

Creticosides A and B are rare examples of the naturally occurring diterpenoid glycosides and their occurrence in fern is of quite interest.

*Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Science University of Tokyo
Ichigaya Funagawara-machi,
Shinjuku-ku, Tokyo*

CHIU-MING CHEN
TAKAO MURAKAMI

Received April 26, 1971

[*Chem. Pharm. Bull.*
19(7)1498-1500(1971)]

UDC 581.13.04

Recherches Toxicologiques des Substances Métaboliques du *Fusarium nivale*. VIII¹⁾. La Quatrième Substance Métabolique de *F. nivale*

Dans une publication antérieure, nous avons déjà mentionné que trois toxines scirpenoides jouent le principal rôle dans la lésion radiomimétique provoquée aux animaux expérimentaux¹⁻³⁾.

Notre équipe travaillant sur l'aspect toxicologique des micotoxines, se charge maintenant de réexaminer toutes les substances qui sont contenues dans la toxine brute. Jusqu'à présent, l'on rend responsable des lésions provoquées aux animaux à qui sont administrés de la toxine brute, les substances scirpenoïdes; mais nous pensons qu'il y ait d'autres substances jouant un petit rôle dans le *fusarium*-toxicose, bien que la toxicité de ces substances soit faible.

Comme première révision, nous avons commencé à examiner la substance f. 127° accompagnée toujours à nivalenol-4-O-acétate.

Récemment nous avons trouvé une souche qui produisait une quantité suffisante de cette substance à partir des souches conservées, et maintenant nous avons recherché la structure chimique de cette substance.

Culture et Isolement

On inocule *F. nivale*, souche Fn-2-B conservée, dans une solution de Czapek additionnée de 1% de peptone et on le cultive à 25° pendant deux semaines. On ajoute 20 g/litre de charbon actif dans 25 litre de la solution de culture pour absorber les toxines, que l'on sépare ensuite du charbon en ajoutant 5 litres méthanol. On fait dissoudre la fraction libérée dans une partie de méthanol à la quelle on a ajouté 9 parties de chloroforme. Après avoir séparé le précipité, on obtient 8,2 g de la fraction soluble du mélange méthanol-chloroforme.

On chromatographie cette fraction sur une colonne de gel de silice en utilisant comme solvant un mélange chloroforme-méthanol (10:1).

Après la fraction qui contient nivalenol-4-O-acétate, nous obtenons la substance qui s'est cristallisée par le chauffage avec benzène.

Examen de la Structure Chimique

La structure chimique de cette nouvelle substance a été supposée comme étant l'anhydride de la Prolyl-tyrosine en considérant ses propriétés physico-chimiques, spectroscopiques

- 1) Part VII: T. Tatsuno, Y. Morita, H. Tsunoda, and M. Umeda, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **18**, 1485 (1970).
- 2) T. Tatsuno, M. Saito, M. Enomoto, and H. Tsunoda, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **16**, 2519 (1968).
- 3) T. Tatsuno, Y. Fujimoto, and Y. Morita, *Tetrahedron Letters*, **1969**, 2823.

et chimiques: $C_{14}H_{16}O_3N_2 \cdot C_6H_6$, f. 127° , $C_{14}H_{16}O_3N_2$ (après avoir séché sur P_2O_5 et paraffine sous pression réduite, pendant 24 hr à 70°) f. 154° . $[\alpha]_D^{25} -58,6^\circ$ ($l=0,5$, méthanol), M^+ ion m/e 260, UV λ_{max}^{MeOH} $m\mu$ (ϵ): 205 (9620), 228 (5850), 280 (1040), IR ν_{max}^{KR} cm^{-1} : 3300, 3200, 3005, 2945, 2855, 1660, 1635, 1602, 1590 (épaule), 1510, 1450, 1440, 1340, 1320, 1210, 1180, 1010, 870, 805. RMN δ ($CDCl_3$, TMS, ppm): 1,60, 2,30 (2H, dd, $J=72, 11$ Hz), 2,02 (2H, quintet), 3,32 (2H, dd, $J=43, 15$ Hz), 3,70 (2H), 4,32 (1H), 4,68 (1H, t), 7,05 (4H-arom., dd, $J=31, 9$ Hz). Anal. élémentaire: A; Calc. pour $C_{14}H_{16}O_3N_2 \cdot C_6H_6$: C, 71,27; H, 7,55; N, 8,27. Tr.: C, 70,92; H, 6,39; N, 8,31. B; Calc. pour $C_{14}H_{16}O_3N_2$: C, 65,68; H, 6,29; N, 9,37. Tr.: C, 64,74; H, 6,14; N, 10,75.

Les résultats de la réaction colorée par l'acide sulfurique, le ninhydrin et le Morish sont tout à fait négatifs.

Ces résultats nous suggèrent qu'il y aurait la fonction de dicétopipérazine⁴⁾. Hydrolysant ce composé avec 6N acide chlorhydrique, on trouve une quantité presque théorique du L-Pro et du L-Tyr. Alors, nous supposons que ce composé est l'anhydride de L-prolyl-L-tyrosine. Nous l'avons vérifié en synthétisant ce composé par le procédé:

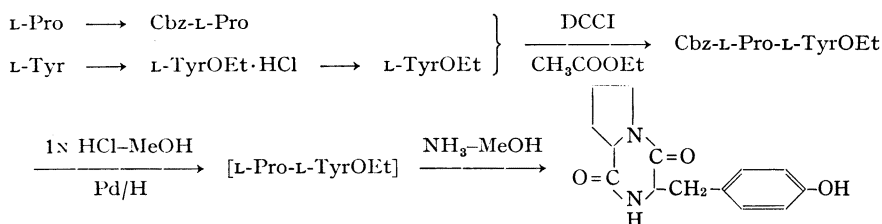


Fig. 1

On fait condenser le Cbz-L-Pro (2 g) avec le Tyr-OEt (1,7 g) en employant DCCI (1,9 g), on obtient Cbz-L-Pro-L-Tyr-OEt (3,4 g). Après la décarbonylation oxydation on conserve L-Pro-L-tyr-OEt obtenu dans la solution de méthanol ammoniacale pendant une nuit.

Le composé obtenu est chromatographié sur une colonne de gel de silice en utilisant comme solvant un mélange chloroforme-méthanol (5:1). La fraction pure est cristallisée par méthanol-benzène, on obtient un cristal de l'anhydride de L-Pro-L-Tyr, f. 127° . Le cristal séché sur P_2O_5 et paraffine à 70° sous la pression réduite, f. 154° , est identifié à la substance isolée parfaitement en employant la fusion mixed et le spectre d'infra-rouge.

Discussion

On a déjà publié que l'on a trouvé les substance de type de dicétopipérazine dans des métabolites microbiens^{5,6)}, mais nous craignons que la dicétopipérazine ne viennent de la peptone que nous avons additionnée dans la solution de Czapek. En effet, nous avons essayé de chercher des dicétopipérazines contenantes dans la peptone employée: en employant 200 g de peptone, nous avons fractionné les substances selon la méthode que nous avons écrit, et nous avons obtenu quelques dipeptides et tripeptides qui contenaient proline, phénylalanine, alanine, sérine et tyrosine, mais nous n'avons pas découvert l'anhydride de Pro-Tyr, la dicétopipérazine. Alors, nous pouvons penser que la dicétopipérazine est une substance métabolique de *F. nivale* ou une substance anabolique par *F. nivale* de peptone.

On sait aussi que les substances ont l'activité pesticidique et l'inhibition de germination. Et, un chercheur tchécoslovaque⁷⁾ a publié la synthèse de quelques dicétopipérazine, mais nous ne pouvons pas trouver l'anhydride de L-Pro-L-Tyr.

4) Le résultat de l'examen du spectre de mass supporte aussi l'hypothèse que la substance consiste en un noyau de dicétopipérazine.

5) Y. Kodaira, *Agr. Biol. Chem.*, **25**, 261 (1961).

6) Y. Chen, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **24**, 372 (1960).

7) K. Blaha, *Collec. Czech. Chem. Commun.*, **34**, 4000 (1969).

Nous nous chargeons maintenant de la recherche sur la toxicologie en ce qui concerne les mammifères et l'activité sur les insectes et les plantes.

*The Institute of Physical and
Chemical Research
2-1, Hirosawa, Wako, Saitama*

*The Food Research Institute, The Ministry
of Agriculture and Forestry
1-4-12, Shiohama, Koto, Tokyo*

TAKASHI TATSUNO
MOTOMU SATO
YUKIO KUBOTA
YASUKO KUBOTA
HIROSHI TSUNODA

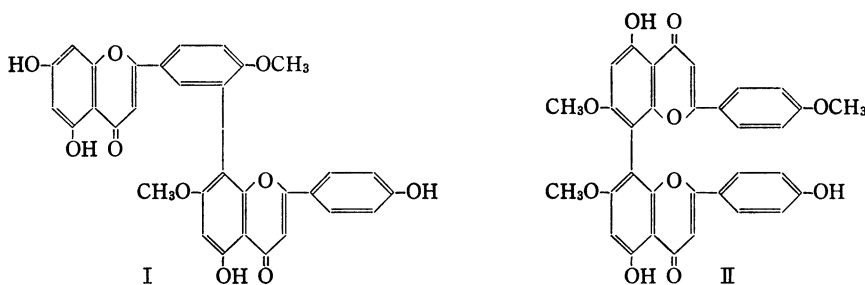
Reçu le 17 May, 1971

[Chem. Pharm. Bull.]
19(7)1500-1501(1971)

UDC 547.814.5.02 : 581.192

Two New Biflavonyls from *Araucaria cunninghamii*

The isolation and characterization of four biflavonyls, 4',4'',7,7''-tetra-O-methylcupressuflavone, 7,7''-di-O-methylcupressuflavone (8,8''-bisgenkwanin), 4',4'',7,7''-tetra-O-methylamentoflavone and 4',4'',7''-tri-O-methylamentoflavone (kayafflavone) as major constituents of the leaf extracts of *Araucaria cunninghamii* have already been reported.¹⁻³⁾ The presence of monomethyl ethers of agathisflavone, cupressuflavone, amentoflavone and hinokiflavone along with traces of the parent hinokiflavone and a dimethyl ether of agathisflavone has also been detected (thin-layer chromatography (TLC)).⁴⁾ In the present communication, we report the isolation of two new biflavonyls from the same source. They have been characterized as 4',7''-di-O-methylamentoflavone (I) and 4',7,7''-tri-O-methylcupressuflavone (II) by nuclear magnetic resonance (NMR) studies.



Extraction of the fresh leaves followed by solvent fractionation and preparative TLC gave seven fractions labelled as ACuI—ACuVII. TLC examination of the methylated products of chromatographically homogeneous ACuIV and V revealed them as mixtures, in un-

- 1) Mohd. Ilyas, J.N. Usmani, S.P. Bhatnagar, M. Ilyas, W. Rahman and A. Pelter, *Tetrahedron Letters*, 1968, 5515.
- 2) A. Pelter, R. Warren, M. Ilyas, J.N. Usmani, S.P. Bhatnagar, R.H. Rizvi, M. Ilyas and W. Rahman, *Experientia*, 25, 350 (1969).
- 3) Ph. D. Thesis of Mohd. Ilyas, Aligarh Muslim University, 1970.
- 4) Nizam U. Khan, W.H. Ansari, M. Ilyas and W. Rahman, *Phytochemistry*, in press.