

and a μ Bondapak C_{18} column (30 cm $\times$ 3.9 mm i.d.), including a pre-column filled with C_{18} /Corasil. Solvent A was H_2O -HOAc (97.5:2.5) and solvent B was MeOH-HOAc (97.5:2.5). The mixture at injection was 90:10 (A:B), which was programmed to 50:50 through a linear gradient (solvent program #6) over 1 hr. Detection was at 365 nm. The flavonoids eluted in 42.0 min (1), 43.2 min (2) and 49.6 min (3) at 1.5 ml/min. Relative concentrations were calculated based on peak heights.

Acknowledgements—We thank Dr. D. J. Pinkava for providing plant material and unpublished morphological and cytological data on the *Opuntia* species and hybrids examined in this study. This project was supported by an Arizona State University Grant-in-Aid.

REFERENCES

1. Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. (1970) *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer, New York.
2. Clark, W. D. and Parfitt, B. D. (1980) *Phytochemistry* (in press).
3. Rösler, H., Rösler, U., Mabry, T. J. and Kagan, J. (1966) *Phytochemistry* 5, 189.
4. Pinkava, D. J. and McGill, L. A. (1979) *J. Ariz.-Nev. Acad. Sci.* 14 (Suppl.), 14.
5. Harborne, J. B. (1973) *Phytochemical Methods*, p. 225. Chapman & Hall, London.
6. Clark, W. D. (1980) *Phytochem. Bull.* (in press).

Phytochemistry, 1980, Vol. 19, pp. 2043–2045. © Pergamon Press Ltd. Printed in England.

0031-9422/80/0901-2043 \$02.00/0

DEUX FLAVONES EXTRAITES D'UN EXSUDAT DE FOUGÈRE (*PITYROGRAMMA CALOMELANOS* VAR. *AUREOFLAVA*)

JEAN FAVRE-BONVIN, MAURICE JAY, ECKHARD WOLLENWEBER* et VOLKER H. DIETZ*

Département de Biologie Végétale, Service de Phytochimie, Université Claude Bernard Lyon-I, 43 Boulevard du 11 Novembre, 69622 Villeurbanne, France; * Institut für Botanik, Technischen Hochschule, Schnitzspahnstr. 3, 6100 Darmstadt, West Germany

(Received 7 December 1979)

Key Word Index—*Pityrogramma calomelanos*; Polypodiaceae; farinose exudate; flavonoids; β -(5,7,4'-trihydroxyflavon-8-yl)- β -phenylpropionic acid; methyl ester.

INTRODUCTION

Les frondes de *Pityrogramma calomelanos* var. *aureoflava* (Hook.) Domin produisent un exsudat farineux de couleur jaune. Une précédente étude a permis d'y déceler la présence de deux flavonoides majeurs: dihydroxy-2',6' diméthoxy-4,4' chalcone, et son homologue dihydrochalcone [1]; plus récemment [2], l'existence d'un nouveau couple chalcone-dihydrochalcone a été rapportée, avec une substitution du type: dihydroxy-2',6' méthoxy-4'. Nous avons aujourd'hui isolé de ce même matériel deux nouveaux aglycones flavoniques, 1 et 2, dont l'analyse structurale apporte la preuve de leur caractère original.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les propriétés spectrales UV de 1 et de 2 orientent vers une structure flavone à noyau B monosubstitué; l'emploi des réactifs classiques [3] permet en outre de placer des hydroxyles libres en -5 (comportement avec $AlCl_3$ et fluorescence) et en -4' (comportement avec NaOH). En présence de NaOAc, deux comportements différents sont enregistrés: pour 1 un déplacement bathochrome de 12 nm sur BII (= OH-7), pour 2 pas de déplacement significatif de

BII mais l'apparition d'une déformation rendant cette bande très dissymétrique.

La SM réalisée sur les produits naturels révèle dans les deux cas un pic de plus haute masse à m/e 400 correspondant à la formule brute $C_{24}H_{16}O_6$; les ions-fragments les plus importants sont $M - 43$ et surtout $M - 77$ signifiant la perte d'un noyau phényle. Bien que différents chromatographiquement, ces deux produits paraissent donc construits sur le même thème de base $C_{15}C_6$ (et probablement) C_3 , sans qu'il soit possible pour l'instant d'aller plus avant dans l'enchaînement de ces trois maillons.

Notre attention portera tout d'abord sur 1; le cas de 2 sera envisagé ultérieurement et par différence à cette première analyse structurale.

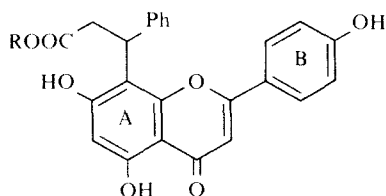
Le dérivé TMSi de 1 montre un pic moléculaire m/e 648 ($432 + 3$ TMSi) qui conduit à reconnaître pour la génine initiale une masse moléculaire égale à 432, c'est à dire supérieure de 32 uma à l'ion de plus haute masse détecté en SM du produit naturel. La réalité du pic moléculaire m/e 432 pour 1 est encore démontrée par SM en CI/D (NH_3 gaz reactant) où est révélé un ion $M + H$ m/e 433, suivi d'un ion $M - 32 + H$ m/e 401; en d'autres termes, tout porte à penser qu'en SM du produit naturel, il y a, avant ionisation, perte d'une molécule de MeOH.

La RMN ^1H confirme le squelette d'une flavone (H-3, δ 6,86, J longue distance avec H-2' et H-6'), avec un noyau B substitué en 4' (2 H δ 7,90 = H-2', H-6'; 2 H δ 6,99 = H-3' et H-5'). Elle permet de placer un H (s δ 6,35) sur le noyau A. Elle démontre l'existence d'un enchaînement phényle-CH-CH₂-CO où le phényle apparaît avec 5 H sous forme d'un massif δ 7,1 à 7,5, et le CH sous forme d'un triplet (δ = 5,34) couplé à un CH₂ (doublet à δ = 3,38); la mise en évidence d'un couplage à longue distance entre le triplet à 5,34 et le singulet à 6,35 témoigne de l'existence d'une liaison entre le -CH et le noyau A de la flavone. La RMN permet enfin de détecter un groupement

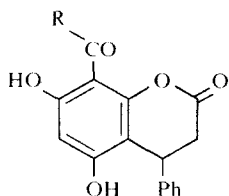
OMe (s δ 3,50) constituant avec le CO de l'enchaînement précédent un ester méthylique (IR ν_{max} 1721 et 1250 cm^{-1}). Lors de la SM du produit naturel, ce groupement méthoxyle s'élimine sous forme de MeOH, provoquant ainsi une cyclisation sur l'oxygène en -7 de la flavone, et rendant compte de l'apparition du pic de plus haute masse m/e 400 précédemment cité.

Ces diverses données sont récapitulées dans la formule 1, où le substituant dihydrocinnamate est lié en C-8 de la flavone de base; la valeur absolue du déplacement chimique du proton attribué au noyau A et le comportement UV en présence de AlCl_3 et de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ semblent en effet militer en faveur d'une flavone non substituée en C-6.

Pour 2, la démarche d'identification structurale est similaire. L'absence de groupement méthoxyle en RMN, et la présence en SM du dérivé TMSi d'un ion moléculaire m/e 706 (418 + 4 TMSi) conduisent à proposer l'existence d'un groupement -COOH libre sur l'unité dihydrocinnamique; sa présence permet d'expliquer la plus grande polarité de 2, et probablement aussi la moins grande réactivité au contact de NaOAc. Comme pour 1, il y a en SM du produit naturel cyclisation mais ici par suite d'une déshydratation. La parenté structurale de ces deux molécules a pu en outre être confirmée par traitement hydrolytique de 1 qui conduit à un composé en tout point identique (UV et R_f) à 2. De plus pour 1, toute hypothèse d'un ester méthylique artificiel (voir protocole de purification) a pu être écartée par recherche chromatographique de 1 dans un extrait initial acetonique des produits d'excrétion.



- 1 R = Me
2 R = H



- 3 R = CH₂CH₂Ph
4 R = CH=CHPh

En conclusion, il faut tout d'abord souligner que 1 et 2 sont deux flavones naturelles nouvelles; elles font partie du pool polyphénolique d'excrétion des frondes de *Pityrogramma calomelanos*; notons toutefois que sur 12 individus cultivés en serre, 4 d'entre eux seulement possèdent ces deux composés, et que sur plusieurs échantillons récoltés dans leur habitat naturel, 1 et 2 n'ont pu être identifiés; mais peut-être faut-il voir là le résultat de modifications structurales survenant lors du séchage et de la conservation précédant l'envoi. Nous remarquerons ensuite que 1 et 2 paraissent structuralement et biogénétiquement très proches des chalcones-neoflavonoides [4] et des dihydrochalcones neoflavonoides [5] que nous avons récemment isolés du genre *Pityrogramma*, et dont deux exemples sont 3 et 4. Il est clair que la cyclodéshydratation qui se produit en SM de 2, conduit à une molécule hybride "flavonoïde-neoflavonoïde" homologue des structures 3 et 4.

La présence de tous ces flavonoides complexes chez *Pityrogramma* démontre une fois encore le haut degré de différenciation du métabolisme polyphénolique des Fougères Gymnogrammoides, métabolisme dont l'originalité a déjà été soulignée chez *Cheilanthes* et chez *Notholaena* [6-8].

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les frondes de *Pityrogramma calomelanos* var. *aureoflata* récoltées dans les serres du Jardin Botanique de Darmstadt sont rincées par Me₂CO au moment de la cueillette. Les produits d'excrétion, flavonoides en particulier, sont adsorbés sur SiO₂ puis chromatographiés sur colonne de ce même adsorbant; le solvant d'élution est un mélange de C₆H₆, MeCOEt et MeOH. Des dernières fractions de la colonne, sont récupérés deux composés 1 et 2; leur purification finale est réalisée sur colonne de Polyamide SC6 par C₆H₆ progressivement enrichi en MeOH; les fractions correspondantes livrent au cours de leur évaporation respectivement 18 et 45 mg de 1 et de 2.

Composé 1. Fluorescence violette, R_f CCM SiO₂ (C₆H₆-diox., AcOH, 8:1:1) 0,60; CCM polyamide 11 (C₆H₆-MeCOEt-MeOH, 70:20:15) 0,80. UV λ_{max} , nm: MeOH 272, 328; NaOAc 284, 390; AlCl_3 278, 306, 346, 392; $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ 280, 306, 344, 392; NaOH 284, 400 avec augmentation d'intensité de B-I. SM 70 eV m/e (%): 400 (100) (C₂₄H₁₆O₆ trouv. 400,094, calc. 400,0947), 372 (20), 357 (30), 323 (33), 239 (10), 205 (20). SM en C/D (gaz reactant NH₃) appareil R-10-10B NERMAG. m/e (%): 433 (10), 401 (100). SM du dérivé TMSi m/e (%): 648, 633 (100), 576 (13). RMN ^1H (100 MHz, DMSO) δ : ppm/TMS: 2 H d 7,90 (J = 8,5 Hz); 5 H m 7,1 à 7,5; 2 H d 6,99 (J = 8,5 Hz); 1 H s 6,86; 1 H s 6,35; 1 H t 5,34 (J = 6,5 Hz); 1 H d 3,38 (J = 6,5 Hz); 3 H s 3,50.

Composé 2. Fluorescence violette, R_f CCM SiO₂ (C₆H₆-diox., AcOH, 8:1:1) 0,40; CCM polyamide 11 (C₆H₆-MeCOEt-MeOH, 70:20:15) 0,45. UV λ_{max} , nm: MeOH 272, 328; NaOAc 275 (283) 386; AlCl_3 280, 306, 344, 390; $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ 280, 304, 343, 390; NaOH 285, 399 avec augmentation d'intensité de B-I. SM 70 eV m/e (%): 400 (100) (C₂₄H₁₆O₆ trouv. 400,094, calc. 400,0947), 372 (25), 357 (33), 323 (33), 239 (10), 205 (25). SM en C/D (gaz reactant NH₃) appareil R-10-10B NERMAG. m/e (%): 401 (100), M - H₂O + 1 par suite d'une déshydratation. SM du dérivé TMSi 70 eV m/e (%): 706, 691 (100), 634 (C₂₅H₂₂O₈ 3 TMSi trouv. 634,223 calc. 634,2237). RMN ^1H (100 MHz, DMSO) δ : ppm/TMS: 2 H d 7,74 (J = 8,5 Hz); 5 H m 7,1 à 7,5; 2 H d 7,00 (J = 8,5 Hz); 1 H s 6,68; 1 H s 6,36; 1 H t 5,20 (J = 6,5 Hz); 1 H d 3,18 (J = 6,5 Hz).

BIBLIOGRAPHIE

1. Wollenweber, E. (1976) *Z. Pflanzenphysiol.* **78**, 344.
2. Wollenweber, E. et Dietz, V. H. (1980) *Biochem. Syst. Ecol.* **8**, 21.
3. Mabry, T. J., Markham, K. et Thomas, M. B. (1970) *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer, New York.
4. Dietz, V. H., Wollenweber, E., Favre-Bonvin, J. et Gomez, L. D. (1980) *Z. Naturforsch. Teil C* **35**, 36.
5. Wagner, H., Seligmann, O., Chari, M. V., Wollenweber, E., Dietz, V. H., Donnelly, D. M. X., Meegan, M. J. et O'Donnell, B. (1979) *Tetrahedron Letters* 4269
6. Wollenweber, E. (1978) *Am. Fern. J.* **68**, 13.
7. Wollenweber, E., Favre-Bonvin, J. et Jay, M. (1978) *Z. Naturforsch. Teil C* **33**, 831.
8. Jay, M., Wollenweber, E. et Favre-Bonvin, J. (1979) *Phytochemistry* **18**, 153.

Phytochemistry, 1980, Vol. 19, pp. 2045-2046. © Pergamon Press Ltd. Printed in England.

0031-9422/80/0901-2045 \$02.00/0

THREE GUAIANOLIDES FROM *HYPOCHOERIS RADICATA**

FERDINAND BOHLMANN and ROLF BOHLMANN

Institute for Organic Chemistry, Technical University Berlin, Strasse des 17. Juni 135, D-1000 Berlin 12, W. Germany

(Received 11 December 1979)

Key Word Index—*Hypochoeris radicata*; Compositae; new guaianolides; sesquiterpene lactones.

So far little is known about the chemistry of the genus *Hypochoeris* (tribe Cichorieae). Flavonoids are known from three species [1], while in one species several guaianolides and an eudesmanolide are present [2]. We have now re-investigated *Hypochoeris radicata* L.; so far only the presence of the flavones luteolin and isoetin has been reported [1].

The roots of *H. radicata* L. afforded a mixture of triterpene acetates, only the lupcol derivative **1** being identified. The more polar fractions contain a complex mixture of sesquiterpene lactones, which could only be partly separated. Intensive ¹H NMR studies led to the structures **2**, **4** and **5**. The presence of a cinnamic ester in **2** and a methacrylate in **4** and **5** easily could be deduced from the NMR data (see Table 1). Irradiation of the doublet at δ 6.42 sharpens the broadened doublets of 14-H and in the ¹H NMR spectrum of the corresponding acetate **3** the 3-H signal is shifted to higher fields. On irradiation at 4.42 the doublet of doublets at 3.34 collapses to a doublet and the four-fold doublet at 3.21 to a broadened doublet. Irradiation of the latter collapses the 13-H doublets to singlets and the three-fold doublet at 5.32 to a doublet of doublets, clearly indicating that the signal at 3.21 must be assigned to 7-H and consequently the signals for 5-H, 6-H and 8-H can be assigned too. The observed couplings of 8-H and those of 6-H indicate the stereochemistry at C-5 to C-8. The configuration at C-10 only can be assigned

indirectly. In the NMR spectrum of **2** the signal of 1-H could be assigned. Inspection of models shows that the observed couplings are in better agreement with a β-orientation of the 10-methyl group, since the cis-annulation of the rings clearly follows from the coupling *J*_{1,5}. The ¹H NMR spectrum of **4** (see Table 1) clearly shows that only the ester group is changed, as all signals are nearly identical with those of **2**. Though **5** could not be separated from **4**, the NMR data indicate that it is the 11,13-dihydro derivative of **4**. The stereochemistry at C-11, however, could not be assigned as the signal of 11-H is overlapped by other multiplets. We have named the desacyl derivative of **2** and **4** hyporadiolide. The aerial parts contain, in addition to **1**, **2**, **4** and **5**, the ester **6**. This investigation shows that guaianolides may be characteristic for the genus *Hypochoeris*.

EXPERIMENTAL

The fresh plant material (grown from seeds Botanical Garden Köln, voucher 79/1387) was cut and extracted with Et₂O-petrol (1:2). The resulting extracts were first separated by CC (Si gel, act. grade II) and further by repeated TLC (Si gel, GF 254). Roots (220 g) afforded 30 mg **1**, 15 mg **2** (Et₂O), 7 mg **4** (Et₂O) and 7 mg **5** (Et₂O) and aerial parts (2.15 kg) 30 mg **1**, 10 mg **2**, 5 mg **4**, 5 mg **5** and 20 mg **6**.

Hyporadiolide-8-O-cinnamate (**2**). Colourless gum, IR (CCl₄) cm⁻¹: 3620 (OH), 1780 (lactone), 1715, 1645 (C=CCO₂R, C=CCO); MS (Cl, isobutane): 409 (C₂₄H₂₄O₆) (M⁺ + 1, 5%); 391 (M - H₂O, 8); 261 (PhCH=CHCO₂H, 97); 149

*Part 280 in the series "Naturally Occurring Terpene Derivatives". For Part 279 see: Bohlmann, F., Rosenberg, E., Robinson, H. and King, R. M. (1980) *Phytochemistry* **19**, 2047