

**Methyl Ether of Methanol Adduct**—To a solution of 50 mg. of MeOH adduct was added an excess of solution of  $\text{CH}_2\text{N}_2$  in  $\text{Et}_2\text{O}$  for 6 hr. Removal of solvent and recrystallization from  $\text{Et}_2\text{O}$  afforded 28 mg. of an analytical sample, m.p.  $166\sim169^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{15} +148^\circ$  ( $c=1.030$ ). UV  $\lambda_{\text{max}}$   $m\mu$  ( $\epsilon$ ) : 226.2 (8640), 280.5 (2216), 285.5 (shoulder). IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  : 1735, 1616, 1589, 1496. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_5$  : C, 69.75; H, 7.02. Found : C, 70.00; H, 6.90.

**Acetate of Ethanol Adduct**—A mixture of 100 mg. of EtOH adduct, 1 ml. of  $\text{Ac}_2\text{O}$  and 1 ml. of pyridine was allowed to stand at room temperature for 20 hr. The mixture was poured into ice  $\text{H}_2\text{O}$  and extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$ . The  $\text{Et}_2\text{O}$  solution was worked up and the solvent was removed. Crystallization from  $\text{Et}_2\text{O}$  afforded acetate, m.p.  $126\sim127.5^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{15} +152^\circ$  ( $c=0.970$ ). UV  $\lambda_{\text{max}}$   $m\mu$  ( $\epsilon$ ) : 269.5 (856), 275.3 (810), 301 (83). IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  : 1766, 1743, 1492. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_6$  : C, 68.38; H, 6.78. Found : C, 68.47; H, 6.62.

**Treatment of II with Aqueous Dioxane**—A solution of 500 mg. of II in 8 ml. of dioxane and 13 ml. of  $\text{H}_2\text{O}$  was refluxed for 2 hr. The solvent was removed and the result triturated with  $\text{Et}_2\text{O}$ . The  $\text{Et}_2\text{O}$  insoluble powder was filtered (193 mg.) and crystallized from  $\text{Et}_2\text{O}$ . An analytical sample was dried at  $110^\circ$  for 20 hr., m.p.  $196.5\sim200^\circ$  (decomp.). UV :  $\lambda_{\text{max}}$   $294\text{ m}\mu$  ( $\epsilon$  12500). IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  : 3385~3350, 1727, 1670, 1647, 1608, 1505. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_5$  : C, 68.34; H, 6.37. Found : C, 68.20; H, 6.49.

The authors wish to express their gratitude to Dr. K. Takeda, Director of Research Laboratory, Shionogi Co., Ltd., and his staff members for the measurement of the NMR spectra. The authors are also grateful to Dr. Y. Kawazoe, and Miss M. Ohnishi of National Cancer Center and Dr. N. Nakagawa of the Univ. of Electrocommunication for their assistance in analytical measurement of the NMR spectra. The authors are indebted to Mr. H. Higuchi of Sankyo Co., Ltd. and Miss K. Arimoto for the infrared spectra measurement, and Misses H. Yamanouchi and K. Hayashi for the elemental analyses.

### Summary

9,10 $\beta$ -Epoxy-9 $\beta$ -estra-1,4-diene-3,11,17-trione (II) and 3,9 $\alpha$ -dihydroxyestra-1,3,5(10)-triene-11,17-dione (IIIa) was synthesized by the treatment of  $\Delta^{9(11)}$ -estrone (Ia) with perbenzoic acid. 9 $\beta$ -Isomer of IIIa (Va) was obtained from II by the catalytic hydrogenation.

(Received December 23, 1963)

[Chem. Pharm. Bull.  
12 (4) 479 ~ 483 ]

UDC 577.15 : 576.882.821.2.095.3

**71. Yoshio Ueno, Shizuo Suzuki, Ikuko Ueno et Takashi Tatsuno :**  
Recherches Enzymatiques du Métabolisme du *Penicillium islandicum* Sopp. I. Préliminaire de la voie Métabolique Principale de *P. islandicum*.

(*Chimie microbiotique à la Faculté de Pharmacie de Rikadaigaku de Tokyo*<sup>\*)1</sup>)

Parmi les pigments que produit le *Penicillium islandicum* Sopp, la lutéoskyrine est une substance toxique pour le foie. Quand on administre le pigment aux souris ou aux rats, une lésion se forme au foie peu après l'administration et la cirrhose et le cancer y apparaissent à une époque plus tardive.<sup>1~3)</sup>

<sup>\*)1</sup> Ichigaya-funagawara-machi, Shinjuku-ku, Tokyo (上野芳夫, 鈴木静夫, 上野郁子, 辰野高司).

- 1) M. Miyake, M. Saito, M. Enomoto, T. Shikata, T. Ishiko, K. Uraguchi, F. Sakai, T. Tatsuno, M. Tsukioka, Y. Sakai : *Acta Pathol. Japon.*, **10**, 75 (1960).
- 2) K. Uraguchi, T. Tatsuno, F. Sakai, M. Tsukioka, Y. Sakai, O. Yonemitsu, H. Ito, M. Miyake, M. Saito, M. Enomoto, T. Shikata, T. Ishiro : *Japan J. Exp. Med.*, **31**, 19 (1961).
- 3) K. Uraguchi, F. Sakai, M. Tsukioka, Y. Noguchi, T. Tatsuno, N. Saito, M. Enomoto, T. Ishiko, T. Shikata, M. Miyake : *Ibid.*, **31**, 435 (1961).

Quant à la lésion prompte du foie que l'on avait provoqué par la lutéoskyrine, nous en avons déjà constaté les effets au niveau des cellules du foie en particulier de la mitochondria.<sup>4,5)</sup> En effet, nous avons voulu donner une réponse affirmative quant à la question de savoir s'il y a quelque interaction entre les facteurs des éléments des cellules du foie et la lutéoskyrine. Nous avons pensé que l'utilisation de la lutéoskyrine-[<sup>14</sup>C] serait le seul moyen pour examiner cette interaction et nous avons essayé de préparer la lutéoskyrine-[<sup>14</sup>C].

Comme nous allons l'expliquer plus bas, la quantité de <sup>14</sup>C incorporée à la lutéoskyrine selon les méthodes conventionnelles étant très petite, il est presque impossible d'avoir suffisamment de lutéoskyrine-[<sup>14</sup>C]. Pour acquérir un rendement plus élevé de lutéoskyrine-[<sup>14</sup>C], il nous fallait examiner à fond la voie même du métabolisme du *P. islandicum*, et particulièrement le mécanisme de la biosynthèse des pigments. 1) Nous avons essayé de savoir quel est le processus d'activation d'acétate, un des précurseurs les plus élémentaires des pigments; 2) Quand on a cultivé le *P. islandicum* dans la solution de Czapék qui contient  $H^{14}CO_3Na$ , l'acétate[1-<sup>14</sup>C], l'acétate[2-<sup>14</sup>C] ou le sucrose[U-<sup>14</sup>C], quelle est la quantité de <sup>14</sup>C incorporée dans les pigment obtenus; 3) Les résultats de 1) et 2) nous ont suggéré qu'il y avait des précurseurs plus appropriés que l'acétate. D'abord, nous avons cherché le système de production du NATPH, un des cofacteurs fondamentaux de la biosynthèse de la graisse dans un corps vivant, en utilisant diverses fractions des broyats des cellules du *P. islandicum*; nous avons essayé de savoir auquel des deux groupes—celui du isocitrate-NATPH ou celui du G-6-P-NATPH—se rattache le système de production du NATPH.

#### Méthode et manipulation

1) **Activation de l'acétate**—Le mycélium du *P. islandicum* a été cultivé à 30° pendant 3 jours dans la solution Czapék. Puis il a été lavé dans une solution à 0.9 p. cent de ClNa à 0°, et broyé à 0° dans l'appareil "French pressoir" sous la pression de 400 kg/cm<sup>2</sup> avec une solution de 0.25M de sucrose. La concentration du broyat ainsi obtenu était de 20 p. cent. Après avoir centrifugé le broyat, nous avons employé dans chaque expérience 0.2 ml de la fraction surnageante à 3000 × g, 10 mins.

On incube à 37° pendant 20 mins. : 0.08 μmoles CoA; 10 μmoles ATP; 200 μmoles KCH<sub>3</sub>COO; 100 μmoles tampon de phosphate-K (pH 7.5); 200 μmoles hydroxylamine; 50 μmoles FK; 10 μmoles Cl<sub>2</sub>Mg et 10 μmoles glutathion; total 1.0 ml.

La réaction terminée, on y a ajouté, selon Lipmann et Tuttle,<sup>6)</sup> 1.5 ml de solution de 0.66N de ClH laquelle contenait 10 p. cent de Cl<sub>2</sub>Fe·6H<sub>2</sub>O et 3.3 p. cent de ATC, puis on a réduit l'absorbance à 530 m<sub>μ</sub> pour mesurer l'acide acétylhydroxamic obtenu, en posant comme témoin l'acétylphosphate de Lithium. La solution enzymatique sans CoA a été obtenue selon la méthode de Stadtman<sup>7)</sup> par l'addition de Dowex-1 (Cl) à 0°, suivie d'une incubation de 10 min., après laquelle le Dowex-1 a été éliminé par centrifugation. Nous avons utilisé la solution surnageante ainsi obtenue.

2) **Incorporation des <sup>14</sup>C-précurseurs dans les pigments**—Le *P. islandicum*, souche E-1, a été incubé dans la solution de Czapék; chaque assiette de 9 cm de diamètre contenait 10 ml de solution; 1) Pour un groupe d'assiettes, la culture à 30° a été continuée pendant 5 jours; au 6<sup>o</sup> jour 30 μc/ml de  $H^{14}CO_3Na$  ou 2.44 μc/ml d'acétate [2-<sup>14</sup>C] y ont été ajoutés, puis la culture a été poursuivie pendant encore 3 jours. 2) Pour un autre groupe d'assiettes, la culture a été faite pendant 2 jours, au bout desquels 10 μc/ml d'acétate [1-<sup>14</sup>C] ou 10 μc/ml de sucrose [U-<sup>14</sup>C] ont été ajoutés, puis la culture a été continuée pendant 2 jours de plus. La culture ainsi terminée nous avons lavé à l'eau les mycélia obtenus puis nous avons extrait à l'acétone tous les pigments produits. Les pigments ont été fractionnés chromatographiquement par le phosphate acide de calcium, ce qui a permis de mesurer le rendement du pigment et de déceler la quantité de radioactivité.

En ce qui concerne le <sup>14</sup>C utilisé, le  $H^{14}CO_3Na$  avait été produit à partir du <sup>14</sup>CO<sub>3</sub>Ba reçu du "Centre de Radio-chimie d'Amsterdam." L'acétate [<sup>14</sup>C] a été fourni par le Daiichi Chemical LTD. du Japon, et enfin le sucrose [U-<sup>14</sup>C] par l'Institut de la Microbiologie de l'Université de Tokyo.

4) Ikuko Ueno : Travaux non publiés.

5) *Idem* : *Ibid.*

6) F. Lipmann, L. C. Tuttle : *J. Biol. Chem.*, **159**, 21 (1945).

7) E. R. Stadtman, G. D. Novelli, F. Lipmann : *Ibid.*, **191**, 365 (1951).

3) La réduction enzymatique de NATP—Nous avons cultivé le *P. islandicum* pendant 3 jours dans la solution de Czapék. Ensuite la culture a été continuée un jour de plus dans une autre, solution celleci sans sucre, pour diminuer le substrat endogène. Ce mycéllium a été lavé avec une solution de  $\text{ClNa}$  de 0.9 p. cent à  $0^\circ$  puis broyé dans l'appareil "French Pressoir" avec une solution de sucre à  $0.25M$  à  $0^\circ$  sous la pression de  $400 \text{ kg/cm}^2$ . La concentration du broyat était de 20 p. cent. En centrifugeant le broyat, nous l'avons fractionné respectivement à  $3000 \times g$ , 10 mins., à  $8500 \times g$ , 15 mins. et à  $100000 \times g$ , 60 mins.

La composition de la solution utilisée était la suivante 100  $\mu\text{moles}$  tampon de tris (pH 7.5); 10  $\mu\text{moles}$   $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ; 100  $\mu\text{g}$  NATPH; 10  $\mu\text{moles}$  substrat; 0.1 ml solution enzymatique; total 3.0 ml.

Le taux d'absorption à  $340 \text{ m}\mu$  a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre du type Beckmann. La dose du NATPH a été déterminée en considérant le coefficient moléculaire d'absorbance à  $6.22 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{mole}$ .<sup>8)</sup> Pour doser la protéine, nous avons utilisé la méthode de Lowry.<sup>9)</sup>

### Résultats des expériences

Les résultats de chacune d'elles se succèdent dans les tableaux 1, 2 et 3.

TABLEAU I. Activation de l'acétate dans le mycéllium de *P. islandicum*

Enzyme	Système de la réaction	Acide acétylhydroxamique obtenu ( $\mu\text{moles}/\text{ml}$ de protéine)
Normal	complet	1.69
	moins ATP	0.82
	moins CoA	1.56
	moins ATP et CoA	0.50
	moins Acétate	0.41
Traité par Dowex-1	complet	1.42
	moins CoA	1.30

TABLEAU II. Rendement de chaque pigment et sa radioactivité

Substrats	Pigments	mg total	c.p.m. total	c.p.m./mg
$\text{H}^{14}\text{CO}_3\text{Na}$	Islandicine	10.0	1,138,000	113,800
	Lutéoskyrine	31.0	22,600	726
	Les autres	5.2	4,000	767
Acétate [ $2-^{14}\text{C}$ ]	Islandicine	8.7	3,320,000	391,000
	Lutéoskyrine	61.0	391,000	6,390
	Les autres	26.0	52,500	2,010
Acétate [ $1-^{14}\text{C}$ ]	Islandicine	7.3	1,505,000	78,400
	Lutéoskyrine	42.0	28,600	680
Sucrose [ $\text{U}-^{14}\text{C}$ ]	Islandicine	5.0	1,505,000	801,000
	Lutéoskyrine	38.0	3,420,000	89,800

### Discussion

1) Nous allons d'abord étudier de quelle manière se fait l'activation d'acétate dans le mycéllium du *P. islandicum* Sopp. D'après résultats de nos expériences, nous pouvons conclure que l'acétate est activé enzymatiquement par l'ATP, même sans addition de CoA. Le fait de ne pas ajouter le CoA dans les milieux réactionnels et d'éliminer le CoA endogène de la solution enzymatique, en utilisant la résine échangeuse d'ion, Dowex-1, n'influence pas le taux de l'acétate activé.

8) B. L. Horecher, A. Kornberg: *J. Biol. Chem.*, **175**, 385 (1948).

9) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall: *Ibid.*, **193**, 265 (1951).

TABLEAU III. Dose du NATPH obtenu concernant les substrats divers

Enzyme	Substrats	NATPH obtenu (m <sub>μ</sub> moles/min/mg protéine)
3000 × g, 10 mins. couche supérieure	G-6-P F-1,6-P G-1-P R-5-P iso-citrate α-cétoglutarate malate phosphoénolpyruvate	50.0 11.6 0 0 0 0 0 0
3000 × g, 10 mins. couche supérieur	G-6-P	45.0
8500 × g, 15 mins. précipite	"	1.0
100000 × g, 60 mins. précipite	"	2.6
100000 × g, 60 mins. couche supérieur	"	46.0

Dans ces conditions nous pensons que la réaction de l'activation d'acétate dans le mycélium du *P. islandicum* est provoquée plutôt par l'acéto kinase qui est produit par l'acétylphosphate que par l'acéto-CoA kinase.

2) Nous avons vu que les pigments produits par le *P. islandicum* contenaient toutes sortes de <sup>14</sup>C. On a pu constater une assez grande différence dans la dose de <sup>14</sup>C incorporée dans les pigments, c'est-à-dire d'une part dans l'islandicine et d'autre part dans la lutéoskyrine, selon que le mycélium a été cultivé dans le milieu contenant H<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>Na ou l'acétate[1-<sup>14</sup>C]. — c.p.m./mg de l'islandicine pour c.p.m./mg de la lutéoskyrine est 1~1.2×10<sup>2</sup> — on peut en constater une assez importante différence de quantité,

Dans le cas de l'emploi d'acétate [2-<sup>14</sup>C], la dose incorporée est plus grande que celle constatée avec H<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>Na ou avec l'acétate [1-<sup>14</sup>C].

Avec le sucre [U-<sup>14</sup>C], la dose incorporée augmente plus spécialement dans la lutéoskyrine, et le taux de l'incorporation dans l'islandicine et dans la lutéoskyrine est de 1/2×10.

3) En utilisant le surnageant du broyat du *P. islandicum* obtenu par une centrifugation de 10 min. à 3000×g, nous avons essayé de produire du NATPH *in vitro*. Avec le G-6-P comme substrat, nous avons pu observer l'augmentation de l'intensité d'absorption d'UV, à 360 m<sub>μ</sub>, mais ce phénomène ne pouvait être constaté avec l'isocitrate; ce qui prouve que l'isocitrate n'est pas le substrat dans le système de la production du NATPH dans le *P. islandicum*. D'autre part, nous avons observé que le F-1,6-P est un des substrats de ce système; cependant, nous pensons que la solution enzymatique étant contaminée par l'isomérase et la phosphofructokinase, celles-ci agissent préalablement sur F-1,6-P et le transforment en G-6-P.

Nous avons aussi essayé avec le NADP au lieu de NATP, mais nous n'avons pas obtenu du NADPH dans les milieux réactionnels. En effectuant la centrifugation de la fraction de 3000×g, 10 mins., nous avons pu trouver, l'activité du G-6-P déhydrogénase dans la fraction de la couche supérieure de 100000×g, 60 mins.

Nous pensons d'après les résultats de nos expériences qu'il faut chercher des précurseurs en dehors de l'acétate pour obtenir la lutéoskyrine [<sup>14</sup>C]. En fait, nous devrons essayer de préciser si la voie de l'incorporation du <sup>14</sup>C dans l'islandicine est la même que celle dans la lutéoskyrine.

Les résultats du tableau 3, nous suggèrent que la voie principale du métabolisme du *P. islandicum* est celle de la hexose monophosphate.

Le fait que l'acéto kinase joue le rôle le plus important dans l'activation de l'acétate est une clé pour résoudre le problème de la synthèse des graisses et des pigments dans le *P. islandicum*.

Cela nous suggère de même que le métabolisme du *P. islandicum* est très semblable à celui des bactéries. Nous considérons que c'est une des plus importantes questions pour que nous puissions continuer nos recherches sur le mécanisme biosynthétique de la lutéoskyrine dans la bonne direction.

### Résumé

Quant au métabolisme du *P. islandicum*, nous avons essayé de savoir quel est le meilleur processus de l'activation d'acéate, le système de la production de NADPH et la précurseur le plus élémentaire des pigments. Nous avons trouvé : (1) que l'acéto-kinase activait l'acéate, (2) que la réaction concernant la G-6-P déhydrogénase pourrait produire le NADPH et (3) que la dose incorporée des précurseurs [ $^{14}\text{C}$ ] dans la lutéoskyrine, (un des pigments obtenus des substances métaboliques du *P. islandicum* Sopp) augmentait plus spécialement quand on avait utilisé le sucre [ $\text{U}^{-14}\text{C}$ ] comme précurseur.

(Reçu le 27 Décembre, 1963)

[Chem. Pharm. Bull.]  
12 (4) 483 ~ 488

UDC 547.92 : 543.544

**72. Shoji Hara, Michiko Takeuchi, Misako Tachibana,<sup>\*1</sup> and Goro Chihara<sup>\*2</sup> : Systematic Analysis of Steroids. IV.<sup>\*3</sup> Thin-layer Chromatography and Densitometry of Bile Components.<sup>\*4</sup>**

(Women's Department, Tokyo College of Pharmacy,<sup>\*1</sup>  
and National Cancer Center Research Institute<sup>\*2</sup>)

There are numerous works on the components of bile, besides their analysis by infrared absorption spectra.<sup>1)</sup> Result of these studies revealed that the chief components are conjugate acids and that there are small or minute amounts of free bile acids, bile pigments, lipids, mucoids, and inorganic substances. However, rapid and reliable methods for separatory determination of each of these components, especially conjugated bile acids, have not yet been available.

Among many techniques devised for such separatory determination, the recently developed thin-layer chromatography seems to be the most useful. In recent years, Gänshirt, *et al.*<sup>2)</sup> and Hofmann<sup>\*5, 3)</sup> reported separation of conjugated bile acids in human bile by thin-layer chromatography of pure products and determination by extraction with 65% sulfuric acid, although these experiments were made only with few kinds of pure substances and not directly on natural bile.

\*1 Ueno-Sakuragi-cho, Daito-ku, Tokyo (原 昭二, 竹内美知子, 橘 美佐子).

\*2 Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo (千原昇郎).

\*3 Part II : This Bulletin, 11, 1189 (1963); Part III : J. Chromatog., 11, 565 (1963).

\*4 A part of this work was reported at the Kanto Local Meeting of the Japanese Biochemical Society, December, 1962; Kanto Local Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, November, 1962, and 83rd Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, November, 1963.

\*5 Usui has recently attempted this method (J. Biochem. (Tokyo), 54, 283 (1963)).

1) G. Chihara, *et al.* : This Bulletin, 10, 1184, 1190 (1962).

2) H. Gänshirt, F. W. Koss, K. Morianz : Arzneimittel-Forsch., 10, 943 (1960).

3) A. F. Hofmann : J. Lipid Res., 3, 110 (1962).