MIKROBIOLOGISCHE HYDROXYLIERUNG DER STEROIDE V (1). HYDROXYLIERUNG VON PROGESTERON UND REICHSTEINS SUB- STANZ S DURCH *DIPLODIA TUBERICOLA* (ELL & EV. GANB.)

KYOSUKE TSUDA, TOSHINOBU ASAI, YOSHIHIRO SATO,
TOKUJI TANAKA und MITSUGI KATO

Institut für angewandte Mikrobiologie der Universität Tokio

Eingegangen am 15. Januar, 1959

Die mikrobiologische Umwandlung von Progesteron in 7-Hydroxy-progesteron wurde erstmalig von FRIED und Mitarbeitern (2) beschrieben, obwohl die Konfiguration der HO-Gruppe in 7-Stellung des Steroid-gerüsts damals nicht aufgeklärt wurde. Kürzlich berichteten McALEER und Mitarbeitern (3) über die Umsetzung von Progesteron mittels *Gladiosporium*- und *Helmenthosporium*-Arten. Dabei führte eine *Gladiosporium*-Art (Merck collection No. SF-523) eine HO-Gruppe in 7 β -Stellung ein, während eine *Helmenthosporium*-Art (Merck collection No. I-39) das Progesteron zu 7 α -Hydroxy-progesteron oxidierte. Zum Konfigurationsbeweis der HO-Gruppe am C-7 verwandten diese Autoren die CrO₃-Oxydationsmethode nach GRIMMER (4). Nun wird die Identität dieses 7 α -Hydroxy-progesterons mit dem oben erwähnten Hydroxylierungsprodukt von FRIED suggeriert, da diese beiden in allen ihren Eigenschaften übereinstimmen.

Die mikrobiologische Hydroxylierung in 7 α -Stellung von Cortexon wurde auch beschrieben (5), dagegen ist die Fermentation von Reichsteins Substanz S zum 7-HO-Derivat noch nicht bekannt. Im folgenden berichten wir über die mikrobiologische Umwandlung von Progesteron bzw. Reichsteins Substanz S in das 7-HO-Derivat durch *Diplodia tubericola* (Ell & Ev. Ganb.).

Die mikrobiologische Umsetzung wurde wie üblich unter aeroben Bedingungen in Schüttelkulturen bei 27° durchgeführt; die Umwandlungsprodukte konnten mit Hilfe der Papierchromatographie durch Umkristallisation direkt gereinigt werden.

Progesteron (I) lieferte ein Monohydroxy-Derivat vom Schmp. 190,5—192,5°, welches mit 7 β -Hydroxy-progesteron (II) (3) identisch war. Die Feststellung der Identität basiert auf Schmp., spez.-Drehung, IR.-Spektrum, Analysenwert und dem Verhalten gegenüber alkalischen Reagenzien. Als Resultat der letzteren Reaktion ergab sich immer das Pregna-4, 6-dien-3, 20-dion (III), welches nach UV.-Absorption und Papierchromatogramm bewiesen werden konnte: Mit Acetanhydrid und Pyridin in der Kälte entstand ein öliges Prod-

ukt, das ausser der UV.-Absorption des α , β -ungesättigten Ketone (239 m μ) noch eine für das 4, 6.-dien-3-on-System typische UV.-Absorption von $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 284 m μ zeigte. Bei der Behandlung dieses öligen Produktes mit methanolisch-KOH isolierten wir ein Verseifungsprodukt, das nur mit der UV.-Absorption von 284 m μ charakterisiert wurde. (II) ergab ferner auch mit Al_2O_3 in Benzol in der Kälte das (III).

Durch Einwirkung von *Diplodia tubericola* auf Reichsteins Substanz S (IV) entstand ein neues, nach seiner Analyse monohydroxyliertes IV vom Schmp. 227,5–231,5°; $\alpha_D + 146^\circ (\text{CH}_3\text{OH})$; $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 240 m μ . Demnach zeigte es unverändert die für die α , β -ungesättigten Ketone typische UV.-Absorption. Im Papier-chromagramm mit dem System Propylenglykol-Toluol (6) bzw. Ligroin-Methanol-Wasser (7) lief es langsamer als 6 β -HO-IV bzw. 11 β -HO-IV und etwas schneller als 11 α -HO-IV.

Die Konstitution (V) der neuen Verbindung konnte folgendermassen bewiesen werden: Mit Acetanhydrid und Pyridin in der Kälte entstand ausser dem Monoacetat noch ein Diacetat. Die beiden zeigten die merkwürdige Versetzung der 20-CO Bande nach kürzere Wellenlänge, welche offensichtlich von der Acetoxy-Gruppe am C-21 herrührt, womit für eine Acetoxy-Gruppe in Diacetat (VI) bzw. Monoacetat (VII) die Stellung 21 gesichert ist. Mit der Diacetat-Bildung wurde ferner bewiesen, dass die neue HO-Gruppe des Hydroxylierungsproduktes nicht tertiär sein kann. Behandlung des Hydroxylierungsproduktes mit NaBiO_3 -Essigsäure ergab ausschliesslich das 7 ξ -Hydroxyandrost-4-en-3,17-dion (VIII), dessen Struktur durch Ueberführung in das bekannte Androsta-4,6-dien-3,17-dion (IX) (8) vom Schmp. 167–168° mit methanolisch-KOH gesichert wurde. Eine HO-Gruppe am C-7 wird in Gegenwart von Säuren oder Basen sehr leicht eliminiert unter Bildung des 4,6-dien-3-on-Systems. Damit wurde die 7-Stellung für die neue HO-Gruppe von (V) gesichert, obwohl ihre sterische Lage noch nicht erklärt werden konnte.

Dem japanischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Unterrichtsministerium) danken wir herzlich für die Unterstützung dieser Arbeit. Wir danken auch Herren Prof. Dr. H. ASUYAMA und Dr. M. TERUNAKA (Institut für Pflanzenpathologie der Universität Tokio) bestens für die Ueberlassung und Bestimmung der Mikrobe. Ferner möchten wir für die Ausführung der Mikroanalysen Fräulein H. YAMANOUCHI und K. HAYASHI (Mikro-Labor dieses Instituts) und für die Aufnahmen der IR.-Spektren Fräulein N. KUROSAWA (IR.-Spektr.-Labor dieses Instituts) ebenfalls herzlich danken.

EXPERIMENTELLER TEIL (9)

7 β -Hydroxy-progesteron (II): Die Sporenaufschwemmung von *Diplodia tubericola* wurde in der Nährlösung (10) 72 Stunden bei 27° gezüchtet. Dann wurde das Progesteron (I) in Methanol (c 2,5) in einer Konzentration von 50 mg pro 100 cc Nährlösung zugegeben und die Mischung unter Schütteln 24 Stunden lang bei der gleichen Temperatur fermentiert. Die vom Myzel

durch Filtrieren abgetrennte Flüssigkeit wurde mit Essigester extrahiert. Die Essigester-Auszüge, die mit NaHCO_3 -Lösung und dann mit Wasser gewaschen wurden, hinterliessen nach Trocknen mit Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum einen öligen Rückstand, der nach einmaliger Umkristallisation aus Essigester, Kristalle vom Schmp. $160\text{--}168^\circ$ ergab. Aus 2 g von (I) ergaben sich 1,35 g Kristalle und 0,6 g ölige Masse. Diese Kristalle enthielten nach papierchromatographischer Untersuchung ausser einer neuen Verbindung (II) noch eine kleine Menge von (I). Die Kristalle wurden also häufig aus Essigester umkristallisiert, worauf sie bei $190,5\text{--}192,5^\circ$ schmolzen, $\alpha_D + 144,2^\circ$ (c 0,5 Dioxan). Zur Analyse wurden sie bei 40° im Hochvakuum getrocknet.

$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_3$: Ber. C 76,32 H 9,15% Gef. C 75,99 H 9,03% UV.-Absorption: $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 242,6 m μ (ϵ 19.000). IR.-Spektrum (in Nujol): Banden bei 3401 cm^{-1} (HO); 1701 cm^{-1} (20-CO); 1645 cm^{-1} (3-CO); 1626 cm^{-1} (Doppelbindung). Es entsprach den für 7 β -Hydroxy-progesteron angegebenen Daten (3).

Pregna-4, 6-dien-3, 20-dion (III): Eine Lösung von 45 mg (II) in 5 cc Benzol wurde 2 Tage in einem Adsorptionsrohr mit 3 g Al_2O_3 bei der Zimmertemperatur stehen gelassen. Beim Waschen der Al_2O_3 -Säule mit Benzol erhielt man 10 mg von (III), das aus Aether umkristallisiert wurde. Schmp. 136° . UV.-Absorption: $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 283,5 m μ (ϵ 32.100). IR.-Spektrum (in Nujol): Banden bei 1709 cm^{-1} (20-CO); 1654 cm^{-1} (3-CO); 1622 und 1592 cm^{-1} (4,6-dien).

Beim Nachwaschen mit Benzol-Aether wurden ferner 30 mg von (II) zurückgenommen.

56 mg (II) wurden mit 1 cc Acetanhydrid und 0,8 cc Pyridin acetyliert, wobei ein öliges Produkt erhalten wurde. UV.-Absorption (in Methanol): Maxima bei 239 m μ (4-en-3-on-Gruppe des Acetats) sowie bei 284 m μ (4,6-dien-3-on-Gruppe von (III)). Papierchromatographie nach Ligroin-Methanol-Wasser-System: Rf 0,4 (Acetat), Rf 0,66 (III). Damit wurde bewiesen, dass es ein Gemisch von (II)-Acetat mit (III) darstellt. 30 mg Acetylierungsprodukt wurden 1 Stunde in Methanol mit KOH (c 0,5) am Rückfluss gekocht. Hierauf wurde das Methanol unter Wasser-Zusatz im Vakuum abgedampft und die wässrige Lösung mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die Methylenchlorid-Lösung wurde mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Dieser Rückstand zeigte UV.-Absorption Maxima bei 284 m μ ; dessen Papierchromatogramm ergab nur ein Fleck von Rf 0,66 (III).

7 ξ , 17 α , 21-Trihydroxy-pregn-4-en-3, 20-dion (7 ξ -Hydroxyliertes Reichsteins Substanz S) (V): Die Fermentation von Reichsteins Substanz S (IV) wurde in analoger Weise wie Progesteron durchgeführt. Aus 2 g von (IV) gewann man 650 mg kristallinisches und 990 mg öliges Umwandlungsprodukt. Nach papierchromatographischer Untersuchung bestand der kristallinische Teil hauptsächlich aus einer neuen Verbindung (V), dagegen enthielt der ölige Teil das (IV) und (V). Die gewonnene Kristalle wurden häufig aus Aceton umkristallisiert. Schmp. 228–230°. $\alpha_D + 146^\circ$ (c 0,526 Methanol). Zur Analyse wurden sie bei 40° im Hochvakuum getrocknet.

C₂₁H₃₀O₅ Ber. C 69,58 H 8,34% Gef. C 69,64 H 8,39% UV.-Absorption: $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 240 m μ (ϵ 18.900). IR.-Spektrum (in Nujol): Banden bei 3509, 3390 und 3311 cm⁻¹ (HO); 1689 cm⁻¹ (20-CO); 1637 cm⁻¹ (3-CO); 1621 cm⁻¹ (Doppelbindung).

Acetylierung von (V): 70,5 mg (V) wurden mit 0,4 cc Acetanhydrid und 0,4 cc Pyridin in der Wärme acetyliert, wobei 72,2 mg Kristalle erhalten wurde. Sie wurden dreimal aus Aceton umkristallisiert, wobei 21-Acetoxy-7 ξ , 17 α -dihydroxy-pregn-4-en-3,20-dion (VII) vom Schmp. 249–251° erhalten wurde. Zur Analyse wurden sie bei 80° im Hochvakuum getrocknet; hiernach zeigte es Schmp. 240,5–241°.

C₂₃H₃₂O₅ Ber. C 68,29 H 7,97% Gef. C 68,26 H 8,03% UV.-Absorption: $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 241 m μ (ϵ 17.800). IR.-Spektrum (in Nujol): Banden bei 3401 cm⁻¹ (HO); 1751 cm⁻¹ (Acetyl-CO); 1730 cm⁻¹ (20-CO); 1667 cm⁻¹ (3-CO); 1626 cm⁻¹ (Doppelbindung); 1241 cm⁻¹ (21 C-O-).

Die Mutterlaugen von (VII) chromatographierte man an Florisil, wobei mit Benzol-Aether-Gemischen steigenden Aethergehalts eluiert wurde. Die Fraktionen von Benzol-Aether (19:1 und 4:1) enthielten 7 ξ , 21-Diacetoxy-17 α -hydroxy-pregn-4-en-3,20-dion (VI), das aus Aceton umkristallisiert wurde. Nach dem Trocknen im Hochvakuum schmolz es bei 180–182°.

C₂₅H₃₄O₇ Ber. C 67,24 H 7,68% Gef. C 67,27 H 7,77% UV.-Absorption: $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 237 m μ (ϵ 24.100). IR.-Spektrum (in Nujol): Banden bei 3401 cm⁻¹

(HO); 1736 cm^{-1} (Acetyl-CO); 1718 cm^{-1} (20-CO); 1658 cm^{-1} (3-CO); 1623 cm^{-1} (Doppelbindung); 1239 cm^{-1} (21-C-O-).

7 ξ -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion (VIII): 100 mg (V) wurden in 20 cc 50%iger Essigsäure gelöst, mit 1,55 g NaBiO₃ versetzt und 6 Stunden lang geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 40 cc Wasser versetzt, mit berechneter Menge der KOH-Lösung neutralisiert und mehrmals mit Benzol extrahiert. Die Benzol-Lösung wurde eingedampft, wobei 67,8 mg Kristalle vom Schmp. $217-222^\circ$ gewonnen wurde. Nach dreimaligem Umkristallisieren zeigten sie Schmp. $242,5-245^\circ$. Zur Analyse wurden sie bei 40° im Hochvakuum getrocknet.

C₁₉H₂₆O₃ Ber. C 75,46 H 8,67% Gef. C 75,31 H 8,64% UV.-Absorption: $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 241,5 m μ (ϵ 16.600). IR.-Spektrum (in Nujol): Banden bei 3412 cm^{-1} (HO); 1730 cm^{-1} (17-CO); 1656 cm^{-1} (3-CO); 1616 cm^{-1} (Doppelbindung).

Androst-4,6-dien-3,17-dion (IX): 55 mg von (VIII) wurden 1 Stunde in 5 cc Methanol mit 50 mg KOH am Rückfluss gekocht. Hierauf dampfte man das Methanol unter Wasser-Zusatz im Vakuum ab und schüttelte die zurückbleibende alkalische Lösung mit Benzol aus. Die Benzol-Lösung wurde mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft, wobei 50 mg des öligen Produkts gewonnen wurde. Zur Reinigung wurde das Produkt an Al₂O₃-Säule chromatographiert. Beim Waschen mit Petroläther-Benzol-Gemischen steigenden Benzolgehalts (1:1 und 1:27) konnte man das (IX) kristallinisch erhalten. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Aether zeigte es Schmp. $167-168^\circ$. $\alpha_D + 131^\circ$ (c 0,497 Dioxan). Zur Analyse wurden sie bei 40° im Hochvakuum getrocknet.

C₁₉H₂₄O₂ Ber. C 80, 24 H 8,51% Gef. C 79,73 H 8,44% UV.-Absorption: $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 282 m μ (ϵ 25.800). IR.-Spektrum (in Nujol): Banden bei 1745 cm^{-1} (17-CO); 1662 cm^{-1} (3-CO); 1616 und 1582 cm^{-1} (4, 6-dien).

ZUSAMMENFASSUNG

Einige mikrobiologischen Umsetzungen mit *Diplodia tubericola* (Ell & Ev. Ganb.) beschrieben. Aus Progesteron (I) wurde das bekannte 7 β -Hydroxyprogesteron (II) erhalten. Reichsteins Substanz S (IV) ergab das bisher nicht beschriebene 7 ξ -Hydroxy-Derivat (V), dessen Struktur durch Ueberführung in die Androstan-Reihe gesichert wurde.

LITERATUR

- (1) IV. Mitteilung: *Chem. & Pharm. Bull.*, **6**, 387 (1958).
- (2) J. FRIED, R. W. THOMA, D. PERLMAN, J. E. HERZ und A. BORMAN: Recent Progress in Hormone Research XI, Academic Press, New York, N.Y., 1955.
- (3) W. J. McALEER, M. A. KOZLOWSKI, T. H. STOUT und JOHN M. CHEMERDA: *J. Org. Chem.*, **23**, 958 (1958).
- (4) G. GRIMMER: *Angew. Chem.*, **69**, 400 (1957).

- (5) CH. MEYSTRE, E. VISCHER und A. WETTSTEIN: *Helv.*, **38**, 381 (1955).
- (6) R. B. BURTON, A. ZAFFARONI und E. H. KEUTMANN: *J. biol. Chem.*, **188**, 763 (1951).
- (7) I. E. BUSCH: *Biochem. J.*, **50**, 370 (1952).
- (8) C. DJERASSI, E. W. FOLTZ und A. E. LIPPMAN: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4354 (1955).
- (9) Die Schmp. sind auf dem Kofler-Block bestimmt und nicht Korrigiert.
- (10) T. ASAI, K. TSUDA, K. AIDA, E. OHKI, T. TANAKA und M. HATTORI: Diese Zeitschrift, **4**, 79 (1958).