

A [4]; 137(23) and 134(20), in accordance with the structure assigned to ring B, due to retro-Diels-Alder partial fragmentation.

EXPERIMENTAL

Extraction and purification. 0.5 kg of the plant were pulverized and percolated with MeOH. The extract was concd to 0.5 l. and purified with trichloroethylene. The methanolic extract was taken to dryness. The dried extract was dissolved in a small vol. of MeOH and chromatographed on 3MM paper, in 15% HOAc for 14 hr. All the bands were eluted with MeOH, concd and re-run in EtOAc-HCO₂H-H₂O (10:2:3), the band with R_f 0.91 being eluted. Final re-run was in 30% HOAc, the band with R_f 0.59 being eluted. The final eluate was treated by TLC with Si gel 60 with C₆H₆-MeOH-HOAc (45:3:2), giving 2 bands with R_f 0.15 (A) and 0.65 (B). By means of TLC on Si gel 60, they were successively purified in CHCl₃-EtOAc-Me₂CO (5:4:1), C₆H₆-EtOAc-Me₂CO (5:4:1) and C₆H₆-MeOH-Me₂CO (45:3:2). Yield: A: 34 mg; B: 22 mg.

Identification. A and B by permethylation with MeI, yielded nobiletin. MS (70 eV direct inlet) m/e 402 (M⁺). By TLC with Si gel, both PM ethers and pure nobiletin showed identical R_f s in 4 solvents. Substance B was identical by TLC with an authentic sample of 5,4'-dihydroxy-6,7,8,3'-tetramethoxyflavone.

Substance A. Mp 196-8°. UV λ_{max} nm: MeOH, 348, 278, 256; NaOMe, 408, 268; AlCl₃, 435, 340 sh, 306 sh, 277; AlCl₃/HCl, 364, 304, 286, 262; NaOAc, 410, 268. NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 3.84, 3.92, 4.02 (s, 3H each, 6-, 7-, 8-OMe), 6.54 (s, 3-H), 6.98 (d, J = 8 Hz, 5'-H), 7.40 (d, J = 2 Hz, 2'-H), 7.48 (q, J = 8 and

2 Hz, 6'-H). MS (70 eV direct inlet) m/e : 360 (M⁺) (65), 345 (M-15) (100), 211 (40), 183 (35), 137 (23), 134 (20); Triacetate: 486 (M⁺), 475 (M-15), 444, 402, 360, 345, 211, 183; Permethylether: 402 (M⁺), 387 (M-15).

Substance B. Mp 162-4°. UV λ_{max} nm: MeOH, 344, 279, 254; NaOMe, 410, 266; AlCl₃, 366, 305 sh, 286, 255 sh; AlCl₃/HCl, 360, 305 sh, 286, 255 sh; NaOAc, 412, 266. MS (70 eV direct inlet) m/e : 374 (M⁺) (49), 359 (M-15) (100), 211 (29), 183 (35); Diacetate: 458 (M⁺), 443 (M-15), 416, 374, 359, 211, 183; Permethylether: 402 (M⁺), 387 (M-15).

Acknowledgements—The authors are indebted to: Dr. B. Rodríguez (Instituto de Química Orgánica C.S.I.C., Madrid) for supplying nobiletin and 5,4'-dihydroxy-6,7,8,3'-tetramethoxyflavone, and Prof. A. Hernández (Departamento de Botánica, Universidad de Murcia) for the identification of the plant material. MS spectra were registered by courtesy of Prof. F. Barba (Departamento de Química Orgánica, Universidad de Murcia).

REFERENCES

- Rodríguez, B. (1977) *Phytochemistry* **16**, 800.
- Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. (1970) *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer, New York.
- Tomás, F., Pastor, R. and Carpena, O. (1976) *Anal. Quim.* **72**, 809.
- Rama Rao, A. V. and Venkataraman, K. (1968) *Indian J. Chem.* **6**, 677.

DIFFERENTIATION DES HYDROXY-5 DIMETHOXY-6,7 OU 7,8 ET DES TRIMÉTHOXY-5,6,7 OU 5,7,8 FLAVONES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

MICHEL GOUDARD*, JEAN FAVRE-BONVIN†, JANOS STRELISKY‡, MIHAIL NOGRADI‡ et JEAN CHOPIN*

*Laboratoire de Chimie Biologique et †Laboratoire de Phytochimie. Université Claude Bernard (Lyon I), 69621 Villeurbanne, France et ‡Institut de Chimie organique, Université technique, Budapest XI, Hungary

(Reçu le 12 juin 1978)

Key Word Index—MS fragmentation; 5-hydroxy-6,7- or 7,8-dimethoxyflavones; 5,6,7- or 5,7,8-trimethoxyflavones.

Abstract—The relative abundance of M and M-15 peaks in the mass spectrum allows the differentiation of 5-hydroxy-6,7-dimethoxy- and 5,7,8-trimethoxyflavones (M > M-15) from 5-hydroxy-7,8-dimethoxy and 5,6,7-trimethoxyflavones (M < M-15) respectively, thus affording a solution to the 5,6,7- or 5,7,8-orientation problem on a microscale.

De nombreux dérivés O-méthylés de trihydroxy-5,6,7 et 5,7,8 flavones et flavonols diversement substitués sur le noyau B ont été mis en évidence dans les extraits végétaux. Le choix entre isomères 5, 6, 7 et 5, 7, 8 dans la détermination de structure est parfois délicat lorsque les deux isomères ou leurs dérivés perméthylés ne sont pas disponibles pour comparaison.

Nous avons montré dans une précédente publication l'intérêt de la spectrométrie de masse pour la différenciation des dihydroxy-5,7 méthoxy-6 ou 8 flavones, flavonols et méthyl-3 flavonols, les isomères méthoxy-6 présentant

un pic M-18 supérieur à 10% et un pic moléculaire supérieur au pic M-15 à l'inverse des isomères méthoxy-8 [1].

Nous avons pu depuis étendre nos investigations aux dérivés diméthylés en 6, 7 ou 7, 8 et aux dérivés triméthylés en 5, 6, 7 ou 5, 7, 8. Comme le montre le Tableau I, les spectres de masse des hydroxy-5 diméthoxy-6,7 flavones, flavonols et méthyl-3 flavonols présentent eux aussi un pic moléculaire (pic de base) supérieur au pic M-15. Cependant, le pic M-18 présente une importance très variable (1 à 25%) suivant les substituants présents

Tableau 1. Structure et pics M et M-15 du spectre de masse des flavones étudiées

Substituants de la flavone										M		M-15		
3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'		m/e	%	m/e	%	
	OH	OMe	OMe							298	100	283	68	
	OH	OMe	OMe				OMe			328	100	313	69	Salvigenine
	OH	OMe	OMe			OH	OMe			344	100	329	61	Eupatorine
OMe	OH	OMe	OMe							328	100	313	43	Alnustine
OMe	OH	OMe	OMe				OH			344	100	329	56	Penduletine [2]
OMe	OH	OMe	OMe			OH	OH			360	100	345	55	[2]
OMe	OH	OMe	OMe			OMe	OH			374	100	359	65	[3]
OMe	OH	OMe	OMe			OMe	OMe			388	100	373	85	[4]
OMe	OH	OMe	OMe		OH		OMe	OH		390	100	375	34	Déméthyl-5 apuléine [5]
OH	OH	OMe	OMe				OH			330	100	315	7	Eupalitine
OH	OH	OMe	OMe			OH	OH			346	100	331	7	Eupatolite
	OH		OMe	OMe						298	61	283	100	
	OH		OMe	OMe	OMe					328	50	313	100	
	OH		OMe	OMe		OMe	OMe			358	56	343	100	
OMe	OH		OMe	OMe			OH			344	68	329	100	
OMe	OH		OMe	OMe		OH	OH			360	68	345	100	
OMe	OH		OMe	OMe		OMe	OH			374	58	359	100	
OMe	OH		OMe	OMe		OH	OMe			374	70	359	100	
	OMe	OMe	OMe							312	33	297	100	
	OMe	OMe	OMe				OMe			342	25	327	100	[6]
	OMe	OMe	OMe		OMe		OMe	OMe		402	?	387	100	[7]
OMe	OMe	OMe	OMe			OMe	OMe			402	66	387	100	[4]
OMe	OMe	OMe	OMe		OH		OMe	OH		404	98	389	100	Apuléine [5]
OMe	OMe	OMe	OMe		OMe		OMe	OMe		432	46	417	100	[5]
OMe	OMe	OMe	OMe		OMe	OMe	OMe			432	42	417	100	[5]
	OMe		OMe	OMe						312	100	297	64	
	OMe		OMe	OMe			OMe			342	100	327	77	
	OMe		OMe	OMe		OMe	OMe			372	100	357	87	
OMe	OMe		OMe	OMe		OH	OH			374	100	359	47	
OMe	OMe		OMe	OMe		OH	OMe			388	100	373	29	
OMe	OMe		OMe	OMe		OMe	OMe			402	100	387	58	

et seuls les flavonols se distinguent par la faible importance (<10%) des pics M-1 et M-15. De même que les dihydroxy-5,7 méthoxy-8 flavones, les hydroxy-5 diméthoxy-7,8 flavones présentent dans leur spectre de masse un pic moléculaire inférieur au pic M-15 (pic de base), le pic M-18 étant absent. La distinction entre hydroxy-5 diméthoxy-6,7 et hydroxy-5 diméthoxy-7,8 flavones reste donc possible, mais seulement sur la base de l'importance relative des pics M et M-15.

Contrairement à ce qui se passe pour les flavones précédentes, hydroxylées en 5, le pic M-15 (pic de base) est supérieur au pic moléculaire dans le spectre de masse des triméthoxy-5,6,7 flavones tandis que le pic moléculaire (pic de base) est supérieur au pic M-15 pour les triméthoxy-5,7,8 flavones. Cette différence peut donc permettre, après méthylation complète des hydroxyles phénoliques, de définir la structure 5,6,7 ou 5,7,8 de n'importe quel dérivé O-méthylé de trihydroxy-5,6,7 ou 5,7,8 flavone ou flavonol hydroxylé ou non sur le noyau B. Compte tenu des faibles quantités de substance requises,

cette méthode peut donc permettre de résoudre à l'échelle microanalytique le problème du choix entre les structures 5,6,7 et 5,7,8.

Les spectres de masse ont été enregistrés avec un appareil AEI MS 902 du Centre de Spectrométrie de Masse de Lyon. L'énergie d'ionisation est de 70 eV.

REFERENCES

1. Goudard, M., Favre-Bonvin, J., Lebreton, P. et Chopin, J. (1978) *Phytochemistry* **17**, 145.
2. Rodriguez, E., Carman, N. F., van der Velde, G., McReynolds, J. H., Mabry, T. J., Irwin, M. A. et Geissman, T. A. (1972) *Phytochemistry* **11**, 3509.
3. Jay, M. et Voirin, B. (1976) *Phytochemistry* **15**, 517.
4. Bowie, J. H. et Cameron, D. W. (1966) *Aust. J. Chem.* **19**, 1627.
5. Braz-Filho, R. et Gottlieb, D. R. (1971) *Phytochemistry* **10**, 2433.
6. Kingston, D. G. I. (1971) *Tetrahedron* **27**, 2691.
7. Purushotaman, K. K., Sarada, A., Saraswathi, G. et Connolly, J. D. (1977) *Phytochemistry* **16**, 398.