

62. Michihiro Yamada^{*1} : Untersuchungen auf dem Gebiet der mikrobiologischen Umsetzung. XIX.¹⁾ Umwandlung von Alkaloiden in der Morphin-Reihe durch *Trametes sanguinea*. (4).

(Institut für angewandte Mikrobiologie der Universität Tokio^{*1})

Als Fortsetzung der vorhergegangenen Mitteilungen in dieser Reihe^{1,2)} soll diesmal über Versuche berichtet werden, bei denen die reduktive Einwirkung von *Trametes sanguinea* auf Ringketone mit gesättigtem Ring, nämlich auf das C₆-Carbonyl des Dihydrocodeinons bzw. des entsprechenden Antipoden, nämlich des (+)-Dihydrocodeinons, untersucht wurden.

Zur Fermentation wurde die für die reduktive Einwirkung auf das 6-Carbonyl geeignete Nährlösung, nämlich Nährlösung Nr. 1,^{*2} verwendet; die Umsetzungen wurden unter aeroben Bedingungen in Schüttelkulturen bei 30° durchgeführt.

Bei der Umsetzung des Dihydrocodeinons (I) verlief die Reaktion etwas langsamer als beim Thebain bzw. Codeinon : Erst nach 72 Std. zeigten sich zwei neue Flecke, bei Rf 0.42 und 0.53, neben dem Fleck vom Ausgangsmaterial (Rf 0.69) im Papierchromatogramm; auch nach 10 tägiger Fermentationsdauer ließen sich nur diese drei Flecke feststellen, von denen der Fleck bei Rf 0.69 sehr schwach war. Diese Umsetzung wurde nach 10 tägiger Dauer abgeschlossen, und die Reaktionsprodukte chromatographisch an Silikagel getrennt, wobei sich zwei Stoffe, nämlich Kristalle vom Schmp. 112~114° (Rf 0.42) und vom Schmp. 198~200° (Rf 0.53) gewinnen ließen. Der erste Stoff erwies sich nach Schmp., Misch-Schmp., IR-Spektrum und Papierchromatogramm als identisch mit Dihydrocodein (II); der zweite Stoff war mit dem nach der Methode von Baizer³⁾ aus Dihydrocodein hergestelltem Dihydro-*iso*-codein (III) identisch.

Bei dieser Umsetzung wurden II und III mit einer Ausbeute von 28.6% bzw. 36.4% erhalten. Wie von Elad *et al.*⁴⁾ berichtet wurden, ließen sich bei der NaBH₄-Reduktion des Dihydrocodeinons diese beiden, nämlich II und III, mit einer Ausbeute von 64% bzw. 34% gewinnen. Das Mengenverhältnis von II und III im Reaktionsgemisch bei der Umsetzung mit *T. sanguinea* ist also umgekehrt wie bei NaBH₄-Reduktion.

Bei den Derivaten des Morphinalkaloids, die die O-Brücke im Molekül nicht haben, wie Dihydrothebainon-methyläther (IVa) bzw. 4-Desoxydihydrothebainon (VI), verlief die Reduktion des 6-Carbonyls mit *T. sanguinea* nicht glatt. Nachdem IVa 10 Tage mit einer Kultur von *T. sanguinea* umgesetzt wurde, ließ sich nur ein schwacher Fleck bei Rf 0.4 neben dem Fleck des Ausgangsmaterials (Rf 0.67) im Papierchromatogramm feststellen. Dieser Rf-Wert war demjenigen des α - bzw. β -Dihydrothebainol-4-methyläthers (Va, b)^{*3} gleich. Bei der chromatographischen Trennung des Reaktionsgemisches

*1 Yayoicho, Bunkyo, Tokio (山田道弘).

*2 Pepton 0.2%, Glukose 1%, Rindfleischextrakt 0.1%, Hefeextrakt 0.1%, Corn-steep-liquor 0.3%. Siehe auch Fußnote 1 und 2.

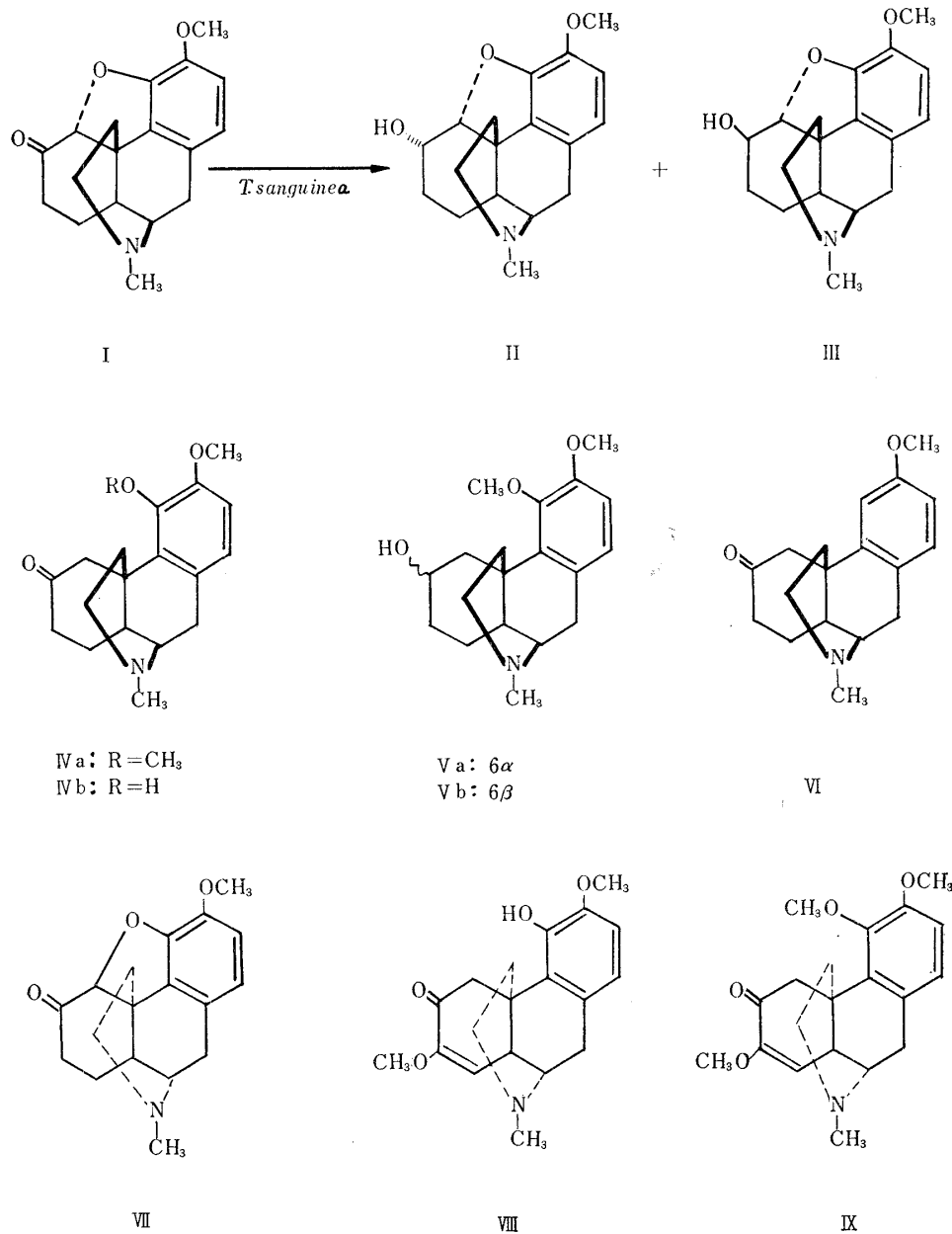
*3 Diese epimeren 6-Ole wurden von E. Speyer *et al.* (Ber. 54, 1519 (1921)) zuerst hergestellt, deren Konfigurationen aber noch nicht aufgeklärt wurden. Ich habe durch Einwirkung von NaBH₄ auf Dihydrothebainon-methyläther (IVa) das ölige 6-Ol (Pikrat : Schmp. 174~176) hergestellt und dieses durch Einwirkung von Aluminiumisopropylat in das epimere 6-Ol vom Schmp. 188~889° überführt. Der letztere entstand auch bei der Aluminiumisopropylat-Reduktion von IVa. Damit wurde bewiesen, daß einerseits das ölige 6-Ol die 6 α -Konfiguration (axial) (Va) und andererseits das kristalline 6-Ol die 6 β -Konfiguration (equatorial) (Vb) hat. Die beiden Epimere ergaben den gleichen Rf-Wert im Papierchromatogramm.

1) XVIII Mitteil. : Dieses Bull. 11, 206 (1963).

2) Dieses Bull., 10, 67 (1962).

3) M.M. Baizer, A. Loter, K.S. Ellner, D.R. Satriana : J. Org. Chem., 16, 543 (1951).

4) D. Elad, D. Ginsberg : J. Am. Chem. Soc., 78, 3691 (1956).



Schema 1.

an Silikagel ließ sich aber nur das Ausgangsmaterial zurückgewinnen (Ausbeute 35.2%); es ist also die Frage, ob sich das 6-OI mit dieser Umsetzung darstellen läßt. 4-Desoxydihydrothebainon (VI) lieferte bei der gleichen Umsetzung kein Umwandlungsprodukt.

Daraus wurde geschlossen, daß die reduktive Umwandlung des 6-Carbonyls nur bei Morphinalkaloiden, die O-Brücke im Molekül haben, stattfindet.

Bei der Umsetzung des Dihydrothebainons (IVb), das im Molekül eine Phenolgruppierung hat, verlief die Umwandlungsreaktion sehr schnell wie beim Morphin²⁾. Nach kurzer Fermentation verschwand der Fleck des Ausgangsmaterials (Rf 0.48), und es bildete sich ein neuer Fleck, nämlich ein langer Streifen, in der Nähe des Startpunkts.

Das isolierte Reaktionsprodukt stellte eine ölige Masse dar, die sich durch Chromatographie nicht reinigen ließ. Es ist sehr wahrscheinlich, daß in diesem Fall, wie beim Morphin, auch die Phenolgruppierung im Molekül durch *T. sanguinea* enzymatisch angegriffen wurde.*4

Es scheint mir von Interesse zu sein, daß bei den Antipoden der Morphinalkaloide, wie (+)-Dihydrocodein (VII),⁵⁾ Sinomenin (VIII) und Sinomeninmethylether (XI),⁶⁾ die Umsetzung mit *T. sanguinea* ganz anders verlief. Es ließ sich dabei der enzymatische Angriff auf diese Antipoden gar nicht oder nur sehr schwach feststellen.

Experimentelles*5

Umsetzung von Dihydrocodein (I) mit *T. sanguinea*—I ließ sich nach der Methode von Rapoport⁷⁾ durch die Oppenauer-Oxydation des Dihydrocodein⁸⁾ herstellen; Schmp. 194~195°, Rf-Wert 0.69. 1 g I wurde 10 Tage bei 30° mit einer Kulturlösung*2 von *T. sanguinea* umgesetzt. Nach der üblichen Aufarbeitung⁹⁾ ließen sich 807 mg Kristalle vom Schmp. 151~175° als basisches Reaktionsprodukt gewinnen. Dieses Produkt zeigte drei Flecke bei Rf 0.09, 0.53 und 0.42 bei papierchromatographischer Untersuchung. Bei der chromatographischen Trennung an 40 g Silikagel ergaben sich die drei folgenden Fraktionen: Die erste kristalline Fraktion (94 mg) wurde beim Eluieren mit Benzol-Me₂CO (1:1) gewonnen; Umkristallisation aus AcOEt ergab Kristalle vom Schmp. 194~195° (Rf 0.69), und sie waren identisch mit I (Ausbeute 9.4%). Beim weiteren Eluieren mit demselben Lösungsmittel erhielt ich die zweite kristalline Fraktion (288 mg); nach Umkristallisation aus Me₂CO zeigten diese Kristalle den Schmp. 112~114° sowie den Rf-Wert 0.42. Sie erwiesen sich nach Schmp., Misch-Schmp., IR und Papierchromatogramm als identisch mit Dihydrocodein (II) (Ausbeute 28.8%). Durch Eluieren mittels Me₂CO ließ sich die dritte Fraktion gewinnen; Kristalle vom Schmp. 190~196° (366 mg). Umkristallisation aus EtOH ergab prismatische Kristalle vom Schmp. 200° (Ausbeute 36.6%). Sie waren nach Schmp., Misch-Schmp., IR und Papierchromatogramm mit Dihydro-*iso*-codein⁹⁾ identisch.

α -, β -Dihydrothebainol-4-methylether—Dihydrothebainon-methylether (IVa): Dihydrothebainon (IVb) wurde durch katalytische Hydrierung mittels Pd-BaSO₄ aus Thebain gewonnen,⁹⁾ Schmp. 135~142°. Zur Lösung von 0.16 g Na in 10 cc BuOH wurde eine Lösung von 1.2 g Trimethylphenylammoniumchlorid¹⁰⁾ in 10 cc BuOH unter Eiskühlung zugegeben, und von abgeschiedenen NaCl abfiltriert. Das Nitrat wurde mit 1.5 g IVb versetzt, 1.5 Std. unter Rückfluß erhitzt und dann das BuOH abdestilliert. Nach Entfernung des restlichen BuOH im Vakuum wurde der Rückstand mit 20 cc H₂O versetzt, mit AcOH schwach angesäuert (pH 5.0) und dreimal mit Et₂O geschüttelt. Die wäßrige Lösung wurde mit NH₄OH alkalisch gemacht, und die Base mit CHCl₃ extrahiert, wobei sich nach Entfernung von CHCl₃ 1.58 g eines öligen Produktes gewinnen ließen. Dieses Produkt wurde an 75 g Al₂O₃ chromatographiert, wobei durch Eluieren mit Benzol-AcOEt (7:3) Kristalle vom Schmp. 115~117° erhalten wurden. 0.95 g (Ausbeute 60.5%). C₁₉H₂₅O₃N (IVa)—Ber.: C, 72.35; H, 7.99; N, 4.44. Gef.: C, 71.93; H, 7.81; N, 4.73. Rf 0.67.

Al(iso-OPr)₃-Reduktion von IVa—2.6 g IVa wurden 24 Std. mit 3.73 g Al(iso-OPr)₃ und 75 cc Toluol unter Rückfluß erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 10% HCl mehrmals geschüttelt und diese HCl-Auszüge mit K₂CO₃ alkalisch gemacht. Die Base ließ sich mit CHCl₃ extrahieren und aus AcOEt umkristallisieren; Schmp. 188~189°, 1.7 g (Ausbeute 65%). C₁₉H₂₇O₃N (β -Dihydrothebainol-4-methylether (Vb))—Ber.: C, 71.89; H, 8.57; N, 4.41. Gef.: C, 72.06; H, 8.69; N, 4.45.

NaBH₄-Reduktion von IVa—3.15 g IVa wurden in 150 cc MeOH gelöst, mit einer Lösung von 7.5 g NaBH₄ in 180 cc MeOH versetzt und dann 2 Std. stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung ergab Kristalle vom Schmp. 110~150°, 3.03 g. Sie wurden an 150 g Silikagel chromatographiert, wobei sich durch Eluieren mit Benzol-Me₂CO (1:1) eine ölige Substanz gewinnen ließ. 1.57 g (50.2%). Diese Substanz

*4 Ueber die Wirkung der Phenoloxydase von *T. sanguinea*: Siehe K. Law, Ann. Botany, **19**, 561 (1955).

*5 Die Schmp. sind auf dem Kofler-Block bestimmt und noch nicht korrigiert; die papierchromatographischen Untersuchungen wurden nach der Methode von Büchi²⁾ ausgeführt.

5) K. Goto, S. Mitsui: Bull. Chem. Soc. Japan, **5**, 284 (1930); K. Goto, I. Yamamoto: Proc. Japan Acad., **34**, 60 (1958).

6) K. Goto, T. Nambo, R. Inaba: Bull. Chem. Soc. Japan, **5**, 223 (1930).

7) H. Rapoport, R. Naumann, E. R. Bissel, R. M. Bonner: J. Org. Chem., **15**, 1103 (1950).

8) K. Law: Ann. of Botany, **19**, 561 (1955).

9) L. Small, G. L. Browning: J. Org. Chem., **3**, 618 (1939).

10) W. Radionov: Bull. Soc. Chim., **39**, 305 (1926).

lieferte ein kristallines Pikrat: Nadeln aus MeOH, Schmp. 174~176°. $C_{25}H_{30}O_{10}N_4$ (Va-Pikrat)—Ber.: C, 54.94; H, 5.53; N, 10.25. Gef.: C, 54.94; H, 5.43; N, 10.35. Bei weiterem Eluieren mit Me_2CO wurden Kristalle vom Schmp. 186~189° erhalten. 1.21 g (Ausbeute 38.1%). Umkristallisation aus AcOEt ergab Kristalle vom Schmp. 188~189°. Sie waren identisch mit Vb.

Epimerisierung von Va—150 mg Va wurden 24 Std. mit 300 mg $Al(iso-OPr)_3$ und Toluol unter Rückfluß erhitzt. Die übliche Aufarbeitung ergab Kristalle vom Schmp. 187~189°, die identisch mit Vb waren. 114 mg (Ausbeute 76%).

Dem Japanischen Nationalfond zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Unterrichtsministerium) danke ich sehr für die Unterstützung dieser Arbeit. Ich danke auch Herrn Doktor K. Takeda (Shionogi Forschungslaboratorium) für die freundliche Ueberlassung des Sinomeninalkalooids. Ferner möchte ich für die Ausführung der Mikroanalysen Fr. H. Yamanouchi und K. Hayashi und für die Aufnahme der IR-Spektren Fr. N. Kurosawa herzlich danken.

Zusammenfassung

Es wird die Reduktionsreaktion des C_6 -Carbonyls von Morphinalkaloid mittels *T. sanguinea* beschrieben. Die Umsetzung des Dihydrocodeinons ergibt die entsprechenden epimeren 6-Ole. Bei der Umsetzung des Dihydrothebainon-methyläthers bzw. des 4-Desoxydihydrothebainons verläuft aber diese Reduktion nicht glatt. Sinomenin und seine Derivate lassen sich auch durch diese Mikroorganismen nicht angreifen.

(Eingegangen am 21. April, 1962)

UDC 581.134:547.972

63. Masayasu Kurono, Koji Nakanishi, Keiko Shindo*¹, and Masaru Tada : Biosyntheses of Monascorubrin and Monascoflavin.

(Department of Chemistry, Tokyo Kyoiku University*²)

Birch *et al.* showed in 1958¹⁾ that the mould pigment screlotiorin (structure revised in 1959²⁾) is built up from acetic acid and formic acid units according to the acetate theory.³⁾ Monascorubrin^{4,5)} and monascoflavin^{6,7)} are pigments closely related to screlotiorin (azaphilone pigments), and the present studies were undertaken to assist structural studies and to clarify the biosynthetic relation between the two pigments.

*¹ Present address: Patent Office, Sannencho, Chiyoda-ku, Tokyo (神藤恵子).

*² Otsukakubomachi, Bunkyo-ku, Tokyo (黒野昌庸, 中西香爾, 多田 愈).

1) A. J. Birch, P. Fitton, E. Pride, A. J. Ryan, H. Smith, W. B. Whalley: J. Chem. Soc., 1958, 4576.

2) F. M. Dean, J. Stauton, W. B. Whalley: *Ibid.*, 1959, 3004.

3) A. J. Birch, H. Smith: "Chem. Soc. Spec. Publ.," No. 12, P. 1 (1958).

4) M. Ohashi, A. Terahara, K. Nakanishi: Bull. Chem. Soc. Japan, 33, 1311 (1960). S. Kumasaki, K. Nakanishi, H. Nishikawa, M. Ohashi: Tetrahedron, 18, 1171 (1962).

5) B. C. Fielding, F. S. Hans, J. S. E. Holker, A. D. G. Powell, A. Robertson, D. N. Stanwey, W. B. Whalley: Tetrahedron Letter, No. 5, 24 (1960).

6) M. Ohashi, S. Yamamura, A. Terahara, K. Nakanishi: Bull. Chem. Soc. Japan, 33, 1630 (1960). Y. Inoue, K. Nakanishi, H. Nishikawa, M. Ohashi, A. Terahara, S. Yamamura: Tetrahedron, 18, 1195 (1962).

7) B. C. Fielding, J. S. E. Holker, D. F. Jones, A. D. G. Powell, K. W. Richmond, A. Robertson, W. B. Whalley: J. Chem. Soc., 1961, 4579.