

and of (2), (10) and sophorol (9) in *Maackia* spp. [9]. Dewick has suggested that his data are consistent with the biosynthetic relationship: (3) → (6) → (8) → (11) [8]. Although the possibility of a metabolic grid cannot be excluded in either pathway, the detection of (1) and (2) in red clover means that an analogous scheme can now be written for the pathway of biosynthesis of (10) in this plant: (3) → (1) → (2) → (7) → (9) → (10). Initial steps in the biosynthesis of (12) are likely to be similar.

EXPERIMENTAL

All mps are uncorrected. MS were recorded at 70 eV. GC-MS of TMSi derivatives (BSA, pyridine [10]) was carried out on 3% OV-101 using a glass column (6 m × 2 mm) at He flow rate 60 ml/min; injection temp. 260°; column 230°; FID 260°; membrane 200°. Retention times are quoted relative to formononetin (9.5 min).

Extraction procedure

Red clover leaves and stems (1.3 kg dry wt, cv Grasslands Hamua) were dried at 37° and extracted with MeOH. Subsequent handling was essentially as described previously [11] except that glycosides were acid hydrolysed (H₂SO₄, 48 hr room temp.) prior to solvent fractionation (EtOAc), and phenolic materials were extracted first from EtOAc with 1 M NaOH and then into Et₂O after re-acidification. The resultant extract was chromatographed on Al₂O₃ (750 g, Woelm, neutral, activity grade 1), with CHCl₃, EtOH and EtOH:H₂O (1:1). Fractions rich in formononetin (TLC) were combined, crystallised, yielding needles (5.27 g): mp (EtOH) 259–260°; MS (probe) *m/e* (rel. int.) 282 (5), 268 (100), $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 249 (4.44), 300 (4.02); cf. (3) lit. [12, 13].

Formononetin (3) and *pseudobaptigenin* (2). GC-MS analysis of the TMSi derivative of the crystalline product showed the presence of (3) (95%); *m/e* (rel. int.) 340 (M⁺; 100), 325 (35), 208 (14), 132 (41); and (2) (5%); *RR*, 1.37; *m/e* (rel. int.): 354 (M⁺; 100), 339 (22), 146 (51), which co-chromatographed with and gave identical MS characteristics to the TMSi derivative of authentic *pseudobaptigenin* derived from *pseudobaptisin* by β -glucosidase hydrolysis. Authentic *pseudobaptigenin*: mp 291–293° (lit. [12], 292°); MS (probe) *m/e* (rel. int.) 282 (M⁺; 100), 146 (95).

Calycosin (1) was separated from the mother liquor of crystallisation (0.32 g) by PC with C₆H₆–HOAc–H₂O (125:72:

3). Material *R_f* 0.4–0.5 (colour reaction as in [1]) was eluted and crystallised (29 mg) mp (EtOH–H₂O) 249–251° (lit. [2] 245–247°). MS (probe) *m/e* (rel. int.) 284 (M⁺; 100), 269 (26), 241 (23), 213 (26), 148 (12), 137 (39); $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 248, 258 (*sh*), 291, 313 (*sh*); $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH} + \text{NaOH}}$ nm: 257, 332; PMR (60 MHz, DMSO-d₆, TMS): δ 8.30 (1 H, s), 8.01 (1 H, d, *J* = 9 Hz), 6.87–7.17 (5 H, m), 3.80 (3H, s) lit. [1]. GC-MS (TMSi derivative): *RR*, 1.82; *m/e* (rel. int.) 428 (M⁺; 100), 413 (15).

Other components of the mother liquor were identified and quantities estimated by PC and GC-MS of TMSi derivatives as (3) 51%; daidzein (5) (*RR*, 1.37) 37%; (1) 12%; (2) <0.5% and a trace of coumestan tentatively identified by MS as medicagol (12) (*RR*, 2.37).

Acknowledgements—The authors are grateful to Dr K. Markham of the Chemistry Division, DSIR, for a gift of pseudobaptisin, to Mr P. Ellingham for MS and GC-MS, to Miss P. Dittmer for technical assistance and to Dr J. Lancashire of the Grasslands Division, DSIR for samples of field-grown red clover.

REFERENCES

1. Markham, K. R., Mabry, T. J. and Swift, T. W. (1968) *Phytochemistry* **7**, 803.
2. Parthasarathy, M. R., Puri, R. N. and Seshadri, T. R. (1969) *Indian J. Chem.* **7**, 118.
3. Wong, E. (1975) in *The Flavonoids* (Harborne, J. B., Mabry, T. J. and Mabry, H. eds.) p 747. Chapman & Hall, London.
4. Higgins, V. J. and Smith, D. G. (1972) *Phytopathology* **62**, 235.
5. Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. (1970) in *The Systematic Identification of Flavonoids*, pp. 257 and 320. Springer, New York.
6. Braga de Oliveira, A., Gottlieb, O. R. and Ollis, W. D. (1968) *An. Acad. Bras. Cienc.* **40**, 147.
7. King, F. E., King, T. J. and Manning, L. C. (1957) *J. Chem. Soc.* 563.
8. Dewick, P. M. (1977) *Phytochemistry* **16**, 93.
9. Sugimoto, H. and Kio, T. (1966) *Bull. Chem. Soc. Japan* **39**, 1541.
10. Nordström, C. G. and Kroneld, T. (1972) *Acta Chem. Scand.* **26**, 2237.
11. Wong, E. (1962) *J. Sci. Food Agric.* **13**, 304.
12. Baker, W., Chadderton, J., Harborne, J. B. and Ollis, W. D. (1953) *J. Chem. Soc.* 1852.
13. Ollis, W. D. (1962) in *The Chemistry of Flavonoid Compounds* (Geissman, T. A., ed.) p. 367. Pergamon, London.

EIN BUTYRYL-FLAVONOL AUS DEM MEHL VON *NOTHOLAENA AFFINIS*

ECKHARD WOLLENWEBER*, JEAN FAVRE-BONVIN† und PHILIPPE LEBRETON†

*Institut für Botanik der Technischen Hochschule, Schnittspahnstr. 3, D-6100 Darmstadt, West Germany; †Service de Phytochimie, Dépt. de Biologie Végétale, Université Cl. Bernard I. yon I, F-69621 Villeurbanne, France

(Eingegangen am 1. März 1978)

Key Word Index—*Notholaena affinis*; Polypodiaceae; farinose exudate; novel flavonol with butyryl side-chain; 7,4'-O-dimethyl-8-O-butyrylherbacetin.

Notholaena affinis (Mett.) Moore gehört zu denjenigen Vertretern dieser Gattung, die Flavonoid-Aglyka in mehrlartiger Form extern ablagern. Als Verbreitungsgebiet wird Mexiko und Mittelamerika angegeben [1]. Im Rahmen einer umfassenden Untersuchung mehlbildender Farne [vgl. 2, 3] fiel eine Population von *N.*

affinis aus Costa Rica durch die Anwesenheit mehrerer unbekannter Substanzen auf. Die Hauptkomponente des Exkrets konnten wir jetzt identifizieren als 7,4'-O-dimethyl, 8-O-butyryl Derivat des Herbacetins.

Das hellgelbe Mehl auf den Farnwedeln läßt sich mit Aceton und Benzol ablösen und liefert die als *NA-I*

bezeichnete Substanz. Chromatographisches Verhalten und UV-Spektrum der Verbindung zeigen eindeutig, daß es sich hierbei um ein sehr unpolares Flavonoid-Aglykon handeln muß. Das Molgewicht $M^+ = 400$, das keinem 'normalen' (d.h. OH- und OMe-substituierten) Flavonoid zugeordnet werden kann, deutet jedoch auf eine ungewöhnliche Substitution. Auf der Polyamid-Dünnschichtplatte zeigt *NA-I* orangefarbene Fluoreszenz, wie ein Flavonol mit freien OH-Gruppen an C-3 und C-5, und die Lage der Absorptionsmaxima ($\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 268, 374 nm) läßt auf eine Verbindung vom Kämpferol-Typ schließen [4]. Tatsächlich erkennt man im PMR-Spektrum bei δ 7.10 und 8.03 4 Protonen, das typische AA'BB'-Spinsystem für einen *p*-substituierten Aromaten. Die Anwesenheit der freien 3-OH-Gruppe wird durch die bathochrome Verschiebung von Bande I mit Al^{3+} ($\Delta\lambda + 61$ nm) bestätigt, die Anwesenheit der freien 5-OH-Gruppe durch die Carbonylschwingung bei ν 1655 cm^{-1} gestützt. Die Massenspektren der Derivate (Methyl-derivat $M^+ 428$, Silyl-derivat $M^+ 544$) bestätigen, daß zwei OH-Funktionen vorliegen. Nach dem Sprühen mit Naturstoffreagenz A (Diphenylborsäure- β -aminoäthylester) wird der betreffende Fleck nicht grünlichgelb, sondern gelb fluoreszierend; auch das ist für ein Flavonol ungewöhnlich [5].

Das PMR-Spektrum ermöglicht die Identifizierung dreier weiterer Substituenten. Man beobachtet 2 OCH_3 -Gruppen (δ 3.85 und 3.91, s) und eine Butyrylgruppe ($2 \times 2\text{H}$, 2.70, t, und 1.75, sext., $J = 7$ Hz, 3 H, δ 1.02, t, $J = 7$ Hz). Die Esterfunktion wird bewiesen durch die Tieffeldlage der CH_2 -Gruppe (2.70 ppm) und die IR-Absorption für die Carbonylgruppe bei 1750 cm^{-1} . Das Massenspektrum bestätigt diese funktionelle Gruppe durch das Auftreten des Base-peaks $M - 70$, der durch Abspaltung von $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ zustande kommt. Nun ist noch die Stellung dieser drei Substituenten zu klären, wobei zunächst die Positionen C-6, C-7, C-8 und C-4' in Frage kommen. Die Position C-7 ist blockiert aufgrund des UV-Spektrums (Bande II durch NaOAc nicht beeinflusst), das auch für die Substitution von C-8 spricht ($\Delta\lambda$ *NA-I*/Kämpferol + 5 nm). C-4' muß nach dem oben Gesagten ebenfalls substituiert sein, und zwar zeigen die Massenspektren von *NA-I* und seinen Derivaten, daß C-4' eine OCH_3 -Gruppe trägt ($m/e = 135$). C-6-Substitution ist dagegen auszuschließen, wie PMR-Spektrum (δ 6.66, H, s) und Massenspektrum (kein Peak $M - 18$, vgl. [6]) belegen. Mit einer Methylfunktion an C-8 ist nicht zu rechnen, da $M > M - 15$ [6]. Die zweite OCH_3 -Gruppe sitzt vielmehr an C-7: wird *NA-I* methyliert und anschließend die Estergruppe verseift, so erhält man ein Monohydroxy-tetramethoxyflavon, dessen UV-Spektrum Methylierung von C-7 in der Ausgangssubstanz beweist (Bande II mit NaOAc unverändert). Die Butyrylgruppe muß also an C-8 sitzen. Damit ist für die Verbindung *NA-I* die Struktur des 7,4'-di-*O*-methyl-, 8-*O*-butyryl-Herbacetins bewiesen.

Das neue Flavonol findet sich besonders im Mehl dieser einen, hier untersuchten Population von *Notholaena affinis* als Hauptprodukt; in anderen, wo oft Kämpferol Hauptbestandteil ist [7], kann *NA-I* als Begleiter auftreten. Flavonoid-Aglyka mit ähnlichem Verhalten sind auch aus einigen weiteren Arten der Gattung *Notholaena* bekannt (Wollenweber, unveröff.)

und werden derzeit untersucht.—Flavonoide mit Isoprenoid-Seitenkette sind aus biogenetisch einleuchtenden Gründen nicht selten [8] (ein unserer Substanz entsprechendes 8-prenyl-Kämpferol ist aus *Sophora angustifolia* beschrieben worden [9]). Die Butyryl-Seitenkette ist verbreitet in der Gruppe der Phloroglucide aus der Farn-Gattung *Dryopteris* (vgl. [10]), dort allerdings C-verknüpft. Ein *O*-Butyryl-Flavonoid ist unseres Wissens in der Natur bisher nicht gefunden worden.

EXPERIMENTELLES

N. affinis wurde in Costa Rica gesammelt (Prov. Guanacaste, Dez. '76; Beleg Nr. 4725 im Herbar des Museo Nacional de Costa Rica, San José). Von 98 g luftgetrockneter Wedel erhält man durch Abspülen mit Aceton und Benzol ca 6 g Exkretmaterial. Aus der konzentrierten Lösung fallen ca 2 g der Substanz *NA-I* aus, ein kleiner Anteil verbleibt in der Mutterlauge. Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Äthanol erhält man reines *NA-I*, Fp 230°. UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (243, 252), 268, (322), 374 nm; Al^{3+} (258), 270, (308), 355, 435 nm; $\text{Al}^{3+}/\text{HCl}$ (258), 268, (307), 353, 435 nm; NaOAc 264, (268), (322), 390, 420 nm, instabil, $\lambda_1 \rightarrow 378$ nm; NaOH 338, 344 nm, zieml. instabil. IR (KBr) ν_{max} : 3300, 2800–2850, 1750, 1655, 1620, 1600, 1560, 1510, 1430, 1370, 1328, 1302, 1260, 1230, 1188, 1170, 1150, 1100, 1040, 1020, 985, 840, 800, 765, 700 cm^{-1} . MS 70 eV m/e (rel. int.): 400 (M^+ , 6), 400.1146; $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{O}_8 = 400.1158$, 330 (100, 330.0740; $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7 = 330.0739$), 315 (5), 301 (3), 287 (1), 153 (3), 135 (5), $m^+ 272.3$ (400 $\rightarrow$ 330), 300.7 (330 $\rightarrow$ 315). PMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 8.03 (2 H, d, $J = 9$ Hz), 7.10 (2 H, d, $J = 9$ Hz), 6.66 (1 H, s), 3.91 (3 H, s), 3.85 (3 H, s), 2.70 (2 H, t, $J = 7$ Hz), 1.75 (2 H, sext., $J = 7$ Hz), 1.02 (3 H, t, $J = 7$ Hz).

Acetat. MS m/e : 484 (<1), 442 (20), 400 (6), 372 (6), 330 (100), 301 (7), 149 (11), 135 (11).

Methyl-derivat. UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (256), 264, (304), 342 nm; Al^{3+} unverändert; NaOH zeitabhängige Zersetzung. MS m/e : 428 (32), 400 (8), 358 ($M - 70$, 100), 357 (100), 343 (358 $\rightarrow$ 15, 40), 339 (357 $\rightarrow$ 18, 40), 135 (84), $m^+ 322$ (357 $\rightarrow$ 339).

Verseiftes Methyl-derivat. UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 273, 302, (350) nm; NaOH 291, 308, 403 (schwach) nm, stabil; NaOAc 273, 300, (360) nm. MS m/e : 358 (M^+ , 100), 357 (90), 343 (33), 339 (41), 135 (50).

Verseiftes Methyl-derivat, erneut methyliert. UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (261), 268, (304), 341 nm; NaOH unverändert, stabil. MS m/e : 372 (100), 371 (90), 357 (57), 353 (30), 343 (30), 341 (21), 339 (14), 135 (>100).

TMS-Derivat. MS m/e : 544 (2), 529 (100), 501 (3), 499 (1), 472 ($M - 72$, 7), 459 (50), 457 (16), 144 (6), 429 (5), 412 (14), 387 (100), 385 (7), 372 (7), 357 (4), 135 (10), $m^+ 514.4$ (544 $\rightarrow$ 529).

Anerkennung—Herrn Luis D. Gómez P., Direktor des Museo Nacional de Costa Rica, San José, Costa Rica, sind wir für die Überlassung des Farmmaterials sehr dankbar.

LITERATUR

1. Tryon, R. (1956) *Contr. Gray Herb.* **179**, 1.
2. Wollenweber, E. (1976) *Phytochemistry* **15**, 2013.
3. Wollenweber, E. (1977) *Z. Naturforsch. Teil C* **32**, 1013.
4. Jay, M., Gonnet, J.-F., Wollenweber, E. und Voirin, B. (1975) *Phytochemistry* **14**, 1605.
5. Wollenweber, E. (1975) *Z. Pflanzenphysiol.* **74**, 415.
6. Goudard, M., Favre-Bonvin, J., Lebreton, P. und Chopin, J. (1978) *Phytochemistry* **17**, 145.
7. Wollenweber, E. (1977) *Z. Pflanzenphysiol.* **85**, 71.
8. Venkataraman, K. (1975) in *The Flavonoids* (Harborne, J. B., Mabry, T. J. and Mabry, H., eds.) p. 277. Chapman & Hall, London.
9. Komatsu, M., Tomimori, T., Hatayama, K. and Mikariya, N. (1970) *Yakugaku Zasshi* **90**, 463.
10. Widén, C. J., von Euw, J. und Reichstein, T. (1970) *Helv. Chim. Acta* **53**, 2176.