

BIFLAVONE UND 2,3-DIHYDROBIFLAVONE AUS 'METASEQUOIA GL YPTOSTROBOIDES'

SIEGFRIED BECKMANN, HANS GEIGER UND WALTER DE GROOT PFLEIDERER²

Lehrstuhl für organische Chemie der Universität, Stuttgart-Hohenheim, Germany

(Eingungen 6 Januar 1971)

Zusammenfassung—Aus dem Herbstlaub von *Metasequoia glyptostroboides* wurden die Biflavone Hinokiflavon, Isocryptomerin, Amentoflavon, Sotetsuflavon, Amentoflavon-7",4"-dimethyläther und Sciadopitysin, die bisher unbekanntes Dihydrobiflavone 2,3-Dihydrohinokiflavon, 2,3-Dihydroamentoflavon-7",4"-dimethyläther und 2,3-Dihydrosciadopitysin, sowie das Flavon Apigenin isoliert.

Abstract—From the autumn leaves of *Metasequoia glyptostroboides* have been isolated the biflavonyls hinokiflavone, isocryptomerin, amentoflavone, sotetsuflavone, amentoflavone-7",4"-dimethylether, sciadopitysin, the hitherto unknown dihydrobiflavonyls 2,3-dihydrohinokiflavone, 2,3-dihydroamentoflavone 7",4"-dimethylether and 2,3-dihydrosciadopitysin, as well as the flavone apigenin.

WÄHREND die bisher als Pflanzeninhaltsstoffe ermittelten etwa 20 Biflavone, von vereinzelt Ausnahmen abgesehen, nur in Gymnospermen vorkommen,³ sind die wenigen kürzlich entdeckten 2,3-Dihydrobiflavone neben Biflavanonen ausschliesslich in Pflanzen der Gattung *Garcinia* (Guttiferae) gefunden worden,⁴⁻⁶ Da wegen der nahen strukturellen Verwandtschaft der Biflavone und Dihydrobiflavone auch ein enger biogenetischer Zusammenhang zu erwarten ist, lag die Vermutung nahe, daß auch in Gymnospermen Dihydrobiflavone als Stoffwechselprodukte auftreten könnten.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die Inhaltsstoffe der ostasiatischen Conifere *Metasequoia glyptostroboides* fiel es auf, daß das einzige, in dieser Pflanze bislang gefundene Biflavon, das Hinokiflavon (I),⁷ wenn es nach der Literaturvorschrift gewonnen wurde, keineswegs rein war. Eine diinnschichtchromatographische Untersuchung zeigte, daß das so erhaltene I in der Tat noch mehrere offenbar strukturell ähnliche Verbindungen enthält. I, das etwa 75 % des Gemisches ausmacht, liess sich durch Umkristallisieren aus Dimethylformamid/Aceton in chromatographisch reinem Zustand gewinnen.

Die Mutterlaugen von I wurden einer mehrfach wiederholten Craig-Verteilung unterworfen. Die weitere Auftrennung der dabei erhaltenen Fraktionen erfolgte durch präparative Diinnschichtchromatographie an Kieselgel, Chromatographie an Polyamid-oder Sephadex LH 20-Säulen und Umkristallisieren aus verschiedenen Lösungsmitteln. Der Fortgang des Trennungsprozesses wurde diinnschichtchromatographisch verfolgt.

¹ III. Mitteilung Inhaltsstoffe von *Metasequoia glyptostroboides* II. Mitteilung: S. BECKMANN und H. GEIGER, *Phytochem.* 7, 1667 (1968).

² W. DE GROOT PFLEIDERER, Dissertation Universität Hohenheim (1969).

³ J. B. HARBORNE, *Comparative Biochemistry of Flavonoids*, S.96, 118. Academic Press, New York (1967).

⁴ C. G. KARAJGACICAR, P. V. RADHAKRISHNAN und K. VENKATARAMAN, *Tetrahedron Letters* 3195 (1967).

⁵ M. KONOSHIMA, J. IKESHIRO, M. NISHINAGA, T. MATSUURA, T. KUBOTO und H. SAKAMOTO, *Tetrahedron Letters* 12 (1969).

⁶ G. A. HERBIN, B. JACKSON, H. D. LOCKSLEY, F. SCHEINMANN und W. WOLSTENHOLME, *Phytochem.* 9 221 (1970).

⁷ T. KARIYONE, M. TAKAHASHI, K. ISOI und M. YOSHIKURA, *J. Pharmac. Soc. Japan (Yakugakuzasshi)* 78 801 (1958); C.A. 52, 18390 (1958).

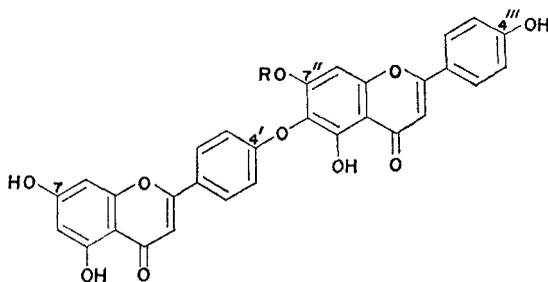
TABELLE I. AUSBEUTEN UND R_f -WERTE DER VERBINDUNGEN AUS LUFTTROCENEM HERBSTLAUB VON *Metasequoia glyptostroboides*

Substanz	%	R_f -Werte			
		A	B	C	D
Hinokiflavin (I)	0,16	0,04	0,04	0,18	0,26
Isocryptomerin (II)	0,0014	0,09	0,26	0,27	0,58
Amentoflavin (III)	0,0028	0,06	0,05	0,21	0,14
Sotetsuflavin (IV)	0,0036	0,12	0,18	0,35	0,40
Amentoflavin-7'',4'''-dimethyläther (V)	0,0088	0,20	0,43	0,54	0,78
Sciadopitysin (VI)	0,013	0,32	0,82	0,68	0,93
2,3-Dihydrohinokiflavin (VII)	0,012	0,11	0,17	0,22	0,37
2,3-Dihydroamentoflavin-7'',4'''-dimethyläther (VIII)	0,0017	0,30	0,63	0,54	0,80
2,3-Dihydrosciadopitysin (IX)	0,0007	0,43	0,91	0,70	0,97
Apigenin (X)	0,0096	0,13	0,14	0,34	0,37

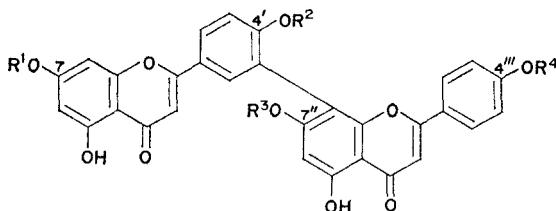
Die Diinnschichtplatten waren mit ca. 0,2 mm Polyamid der Firma Machery, Nagel u.Co. beschichtet.

A: 'Polyamid 1 1', Fließmittel: Methanol-Eisessig (9:1, v:v); B: 'Polyamid 1 1', Fließmittel: Nitromethan-Methanol (40:30, v:v); C: 'Polyamid 66', Fließmittel: Methanol-Eisessig (9:1, v:v); D: 'Polyamid 66', Fließmittel: Nitromethan-Methanol (40:30, v:v).

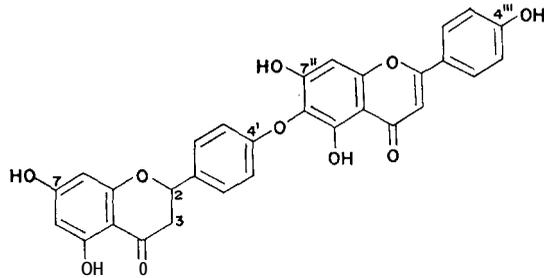
Von den in der Tabelle I genannten Substanzen sind V, VII, VIII und IX erstmalig in Pflanzen gefunden worden.



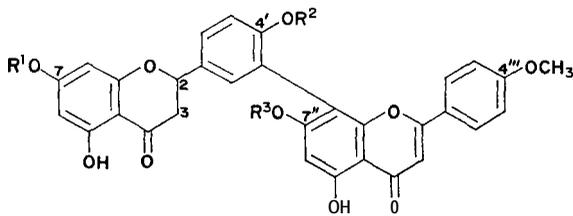
Hinokiflavin (I); R = H.
Isocryptomerin (II); R = CH₃.



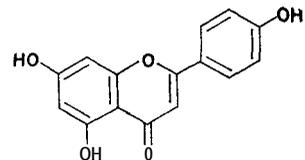
Amentoflavin (III); R¹-R⁴=H.
Sotetsuflavin (IV); R¹, R², R⁴=H, R³=CH₃.
Amentoflavin-7'',4'''-dimethyläther (V); R¹, R²=H, R³, R⁴=CH₃.
Sciadopitysin (VI); R¹, R², R⁴=CH₃, R³=H.



2, 3 - Dihydrohinokiflavin (VII)



2, 3 - Dihydromentoflavin -
 7'', 4''' - dimethyläther (VIII); R¹, R²=H, R³=CH₃.
 2, 3 - Dihydrosciodopitsin (IX); R¹, R²=CH₃, R³=H.



Apigenin (X)

Die **Strukturaufklärung** bzw. Identifizierung der einzelnen isolierten Verbindungen wurde dadurch erschwert, daß die Biflavone zur Bildung von Einschlussverbindungen neigen und vielfach nur in Gegenwart geeigneter **Gastmoleküle** zum Kristallisieren zu **bringen** sind. Andererseits gelingt es **häufig** in Abwesenheit geeigneter **Gastmoleküle** die amorphen Biflavone in Lösungsmitteln zu lösen, in denen die kristallisierten Substanzen an sich unlöslich sind. Dieses Verhalten ist für die chromatographische Trennung von Bedeutung, es erschwert aber auch vielfach die Identifizierung durch Mischschmelzpunkt oder Vergleich der IR-Spektren. Da bei der Vielzahl der möglichen Biflavonmethyläther auch eine chromatographische Identifizierung nicht genügend sicher ist, war es notwendig, nicht nur die neuen, sondern auch die bereits bekannten Biflavone durch Derivate und Abbauprodukte zu identifizieren.

Zur Ermittlung des Kohlenstoffgerüsts werden die Biflavone und Dihydrobiflavone in die strukturell gesicherten Permethyläther, Hinokiflavinpentamethyläther (XIII)^{8,9} bzw. Amentoflavinhexamethyläther (XI)¹⁰ übergeführt, wobei die Dihydrobiflavone anschließend an die Methylierung einer Dehydrierung mit Chloranil¹¹ unterworfen werden. Die Permethyläther lassen sich durch präparative Dünnschichtchromatographie reinigen¹² und durch Schmelzpunkt, R_f -Wert, Fluoreszenzverhalten, IR- und NMR-Spektrum (Abb. 1-4) einwandfrei identifizieren.

⁸ K. NAKAZAWA, *Tetrahedron Letters* 5223 (1967).

⁹ K. NAKAZAWA, *Chem. Pharmac. Bull. (Japan)* 16, 2503 (1968).

¹⁰ K. NAKAZAWA, *Chem. Pharm. Bull. (Japan)* 10, 1032 (1962).

¹¹ R. T. ARNOLD und C. J. COLLINS, *J. Am. Chem. Soc.* 61, 1407 (1939).

¹² H. HALPAAP, *Chemie-Ing.-Techn.* 35, 488 (1963).

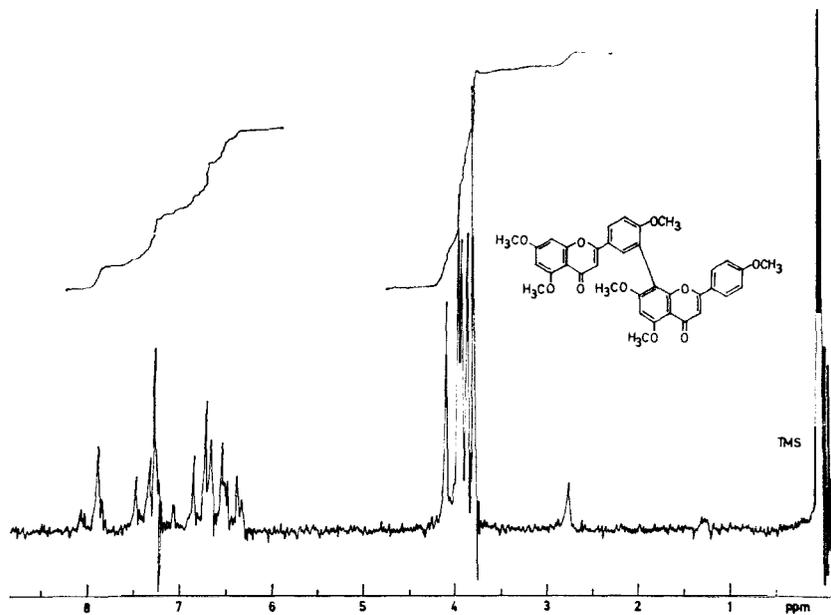


ABB. 1. NMR-SPEKTRUM VON AMENTOFLAVONHEXAMETHYLÄTHER (XI) IN CDCl_3 (TMS = TETRAMETHYLSILAN).

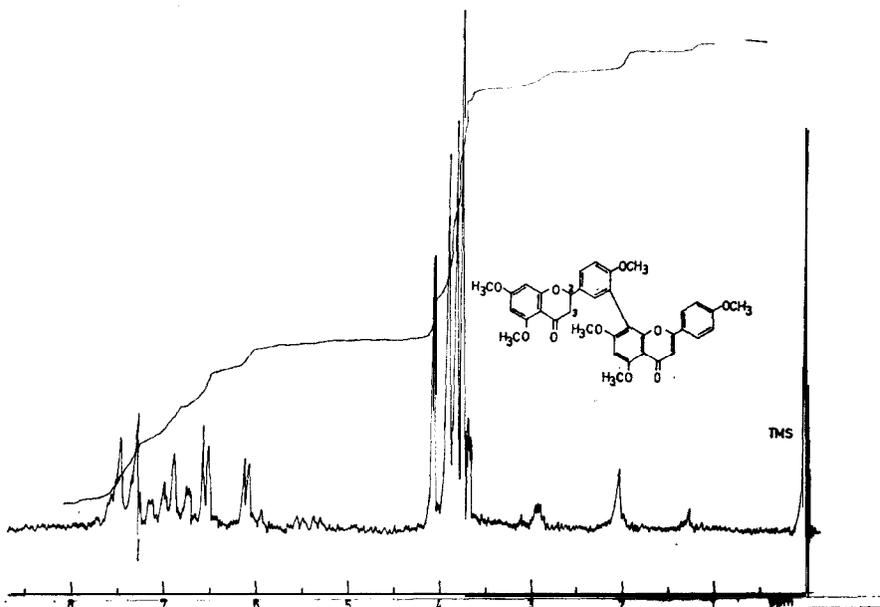


ABB. 2. NMR-SPEKTRUM VON 2,3-DIHYDROAMENTOFLAVONHEXAMETHYLÄTHER (XII) IN CDCl_3 .

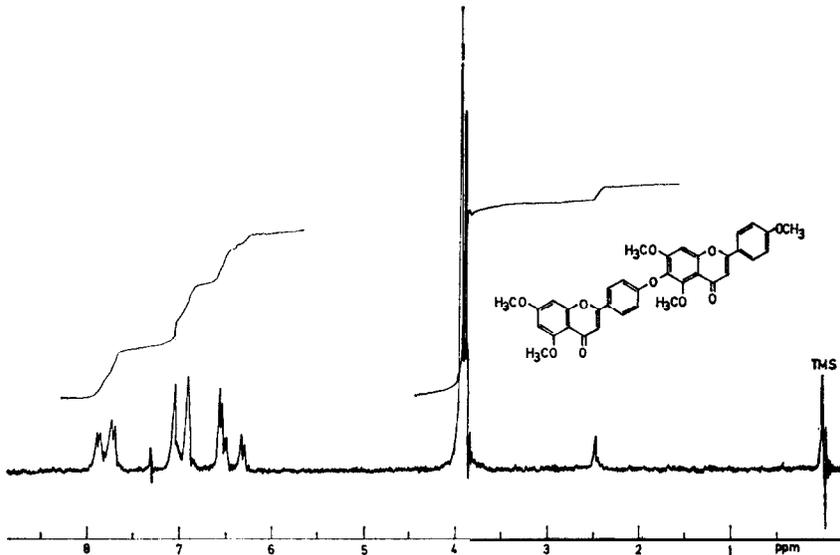


ABB. 3. NMR-SPEKTRUM VON HINOKIFLAVONPENTAMETHYLÄTHER (XIII) IN CDCl_3 .

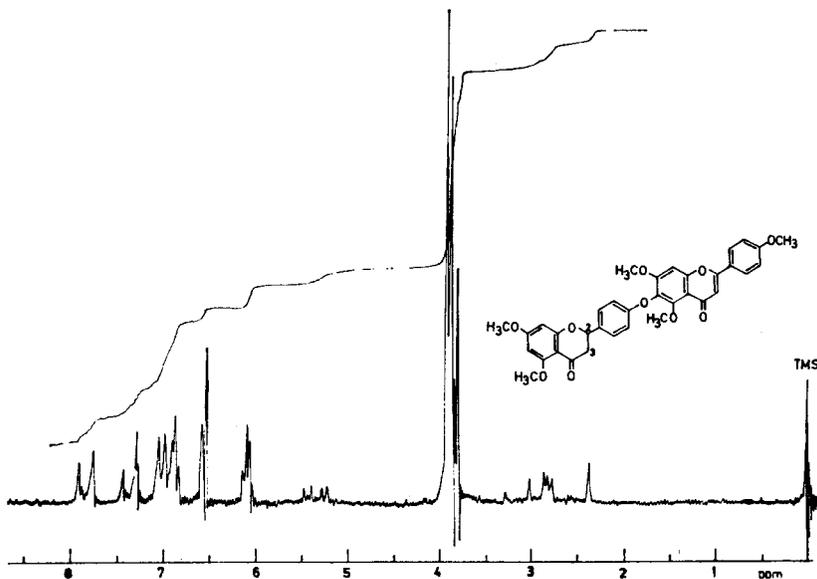


ABB. 4. NMR-SPEKTRUM VON 2,3-DIHYDROHINOKIFLAVONPENTAMETHYLÄTHER (XIV) IN CDCl_3 .

Das Vorliegen eines Dihydrobiflavons ergibt sich aus dem NMR-Spektrum, das ein Quartett um 5,3 ppm und ein Multipllett um 2,8 ppm zeigt, deren Integrale einem bzw. zwei Protonen entsprechen. Es handelt sich dabei um die Signale der Protonen am C_2 und C_3 .¹³ Welcher der beiden γ -Pyrone ringe hydriert ist, ergibt sich aus den Produkten des alkalischen Abbaus des ursprünglichen Dihydrobiflavons.

¹³ T. J. MABRY, J. KAGANAND und H. RÖSLER, *Phytochem.* 4, 177 (1965).

TABELLE 2. R_f -WERTE DER PERMETHYLÄTHER

	R_f *
Amentoflavonhexamethyläther (XI)	0,44
2,3-Dihydroamentoflavonhexamethyläther (XII)	0,54
Hinokiflavonpentamethyläther (XIII)	0,62
2,3-Dihydrohinokiflavonpentamethyläther (XIV)	0,74
Apigenintetramethyläther (Bezugssubstanz)	0,78

* Mit Kieselgeldiünnschicht-Fertigplatten (Merck PF 254), 1 Stunde bei 100° aktiviert, Fließmittel: Chloroform-Methanol (100:4; v/v).

Die Zahl der Methoxylgruppen lässt sich nach Zeisel oder aus dem NMR-Spektrum ermitteln, ihre Stellung wird durch Reaktionen bestimmt, die sich mit wenigen mg Substanz ausführen lassen. Flavon-5-methyläther, die in der Natur nur selten vorkommen, lassen sich sehr leicht selektiv entmethylieren.¹⁰ Ist so eine Methoxylgruppe in 5- oder 5"-Stellung ausgeschlossen, dann lässt sich das Methylierungsmuster aus den Abbauprodukten beim Erhitzen mit Kalilauge oder beim alkalisch-oxydativen Abbau mit Kalilauge und Wasserstoffperoxid ermitteln. Da in stark alkalischem Milieu mit einer teilweisen Entmethylierung gerechnet werden muß, wenn in den Abbauprodukten in o- oder p-Stellung zur Methoxylgruppe eine Carbonylgruppe vorhanden ist, wurde stets, wenn das Fehlen einer Methylgruppe in bestimmter Stellung zu beweisen war, zum Vergleich ein Biflavon abgebaut, das diese Methylgruppe besass.

Isocryptomerin (Hinokiflavon-7"-monomethyläther) (II), das erst während der Durchführung der vorliegenden Arbeit von japanischen Autoren in *Chamaecyparis obtusa* entdeckt worden ist^{14,15} gibt bei der Permethylierung XIII und wird von $AlCl_3$ in Nitrobenzol nicht entmethyliert, wodurch eine Methoxylgruppe in 5- oder 5"-Stellung ausgeschlossen ist. Da beim Alkaliabbau p-Hydroxyacetophenon und Phloroglucin entstehen, kommt als Sitz für die einzige Methoxylgruppe nur die 7"-Stellung in Betracht.

Amentoflavon (III) hat keine Methoxylgruppe und liefert bei der Permethylierung einen Hexamethyläther (XI), der mit Isogingketintetramethyläther und Sciadopitysin-(VI)-trimethyläther identisch ist, und bei der Acetylierung ein Hexaacetat, das mit einem Hexaacetat von authentischem III identisch ist. Der alkalische Abbau liefert p-Hydroxyacetophenon und Phloroglucin.

Sotetsuflavon (Amentoflavon-7"-monomethyläther) (IV) gibt bei der Permethylierung XI bei der Acetylierung ein Pentaacetylderivat, beim alkalischen Abbau p-Hydroxyacetophenon und Phloroglucin. Der alkalisch-oxydative Abbau liefert weder Anissäure, noch p-Methoxyisophthalsäure. Nach diesen Befunden kommt nur die 7"-Stellung für die Methoxylgruppe in Betracht.

Amentoflavon-7",4"-dimethyläther (V) liefert bei der Permethylierung XI, bei der Acetylierung ein Tetraacetat. Beim alkalischen Abbau treten p-Methoxyacetophenon und Phloroglucin auf, beim alkalisch-oxydativen Abbau Anissäure, aber keine p-Methoxyisophthalsäure. Bei der partiellen Entmethylierung mit Pyridinhydrochlorid entsteht IV. Diese Befunde sind nur mit der Struktur V vereinbar.

¹⁴ H. MNRA, T. KIHARA und N. KAWANO, *Tetrahedron Letters* 2339 (1968).

¹⁵ H. MIURA, T. KIHARA und N. KAWANO, *Chem. Pharmac. Bull. (Japan)* 17, 150 (1969).

Sciadopitysin (Amentoflavon-7,4',4''-trimethyläther) (VI) wurde durch alkalischen und alkalisch-oxydativen Abbau^{16,17} identifiziert.

2,3-Dihydrohinokiflavon (VII) gibt ein Pentaacetat und einen Pentamethyläther (XIV), der bei der Dehydrierung mit Chloranil Hinokiflavonpentamethyläther (XIII) liefert. Das NMR-Spektrum von XIV (Abb. 4) zeigt die charakteristischen Signale für die Protonen an C₂ und C₃.¹³ Die Entstehung von p-Hydroxyacetophenon beim alkalischen Abbau beweist, daß der Ring B' einem Flavonsystem angehört. Damit ist für die bislang unbekannt Verbindung die Struktur VII bewiesen.

2,3-Dihydroamentoflavon-7'',4''-dimethyläther (VIII) liefert bei der Permethylierung 2,3-Dihydroamentoflavonhexamethyläther (XII), dessen NMR-Spektrum (Abb. 2) wie bei XIV die charakteristischen Signale für die C₂- und C₃-Protonen zeigt. Die Integrale für die 2,3-Protonen sind etwas zu niedrig ausgefallen, weil sich die Lösung unter Bildung von Chalkonzersetzten. Dehydrierung des Hexamethyläthers XII mit Chloranil liefert XI. Beim alkalischen Abbau erhält man p-Methoxyacetophenon und Phloroglucin, beim alkalisch-oxydativen Abbau Anissäure. Diese Befunde ergeben die Struktur VIII.

2,3-Dihydrosciadopitysin (IX), ein bisher unbekannter 2,3-Dihydroamentoflavontrimethyläther, gibt bei der Permethylierung XII, dessen Dehydrierung mit Chloranil XI liefert. Beim alkalischen Abbau von IX erhält man p-Methoxyacetophenon und 2,6-Dihydroxy-4-methoxyacetophenon, beim alkalisch-oxydativen Abbau Anissäure und p-Methoxyisophthalsäure. Damit ist die Lage der drei Methoxylgruppen festgelegt und die Strukturformel IX gesichert.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die NMR-Spektren wurden mit dem Gerät JEOL C-60 HL aufgenommen.

Isolierung der Verbindungen I-IX aus Blättern von Metasequoia glyptostroboides. 2,5 kg lufttrockene (9,2% H₂O) und gemahlene Blätter von *Metasequoia glyptostroboides* Hu et Cheng, die im Herbst 1965 in Stuttgart-Hohenheim gesammelt worden waren, wurden mit Petroläther (Sdp. 60–90°) 40 Stdn. vorextrahiert und anschließend 40 Stdn. mit Ät₂O extrahiert. Der Atherextrakt wurde auf ca. 3 l. eingengt und insgesamt mit 5 l 2% NaOH ausgeschüttelt. Der alkalische Auszug wurde filtriert und sofort mit verd. H₂SO₄ angesäuert. Die flockig ausgeschiedenen rohen Biflavone, sowie X werden abfiltriert, mit H₂O gewaschen und über P₂O₅ getrocknet. Ausbeute: 14,0 g.

Der Niederschlag wird in 25 ml Dimethylformamid (DMF) heiss gelöst und mit 100 ml heissem MeOH versetzt. Nach einem Monat haben sich 3,84 g Rohkristallat abgeschieden. Durch Umkristallisieren aus 15 ml DMF und 45 ml Aceton werden 2,565 g Hinokiflavon (I) erhalten. Nachdem auf diese Weise der grössere Teil von I aus dem Gemisch entfernt ist, wird der Rest zunächst einer groben Auftrennung durch Craig-Verteilung zwischen Ober- und Unterphase des Systems Ät₂O–H₂O–DMF (200:25:100; v) unterworfen. Dazu werden die vereinigten Mutterlaugen zur Trockne eingedampft, in 200 ml Unterphase gelöst und in 8 Röhren einer 100-stufigen Craig-Verteilungsmaschine (25 ml Phasenvolumen) gefüllt. Der Verlauf der Trennung wird durch DC verfolgt. Nach 240 Überführungen im Durchlaufbetrieb kann eine Fraktion entnommen werden, die nur die beiden Trimethyläther VI und IX enthält. Aus ihr wird VI durch Umkristallisieren aus Aceton und IX durch präparative Schichtchromatographie gewonnen. Nach 720 Überführungen, nunmehr im Kreislaufbetrieb, ist eine Auftrennung des Restes erfolgt in eine langsam wandernde Fraktion, die I, II, III, IV, VII und wenig X enthält und eine schnellere, aus der nach 2200 Überführungen Apigenin (X) abgetrennt und durch Vergleich mit authentischem Material (R_f-Wert, Fluoreszenzverhalten) identifiziert wird, und die dann noch die Dimethyläther V und VIII enthält, die durch Umkristallisieren und präparative DC getrennt werden. Die langsamer wandernde Fraktion (I, II, III, IV, VII und X) wird durch wiederholte Säulenchromatographie aufgetrennt. Insgesamt wurden isoliert:

Hinokiflavon (I). Aus DMF–Aceton gelbe Kristalle, die 2 Mol DMF enthalten. Durch längeres Trocknen i. Vak. über P₂O₅ kann das DMF entfernt werden. Ausb. 3,915 g. (C₃₀H₁₈O₁₀ · 2 C₃H₇NO (684,7) Ber. C 63,16; H 4,71. Gef. C 62,90; H 4,66%; C₃₀H₁₈O₁₀ (538,5) Ber. C 66,93; H 3,37. Gef. C 66,78;

¹⁶ W. BAKER und W. D. OLLIS, in *Recent Development of Natural Phenolic Products* (edited by W. D. OLLIS), S.156 ff., Pergamon Press, New York (1961).

¹⁷ W. BAKER, A. M. FINCH, W. D. OLLIS und K. W. ROBINSON, *J. Chem. Soc.* 1477 (1963).

H 3,75%). *Pentamethyläther* (XZZZ) wird durch 15-stündiges Erhitzen von I mit MeJ und K_2CO_3 in trockenem Aceton und Reinigung durch präparative DC erhalten. Aus Benzol fast farblose Prismen. Schmp. 264–265°. Lit.^{8,18}: 260–261°. Ausbeute: 85%.

Zsocyptomerin (II). Aus DMF-Methanol seideglänzende, grüngelbe Nadeln, die 2 Mol DMF enthalten. Schmp. 308–310°. Ausbeute 0,036 g. ($C_{31}H_{20}O_{10} \cdot 2, C_3H_7ON$ (698,7) Ber. C 63,61; H 4,90; N 4,01; $-OCH_3$ 4,45. Gef. C 64,04; H 4,87; N 3,83; $-OCH_3$ 4,36%.) *Tetraacetat*. Aus II mit Acetanhydrid/Pyridin. Farblose Nadeln aus Äthylacetat. Schmp. 211–212°; Lit.¹⁹: 211°. Ausbeute 38%. *Tetramethyläther*. Aus II wie bei der Methylierung von I beschrieben. Nach Schmp., Misch-Schmp., R_f -Wert und Fluoreszenzverhalten identisch mit XIII.

Amentoflavin (ZZZ). Aus ÄtOH mikrokristallines Pulver mit 2 1/2 Mol Kristallwasser, das durch Trocknen bei 100° im Hochvakuum vollständig entfernt wird. Ausbeute 0,070 g. ($C_{30}H_{18}O_{10}$ (538,4) Ber. C 66,92; H 3,37; Gef. C 66,66; H 3,30%). *Hexaacetat* wird aus III mit Essigsäureanhydrid in Pyridin erhalten. Farblose Nadeln aus Äthylacetat. Schmp. und Misch-Schmp. 234–235°.^{20,21}

Amentoflavin-5,7,4',5',7'',4''-hexamethyläther (XI). Durch Umsetzung von III mit MeJ und K_2CO_3 in acetonischer Lösung. Reinigung durch präparative DC. Fast farblose Prismen aus ÄtOH, die zwischen 200–220° erweichen und bei 245–246° schmelzen. Lit. 238°.¹⁹, 246°.

Sotetsuflavin (IV). Mikrokristallin aus Aceton/H₂O. Schmp. 324–325° (Zers.). Ausbeute 0,090 g. ($C_{31}H_{20}O_{10}$ (552,5) Ber. C 67,39; H 3,65; $-OCH_3$ 5,62. Gef. C 67,12; H 3,97; $-OCH_3$ 5,95%). *Pentaacetat*. Wie bei II-Tetraacetat beschrieben. Farblose Nadeln aus Äthylacetat. Schmp. und Misch-Schmp. mit authentischem Material 230–231°. *Pentamethyläther* (XI). Aus IV entsprechend wie XI aus III dargestellt. Nach Schmp., Misch-Schmp. 245–246°, R_f -Wert und Fluoreszenz identisch mit XI.

Amentoflavin-7'',4''-dimethyläther (V). gelbe Prismen aus Aceton. Die wasserhaltigen Kristalle schmelzen bei ca. 220°, erstarren wieder und schmelzen dann unter Zersetzung bei 318–320°. Ausbeute 0,219 g. ($C_{32}H_{22}O_{10} \cdot H_2O$ (584,5) Ber. C 65,75; H 4,14; $-OCH_3$ 10,61. Gef. C 66,32; H 4,26; $-OCH_3$ 10,15%) *Tetraacetat*. Durch Erwärmen von V mit Essigsäureanhydrid und Pyridin auf 40°. Farblose Nadeln aus Äthylacetat. Schmp. 235–237°. Ausb. 40%. ($C_{40}H_{30}O_{14}$ (734,7) Ber. C 65,04; H 4,12. Gef. C 64,89; H 4,21%) *Tetramethyläther*. Aus V durch Methylierung wie bei XI beschrieben. Nach Schmp., Misch-Schmp. (245–246°), R_f -Wert und Fluoreszenzverhalten identisch mit XI.

Sciadopitysin (VI). Aus Aceton zitronengelbe Prismen. Schmp. 287–289°. Lit. 295–297°, ¹⁷ 286–287°. ¹⁸ Ausb. 0,318 g. ($C_{33}H_{24}O_{10}$ (580,6) Ber. C 68,27; H 4,17. Gef. C 67,91; H 4,23%) *Trimethyläther*. Durch Methylieren von VI wie bei XI aus III beschrieben. Nach Schmp., Misch-Schmp. (245–246°), R_f -Wert und Fluoreszenzverhalten identisch mit XI.

2,3-Dihydrohinokiflavin (VII). Aus Pyridin-ÄtOH (1:2) blassgelbe Nadeln, die 1 Mol Pyridin und 1/2 Mol H₂O enthalten. Schmp. 314–315° (Zers.). ($C_{30}H_{20}O_{10} \cdot C_5H_5N \cdot 1/2 H_2O$ (628,6) Ber. C 66,88; H 4,17; N 2,23. Gef. C 67,22; H 4,19; N 2,62%) *Pentaacetat*. Wie bei II-Tetraacetat beschrieben. Farblose Nadeln aus Äthylacetat. Schmp. 223–225°. ($C_{40}H_{30}O_{15}$ (750,7) Ber. C 64,00; H 4,03. Gef. C 64,10; H 4,16%.)

2,3-Dihydrohinokiflavin-5,7,5'',7'',4''-pentamethyläther (XZV). VII wird wie bei XIII beschrieben, methyliert. Die in beträchtlicher Menge entstehenden gelb gefärbten Nebenprodukte lassen sich durch präparative Schichtchromatographie gut abtrennen. Aus ÄtOH oder Benzol farblose Nadeln, gut löslich in $CHCl_3$, mässig löslich in Benzol und ÄtOH, jedoch besser als XIII. ($C_{35}H_{30}O_{10}$ (610,6) Ber. C 68,85; H 4,95; $-OCH_3$ 25,14. Gef. C 69,20; H 4,91; $-OCH_3$ 23,76%) Beim Stehenlassen der $CHCl_3$ Lösung färbt sich diese allmählich gelb.

2,3-Dihydroamentoflavin-7'',4''-dimethyläther (VIII), der sich aus Aceton mit 1/2 Mol Kristallwasser mikrokristallin ausscheidet. Schmp. 295–297° (Zers.). Ausb. 0,042 g. ($C_{32}H_{24}O_{10} \cdot 1/2 H_2O$ (577,5) Ber. C 66,42; H 4,36. Gef. C 66,74; H 4,34%) Nach dem Integral des NMR-Spektrums enthält VIII in Übereinstimmung mit der aus der Analyse ermittelten Formel 2 Methoxylgruppen.

2,3-Dihydroamentoflavin-5,7,4',5',7'',4''-hexamethyläther (XII). Durch Methylierung von VIII wie bei XI beschrieben. Aus Benzol Kristalle, die bei 150–160° unter Gelbfärbung erweichen und bei 195–200° schmelzen. ($C_{36}H_{32}O_{10}$ (624,6) Ber. C 69,22; H 5,16. Gef. C 69,45; H 5,12%) Nach dem Integral des NMR-Spektrums sind in Übereinstimmung mit der durch Analyse belegten Summenformel 6 Methoxylgruppen vorhanden (Signale um 4 ppm). Beim Stehen von XII-Lösungen tritt Gelbfärbung auf, wahrscheinlich wegen Chalkonbildung.

2,3-Dihydrosciadopitysin (IX). Kurze, gelbe Spiesse aus Methanol. Schmp. 150–152°. Ausb. 0,017 g. ($C_{33}H_{26}O_{10} \cdot H_2O$ (600,6) Ber. C 66,00; H 4,68. Gef. C 66,27; H 4,62.) Nach dem Integral des NMR-Spektrums enthält IX in Übereinstimmung mit der aus der Analyse errechneten Summenformel 3 Methoxylgruppen. Die Methylierung von IX liefert XII, das mit dem aus VIII dargestellten Präparat vollkommen identisch ist.

¹⁸ T. KARIYONE und I. SAWADA, *J. Pharmac. Soc. Japan (Yakugakuzasshi)* 78, 1020 (1958); C. 1963, 19565.

¹⁹ H. MIURA und N. KAWANO, *Chem. Pharm. Bull. (Japan)* 15, 232 (1967).

²⁰ L. HÖRHAMMER, H. WAGNER und H. REINHARDT, *Naturwissenschaften* 52, 161 (1965).

²¹ G. DI MODOICA, P. F. ROSSI und A. M. RIVERO, *Atti accad. naz. Lincei* 27, 127 (1959).

Apigenin. Mit authentischem Material in jeder Hinsicht identisch. Ausb. 0,240 g.
Partielle Entmethylierung von Amentoflavon-7",4"-dimethyläther (V). 150 mg V werden mit 500 mg **Pyridinhydrochlorid**²² in einem geschlossenen Kölbchen 14 Stunden auf 140-150° erhitzt. Die erkaltete Schmelze wird in H₂O aufgenommen und die Reaktionsprodukte mit verd. H₂SO₄ ausgefällt. Durch Chromatographie des Niederschlags an einer Sephadex LH-20-Säule mit Aceton-MeOH-H₂O erhält man 25 mg **Sotetsuflavon (IV)** und 55 mg **Amentoflavon (III)**. III und IV werden durch *R_f*-Werte, Fluoreszenzverhalten und Acetylderivate charakterisiert.

Dehydrierung von 2,3-Dihydrohinokiflavon-5,7,5',7',4"-pentamethyläther (XIV)

15 mg XIV und 450 mg **Chloranil**¹ in 2,5 ml Xylol werden 5 Stunden in einer offenen Ampulle in einem siedenden Xylolbad erhitzt. Nach 3 Std. wird noch 1 ml Xylol hinzugefügt. Der Reaktionsverlauf wird DC verfolgt. Nach Beendigung der Reaktion wird zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit 5 ml CHCl₃ digeriert. Aus der filtrierten Lösung wird durch präparative Schichtchromatographie XIII isoliert. Identifizierung durch Schmp., Misch-Schmp. (262-264°), chromatographisches und Fluoreszenzverhalten. Ausb. 80%.

Dehydrierung von 2,3-Dihydroamentoflavon-5,7,4',5',7,3,4"-hexamethyläther (XII)

Bei der Dehydrierung, die wie oben beschrieben, ausgeführt wurde, erhält man **Amentoflavon-5,7,4',5',7,3,4"-hexamethyläther**¹⁰ (XI). Aus ÄtOH fast farblose Prismen. Schmp. und Misch-Schmp. 240-245°, Ausbeute 70%. Identifizierung durch chromatographisches und Fluoreszenzverhalten.

Alkalischer Abbau von Biflavonen und 2,3-Dihydrobiflavonen

Es wurde wie *loc. cit.*¹⁷ beschrieben verfahren. Die Abbauprodukte wurden dünn-schichtchromatographisch identifiziert.

Alkalisch-oxydativer Abbau von Biflavonen und 2,3-Dihydrobiflavonen

Ausführung wie *loc. cit.*¹⁷ beschrieben. Die Trennung der sauren Reaktionsprodukte erfolgt durch fraktionierte Sublimation aus einem Objektträger mit Hohlschliff an ein Deckglas auf dem Heitzisch eines Schmelzpunktmikroskops. Bei 100-150° sublimiert **Anissäure** in langen, farblosen Nadeln. Schmp. und Misch-Schmp. 180-181°; p-Methoxisophtalsäure sublimiert erst bei 180-250°; Schmp. und Misch-Schmp. 277-278°.

Säulenchromatographie

Zur säulenchromatographischen Trennung wurden 2 Systeme verwendet: (a) Polyamid 6 mit Äthylenglykolmonomethyläther als Eluens. Die Reihenfolge der Elution war II, VII, I III + IV + XI, die Belastbarkeit der Säule 1 g Gemisch/l. Säulenvolumen. (b) Sephadex LH-20 mit Aceton-MeOH-H₂O (2:1:1; v:v:v) als Eluens. Reihenfolge der Elution: X, IV, VII, III, I. Belastbarkeit der Säule 0,2 g Gemisch/l. Säulenvolumen. Wenn die Rohkristallisate in Eluens zu schwer löslich waren, wurden übersättigte Lösungen verwandt. Es wurde in DMF gelöst, mit Wasser amorph ausgefällt, im Vakuum getrocknet, im Eluens gelöst und sofort auf die Säule gegeben. Dabei muss sehr rasch gearbeitet werden, damit keine Kristallisation eintritt.

Präparative Schichtchromatographie

Es wurden 20 x 20 cm Platten, die mit 2 mm Kieselgel PF₂₅₄ (Merck) beschichtet waren, verwandt. Diese Platten liessen sich mit ca. 100 mg Substanz belasten. Als Fließmittel diente CHCl₃-MeOH (90:10; v:v) für die Trennung von V und VIII, sowie VI und IX; zur Reinigung der Permethylläther XI, XII, XIII und XIV wurde das Gemisch CHCl₃-MeOH (95:5; v:v) verwandt. Es wurde mehrfach entwickelt,^{1,2} der Fortgang der Trennung wurde unter der UV-Lampe verfolgt. Nach beendeter Trennung wurden die Zonen von der Platte geschabt und mit CHCl₃/MeOH eluiert. Zur Entfernung kolloidalen Kieselgels wurden die Eluate vor dem Eindampfen über eine 5 cm hohe Schicht im Eluens gequollenen Sephadex LH-20 filtriert.

Dünn-schichtchromatographie

Unter den verschiedensten ausprobierten Systemen für den qualitativen Nachweis von **Biflavanoiden** haben sich unter den gegebenen Bedingungen Dünn-schichten aus Polyamid (Machery, Nagel u. Co., Dilren) als die geeignetsten erwiesen. Als Fließmittel dienten Mischungen aus MeOH/Eisessig und MeOH/Nitromethan.²³ Zur Sichtbarmachung der Substanzen eignen sich folgende Sprühreagenzien:

²² J. B. HARBORNE und E. HALL, *Phytochem.* 3,428 (1964).

²³ J. W. MIZELLE, W. J. DUNLAP, R. E. HAGEN, S. H. WUNDER, B. J. LIME, R. F. ALBACH und F. P. GRIF-FITHS, *Anal. Biochem.* 12,316 (1965).

(1) 1 %ige methanolische Lösung von Diphenylborsäure- β -aminoäthylester ('Flavognost'). Die Substanzen erscheinen als gelbe Flecken, die unter der UV-Lampe (366 nm) in verschiedenen Gelbtönungen fluoreszieren: I, II und VII zeigen eine zitronengelbe, V, VI, VIII und IX eine hellgelbe, III und IV eine dunkelgelbe, X eine leuchtend gelbgrüne Fluoreszenz.

(2) 1 %ige Pthanolische Lösung von AlCl_3 . Die Substanzen erscheinen als gelbe Flecken, die unter der UV-Lampe (366 nm) in gelben Farbtönungen fluoreszieren: I, II, III, IV und VII zeigen einen hellgrüne, V, VI VIII und IX eine zitronengelbe, X zeigt eine leuchtend gelbgrüne Fluoreszenz.

(3) Gesättigte Lösung von NaBH_4 in Isopropanol. Die Substanzen erscheinen als gelbe Flecken. Nach dem Behandeln der Chromatogramme mit Salzsäuredämpfen tritt bei den 2,3-Dihydrobiflavonen in ähnlicher Weise wie bei den Flavanonen eine orangerote Färbung auf. Die Biflavon-Flecken bleiben dabei unverändert.

Die Biflavon-bzw. 2,3-Dihydrobiflavonpermethyläther lassen sich chromatographisch auf Kieselgeldünnschichten auftrennen. Unter der UV-Lampe (366 nm) fluoreszieren XI und XII mit türkisblauer, XIII mit stahlblauer und XIV mit kornblumenblauer Farbe.

Anerkennung—Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der chemischen Industrie danken wir für die finanzielle Unterstützung, Herrn Prof. Dr. Buchloh, Hohenheim, für die Überlassung von Pflanzenmaterial und der Firma Jeolco (Europe) S.A., Paris, für die Aufnahme der NMR-Spektren.

²⁴ R. M. HOROWITZ, *J. org. Chem.* 22, 1733 (1957).