

respectively and the fairly consistency of the amounts in spite of the difference of the molecular weight suggests that Na-CMC is attached laterally to the plane of the particles in the adsorption. These amounts are also consistent well with the concentration at which the minimum viscosity in Newtonian flow and lowest sedimentation volume were observed as described in the previous paper. Moreover, by the addition of sodium chloride to the Na-CMC solution, the amount of Na-CMC adsorbed increased to 2.55 mg./g. of barium sulfate. This is ascribed to the contraction of Na-CMC molecule, which is caused by the suppression of dissociation in the presence of sodium chloride.

(Received March 16, 1962)

UDC 547.94.07:542.98:582.28

37. Michihiro Yamada, Kazuaki Iizuka, Shigenobu Okuda, Toshinobu Asai und Kyosuke Tsuda : Untersuchungen auf dem Gebiet der mikrobiologischen Umsetzung. XVIII.¹⁾ Umwandlung von Alkaloiden in der Morphin-Reihe durch *Trametes sanguinea*. (3).

(Institut für angewandte Mikrobiologie der Universität Tokio*¹⁾)

Wie in den vorherigen Mitteilungen dieser Reihe^{1,2)} berichtet wurde, läßt sich die Carbonylgruppe an C₆ in Codeinon mit *Trametes sanguinea* zur Hydroxylgruppe reduzieren. Die Autoren versuchten diesmal die Reduktion der Carbonylgruppe an C₆ bei einem 14 β -substituierten Codeinon zu erreichen, wobei ihnen interessierte, ob sich diese Verbindungen mit *T.sanguinea* an der Carbonylgruppe reduzierend angreifen lassen, und ob diese enzymatische Reaktion stereospezifisch verläuft. Als Substanzen dienten 14 β -Acetoxycodeinon³⁾ und 14 β -Bromcodeinon.⁴⁾

Die Fermentationen wurden bei 30° unter aeroben Bedingungen in Schüttelkulturen durchgeführt; als Nährlösung wurde eine wäßrige Lösung von Glukose (1%), Pepton (0.2%), Rindfleischextrakt (0.1%), Hefeextrakt (0.1%) und Corn-steep-liquor (0.3%) verwendet.*²⁾ Die Umsetzung wurde vorläufig papierchromatographisch verfolgt und dann in präparativem Maßstab ausgeführt.

Die Umsetzung von 14 β -Acetoxycodeinon (I) verlief sehr befriedigend. Das Umsetzungsprodukt ließ sich mit einer Ausbeute von ca. 70 % gewinnen, und es bestand aus einer einzigen Substanz; im Papierchromatogramm konnte nur ein Fleck von Rf 0.30*³⁾ erhalten werden. Das gereinigte Produkt vom Schmp. 157~157.5° erwies sich nach Schmelzpunkt, Misch-Schmelzpunkt, Papierchromatogramm und Infrarot-Spektrum als identisch mit 14 β -Hydroxycodein (II).⁵⁾ Bei dieser Umsetzung findet also außer der Reduktion der Carbonylgruppe noch eine Reaktion, d. h. der Ersatz der Acetoxygruppe

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

*²⁾ Diese Lösung eignete sich zur Reduktion der Carbonylgruppe des Codeinons. Siehe auch Fußnote 1 und 2.

*³⁾ Nach der Methode von Büchi durchgeführt : Bull. on Narcot., 1960, April-June, 25.

1) K. Iizuka, M. Yamada, J. Suzuki, I. Seki, K. Aida, S. Okuda, T. Asai, K. Tsuda : Dieses Bulletin, 10, 67 (1962).

2) M. Yamada, K. Iizuka, S. Okuda, T. Asai, K. Tsuda : *Ibid.*, 10, 981 (1962).

3) R.E. Lutz, L. Small : J. Org. Chem., 4, 220 (1939).

4) H. Conroy : J. Am. Chem. Soc., 77, 5960 (1955).

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

an C₁₄ durch die Hydroxylgruppe, statt.

Das 14β-Acetycodein⁵⁾ (III) lieferte bei gleicher Umsetzungsreaktion auch II mit einer Ausbeute von ca. 70 %.

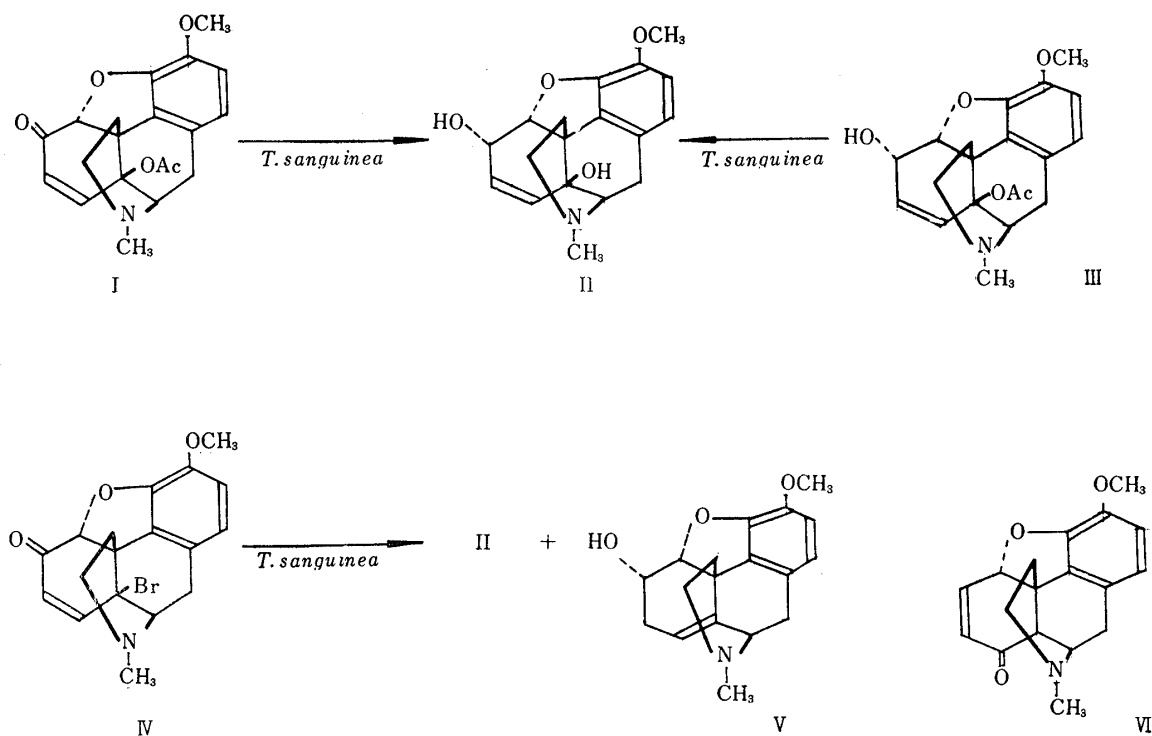
Als Kontrollversuch wurde die Kulturlösung von *T. sanguinea* 15 Min. bei 115° in einem Autoklav sterilisiert, mit I bzw. III versetzt, durch Hinzufügen von Ammoniaklösung schwach alkalisch gemacht (pH 8) und 5 Tage bei 30° geschüttelt; dabei blieb I bzw. III fast unverändert.

Bei dem obengenannten Gruppenaustausch an C₁₄ handelt es sich also nicht um eine Verseifungsreaktion in dem alkalischen Medium, sondern um eine mikrobiologische Umwandlungsreaktion.

Bei der Umsetzung von 14β-Bromcodeinon (IV) ließ sich auch II mit einer Ausbeute von 16 % gewinnen; daneben entstand eine kleine Menge von Neopin⁴⁾ (V) (Ausbeute 4 %). Wie von Stock⁶⁾ bereits bemerkt worden ist, wird das Brom des IV im alkalischen Medium durch eine Hydroxylgruppe nicht ersetzt. Die Autoren haben dieses IV sowie 14β-Bromcodein,⁴⁾ wie bei dem obengenannten Kontrollversuch von I und III, mit einer vorher sterilisierten Kulturlösung von *T. sanguinea* behandelt, wobei sich wirklich die unveränderten Stoff zurückgewinnen ließen.

Daraus läßt sich schließen, daß sich bei der Umsetzung von I bzw. von IV mittels *T. sanguinea* einerseits die stereospezifische Reduktion des 6-Carbonyls, d. h. die stereospezifische Bildung des Hydroxyls mit α-Konfiguration, und andererseits eine Substitutionsreaktion an der C₁₄-Stelle vollzieht.

Im Zusammenhang mit der Carbonylreduktion an C₆-Stelle war für die Autoren auch die mikrobiologische Umsetzung des Pseudocodeinons⁷⁾ (VI) von Interesse, da sich die Carbonylgruppe des letzteren in einer anderen Stellung, nämlich an C₈, befindet. Dieses



Schema 1.

6) R.H.F. Manske, H.L. Holms : The Alkaloids Voll. II. p. 188 (1952), Academic Press Inc. N. Y.
7) L. Knorr, H. Hörlein : Ber., 40, 2032 (1907); 41, 969 (1908).

VI blieb in der Kulturlösung von *T. sanguinea* gänzlich unverändert. Damit wurde bewiesen, daß diese Mikroorganismen stereospezifisch die Carbonylgruppe an C₆ angreifen.

Experimentelles*⁴

Umsetzung von 14 β -Acetoxycodeinon (I) mit *T. sanguinea*—Als Nährlösung wurde folgende Zusammensetzung verwendet: Glukose 1%, Pepton 0.2%, Rindfleischextrakt 0.1%, Hefeextrakt 0.1% und Corn-steep-liquor 0.3%. Ein Schüttelkolben von 500 ccm Inhalt wurde mit 100 ccm Nährlösung beschickt, mit einer Sporenaufschwemmung von *T. sanguinea* geimpft und 48 Std. auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 30° geschüttelt. Dieser Kulturlösung wurden 50 mg I³⁾ (Rf 0.93) zugegeben und 5 Tage geschüttelt. Hierauf wurde diese Gärungsflüssigkeit mit 5-proz. NH₄OH schwach alkalisch gemacht (pH 9), mit CHCl₃ versetzt und dann in einer Homogenisierungsapparatur behandelt. Durch Zentrifugieren wurde die CHCl₃-Schicht von der Gärungsflüssigkeit abgetrennt und mit verd. HCl geschüttelt. Diese wäßrige Lösung wurde mit 5-proz. NH₄OH schwach alkalisch gemacht und die abgeschiedene Base mit CHCl₃ extrahiert. Das aus den CHCl₃-Auszügen erhaltene Produkt (31 mg) wurde aus Benzol-Me₂CO umkristallisiert; Schmp. 157~157.5°. Diese Substanz erwies sich nach Schmp., Misch-Schmelzpunkt IR-Absorption und Papierchromatogramm (Rf 0.32) als identisch mit dem 14 β -Hydroxycodein (II)⁵⁾ 50 mg 14 β -Acetoxycodein (III)⁵⁾ (Rf 0.85) wurden auf gleiche Weise mit *T. sanguinea* umgesetzt, wobei sich 32 mg II gewinnen ließen.

Umsetzung von 14 β -Bromcodeinon (IV) mit *T. sanguinea*—750 mg IV⁴⁾ wurden zu einer Kultur von *T. sanguinea* hinzugefügt und 5 Tage bei 30° fermentiert. Nach der üblichen Aufarbeitung ließen sich 200 mg einer basischen Substanz gewinnen. Diese wurde an 2 g Silikagel chromatographiert. Zum Eluieren diente zuerst Benzol-Me₂CO (1:1), wobei 143 mg Kristalle als erste Fraktion erhalten wurden. Bei der Umkristallisation aus Benzol-Petroläther ergaben sich 100 mg Kristalle vom Schmp. 157~157.5°, die sich nach allen Daten als identisch mit II erwiesen. Beim weiteren Eluieren mit Me₂CO erhielten die Autoren die zweite kristalline Fraktion (26 mg). Da diese Substanz keinen scharfen Schmelzpunkt zeigte, wurde sie in das entsprechenden Hydrobromid Salz überführt und aus H₂O-EtOH umkristallisiert; Schmp. 288~289°. Diese Kristalle erwiesen sich nach Schmelzpunkt, Misch-Schmelzpunkt und IR-Absorption als identisch mit Neopin-HBr.⁴⁾

Dem Japanischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Unterrichtsministerium) danken die Autoren sehr für die Unterstützung dieser Arbeit. Die Elementaranalysen und IR-Spektralaufnahmen wurden in diesem Laboratorium ausgeführt. Dafür möchten die Autoren Fräulein H. Yamanouchi, K. Hayashi und N. Kurosawa herzlich danken.

Zusammenfassung

14 β -Acetoxycodeinon und 14 β -Bromcodeinon wurden mit *T. sanguinea* umgesetzt, wobei sich 14 β -Hydroxycodein als gemeinsames Produkt gewinnen ließ.

(Eingegangen am 23. März, 1962)

*⁴ Die Schmelzpunkte sind auf dem Kofler-Block bestimmt und noch nicht korrigiert. Papierchromatographische Untersuchungen wurden nach der Büchi-Methode*³ durchgeführt.