

SELAGINE, NOUVELLE FLAVONE ISOLEE DE *HUPERZIA SELAGO*

BERNARD VOIRIN et MAURICE JAY

Laboratoire de Phytochimie, Département de Biologie Végétale, UER des Sciences de la Nature, Université Claude Bernard Lyon I, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69621, Villeurbanne, France

et

MARCELLE HAUTEVILLE

Laboratoire de Chimie Biologique, UER de Chimie-Biochimie, Université Claude Bernard, Lyon I, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69621, Villeurbanne, France

(Received 31 October 1975)

Key Word Index—*Huperzia selago*; Lycopodiales; Lycopsidea; Pteridophytes; flavonoid; selagin; 5, 3', 4', 7-tetrahydroxy 5'-methoxy flavone.

Poursuivant notre révision du chimisme des Lycopodiales [1] nous avons isolé, après hydrolyse acide des frondes de *Huperzia selago*, diverses flavones*; l'une d'elles, obtenue à l'état cristallisé, possède un poids moléculaire égal à 316, témoignant d'une structure flavonique tétra-OH mono-OMe. Les données de la SM -ions fragments situés en valeurs m/e à 164 et 153- permettent en outre de répartir 2 OH sur chacun des noyaux A et B et d'attribuer le méthoxyle au phényle latéral (2). L'emploi des réactifs classiques en spectrophotométrie U.V.-visible (3,4) confirme la répartition des hydroxyles et permet de plus—sur le noyau A, de localiser le premier—OH en position 7 ($\Delta\lambda$ bande II (NaOAc-MeOH) = +11 nm), le second en position 5 ($\Delta\lambda$ bande I (AlCl₃/HCl-MeOH) = +33 nm)—sur le noyau B, de déceler un système *O*-diOH ($\Delta\lambda$ bande I (AlCl₃ neutre-MeOH) = +76 nm, (AlCl₃-HCl-MeOH) = +33 nm; Δ bande I (NaOAc-H₃BO₃-NaOAc) = +26 nm).

La structure de ce composé a pu être finalement établie après interprétation du spectre de RMN où apparaissent 4 signaux correspondant au méthoxyle et aux protons aromatiques: le singulet situé à 4,00 ppm correspond au méthoxyle du noyau B, les doublets centrés respectivement à 6,62 ppm (J = 2,5 Hz) et 6,46 ppm (J = 2,5 Hz) caractérisent les protons H-6 et H-8 du noyau A, le singulet à 6,58 ppm le proton en 3 de l'hétérocycle; le dernier signal, doublet incomplètement résolu à 7,127 et 7,123 ppm auquel l'intégration attribue 2 protons, indique que ces derniers possèdent un environnement légèrement différent sur le noyau B.

De ce fait et en tenant compte, d'une part de la valeur du déplacement chimique de ces 2 protons, et d'autre part de l'existence du système *O*-diOH et du *O*-Me, on est conduit à localiser les protons en 2' et 6', les—OH en 3', 4' et le méthoxyle en 5'. Cette flavone, nouvelle à notre connaissance, et pour laquelle nous proposons le nom de sélagine, possède donc la structure suivante: tétra-OH 3', 4', 5, 7—OMe 5' flavone.

La confirmation de cette structure a de plus été apportée par confrontation spectrophotométrique et chromatographique des composés naturel et de synthèse. Ce dernier a été préparé en utilisant la technique de transposition de Baker-Venkataraman que nous avons

mise au point pour synthétiser les hydroxy-5 flavones, via les dihydroxy-2, 5 flavanones (5-7), à partir des esters aromatiques des acétophénonnes correspondantes.

L'ester nécessaire, dans le cas présent, a été obtenu par condensation de la phloracétophénone et du chlorure de diacétoxy-3, 4 méthoxy-5 benzoyl (8, 9): les groupes protecteurs acétyles ont préférentiellement été choisis pour préparer le chlorure d'acide en raison de leur élimination facile dans le milieu alcalin de transposition. L'ester ainsi préparé a été directement traité par la soude pulvérisée, dans le DMSO anhydre, et le produit de transposition attendu après saponification: la penta-hydroxy-2, 3', 4', 5, 7 méthoxy-5' flavanone n'a pas été isolée mais déshydratée en milieu acide, donnant ainsi naissance à la tétrahydroxy-3', 4', 5, 7 méthoxy-5' flavone désirée avec un assez bon rendement. Celle-ci, cependant difficile à recristalliser, a été purifiée par l'intermédiaire de son dérivé acétylé et obtenue sous forme de cristaux jaunes en quantité suffisamment importante pour la caractériser définitivement.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel. *H. selago* a été récolté à Samoëns (74-France) au mois de septembre 1974;

Technique: 500 g de frondes sèches réduites en poudre ont été hydrolysées par fraction de 4 g selon la technique du laboratoire [10]; les aglycones flavoniques sont extraits par Et₂O. Après évaporation du solvant, le résidu sec, repris par EtOH, est chromatographié sur papier Whatman n°3 dans AcOH 15% à front perdu (18 hr de migration). Trois bandes de fluorescence violette apparaissent à la lecture chromatographique en lumière de Wood. La bande de R_f inférieur est élue par MeOH. Cet éluat concentré à quelques cm³ est chromatographié sur colonne de polyamide (Macherey Nagel SC6) avec élution par du C₆H₆ progressivement enrichi en MeCOEt-MeOH. Les 47 fractions collectées, étudiées en CCM de polyamide DC 11 Macherey Nagel, solvant C₆H₆-MeCOEt-MeOH 4:3:3, sont regroupées en 5 lots numérotés de I à V. Le lot n°III renfermant le flavonoïde nouveau est chromatographié à nouveau sur polyamide SC6 Macherey Nagel, l'éluant de départ utilisé étant C₆H₆-MeCOEt-MeOH 400:75:25; l'enrichissement en MeOH est alors effectué très lentement; 21 fractions sont ainsi obtenues. La sélagine, étant récupérée à l'état pur dans les fractions 8 à 13, cristallise lors de l'évaporation du solvant. On obtient ainsi 4 mg d'une poudre jaune. Fluorescence: en CCM de polyamide, violet noir; en CP cellulose, solvant acide, violet noir, jaune après

*Résultats inédits, à paraître.

séchage, R_f CCM de polyamide Macherey Nagel DC 11. C_6H_6 -MeCOEt-MeOH 4:3:3; 0,27; DC-Alufolien Cellulose Merck. AcOH 60%; 0,45; Si gel 60F-254, C_6H_6 -Diox-AcOH 90:25:4; 0,10. λ_{max} en nm, MeOH: 252 sh, 262 sh, 268, 300 sh, 350; + NaOAc: 273, 322, 373; + NaOAc + H_3BO_3 : 256, 270 sh, 376; + $AlCl_3$: 272, 308 sh, 350 sh, 426; + $AlCl_3$ + HCl: 275, 303 sh, 363, 386; + NaOH: 266, 277 sh, 324 sh, 408, stable. SM: pics principaux en valeurs m/e : 316 (100%), 273 (5%), 164 (7%), 153 (17%), 138 (15%). RMN* in CD_3OD XL-100 TF, O-Me (s, 4,00); H-6 (d, 6,22; J 2,5 Hz); H-8 (d, 6,46 J 2,5 Hz); H-3 (s, 6,58); H-2', H-6' (d 7,123 et 7,127).

Synthèse. Chlorure de diacétoxy-3, 4 méthoxy-5 benzoyle. 2,7 g d'acide diacétoxy-3, 4 méthoxy-5 benzoïque, préparés à partir de l'acide gallique selon Scheline (8) et Bradley [9], additionnés de 5 cm³ de chlorure de thionyle et portés à reflux pendant 2 h, conduisent à 2,5 g de chlorure de diacétoxy-3, 4 méthoxy-5 benzoyle. $F = 106-108^\circ$ Litt. $F = 109^\circ$ [9].

Tri(diacétoxy-3', 4' méthoxy-5' benzoyleoxy)-2, 4, 6 acétophénone. A 500 mg (2,9 mmoles) de phloracétophénone dissous dans la pyridine anhydre sont ajoutés 2,5 g (8 mmoles) de chlorure de diacétoxy-3, 4 méthoxy-5 benzoyle fraîchement préparé, dissous dans la pyridine anhydre. Le mélange abandonné 48 h à température ambiante est ensuite versé sur de la glace additionnée d'HCl 6 N (pH du milieu voisin de 7). Le précipité formé est essoré, lavé à l'eau puis séché sous vide (P_2O_5). On obtient 1,55 g de produit sec que l'on soumet directement au traitement de transposition de Baker-Venkataraman.

Tétrahydroxy-3', 4', 5, 7 méthoxy-5' flavone (sélagine). (a) La totalité du produit sec précédemment obtenu est dissoute dans environ 15 cm³ de DMSO anhydre et additionnée d'environ 10 g de NaOH pulvérisée sous Et_2O anhydre. Le mélange laissé sous agitation, à température ambiante, pendant 15 mn est versé sur glace puis abandonné pendant 1 h, pour la saponification, avant d'être neutralisé par AcOH à froid. La solution verdâtre obtenue est extraite par AcOEt et l'extract est lavé à l'eau puis mis à sec. (b) Le résidu sec est dissous dans environ 8 cm³ d'AcOH auxquels on ajoute 1 cm³ de

H_2SO_4 36 N, puis porté au bain marie pendant 5 mn. Après refroidissement le milieu est neutralisé avec NaOH et on obtient, après lavage à l'eau et essorage, 200 mg de précipité. En CCM, la tétrahydroxy-3', 4', 5, 7 méthoxy-5' flavone, révélée en jaune après vaporisation de Na_2CO_3 10%, apparaît en quantité majeure avec des traces d'impuretés: cellulose A 1440 Schleicher et Schüll, AcOH 60%, R_f 0,45; gel de silice A 1500 Schleicher et Schüll, C_6H_6 -Me₂CO (7:3), R_f 0,35. (c) La totalité du précipité ci-dessus obtenu, acétylé par $(MeCO)_2O$ (10 cm³) en présence d'NaOAc (1,5 g), conduit à 155 mg de sélagine acétylée après deux cristallisations dans l'acétone (rendement 13%). $F = 228-230^\circ$; analyse: $C_{24}H_{20}O_{11}$ cal. C 59,50%, H 4,16%; tr. C 59,68%, H 4,04%. (d) 50 mg de sélagine acétylée, additionnés de 3 cm³ de MeOH, sont traités à température ambiante, pendant 15 mn, par 2 cm³ de NaOH 2 N. Le précipité fin formé après neutralisation du milieu, essoré, lavé à l'eau, est cristallisé dans MeOH et donne 20 mg de sélagine (rendement 62%). Spectres UV-visible, RMN sont identiques à ceux de la sélagine naturelle. $F = 320-325^\circ$ (déc.).

BIBLIOGRAPHIE

1. Voirin, B., Jay, M. et Hauteville, M. (1975) *Phytochemistry* **14**, 257.
2. Audier, H. (1966) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 2892.
3. Jurd, L. (1962) in *The Chemistry of Flavonoid Compounds* (Geissman, T. A. ed.), p. 107, Pergamon Press, Oxford.
4. Markham, K. R. and Mabry, T. J. (1968) *Phytochemistry* **7**, 1197.
5. Hauteville, M., Chadenson, M. et Chopin, J. (1973) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1781.
6. Hauteville, M., Chadenson, M. et Chopin, J. (1973) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1784.
7. Hauteville, M., Chadenson, M. et Chopin, J. (1974) *C. R. Acad. Sci. Paris* **278**, 471.
8. Scheline, R. R. (1966) *Acta Chem. Scand.* **20**, 1182.
9. Bradley, W., Robinson, R. et Schwarzenbach, G. (1930) *J. Chem. Soc.* 793.
10. Lebreton, Ph., Jay, M., Voirin, B. et Bouchez, M. P. (1967) *Chim. Anal. Fr.* **49**, 375.

* Déplacements chimiques en ppm (échelle δ) par rapport au TMS.

Phytochemistry, 1976, Vol. 15, pp. 841-842. Pergamon Press Printed in England.

BUTYLATE, PEBULATE, AND VERNOLATE INHIBITION OF PLANT FATTY ACID BIOSYNTHESIS

ROBERT E. WILKINSON and ALBERT E. SMITH

Department of Agronomy, Georgia Station, Experiment, GA 30212, USA

(Received 3 November 1975)

Key Word Index—*Spinacia oleracea*; Chenopodiaceae; spinach; fatty acids; inhibition; butylate; pebulate; vernolate.

Abstract—Incorporation of 2-¹⁴C-acetate into fatty acids of isolated spinach chloroplast was inhibited by μM concentrations of S-ethyl diisobutylthiocarbamate (butylate), S-propyl dipropylthiocarbamate (vernolate), and S-propyl butylthiocarbamate.

Incorporation of 2-¹⁴C-acetate and 2-¹⁴C-malonate into the fatty acyl units associated with thio- and oxygen-esters was inhibited by the herbicide S-ethyl dipropylthiocarbamate (EPTC) [1]. The inhibition of fatty acid synthesis was postulated as the mode of action for EPTC [1]. Resolution of this response as an isolated effect of a single herbicide or as a general action by a whole group of herbicides was necessary.

Butylate, pebulate, and vernolate (80 μM) inhibited the

incorporation of 2-¹⁴C-acetate into the total fatty acids of isolated spinach chloroplasts (Table 1). Incorporation of 2-¹⁴C-acetate into saturated fatty acids was inhibited by 0.8 μM pebulate. Incorporation of 2-¹⁴C-acetate into monoenoic and dienoic fatty acids was inhibited at the 80 μM concentration level in all three compounds. Thus, the inhibition of fatty acid synthesis is not restricted to a single member of the thiocarbamate group.

Stokes and Stumpf demonstrated a nonenzymatic acy-