wurde. Mit Chloroform und Chloroform/Methanol (50:1) eluierte man 180 mg reines **4**, das nach Kristallisation aus Methanol bei 213--217° schmolz.  $[\alpha]_D^{20}$ : -55.5° ( $c = 0.26$ , Methanol).

$C_{28}H_{44}O_4$  (444.6) Ber. C 75.64 H 9.97 10CH<sub>3</sub> 6.98 Gef. C 75.66 H 9.80 OCH<sub>3</sub> 6.64  
UV (Äthanol):  $\lambda_{max}$  245 m $\mu$  (log  $\epsilon = 4.12$ ).

CD (Dioxan): 360 i (+1.13), 343 (+2.67), 330 )+2.88), 319 (+1.99), 240 (-13.39).

IR (CHCl<sub>3</sub>): 3450, 1675, 1624, 1040 und 1024/cm.

NMR: s. Diskussion auf S. 839.

MS:  $m/e$  444 (7%, M<sup>+</sup>), 413 (21%, M-CH<sub>3</sub>O<sup>•</sup>), 412 (33%, M-CH<sub>3</sub>OH), 384 (21%, M-CH<sub>3</sub>OH-CO), 342 (30%, **b**), 316 (78%, **e**), 287 (32%, M-Seitenkette), 285 (44%, M-Seitenkette-2H), 261 (26%, **f**), 129 (100%, **e**), 97 (33%, **c**-CH<sub>3</sub>OH). Die korrekte Elementarzusammensetzung der Ionen wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie bestätigt.

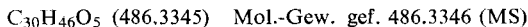
Erhitzte man eine kleine Probe **4** 3 Stdn. in einem Gemisch von Aceton und 1proz. wäbr. *HCl*, so ließ sich dünn-schichtchromatographisch die Anwesenheit von *Polypodogenin (3)* nachweisen. Umgekehrt ließ sich **3** durch Erhitzen in 5proz. *methanol. HCl* (5 Stdn.) in **4** umwandeln.

*26-O-Äthyl-polypodogenin (5)*: Rhizome von *Polypodium vulgare* wurden mit Äthanol erschöpfend ausgezogen und der Extrakt wie üblich<sup>1)</sup> weiter verarbeitet. Durch Chromato-



graphie von 10 g Rohglykosid an 1 kg Kieselgel mit dem System B erhielt man 500 mg einer chromatographisch einheitlichen Saponinfraktion. Diese wurde analog wie bei der Darstellung von **4** enzymatisch gespalten, aufgearbeitet und chromatographiert. Es resultierten 5 mg **5**, das durch sein Massenspektrum charakterisiert wurde:  $m/e$  458 ( $M^+$ ), 413 ( $M-C_2H_5O$ ), 412 ( $M-C_2H_5OH$ ), 384 ( $M-C_2H_5OH-CO$ ), 342 (**b**), 316 (**e**), 287 ( $M$ -Seitenkette), 285 ( $M$ -Seitenkette-2H), 261 (**f**), 143 (entspricht **c** mit  $C_2H_5$  anstelle von  $CH_3$ ).

*26-O-Methyl-polypodogenin-acetat* (**6**): Zur Lösung von 50 mg **4** in 0.5 ccm Pyridin gab man 0.5 ccm *Acetanhydrid* und ließ die Reaktionsmischung 24 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Nach üblicher Aufarbeitung erhielt man aus Methanol 35 mg Kristalle vom Schmp. 215–217°.



IR ( $CHCl_3$ ): 1732, 1678, 1622, 1231 und 1030/cm.

NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta = 0.66$  (s,  $CH_3$ -18), 0.85 (s,  $CH_3$ -19), 2.03 (s,  $CH_3CO$ ), 3.39 und 3.64 (je s, Intensitätsverhältnis 1 : 1.7,  $OCH_3$ ), 3.75, 4.47 und 4.75 (je m, 3  $CHOR$ ) und 5.74 ppm (m,  $C=CH$ ).

MS:  $m/e$  486 (2%,  $M^+$ ), 455 (14%,  $M-CH_3O$ ), 454 (28%,  $M-CH_3OH$ ), 426 (10%,  $M-CH_3OH-CO$ ), 384 (14%, **b**-3-Acetat), 358 (37%, **e**-3-Acetat), 329 (14%,  $M$ -Seitenkette), 327 (36%,  $M$ -Seitenkette-2H), 303 (10%, **f**-3-Acetat), 129 (100%, **c**), 97 (40%,  $c-CH_3OH$ ). Die Elementarzusammensetzung aller Ionen wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie bestimmt.

#### *Desrhamno-26-O-methyl-polypodosaponin* (**7**)

a) *Aus 2*: 6 g rohes *Saponin 2* wurden, wie bei der Gewinnung von **4** beschrieben, enzymatisch gespalten. Aus dem Chloroform-Auszug des Reaktionsgemisches erhielt man 3.6 g Abdampfrückstand, den man an Kieselgel im System C chromatographierte. Die ersten 750 ccm Eluat enthielten im wesentlichen **4**, aus den nachfolgenden Fraktionen (300 ccm) ließen sich 35 mg **7** vom Schmp. 254–255° (aus Methanol) gewinnen.  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-21^\circ$  ( $c = 0.14$ , Methanol).

Nach einer Hydrolyse von **7** (5 mg) mit *wäßr.-methanol. HCl* wurde papierchromatographisch als einziger Zucker *Glucose* nachgewiesen. — Eine erneute enzymatische Spaltung ergab einen lipophilen Neutralstoff, der laut Dünnschichtchromatogramm (System D:  $R_F$  0.69) identisch mit dem *Aglykon 4* war.

b) *Durch Glucosidierung von 4*: Eine Lösung von 3 mg **4** in 0.3 ccm Methanol wurde mit einer Suspension von 10 mg frisch geriebenen *Kartoffelknollen* in 75 ccm Wasser versetzt, und das Gemisch 20 Stdn. bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach filtrierte man und zog mit Chloroform aus. In diesem Extrakt konnte **7** dünn-schichtchromatographisch nachgewiesen werden (System E:  $R_F$  0.35).

*3-Dehydro-26-O-methyl-polypodogenin* (**8**): 55 mg *26-O-Methyl-polypodogenin* (**4**) in 1 ccm Pyridin versetzte man mit einer Suspension von 150 mg  $CrO_3$  in 0.25 ccm Pyridin und beließ die Reaktionsmischung 24 Stdn. bei Raumtemperatur. Nach üblicher Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung erhielt man 32 mg **8**, das nach Kristallisation aus Methanol bei 229–235° schmolz.  $[\alpha]_D^{26}$ :  $-16.9^\circ$  ( $c = 0.03$ , Methanol).



IR ( $CHCl_3$ ): 1711, 1661 und 1621/cm.

NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta = 0.66$  (s,  $CH_3$ -18), 0.86 und 0.97 (je d,  $J = 6$  Hz, 2  $CHCH_3$ ), 1.07 (s,  $CH_3$ -19), 3.34 und 3.47 (je s, Intensitätsverhältnis 1.7 : 1,  $OCH_3$ ), 3.69 und 4.45 (je m, 2  $CHOR$ ), 5.78 ppm (m,  $C=CH$ ).

MS:  $m/e$  442 ( $M^+$ ), 411 ( $M - \overset{\cdot}{\text{C}}\text{H}_3\text{O}$ ), 410 ( $M - \text{CH}_3\text{OH}$ ), 382 ( $M - \text{CH}_3\text{OH} - \text{CO}$ ), 340 (3-Dehydro-**b**), 314 (3-Dehydro-**e**), 285 ( $M - \text{Seitenkette}$ ), 283 ( $M - \text{Seitenkette} - 2\text{H}$ ), 259 (3-Dehydro-**f**), 129 (**c**), 97 ( $\text{c} - \text{CH}_3\text{OH}$ ).

7.8-Dihydro-26-O-methyl-polypodogenin (**9**) und sein Acetat (**10**): Eine Lösung von 120 mg 26-O-Methyl-polypodogenin-acetat (**6**) in 70 ccm trockenem Äther wurde innerhalb von 20 Min. zu einer Lösung von 100 mg Lithiummetall in flüss. Ammoniak getropft. Man ließ das Ammoniak abdampfen, arbeitete wie üblich auf und chromatographierte zur Trennung von **9** und **10** an Kieselgel.

**9**: 32 mg vom Schmp. 167–169° (aus Methanol).  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-38.0^\circ$  ( $c = 0.03$ , Methanol).

$\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_4$  (446.7) Mol.-Gew. gef. 446 (MS)

IR ( $\text{CHCl}_3$ ): 3600 und 1700/cm.

MS:  $m/e$  446 ( $M^+$ ), 415 ( $M - \overset{\cdot}{\text{C}}\text{H}_3\text{O}$ ), 414 ( $M - \text{CH}_3\text{OH}$ ), 386 ( $M - \text{CH}_3\text{OH} - \text{CO}$ ), 344 (Dihydro-**b**), 287 ( $M - \text{Seitenkette} - 2\text{H}$ ), 129 (**c**).

**10**: 20 mg amorphes Material. IR ( $\text{CHCl}_3$ ): 1718/cm.

$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$  (488.7) Mol.-Gew. gef. 488 (MS)

MS:  $m/e$  488 ( $M^+$ ), 456 ( $M - \text{CH}_3\text{OH}$ ), 428 ( $M - \text{CH}_3\text{OH} - \text{CO}$ ), 386 (Dihydro-**b**-3-acetat), 368 (428 - AcOH), 329 ( $M - \text{Seitenkette} - 2\text{H}$ ), 326 (386 - AcOH), 129 (**c**).

Tetrahydro-Derivat **11**: 50 mg 26-O-Methyl-polypodogenin (**4**) wurden, wie oben beim Acetat beschrieben, mit  $\text{Li}/\text{NH}_3$  reduziert. Durch Chromatographie an Kieselgel im System D wurde von nicht umgesetztem Material abgetrennt und das Tetrahydro-Derivat aus Methanol umkristallisiert: Schmp. 248–249°. Zur Charakterisierung von **11** diente sein Massenspektrum:  $m/e$  417 (16%,  $M - \overset{\cdot}{\text{C}}\text{H}_3\text{O}$ ), 416 (38%,  $M - \text{CH}_3\text{OH}$ ), 388 (36%,  $M - \text{CH}_3\text{OH} - \text{CO}$ ), 346 (20%, Tetrahydro-**b**), 318 (18%,  $M - \text{Ring E} - \text{H}$ ), 289 (62%,  $M - \text{Seitenkette}$ ), 129 (100%, **c**); die Zusammensetzung der Fragmente wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie bestimmt.

3-Dehydro-lacton **12**: 17 mg Polypodogenin (**3**) wurden, wie bei der Darstellung von **8** beschrieben, mit 100 mg  $\text{CrO}_3$  in Pyridin oxydiert. Das Reaktionsprodukt (10.5 mg) blieb trotz chromatographischer Reinigung amorph.

$\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_4$  (426.6) Mol.-Gew. gef. 426 (MS)

IR ( $\text{CHCl}_3$ ): 1718, 1713 und 1678/cm.

[430/70]