

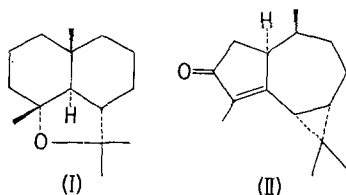
SPECIALIA

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces brèves communications. – Für die Kurzmitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed in the authors' brief reports. – Ответственность за короткие сообщения несёт исключительно автор. – El responsable de los informes reducidos, está el autor.

(–)-Maalioxide and (+)-Cyclocolorenone, Enantiomeric Sesquiterpenoids from the Liverwort, *Plagiochila acanthophylla* subsp. *japonica*¹

The liverworts (*Hepaticae*), placed phylogenetically between the vascular plants and the algae, form a unique division in the plant kingdom, and their haploidal plant bodies (gametophytes) which grow from the spores, contain characteristic oil bodies in the cell.

In a course of our investigation on constituents of liverworts, several terpenoids which are enantiomers of those detected from the higher plants have been isolated, such as (–)-manool, (–)-longiborneal, (–)-longifolene, (+)- α -himachalene and (–)- α -longipinene^{2,3}, together with some new sesquiterpenoids, bazzanene, chiloscypnone, bazzananol, δ -cuparenol and α -pompenene^{4–5}. We have interest in such occurrence of enantiomeric terpenoids in the liverworts in view of stereochemistry and biogenesis of terpenoids, since a pair of the enantiomers have been hardly detected in the higher plants. The present communication deals with the isolation of 2 additional enantiomeric sesquiterpenoids, (–)-maalioxide (I) and (+)-cyclocolorenone (II), from a liverwort, *Plagiochila acanthophylla* subsp. *japonica* (Lac.) Inoue belonging to the *Plagiochilaceae* in the *Jungermanniales*.



The liverwort collected at the valley of Yabakei in Kyushu, after being dried in the shade, was digested with hexane, and a yellowish oily substance was obtained, which showed 4 spots with Rf 0.67, 0.55, 0.47 and 0.37 on TLC using silica gel and a mixed solvent of benzene and ethyl acetate (5:1). The substance was thus eluted over a silica gel column to isolate successfully the latter two components.

(–)-Maalioxide. The component corresponding to the Rf 0.47 spot was isolated as a colourless crystalline, mp 66.0°, $[\alpha]_D -34.5^\circ$ (1.0% in CHCl_3). From the molecular formula of $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ (M^+ 222.2005) and the IR ($\nu_{\text{max}}^{\text{CCl}_4}$ 1460, 1446, 1383, 1370, 1240, 1152, 1053 and 965 cm^{-1}) and NMR ($\delta_{\text{CDCl}_3}^{\text{ppm}}$ 0.88, 1.02, 1.11 and 1.30, each 3H, s) spectra, this compound was deduced to be a saturated tricyclic ether with 2 tertiary methyls and 1 geminal dimethyl. The melting point and the IR-spectrum also coincided with those of maalioxide, which was previously isolated by NARAYANAN et al.⁶ from the roots of *Valeriana wallichii* and prepared by BÜCHI et al.¹⁰ in treatment of maaliol with iodine, although the optical

rotation ($[\alpha]_D -34.5^\circ$) exhibited an opposite sign compared with that ($[\alpha]_D +33.3^\circ$) of (+)-maalioxide⁶. Accordingly, it was certain that the compound was enantiomeric (–)-maalioxide (I).

(+)-Cyclocolorenone. The oily compound, $[\alpha]_D +404^\circ$ (0.9% in CHCl_3), showing the Rf 0.37 spot was an α,β -unsaturated ketone ($\nu_{\text{max}}^{\text{CCl}_4}$ 1688 and 1603 cm^{-1} ; $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 264 nm, ϵ 15200). It had a molecular formula of $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$ (M^+ 218.1663) and afforded a crystalline 2,4-DNP (mp 218–219°). The ketone also contained a methyl attaching on a tetrasubstituted double bond (ν 840 cm^{-1} ; $\delta_{\text{CDCl}_3}^{\text{ppm}}$ 1.72, 3H, d, $J = 2.0$), a secondary methyl (δ 0.79, 3H, d, $J = 7.0$) and a geminal dimethyl (ν 1391 and 1384 cm^{-1} ; δ 1.02 and 1.23, each 3H, s). The IR- and UV-spectra of the compound and the melting point of its 2,4-DNP mentioned above coincided with those of cyclocolorenone¹¹.

The optical rotation ($[\alpha]_D +404^\circ$) of this ketone, however, differed in sign from that ($[\alpha]_D -400^\circ$) of (–)-cyclocolorenone, which was previously isolated from *Psuedowintera colorata* by CORBETT et al.¹¹ and from *Solidago canadensis* by KREPINSKY et al.¹² and also a positive Cotton effect ($[\theta]_{318}^0$, $[\theta]_{330}^0 +504$, $[\theta]_{348}^0$) was shown in the CD curve of this ketone. Furthermore, when this compound was reduced with lithium aluminium hydride, it was converted into a hydrocarbon (M^+ 204;

¹ Chemical Constituents from *Hepaticae*, Part XVII: Part XVI, A. MATSUO, M. NAKAYAMA, H. GOTO, S. HAYASHI and S. NISHIMOTO, *Phytochemistry*, in press.

² A. MATSUO, M. NAKAYAMA, J. ONO and S. HAYASHI, *Z. Naturforsch.* 27b, 1437 (1972).

³ A. MATSUO, M. NAKAYAMA and S. HAYASHI, *Chemistry Lett.* 1973, 769.

⁴ S. HAYASHI, A. MATSUO and T. MATSUURA, *Experientia* 25, 1139 (1969).

⁵ S. HAYASHI, A. MATSUO and T. MATSUURA, *Tetrahedron Lett.* 1969, 1599; A. MATSUO and S. HAYASHI, 1970, 1289.

⁶ S. HAYASHI and A. MATSUO, *Experientia* 26, 347 (1970).

⁷ A. MATSUO, M. NAKAYAMA and S. HAYASHI, *Chemistry Lett.* 1972, 341.

⁸ A. MATSUO, T. MAEDA, M. NAKAYAMA and S. HAYASHI, *Tetrahedron Lett.*, 1973, 4131.

⁹ C. S. NARAYANAN, K. S. KULKARNI, A. S. VAIDYA, S. KANTHAMANI, G. L. KUMARI, B. V. BAPAT, S. K. PAKNIKAR, S. N. KULKARNI, G. R. KELKAR and S. C. BHATTACHARYYA, *Tetrahedron* 20, 963 (1964).

¹⁰ G. BÜCHI, M. S. WITTENAU and D. M. WHITE, *J. Am. chem. Soc.* 81, 1968 (1959).

¹¹ R. E. CORBETT and R. N. SPEDEN, *J. chem. Soc.* 1958, 3710.

¹² J. KREPINSKY and V. HEROUT, *Colln. Czech. chem. Commun.* 27, 2459 (1962).

$[\alpha]_D +155^\circ$, 0.2% in CHCl_3) which was identical with $(-)\text{-}\alpha\text{-gurjunene}$ ($[\alpha]_D -227^\circ$) except that the sign of the optical rotation was opposite¹³. Thus, this tricyclic α,β -unsaturated ketone was estimated as enantiomeric $(+)\text{-cyclocolorone}$ (II).

¹³ M. PALMADE, P. PESNELLE, J. STREITH and G. OURISSON, Bull. Soc. Chim. fr. 1963, 1950.

¹⁴ Acknowledgment. The authors wish to express their gratitude to Mr. T. ONO for the collection and identification of the liverwort. Thanks are also due to Profs. G. BÜCHI and V. HEROUT for the gifts of samples of maali oxide and IR-spectrum of cyclocolorone.

Zusammenfassung. Aus den Hexanextrakten von *Plagiochila acanthophylla* subsp. *japonica* wurden $(-)$ -Maali oxid und $(+)$ -Cyclocoloron isoliert. Diese Verbindungen sind enantiomer zu denjenigen, die aus höheren Pflanzen erhalten worden sind.

A. MATSUO, M. NAKAYAMA, S. SATO, T. NAKAMOTO, S. UTO and S. HAYASHI¹⁴

Department of Chemistry, Faculty of Science, Hiroshima University, Hiroshima 730 (Japan), 13 September 1973.

Activité phosphatasique acide chez *Saprolegnia monoïca* Pringsheim

La régulation de l'activité phosphatasique par la concentration d'orthophosphate dans le milieu de culture a été décrite chez de nombreux organismes. La présence de grande quantité de phosphate réduit l'activité enzymatique des levures (WEINBERG et ORTON¹; SCHURR et YAGIL²; TOUIMI, BENJELLOUN et BONALY³) et provoque aussi la disparition de certaines isoenzymes chez *Aspergillus nidulans* (DORN et RIVERA⁴) et *Neurospora crassa* (HOCHBERG et SARGENT⁵).

Le fluorure de sodium est un inhibiteur, in vitro, des activités phosphatasiques acides. Ainsi chez *Dictyostelium discoideum* à la concentration de 0,03 M, il inhibe 92 à 95% de l'activité enzymatique (GEZELIUS⁶). Mais l'action de cet inhibiteur varie selon l'origine des enzymes: 53% d'inhibition pour celles du foie, 96% pour celles de la prostate et 8% pour celles des érythrocytes, mais aussi selon les pH, révélant ainsi l'existence d'isoenzymes plus ou moins sensibles (PEARSE⁷).

A la concentration de 2 g/l, cet inhibiteur provoque une forte diminution de la vitesse de croissance des hyphes de *Saprolegnia monoïca* sans toutefois affecter le phénomène de ramification (FEVRE⁸).

Nous avons voulu voir si le fluorure de sodium (NaF) perturbe l'activité phosphatasique acide quand il est additionné au milieu de culture, et avons comparé son effet à celui d'un inhibiteur connu de la synthèse des protéines⁹, la DL-parafluorophénylalanine (DLpFPA).

Matériel et méthodes. La souche de *Saprolegnia monoïca* Pringsheim N° 53967 Dick a été obtenue au Centraal Bureau voor Schimmelcultures de Baarn. La culture en milieu liquide est faite sur milieu synthétique de MACHLIS⁹. Après croissance à 25°C pendant 4 jours, les mycéliums sont récupérés par filtration, lavés à l'eau distillée stérile puis lyophilisés. Les protéines sont extraites dans du tampon Tris pH 7,4, en présence de sable de quartz et

les analyses sont faites avec les surnageants issus des centrifugations à 25000 g. L'activité enzymatique est déterminée par la mesure à 420 nm du paranitrophénol libéré (méthode de SCHURR et YAGIL²) à partir du substrat paranitrophényl phosphate (1 mg/ml) dissout dans du tampon acétate pH 4. A 1 ml de la solution de substrat est additionné 0,5 ml d'extrait protéique. Après incubation de 30 à 60 min à 30°C, la réaction est stoppée et la coloration révélée par addition de 2 ml de soude normale.

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide ont été menées selon la technique de DAVIS¹⁰. La révélation des bandes à activité phosphatasique est faite selon la méthode de BREWBAKER¹¹. Les gels sont mis à incuber dans la solution suivante: 100 ml de tampon acétate pH 5, 1 g de NaCl, 0,250 g polyvinyl pyrrolidone, 0,100 g de 6 benzoyl-2-naphtylphosphate, 0,1 g fast blue Base salt et 10 gouttes KCl 10%. Les enregistrements photodensitométriques sont faits à l'aide d'un appareil Vitatron.

Résultats. Les cultures réalisées en présence de fluorure de sodium possèdent une activité phosphatasique très faible, 8 à 13% des témoins, comparés au taux de protéines globales présentes dans le mycélium (64,2 des témoins). Il semble y avoir une inhibition sélective de ces enzymes (ou de leur activité) indépendante de l'action du NaF comme inhibiteur des synthèses protéiques (SAMESHIMA¹²) (Tableau I). Au contraire la DLpFPA inhibe d'une manière comparable l'activité enzymatique et la synthèse des protéines (Tableau I).

Connaissant l'action in vitro du NaF, il est possible d'envisager que l'inhibiteur réduise seulement l'activité des enzymes tout en épargnant leur synthèse. La mise en présence du NaF et des phosphatases acides serait particulièrement efficace au cours des processus d'extraction masquant ainsi au cours des tests la véritable activité enzymatique.

Tableau I. *Saprolegnia monoïca* Pringsheim. Activité phosphatasique suivant les conditions de culture

Milieu de culture	Activité phosphatasique acide (%)	Protéines/mg mycélium (%)
Témoin	100	100
+ NaF (2 g/l)	{ 8,4 13,6	64,2
+ DL para fluoro phénylalanine (0,1 g/l)	51,3	48
Phosphates (0,2 g/l)	239	40

¹ R. WEINBERG and W. L. ORTON, J. Bact. 86, 805 (1963).

² A. SCHURR et E. YAGIL, J. gen. Microbiol. 65, 291 (1971).

³ A. TOUIMI BENJELLOUN et R. BONALY, C. r. Acad. Sci., Paris (D) 276, 2089 (1973).

⁴ G. DORN et W. RIVERA, J. Bact. 92, 1618 (1966).

⁵ M. L. HOCHBERG et M. L. SARGENT, Analyt. Biochem. 57, 516 (1973).

⁶ K. GEZELIUS, Arch. Mikrobiol. 85, 51 (1972).

⁷ A. G. E. PEARSE, *Theoretical and Applied Histochemistry*, 3e edn. (J. A. Churchill, London 1968), p. 547.

⁸ M. FEVRE, Z. Pflanzenphysiol. 68, 1 (1972).

⁹ L. MACHLIS, Am. J. Bot. 40, 449 (1953).

¹⁰ B. J. DAVIS, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964).

¹¹ J. L. BREWBAKER, M. D. UPADHYA, Y. MAKINEN et MACDONALD, Physiologia Plant. 21, 930 (1968).

¹² M. SAMESHIMA, K. ITO et M. IWABUCHI, Biochim. biophys. Acta 281, 79 (1972).