

AcOH (120 cc.) was adjusted to pH 5~6 by addition of glacial AcOH. Into this solution, ethylene oxide (23 g.) was passed at room temperature and the mixture was kept overnight in an ice-box. Solvent and reagent were removed *in vacuo* and the syrupy residue was used as such for the next process without purification.

1,1-Bis(2-chloroethyl)-2,2-dimethylhydrazine Hydrochloride—Into suspension of 1,1-dimethyl-2,2-bis(2-hydroxyethyl)hydrazine (5 g.) in CHCl_3 (15 cc.), SOCl_2 (28 g.) dissolved in CHCl_3 (15 cc.) was added dropwise under ice-cooling. After addition of SOCl_2 was completed, temperature was gradually raised to 40~50° and the whole solution was kept at the same temperature with stirring for 2 hr. The solution separated in two layers, when cooled. The upper-layer was removed off and the lower one was distilled. The residue was poured on ice-water, extracted with Et_2O , and the H_2O -layer was distilled *in vacuo*. Hydrochloride was not obtained in crystalline state. Picrylsulfonate, pale yellow prisms. m.p. 188~189°, was prepared. *Anal.* Calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_9\text{N}_3\text{Cl}_2\text{S}$: C, 30.13; H, 3.58; N, 14.64. Found: C, 30.30; H, 3.22; N, 14.45.

The authors are indebted to Dr. H. Satoh and Dr. H. Imamura for their collaboration in biological experiments.

Summary

Derivatives of 1,1-bis(2-chloroethyl)hydrazine, especially of amino acid hydrazine type, were prepared for the purpose of testing their latent antitumor activity.

(Received August 14, 1961)

UDC 547.94[615.783.19].07:542.98:582.28

158. Michihiro Yamada, Kazuaki Iizuka, Shigenobu Okuda, Toshinobu Asai, und Kyosuke Tsuda: Untersuchungen auf dem Gebiet der Mikrobiologischen Umsetzung. XVII.¹⁾ Umwandlung von Alkaloiden in der Morphin-Reihe durch *Trametes sanguinea* (2).

(Institut für angewandte Mikrobiologie,*¹ Universität Tokio)

Die Beobachtung, daß eine Kultur von *Trametes sanguinea* einerseits Thebain (I) in 14 β -Stellung zu hydroxylieren und andererseits die Carbonylgruppe des 14 β -Hydroxycodeinons (IV) zu reduzieren vermag, veranlaßte uns, das Verhalten dieses Mikroorganismus gegenüber Codeinon (II) bzw. Neopinon (VII) zu studieren.

Die Versuche wurden wie bei der Umsetzung mit Thebain¹⁾ bei 30° unter aeroben Bedingungen in Schüttelkulturen durchgeführt. Die Umsetzungen wurden zunächst papierchromatographisch verfolgt und dann in präparativem Maßstab ausgeführt.

Codeinon (II)²⁾ lieferte bei der Umsetzung in Nährlösung Nr. 2*² zwei Stoffe, nämlich Codein (III)²⁾ und 14 β -Hydroxycodein (V),^{2,3)} mit einer Ausbeute von 24.5 bzw. 7.6%. Wenn diese Umsetzung in Nährlösung Nr. 1*² durchgeführt wurde, so ließ sich auch ein dritter Stoff, nämlich 14 β -Hydroxycodeinon (IV)^{2,4)} neben den obengenannten Stoffen

*¹ Yayoicho, Bunkioku, Tokio (山田道弘, 飯塚和明, 奥田重信, 朝井勇宜, 津田恭介).

*² Nährlösung Nr. 1: H_2O Lösung von 1% Glukose, 0.2% Pepton, 0.1% Rindfleisch-Extrakt, 0.1% Hefe-Extrakt, 0.3% Corn-steep-liq.; Nährlösung Nr. 2: Koji-Extrakt mit 0.3% Corn-steep-liq. Siehe auch Fußnote 1.

1) XVI Mitteil. Dieses Bulletin, 10, 67 (1962).

2) R. H. F. Manske, H. L. Holmes: The Alkaloids Vol. II, p. 91 (1952), Academic Press Inc., New York.

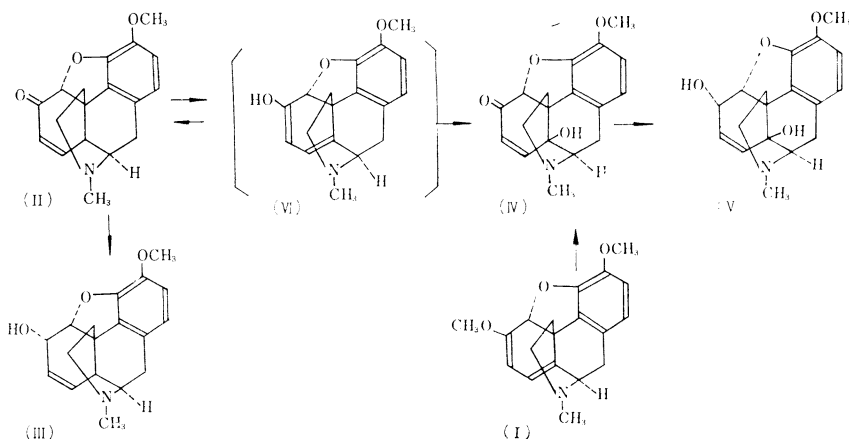
3) A. C. Currie, J. Gillon, G. T. Newbold, F. S. Spring: J. Chem. Soc., 1960, 773.

4) Fel' Dman, Lyutenberg: J. Applied Chem., (U.S.S.R.) 18, 715 (1945).

(III) und (V) gewinnen. Die Ausbeute von (III), (V) und (IV) betrug 8,4, 4,3 bzw. 6,6%. Auf Grund dieses Resultates läßt sich für die Bildung von (IV) bzw. (V) schließen, daß die Enolform des Codeinons (VI) als ein Intermediärprodukt auftritt, welches ähnlich wie beim Thebain¹⁾ schließlich (IV) und (V) ergibt. (Abb. 1.) Schließt man aber nur aus den in der vorliegenden Mitteilung gezeigten Tatsachen auf den Umwandlungsmechanismus, so ist folgender Ablauf wahrscheinlich: Codeinon läßt sich einerseits in der Carbonylgruppe an C₆ reduzieren,^{*3} wobei Codein entsteht, dessen weitere Umwandlung nicht stattfindet. Andererseits wird Codeinon in der Stellung an C₁₄ hydroxyliert und dann an der Carbonylgruppe reduziert,^{*3} wodurch (IV) und (V) entstehen. Aber man muß auf folgende Tatsache Rücksicht nehmen: Während sich Codein bei der Umsetzung von Codeinon mit einer Ausbeute von 8,4% gewinnen läßt, kann es bei der Umsetzung von Thebain in Nährlösung Nr. 2 nicht nachgewiesen werden.¹⁾ Es ist damit erwiesen, daß Thebain (I) durch Verseifung der Methoxygruppe an C₆ nicht die Enolform des Codeinons und weiter dessen Ketoform (II) ergibt, sondern direkt 14-Hydroxylierungsprodukt (IV), welches dann das 6-Hydrierungsprodukt (V) liefert; dagegen kann man ohne Schwierigkeit annehmen, daß sich Thebain in der Stellung an C₁₄ mit Hydroxylation angreifen und gleichzeitig in der Methoxygruppe an C₆ verseifen läßt, wodurch (IV) entsteht.

Wenn die Umwandlung von Codeinon in analoger Weise wie diejenige des Thebains verläuft, läßt sie sich mit dem in Abb. 1. gezeichneten Bild darstellen.

Aus Neopinon (VII)²⁾ ergaben sich bei der Umsetzung in Nährlösung Nr. 2 ebenfalls (III) und (V) mit einer Ausbeute von 3,8 bzw. 8,8%. Neopinon und Codeinon ergeben also unter analogen Umsetzungsbedingungen dieselben Produkte, obgleich beide in Bezug auf die Lage der Doppelbindung im A-Ring verschieden sind.



Schema 1.

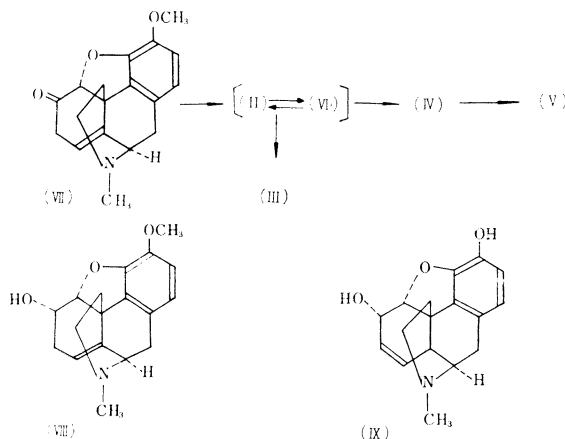
Es ist bemerkenswert, daß das aus Neopinon durch Reduktion des 6-Carbonyls abgeleitete Produkt, nämlich Neopin (VIII),^{*4,2)} bei dieser Umsetzung nicht gefaßt worden ist. Neopin selbst ließ sich durch eine Kultur von *T. sanguinea* nicht angreifen. Aus diesen Resultaten geht hervor, daß die Bildung des Neopins im Umwandlungsverlauf des Neopinons nicht stattfindet.

Wenn Neopinon in Nährlösung Nr. 1. umgesetzt wurde, ließ sich nur (IV) mit einer schlechten Ausbeute (2,8%) gewinnen; außerdem ließ sich (V) im Papierchromatogramm

*3 Die Reduktion von 6-Carbonyl mittels *T. sanguinea* geschieht leicht in Nährlösung Nr. 2.

*4 Es wird bei der NaBH₄-Reduktion von Neopinon erhalten. Siehe Fußnote 2.

nachweisen; aber (III), dessen Existenz sehr wahrscheinlich ist, konnte nicht nachgewiesen werden, da (III) und (IV) den gleichen Rf-Wert im Papierchromatogramm haben. Der Umwandlungsverlauf des Neopinons wird in Abb. 2. beschrieben.*⁵



Schema 2.

Codein ließ sich mit *T. sanguinea* in Nährlösung Nr. 1 bzw. 2 nicht umsetzen. Daher haben die Autoren die Umsetzung von Morphin (IX) untersucht. Wenn die Umsetzung papierchromatographisch verfolgt wurde, ließ sich das Substrat sehr schnell von dem Mikroorganismus angreifen, und die Autoren erhielten ein öliges Produkt; die weiteren Untersuchungen der Morphin-Umwandlung sind noch nicht abgeschlossen. Es läßt sich aber wohl sagen, daß der enzymatische Angriffspunkt bei dieser Umsetzung höchstwahrscheinlich an dem phenolischen Hydroxyl des Morphins liegt, da sich dieses Hydroxyl bei dem gegen *T. sanguinea* widerstandsfähigen Codein mit einem Methylrest schützen läßt.

Abschließend sei noch bemerkt, daß die reduktive Einwirkung von *T. sanguinea* auf ein α,β -ungesättigtes Keton, wie sich bei der Umsetzung von Codeinon bzw. 14β -Hydroxycodeinon¹⁾ erwies, nur in der Morphinreihe erfolgt, während die Umsetzung mit den typischen 4-En-3-on-steroiden, nämlich Testosteron und Progesteron, keinen Erfolg zeigt.

Experimentelles*⁶

Umsetzung von Codeinon (II) mit *T. sanguinea*—1) In Nährlösung Nr. 2.: Die Sporenaufschwemmung wurde in 100 ccm Nährlösung Nr. 2.¹⁾ eingepflegt und 48 Std. bei 30° gezüchtet. Dieser Zuchtflüssigkeit wurde 1 L der gleichen Nährlösung hinzugefügt, noch 20 Std. geschüttelt, mit 1000 mg Codeinon versetzt und 7 Tage bei 30° fermentiert. Diese Gärungsflüssigkeit wurde dann nach der früher erwähnten Methode¹⁾ behandelt, wobei 570 mg des rohen basischen Produkts erhalten wurden. Im Papierchromatogramm gab dieses Produkt zwei Flecke von Rf 0.67 und 0.32. Es wurde an 50 fachem Silikagel chromatographiert, wobei sich zuerst mit Benzol-Me₂CO (4 : 1) Kristalle vom Schmp. 153~155° eluieren ließen; Ausbeute 81 mg. Sie zeigten nach Umkristallisation aus MeOH einen Schmp. von 156~157° und waren mit 14β -Hydroxycodein¹⁾ (Rf 0.32) identisch. Mit Me₂CO ließ sich der zweite Stoff vom Schmp. 141~145° eluieren (250 mg.), welcher nach Umkristallisation aus Benzol einen Schmp. von 153~154° zeigte und mit Codein identisch war. Der Identitätsbeweis stützt sich auf die Bestimmung des Misch-Schmelzpunktes, spez. Drehung, Analysenresultate, Infrarot-Spektren und Papierchromatogramm (Rf 0.67).

*⁵ H. Conroy (J. Am. Chem. Soc., **77**, 5960 (1955)) berichtete, daß sich Neopinon in alkalischer Lösung mit Codeinon in der Gleichgewichtslage befindet.

*⁶ Die Schmelzpunkte sind auf dem Kofler-Block bestimmt und noch nicht korrigiert. Papierchromatographische Untersuchungen wurden nach der Büchi-Methode¹⁾ durchgeführt.

2) In Nährlösung Nr. 1.¹⁾: 800 mg Codeinon wurden auf gleiche Weise mit *T. sanguinea* umgesetzt, wobei sich 286 mg des basischen Produktes gewinnen ließen. Im Papierchromatogramm ergab es Flecke von Rf 0.65~0.7 und 0.35. Es wurde an 50 fachem Silikagel chromatographiert. Die mit Benzol-Me₂CO (4 : 1) eluierte Fraktion ergab 56 mg Kristalle vom Schmp. 258~261°, welche nach Umkristallisation aus EtOH einen Schmp. von 271~273° und einen Rf-Wert von 0.68 hatten. Nach Analysenergebnissen, Misch-Schmelzpunkte, spez. Drehung, Infrarot-Spektren und Rf-Wert erwiesen sich diese Kristalle als identisch mit 14β-Hydroxycodeinon.¹⁾ Nach weiterer Eluierung mit Benzol-Me₂CO (4 : 1) wurde der zweite Stoff erhalten. Er zeigte einen Schmp. von 156~157° und erwies sich als identisch mit 14β-Hydroxycodein (37 mg). Die mit Me₂CO eluierte Fraktion gab Kristalle vom Schmp. 153~154° (68 mg), welche mit codein identisch waren.

Umsetzung von Neopinon (VII) mit *T. sanguinea*—1) In Nährlösung Nr. 2 : 600 mg (VII) wurden in analoger Weise mit *T. Sanguinea* umgesetzt, wobei sich 188 mg des basischen Produktes gewinnen ließen. Dieses Produkt gab im Papierchromatogramm zwei Flecke bei Rf 0.67 und 0.32. Nach Chromatographieren an 50 fachem Silikagel wurden 56 mg von 14β-Hydroxycodein und 23 mg vom Codein gewonnen. 2) In Nährlösung Nr. 1. : 600 mg Neopinon wurden in Nährlösung Nr. 1. umgesetzt, und das hierbei erhaltene basische Produkt (42 mg) an 50 fachem Silikagel chromatographiert. Das rohe Produkt ergab im Papierchromatogramm drei Flecke bei Rf 0.81, 0.67 und 0.32, aber beim Chromatographieren an 50 fachem Silikagel erhielten die Autoren nur das 14β-Hydroxycodeinon (16 mg).

Die Elementaranalysen und die Infrarot-Spektalaufnahmen wurden in Speziellaboratorien dieses Institutes von den Fräulein H. Yamanouchi, K. Hayashi und N. Kurosawa ausgeführt.

Zusammenfassung

Codeinon und Neopinon wurden mittels *T. sanguinea* umgesetzt, wobei beide dieselben Umsetzungsprodukte, nämlich Codein, 14β-Hydroxycodein und 14 β-Hydroxycodeinon, ergaben.

(Eingegangen am 21 Aug., 1961)