

72. **Kyosuke Tsuda, Toshinobu Asai, Eiji Ohki, Atsuji Tanaka, und Takemasa****Matsuhisa** : Mikrobiologische Hydroxylierung der Steroide. VII.¹⁾Hydroxylierung von Progesteron in der 7 α ,14 α - und 15 β -
Stellung durch *Syncephalastrum racemosum* COHN.

(Institut für angewandte Mikrobiologie,* Universität Tokyo)

Vor kurzem haben wir die mikrobiologische Umwandlung von Progesteron, 11 α -Hydroxyprogesteron und Reichsteins Substanz-S durch *Syncephalastrum racemosum* COHN²⁾ beschrieben.³⁾ Progesteron ergab dabei 7 α ,15 β -Dihydroxyprogesteron. Daneben wurde bei dem längeren Fermentationstermin ein Trihydroxyprogesteron isoliert, das wir in vorliegender Mitteilung näher charakterisieren.

Dieses Trihydroxyprogesteron vom Schmp. 263~265° wurde durch 72 stündiger Einwirkung der Mikroorganismen auf Progesteron (I) in 7-proz. Ausbeute erhalten. Dasselbe Hydroxylierungsprodukt konnte auch bei der Umsetzung von 7 α ,15 β -Dihydroxyprogesteron (II) mit gleichen Mikroorganismen gewonnen werden, womit für die zwei Hydroxy-Gruppen in Trihydroxyprogesteron die 7 α - und 15 β -Stellung gesichert ist. Eine Hydroxy-Gruppe am C-7 wird in Gegenwart von Säuren oder Basen sehr leicht eliminiert unter Bildung des 4,6-Dien-3-ons. Das durch Acetylierung mittels Acetanhydrid und Pyridin erhaltene 7-Monoacetat (IV) ergab wirklich bei der Verseifung mit methanolisch-Kaliumcarbonat ein 4,6-Dien-3-on (V) vom Schmp. 266~268°.

Durch den negativen Ausfall der Porter-Silber-Reaktion⁴⁾ bzw. Eisentrichlorid-Reaktion liessen sich die Stellung 2, 16, und 17 für die dritte Hydroxy-Gruppe ausschliessen. Das 7-Monoacetat (IV) reagierte mit dem Reagens von Tollens,⁵⁾ und damit war das Vorliegen einer α -Glykol-Gruppierung sehr wahrscheinlich. Diese Substanz verbrauchte wirklich ca. 1 Mol Perjodsäure oder Bleitetraacetat. Dadurch wurde bewiesen, dass in diesem Trihydroxyprogesteron die dritte Hydroxy-Gruppe sich neben am C-15 befindet und mit 15 β -Ol eine α -Glykol-Gruppierung bildet. Da die 16-Stellung, wie gesagt, nicht in Frage kommt, kann es sich nur um ein 14 α -Ol⁶⁾ handeln. Die mikrobiologisch eingeführten Hydroxy-Gruppen müssen sich also in 7 α -, 14 α -, und 15 β -Stellung befinden (III).

Zur Bestätigung dieser *trans*-Glykol-Gruppierung wurde die Oxydationsgeschwindigkeit von 7-Monoacetat (IV) mittels HJO₄ bzw. Bleitetraacetat mit diejenigen von 3-Benzoyloxy-14 α ,15 α -dihydroxycholestan bzw. 3-Benzoyloxy-14 α ,15 β -dihydroxycholestan verglichen : Das Resultat ist in Tabelle I gezeigt.

Der Oxydationsverlauf des *trans*- α -Glykols ist bekanntlich langsamer als derjenige des *cis*- α -Glykols.⁷⁾ Unsere Versuche über die Oxydationsgeschwindigkeit beider *cis*-, *trans*-Cholestan-14,15-diole führten ebenfalls zum gleichen Resultat. Wie in Tabelle I gezeigt, verlief die Oxydierung von 7-Monoacetat (IV) noch langsamer als das *trans*-

* Yayoicho, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo (津田恭介, 朝井勇宜, 大木英二, 田中篤二, 松久毅正).

1) VI Mitt. : J. Gen. Appl. Microbiology (Tokyo), 5 (1959), im Druck.

2) Charakterisierung dieses Stamms wurde bei der Sanraku-AG. (Tokyo) ausgeführt. Dafür danken wir herzlichst.

3) K. Tsuda, T. Asai, E. Ohki, A. Tanaka, M. Hattori : Dieses Bulletin, 6, 388(1958).

4) C. C. Porter, R. H. Silber : J. Biol. Chem., 185, 201(1950); 210, 923(1951).

5) L. Hough : Nature, 165, 400(1950).

6) Nach enzymatischen Hydroxylierungsmechanismen kann nur die α -Orientierung in Betracht gezogen werden. cf. M. Hayano, M. Gut, R. J. Borfman, O. K. Sebek, D. H. Peterson : J. Am. Chem. Soc., 80, 2336(1958).

7) P. Levesley, W. A. Waters, A. W. Wright : J. Chem. Soc., 1956, 840.

TABELLE I. Vergleich der experimentell bestimmten Mol-Werte von verbrauchten HJO_4 bzw. $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ mit der Zeit (Std.)

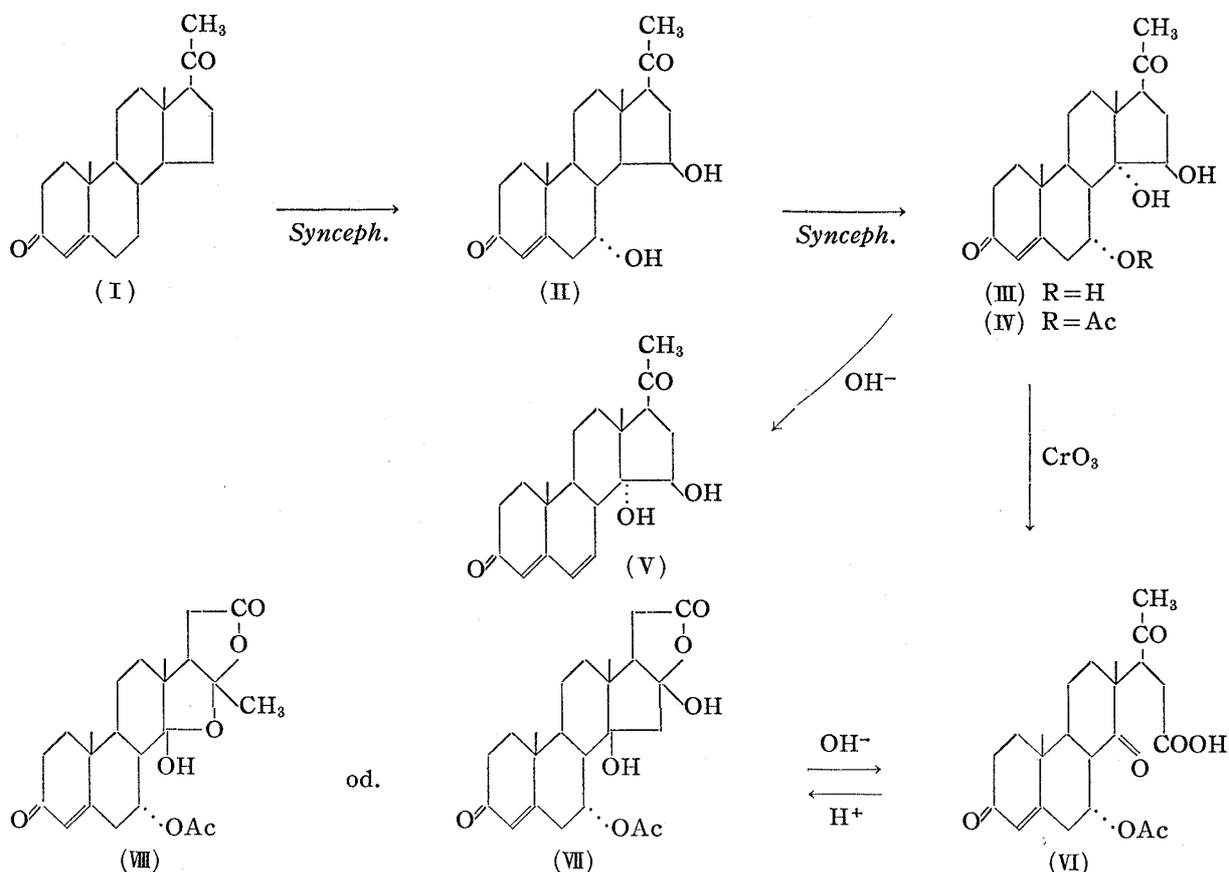
Stdn.	$\text{Pb}(\text{OAc})_4^{a)}$			$\text{HJO}_4^{b)}$	
	Trihydroxyprogesteron-7-monoacetat (IV)	3-Benzoyloxy-14 α ,15 α -dihydroxycholestan (<i>cis</i> -Glykol)	3-Benzoyloxy-14 α ,15 β -dihydroxycholestan (<i>trans</i> -Glykol)	Trihydroxyprogesteron-7-monoacetat (IV)	3-Benzoyloxy-14 α ,15 β -dihydroxycholestan (<i>trans</i> -Glykol)
20	0.05	0.55	0.25	0.07	0.26
50	—	1.01	0.60	—	0.70
100	0.10	—	—	0.15	—
220	—	—	—	—	—
310	0.60	—	—	—	—
760	—	—	—	1.08	—

a) 0.05 mMols Substanz wurden in 25 ccm Dioxan gelöst, mit 10 ccm $N/30$ $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ -AcOH-Lösung versetzt und in der Dunkel-Kammer bei 25° stengelassen. Nach Ablauf einer bestimmten Zeit wurden je 2 ccm der Reaktions-Lösung durch Pipettierung herausgenommen, mit überschüssiger KJ-Lösung und dann NaOAc-Lösung versetzt und das ausgeschiedene Jod mit $N/100$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung titriert.

b) Zur Lösung von 0.05 mMols Substanz in 2.5 ccm Dioxan wurden 5 ccm der 0.3-proz. KJO_4 -Lösung und 0.5 ccm von $2N$ H_2SO_4 -Lösung zugegeben und in der Dunkel-Kammer bei 25° stengelassen. Nach Ablauf einer bestimmten Zeit wurde je 1 ccm der Reaktionslösung herausgenommen, mit überschüssiger KJ-Lösung versetzt und das ausgeschiedene Jod mit $N/100$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung titriert.

Cholestan-diol. Damit wurde die *trans*-Konfiguration der 14,15-Diol-Gruppierung im Trihydroxyprogesteron-Molekül festgestellt.

Die Behandlung des Trihydroxyprogesteron-monoacetat (IV) mit Chromiumtrioxyd bei Zimmertemperatur ergab ausschliesslich eine Substanz vom Schmp. 168~173°. Sie erwies sich nach Titration als einbasische Säure. Sie zeigte auch die der Struktur von (VI) entsprechenden Analysenwerte. Das IR-Spektrum des Oxydationsprodukts in



Nujol wies, aber neben den Banden für die 4-En-3-on-Gruppierung (1667, 1624 cm^{-1}) und Acetyl-Gruppe (1742 cm^{-1}) nur die intensive Banden der γ -Lakton-Gruppierung (1773 cm^{-1}) und der Hydroxy-Gruppe (3559 cm^{-1}). Dabei konnten wir keine Banden für 6-Ringketon, aliphatisches Keton und Carboxy-Gruppierung finden, die alle für die Struktur (VI) unentbehrlich sind. Aus dem IR-Spektrum kann man schliessen, dass für das Oxydationsprodukt in festem Zustand die Formel (VII) oder (VIII), die durch Ketalisierung von (VI) gebildet wird, wahrscheinlich ist. Bei der Behandlung mit Alkali wurde das neutrale Produkt (VII od. VIII) zur Säure (VI) umgewandelt.

Dem Japanischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Unterrichtsministerium) danken wir herzlich für die Unterstützung dieser Arbeit. Wir danken auch Herren Dr. K. Okazaki und R. Shirasaka (Takamine-Laboratorium) für ihre freundliche Hilfe bei der Massenkultivierung. Ferner möchten wir für die Ausführung der Mikroanalysen Fr. H. Yamanouchi und K. Hayashi (Mikro-Labor dieses Instituts) und für die Aufnahme der IR-Spektren Fr. N. Kurosawa (IR-Spektr.-Labor dieses Instituts) ebenfalls herzlich danken.

Experimentell⁸⁾

7 α ,14 α ,15 β -Trihydroxyprogesteron (III)—30 g Progesteron (I) wurden zu der Kultur von *Syncephalastrum racemosum* COHN unter sterilen Bedingungen zugegeben und 72 Std. lang bei 30° fermentiert.³⁾ Hierauf wurde die Suspension wie üblich aufgearbeitet und ergab 16.5 g Rohkristalle. Sie wurden mit CHCl_3 gewaschen und die in CHCl_3 schwer lösliche Kristalle (5 g) mehrmals aus MeOH umkristallisiert. Schmp. 263~265°, $[\alpha]_D +103^\circ$ (c=0.5, MeOH). Ausbeute: 2.3 g. Zur Analyse wurden sie bei 40° im Hochvakuum getrocknet. $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$ -Ber.: C, 69.58; H, 8.34. Gef.: C, 69.59; H, 8.44. UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 240.4 m μ (ϵ 12500). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 3546~3322 (OH); 1689 (20-CO); 1672 (3-CO); 1626 (Doppelbindung).

50 mg 7 α ,15 β -Dihydroxyprogesteron (II) wurden 48 Std. lang bei 30° in analoger Weise wie Progesteron fermentiert. Das erhaltene kristallinische Produkt (20 mg) wurde aus CHCl_3 und dann aus MeOH umkristallisiert. Die Kristalle vom Schmp. 261~263° erwiesen sich nach Schmp., Misch-Schmp., IR und Papierchromatogramm als identisch mit (III).

(III)-Monoacetat (IV)—220 mg (III) wurden in 2.5 ccm Pyridin gelöst, mit 2.5 ccm Ac_2O versetzt und einer Nacht stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung wurden 188 mg Kristalle vom Schmp. 228~230° erhalten. $[\alpha]_D +126^\circ$ (c=0.62, MeOH). Zur Analyse wurden sie bei 40° im Hochvakuum getrocknet. $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_6$ -Ber.: C, 68.29; H, 7.97. Gef.: C, 68.15; H, 7.97. UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 235.7 m μ (ϵ 15000). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 3584~3356 (OH); 1736 (Acetyl-CO); 1692 (20-CO); 1650 (3-CO); 1616 (Doppelbindung).

14 α ,15 β -Dihydroxypregna-4,6-dien-3,20-dion (V)—72 mg (IV) wurden mit 30 ccm wässrigem MeOH-KHCO₃ (c=0.5) siedend erhitzt. Die Lösung wurde mit verd. HCl neutralisiert und mit Äther ausgeschüttelt. Nach Trocknen und Eindampfen der Äther-Lösung wurde der erhaltene Rückstand aus Aceton umkristallisiert. Schmp. 266~268°. Ausbeute: 13 mg. Zur Analyse wurden sie bei 40° im Hochvakuum getrocknet. UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 284.5 m μ (ϵ 29000). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 3410 (OH); 1695 (20-CO); 1645 (3-CO); 1612 und 1580 (4,6-dien). $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_4$ -Ber.: C, 73.22; H, 8.19. Gef.: C, 73.17; H, 8.07.

CrO₃-Oxydationsprodukt von (IV)—Zur Lösung von 110 mg (IV) in 2 ccm AcOH wurde die Lösung von 50 mg CrO₃ in 2.4 ccm AcOH in der Kälte zugesetzt und 3.5 Std. lang bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Zusatz kleiner Menge MeOH wurde die Lösung mit Wasser versetzt und mit CHCl_3 ausgeschüttelt. Die CHCl_3 -Auszüge wurden erst mit verd. NaHCO₃-Lösung, dann mit Wasser gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Nach Eindampfen der CHCl_3 -Lösung wurde eine Spur von neutraler Substanz gefunden. Aus den mit HCl angesäuerten NaHCO₃-Auszügen wurde eine kristalline Säure erhalten. Sie wurde mit CHCl_3 extrahiert und die CHCl_3 -Auszüge nach Trocknen eingedampft. Der Rückstand gab durch Umkristallisieren aus Benzol-Äther Kristalle vom Schmp. 168~173°. Ausbeute: 30 mg. Sie sind nicht löslich im Wasser und leicht löslich in der gesätt. NaHCO₃-Lösung unter Schäumen. Nach Titration erwiesen sie sich als einbasisch. Zur Analyse wurden sie bei 40° im Hochvakuum getrocknet. $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_7$ -Ber.: C, 66.01; H, 7.23. Gef.: C, 65.83; H, 7.23. UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 235 m μ (ϵ 15000). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 3559 (OH); 1773 (γ -Lakton); 1742 (Acetyl-CO); 1667 und 1625 (4-en-3-on).

3 β -Benzoyloxycholestan-14 α ,15 α -diol—Zu einer Lösung von 400 mg 3 β -Benzoyloxycholestan-14-en⁹⁾ in 20 ccm abs. Äther und 0.3 ccm Pyridin wurde eine Lösung von 210 mg OsO₄ in 7 ccm abs. Äther gegeben. Nach 2 stündiger Umrührung wurde die Reaktionslösung über Nacht bei Zimmer-

8) Die Schmp. sind auf dem Kofler-Block bestimmt und noch nicht korrigiert.

9) F.R. Schenk, K. Buchholz, O. Wiese: Ber., 69, 2596(1936).

temperatur stehengelassen, wobei das Addukt ausschied. Zu diesem Gemisch wurde eine Lösung von 1 g Na_2SO_3 in 30 cc 50-proz. EtOH gegeben, 3.5 Std. lang unter Rückfluss gekocht und dann filtriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingeengt, mit Wasser versetzt und mit Äther extrahiert. Der durch Eindampfen der Äther-Auszüge erhaltene Rückstand wurde aus MeOH umkristallisiert. Schmp. 160~163°. Ausbeute: 300 mg. Zur Analyse wurden sie bei 60° getrocknet. $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_4$ -Ber.: C, 77.82; H, 9.99. Gef.: C, 77.57; H, 9.93. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 3520~3480 (OH); 1700 (Benzoyl-CO).

3 β -Benzoyloxycholestan-14 α ,15 β -diol—Zur Lösung von 5 g 3 β -Benzoyloxycholestan-14-en⁹⁾ in 100 ccm CHCl_3 wurde eine Lösung von Perbenzoesäure in CHCl_3 (1.2 Mols von aktiviertem Sauerstoff haltig) in der Kälte zugesetzt und die Reaktionslösung 40 Std. lang bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die Lösung wurde erst mit 10-proz. NaOH-Lösung, dann mit Wasser gewaschen und getrocknet. Nach Eindampfen wurde der Rückstand aus Aceton umkristallisiert. Schmp. 152~154°. Das erhaltene 3 β -Benzoyloxycholestan-14 α ,15 α -epoxid wurde bei 40° im Hochvakuum getrocknet und analysiert. $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{O}_3$ -Ber.: C, 80.58; H, 9.95. Gef.: C, 80.55; H, 9.92.

0.5 g Epoxid wurden in 100 ccm Aceton gelöst, mit 10 ccm Wasser und 0.5 ccm 10-proz. HClO_4 -Lösung versetzt und 40 Std. lang stehengelassen. Nach Zusetzen von Wasser wurde das Produkt mit Äther ausgezogen und aus Aceton umkristallisiert. Schmp. 202~205°. Ausbeute: 362 mg. Diol wurde bei 60° im Hochvakuum getrocknet und analysiert. $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_4$ -Ber.: C, 77.82; H, 9.99. Gef.: C, 77.93; H, 9.96. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 3450 und 3550 (OH); 1690 (Benzoyl-CO).

Zusammenfassung

Progesteron (I) wurde durch Fermentierung mit *Syncephalastrum racemosum* COHN in 7 α ,15 β -Dihydroxyprogesteron (II) und Trihydroxyprogesteron (III) übergeführt. Das letztere konnte auch durch mikrobiologische Umwandlung von (II) mit gleichem Mikroorganismus erhalten werden. Damit wurden die Stellungen 7 α und 15 β für die zwei Hydroxy-Gruppen im Trihydroxylierungsprodukt gesichert. Für das dritte Hydroxyl wurde die 14 α -Stellung vorgeschlagen und diese Zuordnung durch Vergleichung mit Cholestan-14 α ,15 α -diol bzw. Cholestan-14 α ,15 β -diol in Bezug auf der Verbrauchsgeschwindigkeit von Perjodsäure bzw. Bleitetraacetat gestützt.

(Eingegangen am 30. März, 1959)

UDC 615.722 : 547.822.3'732

73. Y. Kasé, T. Yuizono*¹; T. Yamasaki, T. Yamada, S. Io, M. Tamiya, and I. Kondo*²: A New Potent Non-narcotic Antitussive, 1-Methyl-3-di(2-thienyl)methylenepiperidine. Pharmacology and Clinical Efficacy.

(Department of Chemico-Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Kumamoto,*¹ and the Internal Clinic of the Kumamoto Central Hospital*²)

During the course of studies on the structure-activity relationship in antitussive effects of thienyl-alkylamino compounds,^{1~5)} it has been found that 1-methyl-3-di(2-thienyl)methylenepiperidine citrate (designated hereafter as AT-327), regarded as one of isomers produced by cyclization of $>\text{C}=\text{C}-\text{C}-\text{N}< \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ chain of Iso-ohton or Ohton (3-dimethylamino-1,1-di(2-thienyl)but-1-ene), shows antitussive effect more potent than codeine in the dog and lower toxicity than Ohton. The fact that this compound is completely devoid of analgesic activity is the most favorable property for appraisal of the

*¹ Ōe-machi, Kuhonji, Kumamoto (加瀬佳年, 由井蘭倫一).

*² Shin-yashiki-machi, Kumamoto (山崎徳二, 山田知章, 井尾重雄, 田宮又男, 近藤 功).

1) Y. Kasé: Japan. J. Pharmacol., **2**, 7(1952).

2) *Idem.*: This Bulletin, **2**, 298(1954).

3) *Idem.*: Japan. J. Pharmacol., **4**, 118(1955).

4) *Idem.*: *Ibid.*, **4**, 130(1955).

5) Y. Kasé, *et al.*: This Bulletin, **3**, 394(1955).