

further confirmation, a solution of the product 2c (70 mg) in 10% HCl (20 ml) was refluxed for 6 hr and the residue obtained on removal of the solvent *in vacuo* was chromatographed (CHCl₃: MeOH, 4:1) to give colorless crystals of mp 279° from H₂O, 20 mg or 63%. This hydrolyzed product was identical with the authentic sample of 2b by mixed mp (279—280°).

Preliminary Experiments with Other Nucleo-bases—A solution of base in HCO₂H (4 ml, 2 mM) was irradiated as above, and the disappearance of the substrate was followed by UV measurement. The absorption of adenine, thymine and cytosine disappeared within 30 min. Guanine was stable under these conditions.

[Chem. Pharm. Bull.]
19(4) 839—842 (1971)]

UDC 547.724.02.05.09 : 615.33.076.9

Recherches Toxicologiques sur les Mycotoxines qui Polluent le Fourrage Artificiel du Porc

HIROKO KOBAYASHI,^{1a,c)} HIROSHI TSUNODA^{1b)}
et TAKASHI TATSUNO^{1a)}

*The Institute of Physical and Chemical Research^{1a)} and the Food Research Institute,
the Ministry of Agriculture and Forestry^{1b)}*

(Reçu le 30, September, 1970)

Pour élever le porc, on emploie généralement un fourrage mixte commercial. K. Ohkubo, *et al.*,²⁾ ont découvert que l'on trouve souvent une cirrhose du foie chez les porcs qui sont élevés avec ce fourrage artificiel; ils se sont demandés s'il y aurait pollution des mycotoxines au fourrage.

Un de nos collaborateurs, H. Tsunoda, a procédé aux examens toxicologiques et microbiologiques de ces fourrages.

En considérant les résultats, on a pensé que trois espèces de microbes, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, et *Penicillium olivino-viride* pouvaient bien être responsables de cette toxicité. On sait bien que les deux premières sont des espèces qui produisent des substances cancérogènes, l'aflatoxine³⁾ et la sterigmatocystine,⁴⁾ mais en ce qui concerne les substances métaboliques de *P. olivino-viride*, il n'y avait pas encore de publication.

Nous avons donc commencé à examiner toxicologiquement les substances métaboliques de cette souche microbienne. Nous avons pu trouver que la souche produit une grande quantité d'acide penicillique dans le bouillon de culture de Czapek.

Il y a déjà beaucoup de bibliographies concernant la production et l'élucidation de la structure chimique de l'acide penicillique à partir des microbes, par exemple *Penicillium puberulum* Bain,⁵⁾ *P. cyclopium* Westl,⁶⁾ et *Aspergillus ochraceus* Wilhelm,⁷⁾ *etc.*

Mais, nous n'avons pas trouvé de description concernant la production de l'acide penicillique par *P. olivino-viride*, ainsi que son étude physico-chimique.

1) Location: a) 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama; b) 1-4-12, Shiohama, Koto-ku, Tokyo; c) Adresse actuelle: Nihon Université, 1-8, Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo.

2) K. Iwase, H. Iwasaki, K. Kaneko, Y. Ando, T. Goto, S. Miyakura, T. Inoue, K. Sakihara, et K. Ohkubo, *Pro. de 69^{ème} Congres Anniv. de la Soc. Veter. du Japon*, 1969, p. 107.

3) Communication privée.

4) Communication privée.

5) Communication privée.

6) Communication privée.

7) Communication privée.

Aussi, nous allons décrire, l'isolation de l'acide penicillique à partir de la solution de culture de Czapek de *P. olivino-viride*, et la structure chimique en considérant résultats de résonance magnétique nucléaire (RMN).

Processus Experimental

i) **Espèce et Souche Microbienne**—Nous employons la souche de *P. olivino-viride* que nous avons isolé à partir de fourrage artificiel.

ii) **Condition de Culture**—Nous inoculons la souche de *P. olivino-viride* à une solution de Czapek (contenant 5% de sucre de canne) et la cultivons pendant 14 ou 20 jours à 25° sans agitation et sans ventilation. Nous employons le milieu de culture comme matière première pour l'isolement des substances toxiques.

iii) **Isolement de la Substance Toxique, l'acide Penicillique**—En essayant la cytotoxicité de chaque fraction obtenue selon méthode de Panel,⁸⁾ nous pouvons isoler la toxine principale sous forme cristalline. Nous présentons la procédé d'isolement sur la Fig. 1.

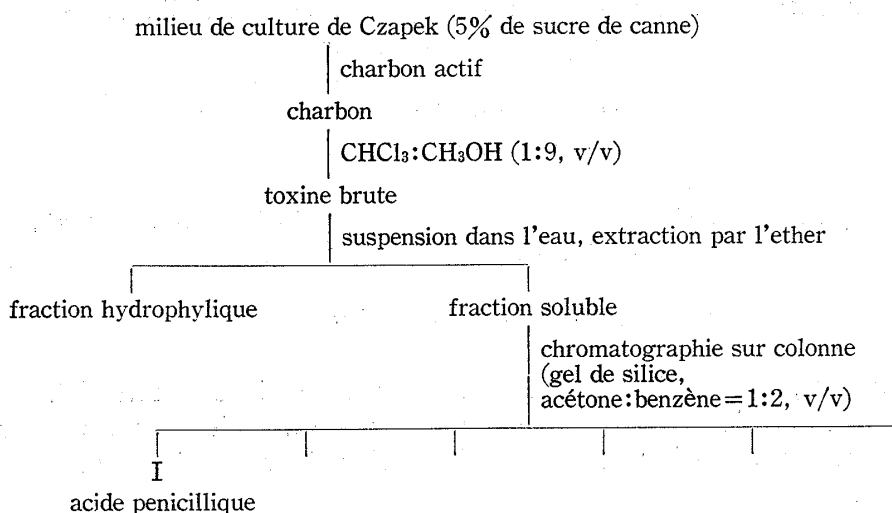


Fig. 1. Procédé de l'isolement de l'acide Penicillique

On ajoute du charbon actif (20 g/l) dans la solution de culture pour adsorber les toxines, que l'on sépare ensuite du carbone en ajoutant un mélange méthanol-chloroforme (9:1, v/v). On remet en suspension dans l'eau la fraction séparée, et on en extrait la toxine brute avec de l'éther.

On obtient 135 mg/ml de toxine brute à partir du milieu de culture à 25° pendant 14 jours, et 268 mg/ml dans le cas où la solution est cultivée à 25° pendant 20 jours.

iv) a) On fractionne les dérivés métaboliques en employant la chromatographie sur colonne avec gel de silice, utilisant comme solvant un mélange benzène-acétone (2:1, v/v), et on vérifie la pureté de chaque fraction par la chromatographie en couche mince (gel de silice-mélange de platre: solvant: mélange benzène-acétone-*n*-hexane (1:2:1, v/v)).

b) A partir de la fraction principale (I) par dérivaison chimique on obtient le dihydro-dérivé (II) et le méthoxyle-dérivé (III) comme on le voit sur la Fig. 2.

On réduit (I) en présence de Pd noir et d'hydrogène dans la solution éthanolique, et obtient

le composé (II), f. 83—85° sous forme de cristaux en aiguilles, incolores. On fait réagir CH_2N_2 à (I) dans la solution étherée, et on obtient (III). Nous avons examiné ses propriétés physico-chimiques sans le raffiner.

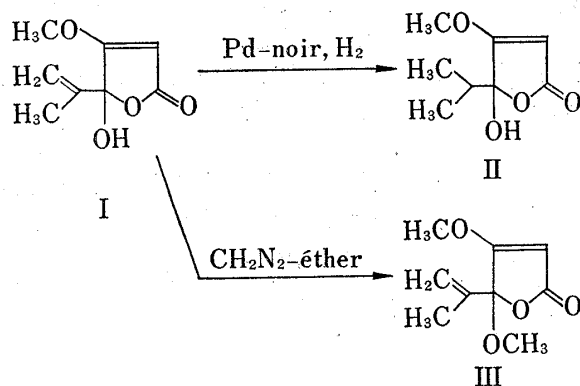


Fig. 2. Procédé chimique de la Dérivation

8) Communication privée.

Résultats Expérimentaux

i) a) La toxine (I) est obtenue sous forme de cristaux en aiguilles incolores, f. 83°, poids moléculaire : 170 [M⁺] ou 177 (calculé à partir de la mesure de la pression osmotique des vapeurs), analyse élémentaire: Calc. C, 56,46; H, 5,92, obs, C, 56,75; H, 6,25. UV: $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ m μ : 224 (ϵ 10.455). IR: ν_{KBr} cm⁻¹: 3270 (OH), 1740, 1730 (CO), 1640 (C=C).

b) Le composé réduite (II) est obtenu aussi sous forme de cristal incolore en aiguille, poids moléculaire: 172 [M⁺]. UV: $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ m μ : 223 (ϵ 10.836), 205 (épole). IR: ν_{KBr} cm⁻¹: 3270 (OH), 1740 (CO), 1640 (C=C).

ii) En considérant les résultats des analyses chimiques et physico-chimiques, nous pensons que la toxine (I) est une γ -lactone α,β -insaturé qui possède un hydroxyle, un méthoxyle et un isopropényle.

Comme on voit sur la Table I, le spectre RMN de la dihydro-toxine (II), présente des pics caractéristiques des groupes CH₃ (à 8.98 et 9.10 τ , chaque s, 3H) et méthylène (à 7.55—8.02 τ , m, 1H).

TABLE I. Spetre de RMN de I, II, III

I		II		III	
CDCl ₃ , 60 MHz, τ	DMSO-d ₆ , 60 MHz, τ	CDCl ₃ , 60 MHz, τ	CDCl ₃ , 60 MHz, τ	CDCl ₃ , 60 MHz, τ	
8.25 (3H, -CH ₃)	8.35 (3H, -CH ₃)	9.10 (3H, d, -CH ₃) $J=12$	8.40 (3H, s, -CH ₃)		
6.08 (3H, s, -OCH ₃)	6.65 (1H, s, -OH)	8.98 (3H, d, -CH ₃) $J=12$	6.42 (3H, s, -OCH ₃)		
4.85 } (3H) ^{a)}	6.15 (3H, s, -OCH ₃)	7.55—8.02 (1H, m)	6.17 (3H, s, -OCH ₃)		
4.80 }	4.90 } (2H, H _A >=H _B)	6.08 (3H, -OCH ₃)	5.47 (1H, dd, $J=2.25, 7.5$)		} = C < $\begin{matrix} \text{H} \\ \text{H} \end{matrix}$
4.52 (1H)	4.68 ca. }	4.98 (1H, H _A >=H _B)	5.32 (1H, dd, $J=2.25, 7.5$)		
	4.62 (1H, H _A >=H _B)	4.83 (1H, -OH)	4.83 (1H, s, H _A >=H _B)		

s: singlet, d: doublet, m: multiplet, J: Constante couplée est exprimée en Hz.

a) Un des trois protons disparaît par deutération.

En conséquence, on peut affirmer la présence d'isopropyle, ce qui explique la présence d'un groupe d'isopropényle dans le composé (I).

De plus en vérifiant le spectre RMN du composé (III), on ne trouve pas de pic de proton d'hydroxyle, mais on trouve à nouveau un pic de méthoxyle à 6.42 τ , et puis les pics de méthylène de vinyle (4.52 et 4.85 τ) de (I) sont déplacé à 5.32 et 5.47 τ et il se trouve que le dessin de ces pics est déformé.

En considérant ces résultats, on conclut que le groupe hydroxyle de (I) doit se situer près du groupe d'isopropényle, et qu'ils subissent leur mutuelle influence.

En supposant que la structure chimique de (I) ait la form représentée sur la Fig. 2, c'est-à-dire, que (I) soit l'acide penicillique, nous l'avons examiné en le comparant avec le témoin: la chromatographie en couche mince, les spectres IR et RMN, et le point de fusion mixte étaient identiques.

Conclusion et Discussion

Nous avons pu mettre en évidence la production d'une grande quantité d'acide penicillique quand on cultive *P. olivino-viride* dans une solution de Czapek. Nous savons que la DL₅₀ de l'acide penicillique est 2 mg/kg⁹⁾ (souris, souche DDD mâle, par voie sous-cutané)

9) Communication privée.

et que l'acide penicillique provoque des lésions histopathologiques diffuses du foie, du rein et de la thyroïde, etc.¹⁰⁾

On aussi sait que c'est une substance cytotoxique à la concentration de 3.2 µg/mg quand on ajoute l'acide penicillique dans une culture de cellule HeLa.

A cette occasion, on a pu observer des anomalies du noyau de ces cellules.

Nous n'avons pas encore observé de résultats qui nous permettent de relier l'acide penicillique à la cirrhose du foie quand on l'administre isolément aux animaux, mais nous pensons que l'acide penicillique joue un rôle principal dans l'intoxication par *P. olivino-viride*, parce que la quantité d'acide penicillique produit par ce microbe est énorme.

Des essais biologiques menés par notre équipe indiquent qu'il y a une autre substance cytotoxique, un peu plus puissante que l'acide penicillique et, nous nous occupons maintenant de l'isolement de cette toxine à partir de métabolites du *P. olivino-viride*.

10) Communication privée.

[Chem. Pharm. Bull.]
19(4) 842-844 (1971)

UDC 547.597.04 : 542.98

Microbial Transformation of Sesquiterpenoids. III.¹⁾ 6β- and 7α-Hydroxylation of Guaioxide

HIROSHI ISHII, TAKEHIKO TOZYO, and MIHARU NAKAMURA

*Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.*²⁾

(Received October 22, 1970)

As reported already³⁾ microbial oxidation of guaioxide (I) with *Mucor parasiticus* yielded 4α-hydroxy-, 8α-hydroxy-, and 4α,8α-dihydroxy-guaioxide, all of which were useful for the structure determination of guaioxide itself. On further examination of this reaction we have isolated 6β-hydroxy- and 7α-hydroxy-guaioxide (II and III).

Compound (II), C₁₅H₂₆O₂, mp 160—161°, showed an infrared (IR) hydroxy-band at 3630 cm⁻¹, and on oxidation with Jones reagent gave a ketone (IV), ν_{max} 1747 (five-membered ring ketone) cm⁻¹; thus the hydroxyl group in II is secondary and located at C-2, C-3, or C-6. When passed through a column of alumina the ketone (IV) remained unchanged. Since 2-oxo-⁴⁾ and 3-oxo-guaioxide³⁾ are known to rearrange on alumina, the structure 6-oxoguaioxide (IV) was assigned to this ketone. Lithium aluminum hydride reduction of IV furnished predominantly an epimeric alcohol (V), mp 161—165°. The configuration of the C-6 hydroxyl groups in II and V were assigned by inspection of the nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum and examination of molecular models of these compounds. The signal for the C-6 proton in II appeared as a singlet at τ 5.94, showing that the dihedral angle between C(6)-H and C(7)-H is about 90°. This indicates that the C(6)-H in II is α-oriented, i.e. the hydroxyl group at C-6 has β-configuration.

The signal pattern of the C(6)-H in V is a broad doublet (*J*=6 cps; τ 5.53) so that the dihedral angle between C(6)-H and C(7)-H is about 30°, indicating that the orientation of the C(6)-H in V is β. Therefore compound (V) is 6α-hydroxyguaioxide.

- 1) Part II: E. Funke, T. Tozyo, H. Ishii, and K. Takeda, *J. Chem. Soc. (C)*, **1970**, 25 84.
- 2) Location: *Fukushima-ku, Osaka*.
- 3) H. Ishii, T. Tozyo, M. Nakamura, and H. Minato, *Tetrahedron*, **26**, 2751 (1970).
- 4) C. Ehret and G. Ourisson, *Bull. Soc. Chim. France*, **1968**, 2629.