

ring, and the remaining radioactivity was confined only to 5-C and 8-C. In short, acetoin is a direct material for the biosynthesis of the pteridine ring and seems to be related to the formation of the benzene ring in riboflavin.

Summary

4-Ribitylamino-5-aminouracil (II), which is regarded as an intermediate in the biosynthesis of riboflavin, was synthesized and the formation of 6,7-dimethylribolumazine (III) and riboflavin (IV) was examined in three cases, in which a mixture of (II) and a crude enzyme solution prepared from *Er. ashbyii*, a mixture of (II) and acetoin, and a mixture of (II), acetoin, and a crude enzyme solution were each incubated at 37°. In the first two cases, the formation of (III) and (IV) was not observed, but in the last case the formation of a green fluorescent substance and increase of (IV) were recognized. The green fluorescent substance was confirmed to be (III) from its Rf values and ultraviolet spectrum.

From these results, it seems reasonable to think that riboflavin which is an isoalloxazine derivative is biosynthesized in the mycelium of *Er. ashbyii* from a pyrimidine compound (II) through a pteridine compound (III).

(Received April 22, 1959)

UDC 549.92.07

96. Kyosuke Tsuda, Nobuo Ikekawa, und Shigeo Nozoe : Untersuchungen über Steroide. XIII.¹⁾ Mattox-Umlagerung von Reichsteins Substanz S bei der Ketalisierung mit 2-Methyl-2-äthyl-1,3-dioxolan.

(Institut für angewandte Mikrobiologie,*¹ Universität Tokio)

Die Bildung eines Nebenprodukts bei der 3,20-Bis-ketalisierungsreaktion von Reichsteins Substanz S (I) mittels Äthylenglykol in Benzol in Gegenwart von *p*-Toluolsulfonsäure als Katalysator war erstmalig von Antonucci, *et al.*²⁾ beschrieben worden, obwohl dessen Charakterisierung noch nicht ausgeführt worden ist. Vor kurzem berichteten Evans, *et al.*,³⁾ dass beim Ketalisieren von 4,5 α -Dihydrocortison (17 α ,21-Dihydroxyallopregnan-3,11,20-trion) unter analogen Bedingungen neben 3,20-Bis-äthylenketal und 3-Monoäthylenketal noch eine Verbindung der Formel C₂₇H₄₀O₇ gebildet wurde. Hierbei wurde bewiesen, dass dieses Nebenprodukt eine 3-Äthylenketal- und eine 11-Oxo-Gruppe auf seinem Steroid-Gerüste besitzt, aber keine OH-Gruppe in der Seitenkette. Damit vermuteten diese Autoren, dass die Dihydroxyaceton-Gruppierung an C-17 des 4,5 α -Dihydrocortisons unter den Angriff der zwei Mols Äthylenglykols zur Spiroketal- oder Tetraoxadekalin-Gruppierung verwandelt würde und keine OH-Gruppe sich in der Seitenkettene mehr befände. Jedenfalls wurde die Ausbeute der normalen Ketal-Verbindungen bei dieser Reaktionen durch Hervorkommen der Nebenprodukte zurückgehalten.

Wir haben nun auch das Reichsteins Substanz S (I) unter etwas modifizierten Bedingungen ketalisiert. Als Ketalisierungsmittel diente 2-Methyl-2-äthyl-1,3-dioxolan (Methyl-äthylketon-äthylenketal).⁴⁾ Die Reaktion wurde in Dioxan in Gegenwart von *p*-Toluolsul-

*¹ Yayoicho, Bunkyo-ku, Tokio (津田恭介, 池川信夫, 野副重男).

1) XII. Mitt. K. Tsuda, S. Nozoe : Dieses Bulletin, **7**, 238(1959).

2) R. Antonucci, S. Bernstein, R.H. Lenhard : J. Am. Chem. Soc., **76**, 2956(1954).

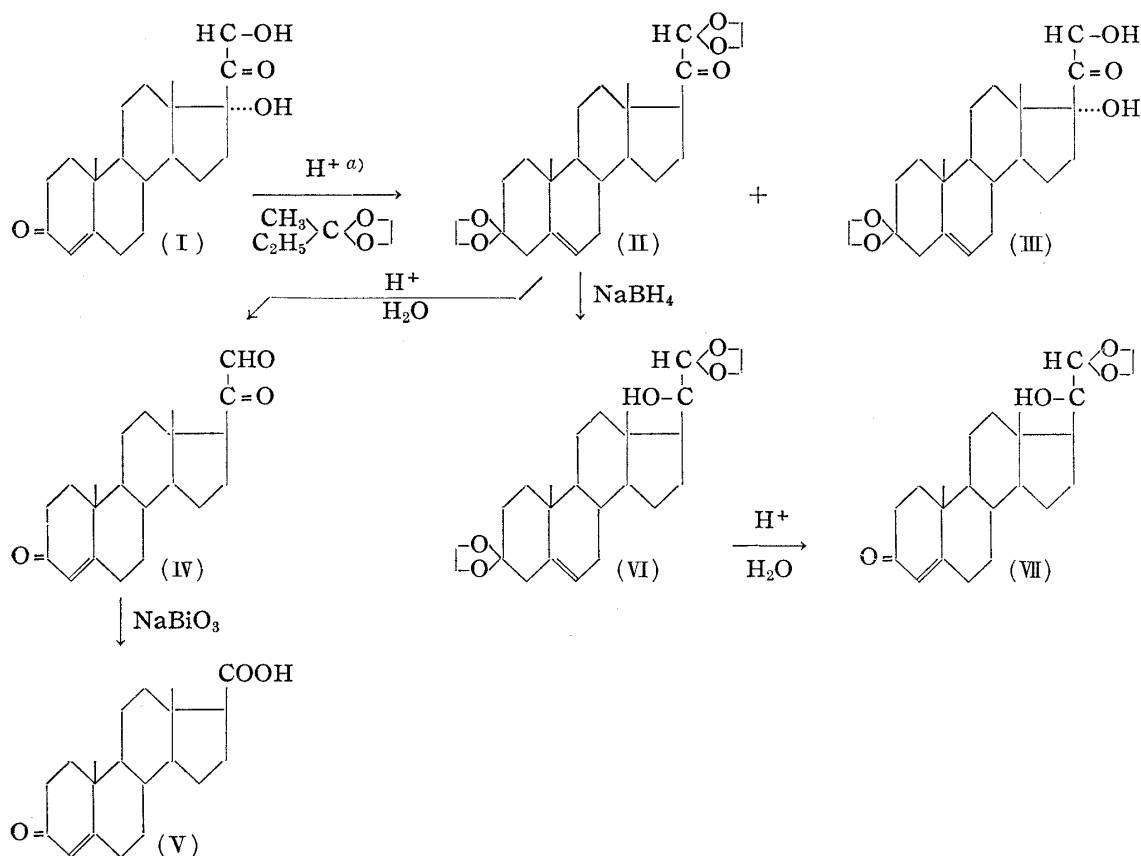
3) R.M. Evans, G.F.H. Green, J.S. Hunt, A.G. Long, B. Mooney, G.H. Philipps : J. Chem. Soc., **1958**, 1529.

4) F. Sondheimer, O. Mancera, G. Rosenkranz : J. Am. Chem. Soc., **76**, 5020(1954).

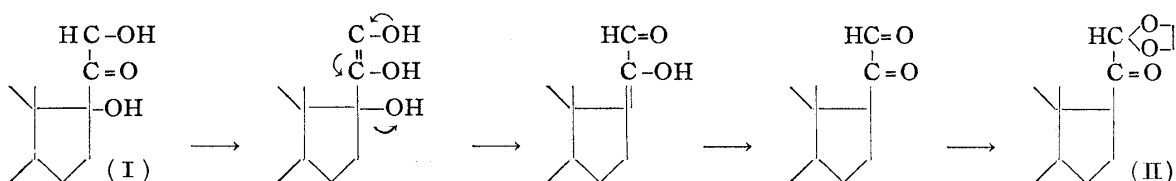
fonsäure als Katalysator in der Siedehitze durchgeführt.

Die Reaktionsprodukte wurden einer chromatographischen Analyse an Florisil unterworfen. Aus den ersten Eluatien liess sich eine Verbindung (II) vom Schmp. 178~180° in 34-proz. Ausbeute resultieren. Weitere Eluate enthielten Spuren von 3-Monoäthylenketal (III), das durch Acetylierung mit Acetanhydrid-Pyridin zum 21-Acetat vom Schmp. 270~274° übergeführt und mit authentischem Präparat von (III)-Acetat⁴⁾ direkt verglichen wurde.

Die Analyse des Hauptprodukts vom Schmp. 178~180° passte auf die Summenformel $C_{25}H_{36}O_5$. Nach seinem C-Gehalt war verständlich, dass (I) mit 2 Mols des Ketalisierungsmittels reagierte. 3-Oxo-Gruppe wurde nämlich ketalisiert, da das 4-en-3-on-System des (I) nach UV- bzw. IR-spektroskopischer Untersuchungen abhanden war. Eine Oxo-Gruppe liegt in Seitenkette an C-17, da im IR eine Bande bei 1729 cm^{-1} (Nujol) gezeigt wurde. Eine auffallende Abweichung des Produkts war die Abwesenheit einer OH-Gruppe, wie IR sie aufwies. Die Beobachtung von Mattox, *et al.*,⁵⁾ dass die 17,21-Dihydroxy-20-oxo-Gruppierung von Cortison bzw. von $3\alpha,17\alpha,21$ -Trihydroxypregnan-11,20-dion durch Einwirkung von HCl-Methanol zur 21,21-Dimethoxy-20-oxo-Gruppierung



a) Umlagerungsmechanismus nach Mattox.⁵⁾



5) V.R. Mattox, E.C. Kendall : J. Biol. Chem., **188**, 287(1951); J. Am. Chem. Soc., **74**, 4340(1952).

umgewandelt wurde, veranlasste uns dem obengenannten Produkt die Formel (II),*² 3,3; 21,21-Bis(äthylendioxy)-20-oxopregn-5-en, zu erteilen.

Zum Konstitutionsbeweis wurde das (II) mittels verd. H₂SO₄ zum 20,21-Glyoxal, 3,20-Dioxopregn-4-en-21-al (IV), vom Schmp. 224~227°, hydrolysiert (Ausbeute: 74%). Es zeigte im IR die CO-Banden bei 1728 und 1701 cm⁻¹ (20-on-21-al); ungesättigte CO-Banden bei 1656 cm⁻¹ (3-CO) und 1616 cm⁻¹ (4-en). Ferner wurde die α-Dioxo-Gruppierung durch Chinoxalin-Bildung mittels *o*-Phenylendiamin bewiesen. Andererseits wurde (IV) mittels NaBiO₃ zu der entsprechenden Ätiosäure, 3-Oxo-ätiochol-4-ensäure⁶⁾ (V) vom Schmp. 238~243° abgebaut. Bei der Behandlung von (II) mit NaBH₄ entstand 20β-OI (VI), welches durch milde Hydrolyse mittels verd. H₂SO₄ das 20β-Hydroxy-21,21-äthylendioxy-20-oxopregn-4-en-3-on (VII) lieferte.

Experimentell*³

3,3;21,21-Bis(äthylendioxy)-20-oxopregn-5-en (II)—Zu der Lösung von 8 g Reichsteins Substanz S (I) und 100 ccm 2-Methyl-2-äthyl-1,3-dioxolan in 100 ccm abs. Dioxan wurden 200 mg *p*-Toluolsulfonsäure (Monohydrat) gegeben und die Lösung 1.5 Std. unter Rückfluss gekocht. Hierauf wurde die Flüssigkeit im Vakuum abgedampft, der Rückstand mit einer Lösung von 70 mg NaHCO₃ in 50 ccm H₂O versetzt und mit Benzol ausgeschüttelt. Die mit H₂O gewaschenen organischen Extrakt lieferten nach dem Trocknen und Eindampfen einen öligen Rückstand, der an Florisil chromatographisch gereinigt wurde. Aus den mit Benzol eluierten Hauptfraktionen konnten durch Kristallisation aus Benzol insgesamt 3.2 g (34%) des (II) isoliert werden. Blättchen vom Schmp. 178~180°. [α]_D²⁵ +46° (c=0.7, CHCl₃). Zur Analyse wurden sie bei 80° im Hochvakuum getrocknet. C₂₅H₃₆O₅—Ber.: C, 72.08; H, 8.71. Gef.: C, 72.14; H, 8.72. IR (in Nujol): 1729 cm⁻¹ (20-CO).

Bei dem weiteren Eluieren mit Benzol lief eine ölige Fraktion nach, welche sofort mit Ac₂O und Pyridin auf üblicher Weise acetyliert wurde. Das hierbei erhaltene Acetat (20 mg) schmolz nach Umkristallisieren aus Benzol bei 270~274° und erwies sich nach Mischschmp. als identisch mit 3-Monoäthylketal (III).

3,20-Dioxopregn-4-en-21-al (IV)—310 mg (II) wurden in 40 ccm MeOH gelöst, mit 1.5 ccm 10-proz. H₂SO₄ versetzt und 20 Min. zur Siedehitze gebracht. Dann wurde die Lösung mit einer Lösung von K₂CO₃ in Wasser neutralisiert, das MeOH im Vakuum entfernt und die abgeschiedene Kristalle abgesaugt. Sie lieferten nach Umlösen aus Benzol 180 mg (IV). Nadeln vom Schmp. 224~227°. [α]_D²⁵ +135.5° (c=1.3, CHCl₃). Zur Analyse wurden sie bei 60° im Hochvakuum getrocknet. C₂₁H₂₈O₅—Ber.: C, 76.79; H, 8.59. Gef.: C, 76.76; H, 8.82. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 241 m μ (ϵ 16200). IR (in Nujol) cm⁻¹: 1728 und 1701 (20-CO und 21-CO), 1656 (3-CO), 1616 (4-en).

284 mg (IV) und 93 mg *o*-Phenylendiamin wurden in 50 ccm AcOH gelöst und nach Verdrängen des O₂ durch N₂ wurde die Lösung 30 Min. unter Rückfluss gekocht. Nach Eindampfen im Vakuum und nach Zugabe von Wasser wurde das Reaktionsprodukt mit Benzol extrahiert und die Benzol-Lösung nach Trocknen mit Na₂SO₄ an Al₂O₃ chromatographiert. Mit Benzol wurde zunächst ein gelbes Öl eluiert. Das 17β-(Quinoxalino-2)-androst-4-en-3-on befand sich aber, in den nachfolgenden Benzol-AcOEt-Fractionen. Es stellte nach chromatographischer Reinigung mit Al₂O₃ ein blassgelbes Öl dar. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ m μ (ϵ): 240 (14800), 320 (1360), 360 (480).

3-Oxo-ätiochol-4-ensäure⁶⁾ (V)—100 mg (IV) wurden mit 50 ccm 50-proz. AcOH versetzt und 6 Std. mit 2 g NaBiO₃ unter Rühren bei Zimmertemperatur oxydiert. Nach Zugabe von 100 ccm 3N KOH extrahiert das Reaktionsprodukt mit Benzol. Darauf wurden die Benzolextrakt mit Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Durch Umkristallisation des Rückstands aus Benzol er-

*² Die vorliegende Arbeit dementiert nicht die Möglichkeit der 20,20-Äthylendioxy-21-al-Formel. Trotzdem schlugen wir die Formel (II) aus folgenden Grund vor: (i) Mancera, *et al.* (J. Am. Chem. Soc., **77**, 5669(1955)) erhielten bei Ketalisierung von Reichsteins Substanz S mittels Benzylalkohol das 21,21-Bis(benzyloxy)-Derivat, dessen Struktur durch Überführung zum Cortexon (21-Hydroxypregn-4-en-3,20-dion) festgestellt wurde. (ii) Wird die 20,21-Glyoxal-Gruppierung, die aus 17,21-Dihydroxy-20-oxo-Gruppierung des Steroid-Gerüsts durch Mattox-Umlagerung zuerst hervorkommt, von dem Ketalisierungsmittel angegriffen, so träte die Ketalisierung von 21-Oxo-Gruppe bevorzugt ein, da die 20-Oxo-Gruppe an Ketalisierungsreaktion immer etwas sterisch behindert ist.

*³ Die Schmp. sind im Flüssigkeitbad bestimmt und nicht korrigiert. Die Elementaranalysen und Spektalaufnahmen wurden in unseren Speziallaboratorien ausgeführt. Dafür danken wir Frl. H. Yamanouchi, K. Hayashi und N. Kurosawa.

6) P. L. Julian, E. W. Meyer, H. C. Printy: J. Am. Chem. Soc., **70**, 887(1948).

hielten die Kristalle vom Schmp. 238~243°. $[\alpha]_D^{25} + 160^\circ (c=0.7, \text{CHCl}_3)$. Zur Analyse wurden sie bei 60° im Vakuum getrocknet. $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$ —Ber.: C, 75.91; H, 8.92. Gef.: C, 75.61; H, 8.60.

3,3:21,21-Bis(äthylendioxy)-20 β -hydroxypregn-5-en (VI)—Zu einer Lösung von 350 mg (II) in 30 ccm EtOH und 30 ccm Tetrahydrofuran wurden 3 ccm 2.5-proz. NaOH und 500 mg NaBH₄ gegeben und die Mischung 6 Std. lang unter Rückfluss gekocht. Nach Zugabe von 20 ccm H₂O wurde die Mischung im Vakuum eingengt und die abgeschiedene Kristalle abfiltriert. Nach Umkristallisation aus AcOEt zeigten sie Schmp. 180~182° (250 mg), $[\alpha]_D^{25} - 47.2 (c=0.89, \text{CHCl}_3)$. Zur Analyse wurden sie bei 60° im Hochvakuum getrocknet. $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_5$ —Ber.: C, 71.74; H, 9.15. Gef.: C, 71.42; H, 9.14. IR (in Nujol): 3630 cm⁻¹ (HO).

21,21-Äthylendioxy-3-oxo-20 β -hydroxypregn-4-en (VII)—Zu einer Lösung von 100 mg (VI) in 30 ccm MeOH wurden 1.1 ccm 10-proz. H₂SO₄ gegeben und 20 Min. unter Rückfluss gekocht. Nach Neutralisieren mit NaHCO₃-Lösung wurde MeOH im Vakuum abgedampft, der Rückstand mit H₂O versetzt und ausgeäthert. Die Äther-Auszüge wurden nach Trocknen mit Na₂SO₄ eingedampft und der Rückstand an Al₂O₃ chromatographiert. Die mit Benzol-AcOEt-Gemisch (9:1) eluierten Fraktionen wurden aus Äther umkristallisiert, wobei 70 mg (VII) vom Schmp. 133~135° erhalten wurden. $[\alpha]_D^{25} + 73^\circ (c=1.02, \text{CHCl}_3)$. Zur Analyse wurden sie bei 40° im Hochvakuum getrocknet. $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_4$ —Ber.: C, 73.76; H, 9.15. Gef.: C, 73.37; H, 9.35. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 242 m μ (ϵ 18400). IR (in Nujol) cm⁻¹: 3646 (HO), 1662 und 1617 (4-en-3-on).

Zusammenfassung

Die Ketalisierung von Reichsteins Substanz S mit 2-Methyl-2-äthyl-1,3-dioxolan in Gegenwart von *p*-Toluolsulfonsäure führte in 34-proz. Ausbeute zu 3,3; 21,21-Bis-(Äthylendioxy)-20-oxopregn-5-en; letztere wurde durch Verseifung zu 17 β -Glyoxylylandrost-4-en-3-on übergeführt.

(Eingegangen am 11. Mai, 1959)

UDC 547.92.07

97. Kyosuke Tsuda, Eiji Ohki und Junnosuke Suzuki: Untersuchungen über Steroide. XIV.¹⁾ Reduktion von Reichsteins Substanz S mittels Zink in Essigsäure.

(Institut für angewandte Mikrobiologie,*¹ Universität Tokio)

Es war bekannt, dass bei der Einwirkungen von Zink in Essigsäure auf Steroid-Ketol bzw. -Ketolacetate unter Abspaltungen von HO- bzw. AcO-Reste die entsprechenden Steroid-Ketone vorwiegend gewonnen werden, nämlich bei 2-Acetoxy-3-oxo-,²⁾ 5-Hydroxy-6-oxo-,³⁾ 6-Hydroxy-3-oxo-4-en,⁴⁾ 11-Hydroxy-12-oxo-,⁵⁾ 12-Hydroxy-11-oxo-⁵⁻⁷⁾ und sogar 17-Hydroxy-20-oxo-steroide.^{8,9)}

Wir untersuchten die analoge Reaktion am Reichsteins Substanz S (17 α ,21-Dihydroxy-3,20-dioxopregn-4-en) (I). Bei der Reduktion nach der Methode von Norymberski⁹⁾ erhielten wir ein Gemisch, das neben dem früher von diesem Autor erhaltenen Reaktionsprodukt,

*¹ Yayoi-cho, Bunkyo-ku, Tokio (津田恭介, 大木英二, 鈴木準之助).

1) XIII. Mitt. K. Tsuda, N. Ikekawa, S. Nozoe: Dieses Bulletin, **7**, 519(1959).

2) F. Sondheimer, St. Kaufmann, J. Romo, H. Martinez, R. Rosenkranz: J. Am. Chem. Soc., **75**, 4712(1953).

3) D. H. R. Barton, C. H. Robinson: J. Chem. Soc., **1954**, 3045.

4) L. F. Fieser: J. Am. Chem. Soc., **75**, 4377(1953).

5) R. S. Rosenfeld, T. F. Gallagher: *Ibid.*, **77**, 4367(1955).

6) M. Roth, G. Sancy, R. Anliker, O. Jeger, H. Heusser: Helv. Chim. Acta, **36**, 1909(1953).

7) J. H. Chapman, J. Elks, G. H. Phillips, L. J. Wyman: J. Chem. Soc., **1956**, 4344.

8) J. K. Norymberski: *Ibid.*, **1956**, 517.

9) R. S. Rosenfeld: J. Am. Chem. Soc., **79**, 5540(1957).