

80. Die Phloroglucide von *Dryopteris caucasica* (A. Br.) *Fraser-Jenkins et Corley*

von C.-J. Widén, C. R. Fraser-Jenkins, M. Lounasmaa, J. v. Euw
und T. Reichstein

Department of Pharmacognosy, University of Helsinki
z. Z. Charterhouse, Godalming (Surrey) England
State Institute for Technical Research (VTT) Chemico-Technical Lab.
SF-02150 Otaniemi, Finland
Institut für Organische Chemie, Universität Basel

(20. II. 73)

Summary. Rhizomes of the recently rediscovered diploid fern *Dryopteris caucasica* were shown to contain the following phloroglucides: much filixic acid and para-aspidin, appreciable amounts of desaspidin and traces of flavaspidic acid, trisdesaspidin and aspidinol (artefact), *i.e.* exactly the same compounds as recently found in *D. villarii* ssp. *villarii*. These results are compatible with the hypothesis that either *D. caucasica* or a member of the *D. villarii* complex is the second, still unknown, ancestor of the allotetraploid *D. filix-mas* (L.) Schott. They also demonstrate the limitations of the chemical method which is quicker but less informative than the classical hybridisation procedures.

Problemstellung. – Die meisten Arten der Farngattung *Dryopteris* enthalten in ihren Rhizomen und Stielbasen charakteristische Phloroglucinderivate (= Phloroglucide), die u. a. auch über ihre gegenseitige Verwandtschaft etwas aussagen können (Lit. vgl. bei Widén *et al.* [1]). Vor kurzem haben wir versucht [1], durch chemische Untersuchung der Farne aus der Gruppe von *Dryopteris villarii* (Bell.) Woytnar etwas über die mögliche Abstammung des in Europa weitverbreiteten Wurmfarns *D. filix-mas* (L.) Schott auszusagen. Dieser Farn ist nach Manton [2a] sowie Manton & Walker [2b] eine allotetraploide Species, muss also zwei verschiedene diploide Vorfahren haben, von denen bisher nur einer bekannt war, nämlich *D. abbreviata* (DC.) Newm. Unsere damaligen chemischen Resultate [1] zeigten, dass ein Vertreter aus dem Komplex der *D. villarii* sehr wohl den bisher unbekanntem zweiten Vorfahren darstellen könnte.

Inzwischen ist von Fraser-Jenkins im Kaukasus eine bisher kaum bekannte *Dryopteris*-Art gesammelt und als *D. caucasica* (A. Br.) Fraser-Jenkins et Corley neu beschrieben worden [3]. Morphologische und geographische Befunde sprechen stark dafür, dass *D. caucasica* in Wirklichkeit den zweiten, bisher unbekanntem Vorfahren der *D. filix-mas* darstellt. Versuche, dies durch cytologische Untersuchung von Kreuzungen zu beweisen, sind im Gange. Hier beschreiben wir die chemische Untersuchung des Rhizoms von *D. caucasica*, sie soll vorläufig zeigen, ob die Zusammensetzung der darin enthaltenen Phloroglucide mit der genannten Annahme in Einklang steht.

Material. – Zur Untersuchung diente ein Rhizom der von C. R. Fraser-Jenkins am 5. Sept. 1971 in der Türkei, Vilhayet Trabzon, bei Küçükkonat, Zigana Geçidi gesammelten Pflanze (CRFJ-2270), die er zunächst in Bridgend Glamorgan (England) kultiviert und als diploid ($2n = \text{ca. } 82$) befunden hatte [3]. Das Rhizom wurde im

Januar 1972 ausgegraben, es wog frisch 290 g und gab 135 g getrocknetes Pulver. Ein gepresster Wedel derselben Pflanze ist im Herbarium des British Museum (Natural History) (BM) deponiert.

Chemische Untersuchung. – Das Rhizom wurde gepulvert und wie früher [1] mit peroxydfreiem Äther maceriert. Aus dem rohen Ätherextrakt wurde die Hauptmenge der Phloroglucide (MgO-Rohfilicine) zunächst mit MgO nach der Schnellmethode von *Ackermann & Mühlemann* [4] abgetrennt, wobei Na_2SO_3 als Stabilisator diente. Diese schonende Methode liefert wenig Zersetzungsprodukte, erfasst aber die schwach sauren Phloroglucide nur unvollständig. Die nicht mit MgO reagierenden Anteile wurden daher noch mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ behandelt [5], wobei noch eine zusätzliche Menge roher Phloroglucide ($\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Rohfilicine) erhalten wird, die aber merklich grössere Mengen von Artefakten enthalten (Ausbeuten vgl. Tab. 1).

Die MgO-Rohfilicine enthielten nach Dünnschichtchromatographie (DC.) viel Filixsäure und Para-aspidin (darunter auch das Homologe AB oder BA)¹⁾, merkliche Mengen Desaspidin sowie wenig Flavaspidsäure, Trisdesaspidin und Aspidinol (Artefakt). Albaspidin und andere Phloroglucide waren nicht nachweisbar.

Die $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Rohfilicine enthielten nach DC. und PC. (Papierchromatographie) weitgehend dieselben Stoffe, daneben aber noch kleine Mengen von Albaspidin (vermutlich als Artefakt). Sie wurden präparativ nicht getrennt.

Die MgO-Rohfilicine wurden hierauf noch durch Chromatographie an SiO_2 präparativ getrennt, worauf sich Filixsäure, Para-aspidin und Desaspidin in Kristallen isolieren liessen. Alle drei Kristallisate erwiesen sich aber, wie dies in den meisten analogen Fällen bisher auch der Fall war, als Gemisch von Homologen¹⁾. Ihre ungefähre Zusammensetzung lässt sich am einfachsten durch Kombination von Massenspektroskopie²⁾ mit reduktiver Spaltung und anschliessender Identifizierung der einkernigen Spaltprodukte in DC. und PC. ermitteln (vgl. 3.5. auf S. 2834 bei [1]). Für die 3 Kristallisate erhielten wir die folgenden Ergebnisse:

Die Filixsäure (Smp. 173–175°) gab im Massenspektrum im Bereich der höchsten Massenzahlen drei Spitzen bei m/e 668, 654 und (640), letztere schwach. Sie entsprechen den Filixsäuren-BBB ($M = 668$, Formel 16 in [1]) als Hauptprodukt und dem Homologen PBB ($M = 654$) in merklicher Menge. Die schwache Spitze bei m/e 640 kann vom Homologen ABB ($M = 640$) und vom Homologen PBP (ebenfalls $M = 640$) herrühren. Daneben wurde noch eine sehr schwache Spitze bei m/e 682 beobachtet, die vielleicht von einem höheren Homologen mit Valerylrest stammt. Nach reduktiver Spaltung der MgO-Rohfilicine liessen sich durch PC. die folgenden Mengen einheitlicher Filicinsäuren semiquantitativ ermitteln:

1) Formeln der hier genannten Stoffe siehe frühere Mitteilungen [1] [6]. Fast bei jedem dieser Stoffe handelt es sich, wie bei anderen *Dryopteris*-Arten um Gemische von Homologen, in denen die Butyrylderivate (als B bezeichnet) überwiegen; sie sind begleitet von Propionyl- und Acetyl-derivaten (als P und A bezeichnet). Bei 2- und 3-kernigen Vertretern sind diese Gemische durch Säulenchromatographie oder DC. praktisch nicht trennbar. Dies gilt auch für die Para-aspidine-BB, BP, PB und PP; hingegen lassen sich die Para-aspidine-AB und -BA im DC. von den 4 vorgenannten Homologen unterscheiden.

2) Bei der Interpretation der Massenspektren von dreikernigen Phlorogluciden müssen thermische Reaktion, insbesondere die Möglichkeit der *Rottleron*-Umlagerung berücksichtigt werden [6b].

Tabelle 1. *Semiquantitative Zusammensetzung von Phlorogluciden von Dryopteris spec. aus dem D. villarii-Komplex sowie von D. caucasica*

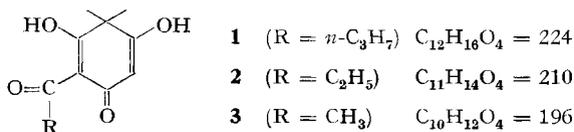
Nummern sowie Lit.	Sippe und evtl. Herkunft ³⁾	Ploidiestufe ⁴⁾	Fortpflanzung ⁵⁾	Eingesetzte Menge in g	Äther-Extrakt roh in g (in %)	MgO-Rohfliche in g (in %)	Ba(OH) ₂ -Rohfliche in g (in %)	Aspidinol (1 in [1])	Flavaspid. (3 in [1])	Aspidin-BB (-PB) (4 in [13])	Para-aspidin (5 in [1])	Desaspidin (7 in [1])	Albaspidin-1 (9 in [1])	Albaspidin-2 (9a in [1])	Filixsäure (16 in [1])	Tripara-aspidin (20 in [1])	Tridesaspidin (21 in [1])	Trisilavaspidsäure (22 in [1])
<i>D. villarii</i> sp. villarii TR-2747	It	2 ×	s	77	10,44 (13,5)	2,20 (2,89)	-	+	++	-	+++	+	+	-	++	-	-	-
<i>D. villarii</i> sp. pallida TR-116	It	2 ×	s	1	n.g.	n.g.	-	+	++	-	+++	+	+	+	-	+	+	-
var. balearica TR-3253	Bl	2 ×	s	35,7	2,29 (6,4)	0,079 (0,22)	-	+	+	(+)	-	+++	+	+	-	-	+	+
<i>D. villarii</i> tetraploide Sippe ACJ	Br	(4 ×)	[s]	85	5,2 (6,12)	0,49 (0,5)	-	+	++	-	+++	(+)	++	-	++	-	-	-
GV	Rm	4 ×	s	1	n.g.	n.g.	-	+	++	-	+++	+	++	-	++	-	-	-
<i>D. caucasica</i> CRFJ-2270	Tu	2 ×	s	135	11,3 (8,12)	2,09 (1,57)	1,52 (1,13)	+	+	-	+++	++	-	-	+++	-	-	-

³⁾ It = Italien, Bl = Balearen, Br = Grossbritannien, Rm = Rumänien, Tu = Türkei.

⁴⁾ Angabe ohne Klammer, wenn die Pflanze von der das Untersuchungsmaterial stammt, oder eine am gleichen Wuchsort gesammelte Schwesterpflanze cytologisch kontrolliert wurde. In Klammern, wenn diese Kontrolle nicht erfolgt ist, wenn aber die Ploidiestufe der betreffenden Sippe aus der Literatur oder von früheren eigenen Befunden her bekannt ist.

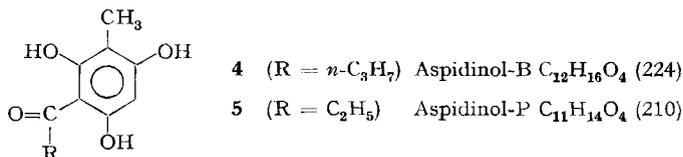
⁵⁾ a = apogam, s = sexuell, hier ebenfalls aus Lit. entnommen oder von früheren Befunden stammende Angaben in Klammern.

Butyrylfilicinsäure (1) 64%; Propionylfilicinsäure (2) 30%; Acetylfilicinsäure (3) 6%.



Danach dürfte unser Kristallinat vorwiegend Filixsäure-BBB, daneben merkliche Mengen der homologen Säuren PBB und wenig ABB enthalten haben; wir vermuten, dass auch etwas PBP anwesend war.

Das Para-aspidin (Smp. 124–126°) zeigte im Massenspektrum im Bereich der höchsten Massen drei Spitzen bei *m/e* 460, 446 und 432 (schwach). Die erstere entspricht dem Homologen BB (Formel 5 in [1] und 25 in [6b]), die zweite dem Homologen PB oder BP oder beiden und die dritte dem Homologen PP, AB oder BA. Nach reduktiver Spaltung wurden durch PC. und DC. die folgenden Bruchstücke ermittelt: Butyrylfilicinsäure (1), Propionylfilicinsäure (2), Aspidinol-B (4) und Aspidinol-P (5).



Die Kombination dieser Resultate zeigt, dass unser Kristallinat die homologen Para-aspidine-BB, PB, BP und PP enthalten hat, dabei das erstgenannte in grösster Menge. Die DC. der MgO-Rohfilicine zeigte, dass ausserdem auch das Homologe AB oder BA in kleiner Menge anwesend war. Dieses lässt sich im DC. von den anderen Homologen unterscheiden und wird offenbar auch bei der Säulenchromatographie teilweise abgetrennt, so dass es in unserem Kristallinat nicht mehr nachweisbar war.

Unser krist. Desaspidin (Smp. 140–143°) zeigte im Massenspektrum zwei Spitzen bei *m/e* 446 und 432. Die erstere entspricht dem Homologen BB (Formel 7 in [1]), die zweite dem Homologen PB oder BP oder beiden. Eine reduktive Spaltung wurde nicht durchgeführt, so dass diese Frage nicht entschieden ist.

Diskussion. Tab. 1 zeigt die erhaltenen Resultate. Zum Vergleich die früher bei verschiedenen Sippen des *Dryopteris villarii*-Komplexes erhaltenen Ergebnisse. Wie daraus ersichtlich, enthält *D. caucasica* weitgehend gleiche Phloroglucide wie die alpine *D. villarii* subsp. *villarii*. Der einzige Unterschied besteht darin, dass *D. caucasica* kein Albaspidin enthält, dafür aber kleine Mengen Trisaspidin. Letzteres war aber in zwei anderen Sippen des *D. villarii*-Komplexes auch in kleinen Mengen anwesend. Wie früher erwähnt, wäre das gefundene Muster sehr gut mit der Annahme verträglich, dass *D. villarii* den bisher unbekanntesten zweiten Vorfahren der *D. filix-mas* darstellt. Unsere jetzigen Resultate zeigen, dass dasselbe auch für *D. caucasica* zutrifft. Die chemische Untersuchung der Phloroglucide, die zu den pflanzlichen Sekundärprodukten gerechnet werden, erlaubt es also in diesem Falle nicht, etwas darüber auszusagen, ob *D. villarii* oder *D. caucasica* den wahren Vorfahren der *D. filix-mas* darstellt. Sie erlaubt es aber, die begründete Vermutung auszusprechen, dass eine dieser

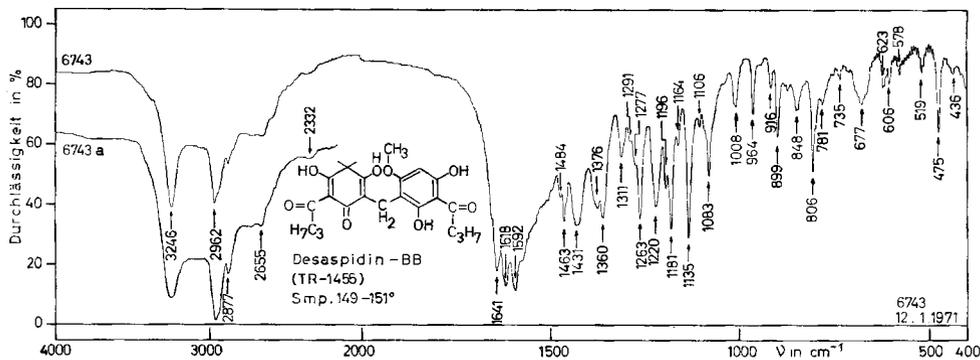


Fig. 1. IR.-Absorptionsspektrum von Desaspidin-BB (7 in [1]), Smp. 149–151°, isoliert aus *Dryopteris assimilis*. Obere Kurve 6743 = 0,6 mg fest in ca. 300 mg KBr; untere Kurve 20% nach unten versetzt 6743a = 0,06 molar in CCl_4 , $d = 0,2 \text{ mm}^6$).

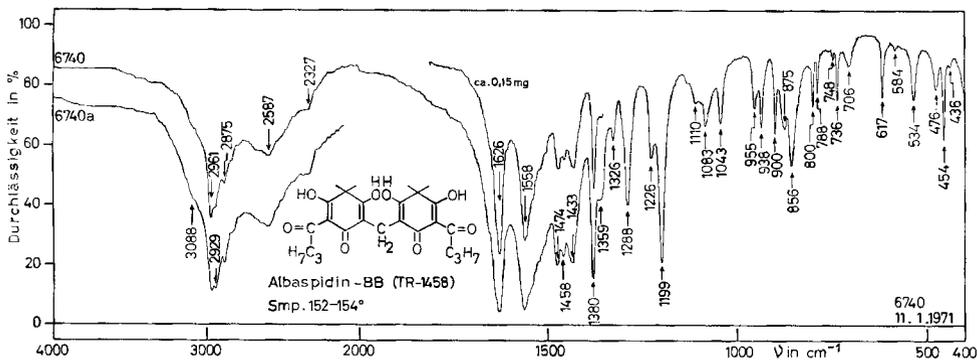


Fig. 2. IR.-Absorptionsspektrum von Albaspidin-BB (9 in [1]), Smp. 152–154°, isoliert aus *Dryopteris assimilis*, obere Kurve 6740 = 0,65 mg fest in ca. 300 mg KBr, untere Kurve 20% nach unten versetzt 6740a = 0,06 molar in CCl_4 , $d = 0,2 \text{ mm}^6$).

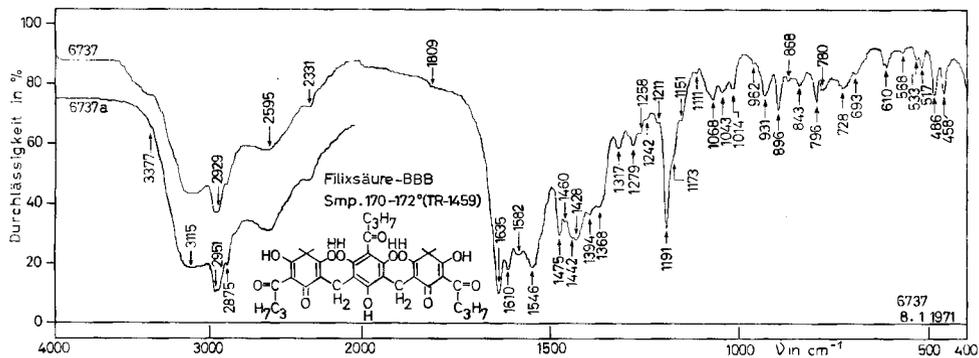


Fig. 3. IR.-Absorptionsspektrum von Filixsäure-BBB (16 in [1]), Smp. 170–172° (TR-459), isoliert aus *Dryopteris villarii*. Obere Kurve 6737 = 0,57 mg fest in KBr, untere Kurve 20% nach unten versetzt 6737a = 0,06 molar in CCl_4 , $d = 0,2 \text{ mm}^6$).

⁶) Aufgenommen von Herrn K. Aegerter im Spektrallaboratorium des Institutes für Organische Chemie der Universität Basel, auf einem Perkin-Elmer-IR.-Gitter-Spektrophotometer, Modell 125.

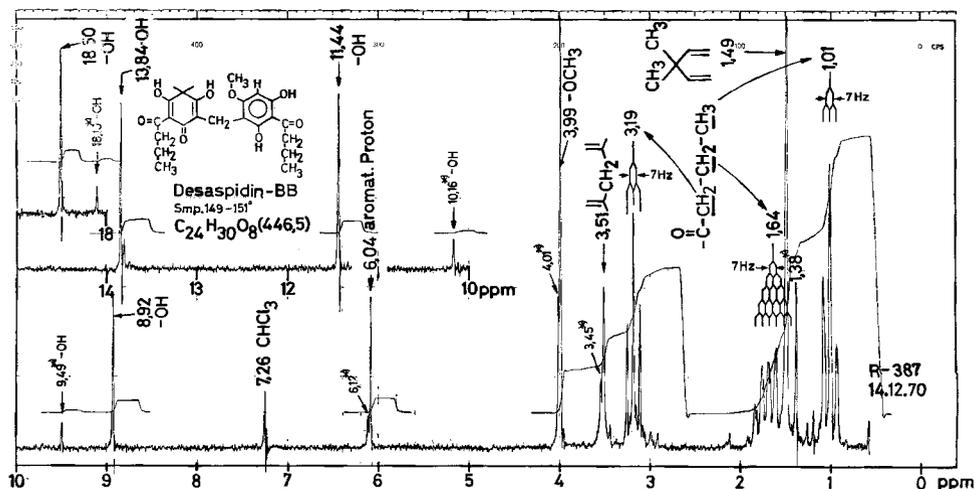


Fig. 4. NMR-Spektrum von Desaspidin-BB (7 in [1]), Smp. 149–151°, isoliert aus *Dryopteris assimilis*, vermutlich Gemisch von zwei verschiedenen Assoziaten, in CDCl_3 ?

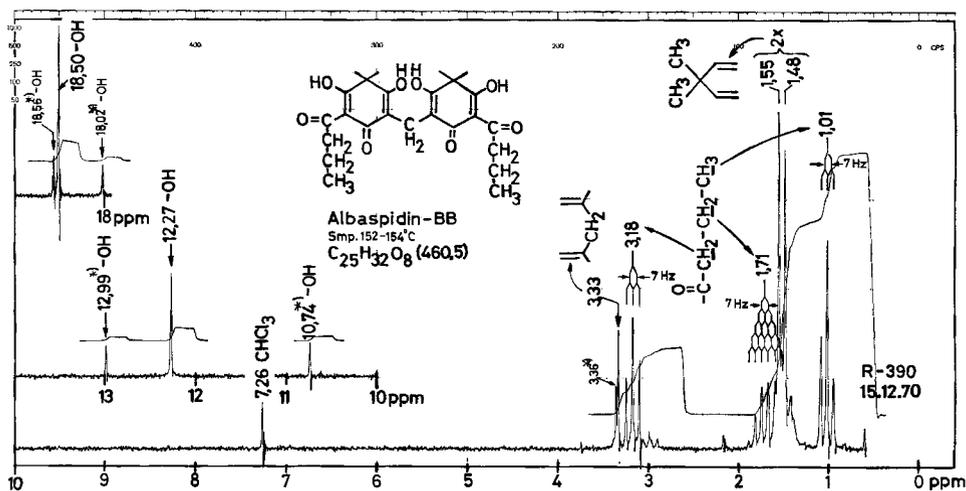


Fig. 5. NMR-Spektrum von Albaspidin-BB (9 in [1]), Smp. 152–154°, isoliert aus *Dryopteris assimilis*, vermutlich Gemisch von zwei verschiedenen Assoziaten, in CDCl_3 ?

7) Wir danken den Herren Dr. H. Fuhrer und A. Borer, Physiklaboratorium der Ciba-Geigy AG, Basel, auch hier bestens für diese Aufnahme und ihre Hilfe bei der Interpretation. Zur Aufnahme diente ein Varian-Spektrograph, Modell HA-100. Die mit OH bezeichneten Signale verschwanden nach Zugabe von D_2O . Chemische Verschiebungen in δ -Werten in ppm, bezogen auf Tetramethylsilan = 0. Die Intensität der mit *) bezeichneten Signale ist geringer als wenn sie einem Proton entsprechen würden; diese Signale stammen vermutlich von Assoziaten, die im Gleichgewicht mit anderen Formen stehen.

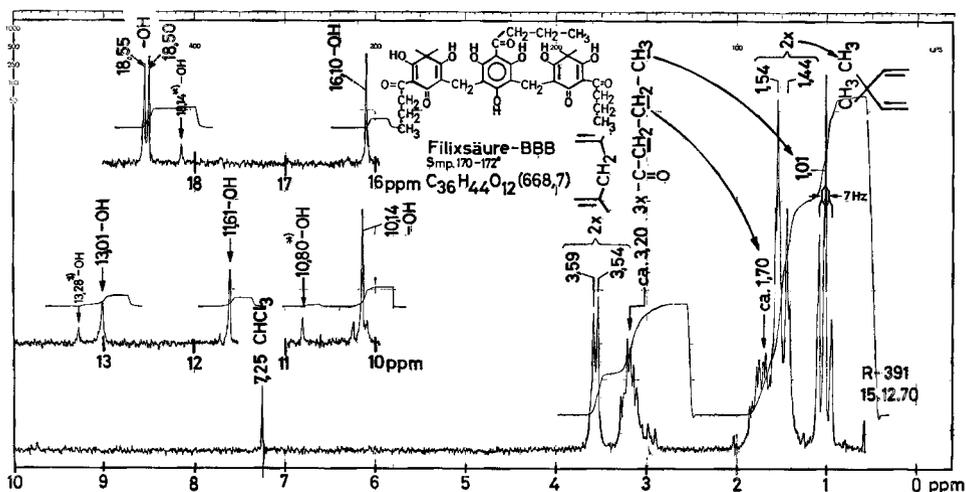


Fig. 6. NMR-Spektrum von Filixsäure-BBB (16 in [1]), Smp. 170–172°, isoliert aus *Dryopteris villarii*, vermutlich Gemisch von verschiedenen Assoziaten, in CDCl_3 .

Arten tatsächlich der gesuchte Vorfahre ist. Morphologische Merkmale sprechen eher für *D. caucasica*. Was richtig ist, kann nur durch mühsame Kreuzungsversuche ermittelt werden. Die chemischen Befunde geben aber doch wertvolle Hinweise, welche Sippen dafür in erster Linie in Betracht kommen können. Das Resultat zeigt auch die Grenzen der chemischen Methode zur Abklärung von verwandtschaftlichen Beziehungen in dieser Pflanzengruppe. Sie arbeitet zwar schneller, gibt aber keine so eindeutigen Befunde wie die klassischen Methoden der Hybridisierung ab.

Die Fig. 1–3 geben die IR.-Spektren von drei der hier besprochenen Stoffe, die zur Identifizierung nützlich sind. Die Fig. 4–6 geben die NMR.-Spektren, sie stimmen mit den anderweitig abgeleiteten Strukturen gut überein und zeigen ausserdem, dass bei diesen Stoffen in Lösung meistens zwei (oder mehr) Formen (verschiedene Assoziate) im Gleichgewicht stehen. Gelegentlich lassen sich solche in Kristallen fassen (vgl. z. B. Fig. 3 in [1]).

Experimenteller Teil

Allgemeine Angaben. Alle Smp. wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und korrigiert. Ausführung der Extraktionen und Chromatographien wie früher [1]. Abtrennung der $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Rohfilicine nach Widén & Britton [5]. Abkürzungen: Ä = Diäthyläther; Alk = Äthanol, Be = Benzol, Chlf = Chloroform, Fr = Fraktion(en), n.u. = nicht weiter untersucht, n.g. = nicht gewogen. Die Massenspektren wurden von Herrn lic. A. Hutikangas auf einem Perkin-Elmer 270 Mass-Spektrometer aufgenommen.

Trennung der Rohfilicine aus *D. caucasica*. 2,0 g MgO-Rohfilicine wurden an 50 g SiO_2 chromatographiert. Resultat vgl. Tab. 2.

Die Fr. 1–2 gaben aus Aceton 60,8 mg reine krist. Filixsäure, Smp. 173–175°.

Die 360 mg Material der Fr. 5–7 von Tab. 2 wurden nochmals an 9 g SiO_2 chromatographiert (10 ml pro Fr.).

Die ersten 10 Fr. (eluiert mit *n*-Hexan) lieferten keinen merklichen Rückstand. Die Fr. 11–20 (202,1 mg, eluiert mit *n*-Hexan/Be 1:1) zeigten im DC. nur den Fleck der Filixsäure, gaben aber aus Aceton nur 3 mg krist. Filixsäure vom Smp. 167–170°. Die Fr. 21–80 (155,5 mg, eluiert mit

Tabelle 2. *Chromatographie von 2,0 g MgO-Rohfilicine an 50 g SiO₂*⁸⁾

Fr. Nr.	Eluiermittel 10 ml pro Fr.	Eindampfrückstand		
		Menge in mg	Flecke im DC.	weitere Verarbeitg.
1–2	Be	109,5	Filixsäure	krist.
3–4	Be	458	Filixsäure Para-aspidin (Albaspidin) ⁹⁾	nicht getrennt
5–7	Be	360	Filixsäure Para-aspidin	nochmals chromatogr.
8–13	Be	282	Para-aspidin	krist.
14–24	Be	185,6	Para-aspidin Desaspidin, Aspidinol	nicht getrennt
25–55	Be	177	Desaspidin (Para-aspidin) (Aspidinol)	krist.
56–79	Be	46,0	Aspidinol	n.u.
80–130	Be/Chlf 1:1		n.u.	n.u.
131–155	Chlf		n.u.	n.u.

n-Hexan/Be 1:1) zeigten im DC. nur den Fleck des Para-aspidins und gaben aus Aceton 1,2 mg krist. Para-aspidin, Smp. 124–126°.

Die Fr. 8–13 von Tab. 2 gaben aus Aceton noch 6,5 mg krist. Para-aspidin, Smp. 124–126°.

Die Fr. 25–55 von Tab. 2 gaben aus Äther 9,0 mg krist. Desaspidin, Smp. 140–143°.

Das Resultat der Untersuchung der drei in Kristallen isolierten Stoffe durch Massenspektroskopie und reduktive Spaltung ist im theoretischen Teil erwähnt. Alle drei lagen wie meist in analogen Fällen, als Gemische von Homologen vor, bei denen die Butyryl-derivate überwogen.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] C.-J. Widén, G. Vida, J. von Euw & T. Reichstein, *Helv.* 54, 2824 (1971).
 [2] a) I. Manton, «Problems of Cytology and Evolution in the Pteridophyta», Cambridge University Press 1950; b) I. Manton & S. Walker, *Ann. Bot. N.S.* 18, 377 (1954).
 [3] C. R. Fraser-Jenkins & H. V. Corley, *Brit. Fern. Gaz.* 10, (5) 221 (1972) erschien im März 1973.
 [4] M. Achermann & W. Mühlemann, *Pharmaceut. Acta Helv.* 21, 157 (1946).
 [5] C.-J. Widén & D. M. Britton, *Can. J. Bot.* 49, 1589 (1971).
 [6] a) C.-J. Widén, J. von Euw & T. Reichstein, *Helv.* 53, 2176 (1970); b) M. Loumasmaa, C.-J. Widén & T. Reichstein, *Helv.* 54, 2850 (1971).

⁸⁾ In Klammern schwache Flecke.

⁹⁾ Vermutlich bei der Chromatographie entstanden; es bildet sich leicht aus Filixsäure. Im rohen MgO-Filicin konnte kein Albaspidin nachgewiesen werden.