

EXPERIMENTAL

Materials and methods. Leaf material of *Gnetum gnemon* L. was collected on the campus of the University of Malaya during January, 1977. Voucher specimens are on file in the Herbarium of: The University of Malaya (B. C. Stone No. 12834) and Western Carolina University. Dried pulverized leaf material (50 g) was extracted with $\text{Me}_2\text{CO} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1:1), the solvents removed *in vacuo*, and the residue taken up in aq. MeOH (75%, MeOH) for 2D PC on Whatman 3MM paper. The maximum spotting concentration was determined to be the equivalent of 1.6 g of the original plant material per chromatogram. PCs were developed according to ref. [8] in TBA and 15% HOAc. Si gel TLC (20 × 20 cm) were developed in EPWM according to ref. [9]. R_f values (Table 1) were obtained by developing the chromatographically pure compounds 1DPC; rutin (Aldrich Chem. Co., R230-3) was used as an internal PC ref. UV-Visible spectra (Table 1) with 4 diagnostic reagents and PMR spectra of the TMS derivatives were also obtained according to ref. [8]. O-Glycosidic moieties were identified by GLC on 3% OV-1 (60/80 CGQ, 2 × 6 mm SS Column, 180°) by comparison to 70 monosaccharide standards. Acid reflux was carried out in 2 N HCl (2 hr) and all cochromatography was carried out 1D PC in TBA, HOAc and H_2O and EPWM (TLC).

1 *Swertisin* (7-O-methyl-6-C-glucosylapigenin) and 2 *isowertisin* (7-O-methyl-8-C-glucosylapigenin). PMR spectra agreed to those of isovitexin and vitexin, respectively [8] except for the presence of a signal corresponding to the methoxyl group (3.9 ppm). Integration of the PMR spectrum demonstrated the presence of a hexose. The presence of a C-glycosyl derivative was based on the plus convention of 1 and 2 after acid refluxing.

3 *X''-O-Glucosylswertisin*. Acid hydrolysis produced glucose plus 1 and 2. Enzyme hydrolysis (Pectinase, Sigma Chem. Co. P-4625; 16 hr, 20°) produced 1 alone.

4 *7-O-Glucosylisovitexin*. Acid hydrolysis produced a mixture of vitexin and isovitexin. Pectinase hydrolysis produced only isovitexin.

5 *Isovitexin*.

6 *Swertiajaponin* (7-O-methyl-6-C-glucosylisorientin) and 7 *Isoswertiajaponin* (7-O-methyl-8-C-glucosylorientin). Compound 6 formed an equilibrium mixture with 7 after acid refluxing and *vice versa*.

8 *Vicenin II*. The absence of aglycone formation or isomerization after prolonged refluxing (4 hr, 2 N HCl) is suggestive of a 6,8-di-C-glycosyl compared with both glycosyl residues being identical. It is assumed that the C-glycosyl moieties are glucosyl based on the presence of other C-like compounds in the plant. Authentic vicenin II was not available for cochromatography.

Each isomer produced by acid refluxing of a parent C-glycosylflavone was subsequently reisolomerized (2N HCl, 2 hr) to reform the pair which was detected cochromatographically. Except for vicenin II all compounds were cochromatographed with authentic compounds.

Acknowledgements. The authors are grateful to Dr B. C. Stone, University of Malaya, for supplying the plant material, to Drs. Sam Asen and Leonard Jurd for samples of swertisin, furnished to them by Dr K. Hayashi, and to Dr Asen for samples of swertiajaponin, vitexin and isovitexin. The latter two were original samples of Dr M. Seikel. One of us (JWW) also acknowledges support of a Western Carolina University Faculty Research Grant.

REFERENCES

1. Harborne, J. B., Mabry, T. J. and Mabry, H. (1974) in *The Flavonoids*. Academic Press, New York.
2. Swain, T. (1975) in *The Flavonoids* (Harborne, J. B., Mabry, T. J. and Mabry, H., eds.) pp. 1096–1129. Academic Press, New York.
3. Sawada, T. (1958) *J. Pharm. Soc. Japan* **78**, 1023.
4. Niemann, G. J. and Bekoooy, R. (1971) *Phytochemistry* **10**, 893.
5. Carson, J. L. and Wallace, J. W. (1972) *Phytochemistry* **11**, 842.
6. Dossaji, S. F., Bell, E. A. and Wallace, J. W. (1973) *Phytochemistry* **12**, 371.
7. Dossaji, S. F. (1974) Ph.D. dissertation, Univ. of Texas at Austin.
8. Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. (1970) in *Systematic Identification of the Flavonoids*. Springer, New York.
9. Chopin, J. and Bouillant, M. L. (1975) in *The Flavonoids* (Harborne, J. B., Mabry, T. J. and Mabry, H., eds.) pp. 632–691. Academic Press, New York.

DI-C-METHYL-6,8 METHYL-3 KAEMPFEROL, NOUVEL AGLYCONE FLAVONIQUE ISOLE DE *DIDIEREA MADAGASCARIENSIS*

ZAFERA ANTOINE RABESA, BERNARD VOIRIN, JEAN FAVRE-BONVIN et PHILIPPE LEBRETON

Laboratoire de Phytochimie, Département de Biologie végétale, Université Claude Bernard, Lyon 1, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, 69621 Villeurbanne, France

(Reçu 6 Mars 1978)

Key Word Index.—*Didierea madagascariensis*; Didieraceae; Centrospermae; 6,8-di-C-methyl, 3-O-methyl kaempferol.

Les *Didiereaceae*, l'une des familles endémiques de l'île de Madagascar, regroupent onze espèces réparties en quatre genres: *Didierea*, *Alluaudia*, *Alluaudiopsis* et *Decaryia*. Ses représentants, arbres ou arbustes, se rencontrent d'ailleurs exclusivement dans la végétation xérophile du Sud et du Sud-Ouest malgache [1]. Les résultats rapportés dans ce travail présentent un double intérêt puisque, non seulement aucune analyse flavonique n'avait été conduite jusqu'à ce jour sur des représentants de cette famille, mais son chimisme polyphénolique montre d'ores et déjà une originalité certaine.

Ainsi, à partir d'un hydrolysât de l'écorce de la tige et/ou des épines de *Didierea madagascariensis*, avons-nous isolé un composé de fluorescence violette, dont les propriétés spectrales ($\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 276, 335, (370)) et chromatographiques (Tableau 1) ne permettent pas l'identification à un aglycone connu. Le tracé spectral *in MeOH* suggère néanmoins qu'il s'agit d'un dérivé monosubstitué sur le phényle latéral, de type kaempférol ou apigénine. L'emploi des réactifs classiques [2], [3] permet de déceler deux —OH libres en positions 5 ($\Delta\lambda$ bande 1 (AlCl_3/HCl MeOH) 54 nm) et 4' ($\Delta\lambda$ bande 1 (NaOH -

Tableau 1. R_f ($\times 100$)

Solvants	Système I			Système II
	1	2	3	
Di-C-méthyl-6,8 méthyl-3 kaempférol	60	76	89	59
(nouveau composé)				
Méthyl-3 kaempférol	71	87	92	55
Apigénine	61	81	91	45

Système I: CP (Whatman No. 1), solvant 1: AcOH-H₂O (6:4); solvant 2: AcOH-H₂O-HCl (30:10:3); solvant 3: n-BuOH-AcOH-H₂O (4:1:5 phase supérieure); système II: CCM polyamide 11 F 254 Merck, solvant 4: C₆H₆-MeCOEt-MeOH (4:3:3).

MeOH) 40 nm). Le spectre de masse, pic moléculaire à m/e 328 (100%) (C₁₈H₁₆O₆), indique la présence de trois groupements méthyles sur le squelette en C₁₅. L'étude des fragments [4] confirme la monohydroxylation du noyau B (pic à m/e 121 (31%)) et prouve la présence de deux méthyles sur le noyau A (pic à m/e 181 (13%)); le troisième méthyle est donc en position 3 de l'hétérocycle. Le spectre de RMN montre l'existence d'un méthoxyle (s 3,78; 3-H) et révèle celle de deux C-méthyles (s , 2,11; 3-H et s 2,29; 3-H) localisés positions 6 et 8, vu l'absence de signaux protoniques correspondant à ces deux positions. La SM du dérivé TMSi confirme la présence de trois hydroxyles libres dans la molécule. Ce nouveau composé est donc le di-C-méthyl-6,8 méthyl-3 kaempférol.

Il s'agit d'un composé naturel puisque cette forme aglycone a pu être obtenue par extraction étherée du matériel végétal. La rareté de ce type de composé mérite d'être soulignée; en effet, ce résultat constitue la première mention d'une part, d'un C-méthyl flavonol dérivé du kaempférol—les précédents travaux rapportent l'existence de C-méthyl quercétine et de C-méthyl myricétine [5]—et d'autre part, d'un di-C-méthyl flavonol.

Du point de vue spectral enfin, ce composé présente une particularité puisqu'après addition de NaOAc, le déplacement bathochrome de la bande II ($\Delta\lambda$ + 4 nm) est inférieur à celui attendu (entre 5 et 20 nm généralement). Cette anomalie réactionnelle peut sans doute s'expliquer par l'encombrement stérique dû aux deux méthyles en 6 et 8. Cette observation rejoint celles déjà faites par Mabry *et al.* [3], Voirin *et al.* [6] et Pineau [7] qui, pour des méthoxy-6 ou 8 flavones ou des 6- ou 8-C-méthyl flavones, ont enregistré des phénomènes du même genre.

En outre, nous trouvons ici confirmation de la richesse des Didieraceae en flavonoïdes polyméthylés [8], sans pouvoir pour l'instant faire la part de l'originalité taxinomique et de la signification physiologique de substances si particulières.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel. *Didierea madagascariensis* a été récoltée dans le Sud de Madagascar en Décembre 1976.

Technique. 100 g d'épines sèches et/ou d'écorce de tige sèche sont réduites en poudre puis hydrolysées par fraction de 3 à 5 g selon la technique du laboratoire [9]; les aglycones flavoniques sont extraits par Et₂O. Après évapn du solvant, le résidu sec, repris par quelques ml de EtOH est chromatographié sur colonne de résine XAD-2 avec élution par EtOH-H₂O (3:17); cette première chromatographie élimine la plupart des acides phénols. Les aglycones sont ensuite récupérés après élution par EtOH et, l'éluat, concentré à quelques ml est enfin chromatographié sur colonne de polyamide (Macherey Nagel SC 6) avec élution par du C₆H₆ progressivement enrichi en MeCOEt-MeOH. 68 fractions ont été obtenues et l'examen en CCM de polyamide (Macherey Nagel DC 11, solvant C₆H₆-MeCOEt-MeOH (4:3:3) de toutes ces fractions montre que le nouveau composé est recueilli entre la 11^{ème} et la 20^{ème} fraction. Il est repurifié par CCM de polyamide (Macherey Nagel DC 6) solvant CHCl₃-MeOH-MeCOEt-Acétylecétone, 90:2:2:1 (R_f 0,20); 5 mg de produit (couleur jaune) ont été obtenus. Une extraction non hydrolytique a été également menée: le matériel, en poudre, est alors directement extrait par Et₂O. $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm: 276,335,370 sh; + AcONa: 280,342 sh, 388; + AcONa + H₃BO₃: 276, 335, 370 sh; + AlCl₃: 284, 310, 360, 424 sh; + AlCl₃ + HCl: 287, 310 sh, 358, 424 sh; + NaOH: 284, 334, 410. SM: pics principaux à m/e : 328 (M⁺; 100%), 327 (65%), 309 (24%), 299 (17%), 285 (34%), 181 (13%) et 121 (31%). SM du dérivé TMSi, pics principaux à m/e : 544 (M⁺; 2%), 529 (M⁺ - 15; 100%), 514 (3%), 499 (2%), 472 (14%), 457 (3%), 257 (9%) et 193 (5%). RMN (δ en ppm/TMS) in MeOH D₄ XL-100 Varian, O-Me (s 3,78); deux C-Me (s 2,11 et s 2,29); double système AB des 4 protons du noyau B: H-3' et H-5' (d 6,94; J = 8,5 Hz), H-2' et H-6' (d 8,02; J = 8,5 Hz).

Remerciements.—Nous remercions vivement Monsieur le Professeur Pierre Boiteau, Laboratoire de Phanérogamie du Muséum de Paris, pour la récolte et l'identification du matériel végétal.

BIBLIOGRAPHIE

1. Rauh, W. (1963) in *Flore de Madagascar et des Comores* (121^{ème} famille). Mus. Ntl. Hist. Nat., Paris.
2. Jurd, L. (1962) in *The Chemistry of Flavonoid Compounds* (Geissman, T. A., ed.) p. 107, Pergamon Press, Oxford.
3. Mabry, T. J., Markham, K. R. et Thomas, M. B. (1970) in *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer, New York.
4. Audier, H. (1966) *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2892.
5. Gottlieb, O. R. (1975) in *The Flavonoids* (Harborne, J. B., Mabry, T. J. et Mabry, H., ed.) pp. 327 et 330. Chapman & Hall, London.
6. Voirin, B. et Lebreton, Ph. (1967) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **49**, 1402.
7. Pineau, J. P. (1967) Thèse Doct. Ing., Lyon.
8. Rabesa, Z. A. et Lebreton, Ph. (1977) Colloque international sur les plantes malgaches et la thérapie du cancer, Sept. 1977, Antananarivo.
9. Lebreton, Ph., Jay, M., Voirin, B. et Bouchez, M. P. (1967) *Chim. Anal. Fr.* **49**, 375.

NOTE AJOUTÉE SUR EPREUVES

Higuchi *et al.* (1978) *Phytochemistry* **17**, 787, rapportant l'existence d'un C-méthyl-6 3-O-glucosyl kaempférol chez *Pinus contorta*, il s'agit donc ici de la seconde mention d'un dérivé C-méthylé en 6 du kaempférol.