

REFERENCES

1. Takao, T. (1974) *Phytochemistry* **13**, 1401
2. Dunnill, P. M. and Fowden, L. (1963) *J. Exp. Botany* **14**, 237.
3. Crocorno, O. J. and Fowden, L. (1970) *Phytochemistry* **9**, 537.
4. Von Preusser, E. (1975) *Biol. Zb. L'vov'sk Derzh. Univ.* **94**, 75.

Phytochemistry, 1978, Vol. 17, pp. 314-315 Pergamon Press Printed in England

DIE CYANOGENEN VERBINDUNGEN VON *HETERODENDRON OLEAE-FOLIUM*

ADOLF NAHRSTEDT und WINFRIED HÜBEL

Institut für Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität, D-3300 Braunschweig, Deutschland

(Received 16 August 1977)

Key Word Index—*Heterodendron oleae-folium*; Sapindaceae; cyanolipids, cyanogenic glucoside; configuration; 2- β -D-glucopyranosyloxy-3-methyl-butyronitrile.

Kürzlich berichteten wir über das Vorkommen eines neuen cyanogenen Glykosides (2- β -D-glucopyranosyloxy-3-methylbutyronitril, **1**) in den vegetativen Teilen der Sapindacee *Heterodendron oleae-folium* Desf. [1]; eine Verbindung gleicher Struktur wurde in der Mimosaceae *Acacia sieberiana* gefunden [2]. Die Konfiguration am Asymmetriezentrum C-2 im Aglykon von **1** blieb offen. Darüberhinaus enthält *H. oleae-folium* in den Samen der reifen Früchte in Übereinstimmung mit vielen anderen Sapindaceen [3] ein cyanogenes Öl, dessen Zusammensetzung unbekannt war. Über die Klärung der Konfiguration von **1** sowie die cyanogenen Sameninhaltsstoffe von *H. oleae-folium* wird im folgenden berichtet.

1 läßt sich in rauchender HCl unter Erhalt der Konfiguration am C-2 [4] zu 2-Hydroxy-isovaleriansäure (**2**) hydrolysieren. Veresterung von **2** mit (–) Menthol und anschließender GLC des (–) Menthylesters von **2** an FFAP im Vergleich zu (–) Menthylestern eines käuflichen Enantiomerengemisches von 2-Hydroxyisovaleriansäure zeigte, daß **2** optisch rein vorlag. 2-(–) Menthylester war mit demjenigen Diastereomeren mit kürzerer Retentionszeit des veresterten Enantiomerengemisches identisch. (S)-2-Hydroxy-isovaleriansäure ist aus L-Valin unter Erhalt der Konfiguration am C-2 über Diazotierung und anschließende Verkochung in guter Ausbeute zugänglich [5, 6]. Der (–) Menthylester derartig dargestellter (S)-2-Hydroxy-isovaleriansäure ist GLC identisch mit demjenigen aus **2**, dem damit ebenfalls (S)-Konfiguration am C-2 zukommt. Daraus folgt, daß auch **1** (S)-Konfiguration am C-2 besitzt. **1** ist demnach 2- β -D-glucopyranosyloxy-3-methyl-(2S)-butyronitril. Im Gegensatz zu der bei [7] auf Grund vergleichender ¹H-NMR-Daten geäußerten Ansicht nehmen wir aus biogenetischen Gründen an, daß auch dem zweiten aus *H. oleae-folium* isolierten [1], ebenfalls biogenetisch aus Leucin ableitbaren Cyanoglucosid 2- β -D-glucopyranosyloxy-3-methylen-4-hydroxy-butyronitril (Cardiospermin) [8] (S)-Konfiguration im Aglykon zukommt. Über die Konfigurationsklärung von Acacipetalin [9] und Dihydroacacipetalin [2] aus Mimosaceen berichten wir an anderer Stelle.

Tabelle 1 Prozentualer Anteil der Fettsäuren in den Fraktionen A–C sowie der Gesamtcyanolipid-Fraktion

Fraktion	% Anteil im Gesamtcyanolipid	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{20:0}	C _{20:1}
Gesamtcyanolipide		3.6	1	42.7	1	15.0	38.5
A	50.9	4.0	1	48.2	1.7	1.3	44.1
B	43.6	2.9	1	35.3	1	29.4	32.4
C	5.5	5.7	3.8	41.5	—	20.8	28.3

Die reifen Samen von *H. oleae-folium* enthalten ca 42% eines fetten Öles, das nach saurer und alkalischer Hydrolyse HCN freisetzt; das entfettete Samenschrot ist dagegen nicht cyanogen. Das durch Petroläther-Extraktion gewonnene Öl wurde im wesentlichen nach [10, 11] analytisch bearbeitet. Das Fehlen einer Nitrilbande im IR-Spektrum des Gesamtöles belegt die Abwesenheit acyanogener Cyanolipid-Typen [11]. Die quantitative Auswertung des ¹H-NMR-Spektrums des Gesamtöles ergab einen Anteil von 30% Cyanolipiden im Samenöl. Die Cyanolipidfraktion wurde durch präparative DC an Kieselgel sowie HPLC an einer C-18-Säule von den Glyceriden abgetrennt. Das ¹H-NMR-Spektrum dieser Fraktion ist mit demjenigen einer *Allophylus* spec. [12] dargestellt in [10] identisch und belegt als einzigen Cyanolipid-Typ den Fettsäurediester eines 2,4-Dihydroxy-3-methylenbutyronitrils (Typ II nach 11). Die Gesamtcyanolipide wurden durch HPLC an einer C-18-Säule mit Acetonitril–MeOH-Gemischen in drei Fraktionen zerlegt (A, B, C). Alkalische Hydrolyse der Gesamtcyanolipide als auch der Cyanolipidfraktionen A–C und GLC der erhaltenen Fettsäuren als Methylester an FFAP führten zu den in Tabelle 1 dargestellten Ergebnissen. Sie zeigen, daß auch nach Auftrennung in dem verwendeten HPLC-System keine einheitlichen Cyanolipide vorliegen. Es lassen sich vornehmlich drei Diester-Typen mit C_{18:1}/C_{20:1}-, C_{18:1}/C_{20:0}- und C_{20:1}/C_{20:1}-Fettsäureresten konstruieren, deren Substitutionsverteilung am C-2- bzw. C-4-Hydroxyl der Alkoholkomponente jedoch offen bleibt. Mit den vorgelegten Daten befindet sich *H. oleae-folium* im Übereinstimmung mit etlichen weiteren

Sapindaceen-Ölen, die mit einem hohen Anteil an $C_{18:1}$ -, $C_{20:0}$ - und $C_{20:1}$ - Fettsäuren [10] Cyanolipid-Typ II kumulieren [3].

EXPERIMENTELLER TEIL

Gewinnung von 2. 1 wurde wie bei [1] beschrieben isoliert. 46 mg 1 wurden mit 1 ml rauchender HCl (37%) 30 min auf 120° erhitzt, der Ansatz nach dem Erkalten dreimal mit EtOEt ausgeschüttelt, die EtOEt-Phase getrocknet und zur Trockne eingengt.

Derivatisierung mit (-) Menthol. 2 sowie 2-Hydroxy-isovaleriansäure (Serva, Heidelberg, bzw. nach [5, 6] dargestellt und charakterisiert) werden in Mengen von ca 10 mg in 1 ml Benzol mit 25 mg (-) Menthol versetzt und unter Hinzufügung einer Spur *p*-Toluolsulfonsäure 12 hr am Rückfluß gekocht. Der Ansatz wird direkt zur GLC verwendet.

Gewinnung der Samenlipide. 20 g gepulverte Samen (bezogen von Nindethana Seed Service, Wellington, N.S.W. Australien und nach [13] als *Heterodendron*-Samen sowie Mustern des Royal Bot. Gardens and National Herb., Sidney identifiziert) wurden 2 mal 4 hr mit Petrol extrahiert. Der Petrol wurde abgedampft und der Rückstand bis zur Konstanz getrocknet.

HPLC-Bedingungen. Säule: μ Bondapak C-18; Fließmittel: CH_3CN -MeOH (17:3) isokratisch; 2 ml/min, Detektor: Refraktometer.

GLC-Bedingungen. Säule: FFAP (WGA, Griesheim) 10% auf Chromosorb HP-AW-DMCS 80-100 mesh, Stahl, 5 m \times 2 mm i.d.; Ofentemperatur: 200° (Fettsäuremethylester) isotherm, 155° ((-) Menthylester) isotherm. Die Methylierung der Fettsäuren erfolgte nach [14].

¹H-NMR-Spektren. Varian T-60-NMR, jeweils ca 30 mg

in $CDCl_3$. Gesamtöl-Spektren sind in [11], das Cyanolipid-Spektrum in [10] ausführlich diskutiert.

Danksagung—Wir danken Mr. L. A. S. Johnson, Royal Botanic Gardens and National Herbarium, Sidney, für die Überlassung von Samen Mustern, Prof. Dr. D. S. Seigler, Illinois, für ¹H-NMR-Spektren verschiedener Cyanolipide sowie Frau G. Siudzinski für technische Assistenz.

LITERATUR

1. Hübel, W. und Nahrstedt, A. (1975) *Phytochemistry* **14**, 2723.
2. Seigler, D. S., Butterfield, C. S., Dunn, J. E. und Conn, E. E. (1975) *Phytochemistry* **14**, 1419.
3. Seigler, D. S. und Kawahara, W. (1976) *Biochem. Syst. Ecol.* **4**, 263.
4. Kofod, H. und Eyjólfsson, R. (1969) *Phytochemistry* **8**, 1509.
5. Fischer, E. und Scheibler, H. (1908) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **41**, 2891.
6. Farmer, T. H. (1947) *Sci. J. Roy. Coll. Sci.* **17**, 27.
7. Seigler, D. S. (1975) *Phytochemistry* **14**, 9.
8. Seigler, D. S., Eggerding, C. und Butterfield, C. (1974) *Phytochemistry* **13**, 2330.
9. Butterfield, C. S., Conn, E. E. und Seigler, D. S. (1975) *Phytochemistry* **14**, 993.
10. Seigler, D. S., Mikolajczak, K. L., Smith, C. R., Wolff, I. A. und Bates, R. B. (1970) *Chem. Phys. Lipids* **4**, 147.
11. Seigler, D. S. (1974) *Phytochemistry* **13**, 841.
12. Seigler, D. S. (1976) *Biochem. Syst. Ecol.* **4**, 235.
13. Radlkofer, L. (1933) in *Das Pflanzenreich Bd. IV* (Engler, A. ed.), 165, 1. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
14. Greeley, R. H. (1974) *J. Chromatogr.* **88**, 229.

Phytochemistry, 1978, Vol. 17, pp 315-317. Pergamon Press. Printed in England

POLYACETYLENES FROM *CARTHAMUS TINCTORIUS*

RONALD G. BINDER, ROBERT E. LUNDIN, SAIMA KINT, JOHN M. KLISIEWICZ* and ANTHONY C. WAISS, JR

Western Regional Research Laboratory, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Berkeley, CA 94710, U.S.A.; *Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Davis, CA 95616, U.S.A.

(Revised received 20 August 1977)

Key Word Index—*Carthamus tinctorius*; Compositae; safflower; polyacetylenes; spore germination stimulator.

Polyacetylenes are found in safflower roots [1], aerial parts [1, 2], flowers [3, 4], immature seed [5] and *Phytophthora*-infected stems [6, 7]. In 4-day-old seedlings, there are about 175 nmol per seedling of polyacetylenic hydrocarbons, mostly in the cotyledons [8].

While trying to identify compounds in germinating safflower that stimulate fungal spore germination, we found and identified the polyacetylenic hydrocarbons 1-5. Of the compounds identified, four (2a, 4a, 5a and 5b) were not previously reported to be in safflower and three of these (4a, 5a and 5b) are herein first described as natural products. Data from UV and mass spectra also indicate the presence of trace amounts of trideca-1,3,5-triene-7,9,11-triene, previously found in immature seed [5]. We have shown that polyacetylenes 1-5 potentially stimulate germination of teliospores of the safflower rust *Puccinia carthami* [9].

EXPERIMENTAL

Seed of a commercial cultivar of safflower, soaked for 2 hr in H_2O , was allowed to germinate for 4 days in the dark on open trays to which water was occasionally added. Seedlings were then blended with Me_2CO . Solvent was removed from the Me_2CO extract and the residue was partitioned between Et_2O and H_2O . Saponification of the Et_2O extract gave nonsaponifiables. A short Si gel column removed polar compounds. Nonpolar nonsaponifiables were chromatographed on a 5 \times 85 cm Sephadex LH-20 column with MeOH as eluting solvent and then repeatedly on a 2 \times 95 cm Si gel H (dried at 120°) column with heptane as eluting solvent. To avoid isomerism of double bonds, operations were conducted in dim light or in darkness and peak positions were determined by UV analysis of aliquots of collected fractions. 1-5 were recognised by their distinctive UV spectra [5]. Purity of the isomers isolated was checked by HPLC on a Vydak reverse phase column. Electron ionization MS (70 eV) were recorded