

Kyosuke Tsuda, Toshinobu Asai, Yoshihiro Sato, und Tokuji Tanaka :

Mikrobiologische Hydroxylierung der Steroide. VIII.¹⁾

15 α -Hydroxyliertes Reichsteins Substanz S.

(Institut für angewandte Mikrobiologie,*¹ Universität Tokio)

Durch Einwirkung von *Helminthosporium sativum* PAMMEL, KING ET BAKKE*² auf Reichsteins Substanz S (17 α ,21-Dihydroxypregn-4-en-3,20-dion) (I) in mind. 40-proz. Ausbeute entstand ein, nach seiner Analyse monohydroxyliertes Derivat vom Schmp. 216~218°; $[\alpha]_D^{30} +145^\circ$ (Methanol). Diesem Produkt erteilen wir die Konstitution des 15 α -Hydroxylierten Reichsteins Substanz S (15 α ,17 α ,21-Trihydroxypregn-4-en-3,20-dion) (II), welches von Bernstein, *et al.*³⁾ durch Einwirkung von *Hormodendrum viride* auf Reichsteins Substanz S gewonnen wurde.

Die Konstitution der Verbindung konnte folgendermassen bewiesen werden: Durch Acetylierung mit überschüssigem Acetanhydrid und Pyridin in der Kälte entstand ein Diacetat²⁾(III) vom Schmp. 196~199°, so dass die neue Hydroxy-Gruppe nicht tertiär sein kann. Wurde das Hydroxylierungsprodukt mittels NaBiO₃ oxydiert, so spaltete sich die Seitenkette an C-17 ab und es entstand das bekannte 15 α -Hydroxyandrost-4-en-3,17-dion (IV),³⁾ das nach CrO₃-Oxydation Androst-4-en-3,15,17-trion (V) lieferte. Das letztere zeigte die für β -Diketon charakteristische UV-Absorption (244 und 276 m μ). Die mikrobiologisch eingeführte neue Hydroxy-Gruppe muss sich demgemäss in 15 α -Stellung befunden haben. Dem Monohydroxylierten Reichsteins Substanz S kommt dann die Formel (II) zu.

Weitere Versuche zum Konstitutionsbeweis wurden wie folgt durchgeführt: Bei der Behandlung von (II) mit 1 Mol Acetanhydrid in Dioxan-Pyridin, isolierten wir nach Chromatographie an Silicagel drei kristallinische Acetate ausserdem Ausgangsmaterial. Das erste Produkt vom Schmp. 196~199° (20%) war mit dem Diacetat identisch. Das zweite Reaktionsprodukt vom Schmp. 212~214° (23%) war das 15-Monoacetat (VI), da sein IR-Spektrum keine typische Veränderung in 20-CO Bande (1720 cm⁻¹) zeigte. Das dritte Reaktionsprodukt vom Schmp. 202~205° (10%) wies in seinem IR-Spektrum eine merkwürdige Versetzung der 20-CO Bande nach kürzere Wellenlänge (1736 cm⁻¹) auf, die offensichtlich von 21-Acetoxy-Gruppe herrührt. Es stellte also, das 21-Monoacetat (VII) dar. Bei der Behandlung von 15,21-Diol-Diacetat (III) mit KHCO₃-Methanol wurden das Diol-15-monoacetat (VI) und das Diol (II) erhalten.

Das 15 α -Monoacetat (VI) lieferte mit NaBiO₃ und Essigsäure das 15 α -Acetoxyandrost-4-en-3,17-dion (VIII), dessen IR-Spektrum bei 1743 cm⁻¹ die für 17-CO und Ester-CO typische Bande und bei 1248 bzw. 1043 cm⁻¹ die für Ester C-O- typischen Banden. Durch Acetylierung von (IV) mittels Acetanhydrid-Pyridin ergab sich auch das (VIII). Andererseits lieferte das 21-Monoacetat (VII) durch CrO₃-Oxydation das 15-Oxo-Derivat (IX) vom Schmp. 253.5°, welches von Bernstein, *et al.*³⁾ bereits durch Oxydation von 21-Monoacetat des 15 β -Hydroxylierten Reichsteins Substanz S erhalten wurde.

Im Papierchromatogramm mit dem System Propylenglykol-Toluol³⁾ oder in der

*¹ Yayoi-cho Bunkyo-ku, Tokio (津田恭介, 朝井勇宣, 佐藤良博, 田中篤治).

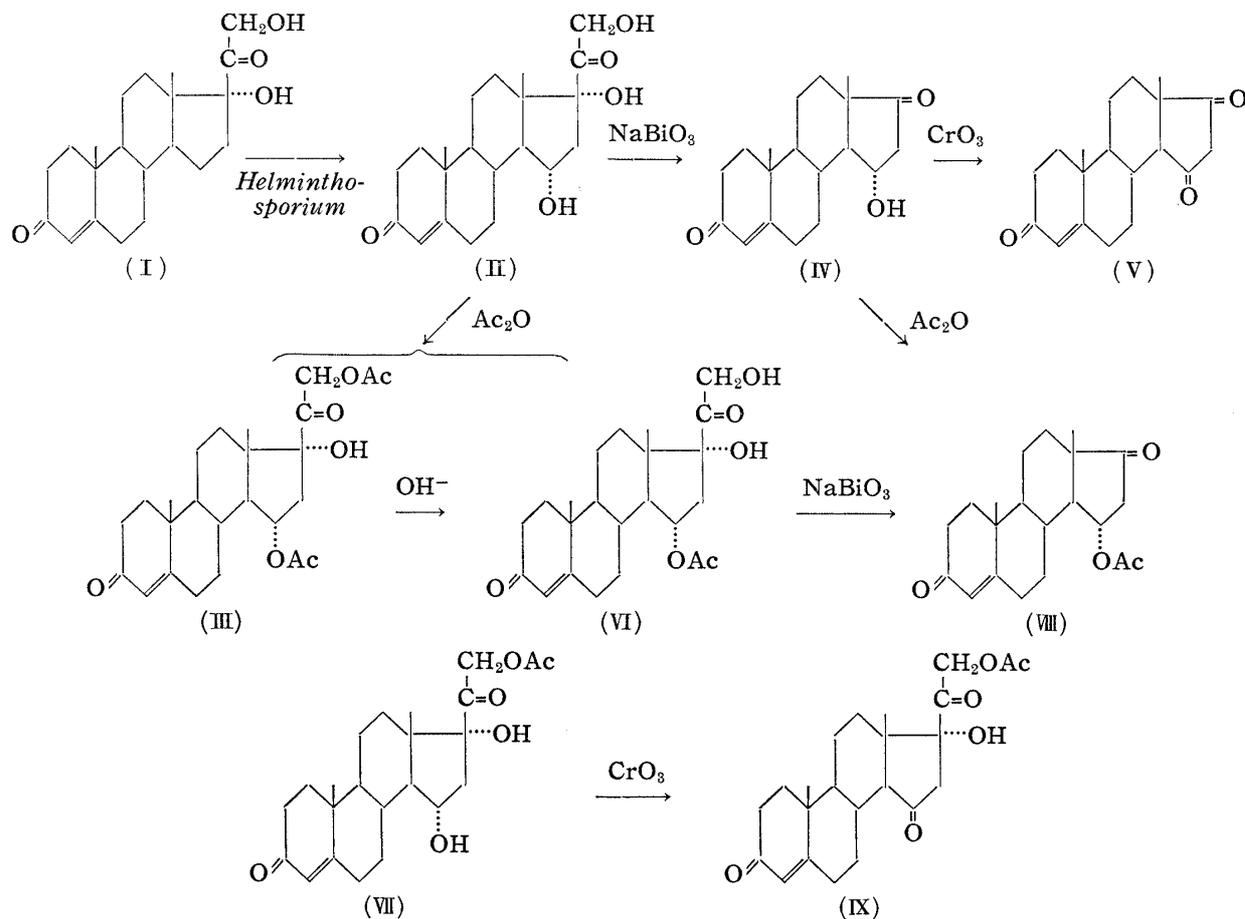
*² Wir danken den Herren Prof. Dr. H. Asuyama und Dr. S. Miyashita (Institut für Pflanzenpathologie der Universität Tokio) bestens für die Überlassung und Bestimmung dieser Stämme.

1) VII. Mitt. K. Tsuda, *et al.*: Dieses Bulletin, 7, 370(1959).

2) S. Bernstein, L. I. Feldman, W. S. Allen, R. H. Blank, C. E. Linder: Chem. & Ind. (London), 1956, 111.

3) R. B. Burton, A. Zaffaroni, E. H. Keutmann: J. Biol. Chem., 188, 763(1951).

Partitionschromatographie an Silicagel lief das 15-Monoacetat schneller als das 21-Monoacetat. Die Hydroxyl-Gruppe an C-15 α muss daher die grössere Polarität als diejenige an C-21 besitzen.⁴⁾ Ferner wurde die Beweglichkeit von der 15 α -Hydroxylierten Reichsteins Substanz S beim Papierchromatogramm mit derjenigen von 11 α -Hydroxylierten (Epicortisol) bzw. der 6 β -Hydroxylierten Reichsteins Substanz S verglichen, daraus ergab sich die Reihenfolge : 6 β > 11 α > 15 α . Damit war bewiesen, dass 15 α -Hydroxy-Derivat die grösste Polarität unter drei Monohydroxy-Derivaten des Reichsteins Substanz S besitzt.



Dem Japanischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Unterrichtsministerium) danken wir herzlich für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimentell^{*3}

15 α , 17 α , 21-Trihydroxypregn-4-en-3,20-dion (15 α -Hydroxyliertes Reichsteins Substanz S)²⁾ (II)— Die Sporenaufschwemmung von *Helminthosporium sativum* [PAMMEL, BING ET BAKKE wurde in der Nährlösung⁵⁾ 72 Std. bei 27° gezüchtet. Hierauf wurde das Reichsteins Substanz S (I) in MeOH (c=2.5) in einer Konzentration von [50 mg/100 ccm Nährlösung zugegeben und die Mischung unter Schütteln 24 Std. lang fermentiert. Die vom Myzel durch Filtrieren abgetrennte Flüssigkeit wurde

*3 Die Schmp. sind auf dem Kofler-Block bestimmt und noch nicht korrigiert. Wir danken Herrn M. Kato bestens für seine experimentelle Mitarbeit. Ferner möchten wir für die Ausführung der Mikroanalysen Frl. H. Yamanouchi und K. Hayashi (Mikro-Labor dieses Instituts) und für die Aufnahme der IR-Spektren Frl. N. Kurosawa (IR-Spekt.-Labor dieses Instituts) ebenfalls herzlich danken.

4) Über die Polaritätserniedrigung der Hydroxyl-Gruppe an C-21 wies Savard bereits auf die Möglichkeit der Verknüpfung des 20-Ketons mit der 21-Hydroxy-Gruppe in Form eines Wasserstoff-Bindungs hin (K. Savard : J. Biol. Chem., **202**, 457(1953)).

5) T. Asai, K. Tsuda, K. Aida, E. Ohki, T. Tanaka, M. Hattori, H. Machida : J. Gen. & Appl. Microbiol. (Tokio), **4**, 63(1958).

mit AcOEt extrahiert. Die AcOEt-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 Aceton Kristalle vom Schmp. $207\sim 210^\circ$ ergab. Aus 670 mg von (I) ergaben sich 290 mg Rohprodukt (Ausbeute, 42%). Durch mehrmaligen Umkristallisation aus MeOH isolierten wir prismatische Kristalle (II) vom Schmp. $212\sim 214^\circ$. Zur Analyse wurden sie 8 Std. lang im Hochvakuum bei 80° getrocknet. $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5 \cdot \frac{1}{2}\text{CH}_3\text{OH}$ —Ber.: C, 68.22; H, 8.52. Gef.: C, 68.17; H, 8.51.

Bei der Umkristallisation aus Aceton gab das Rohprodukt Kristalle vom Schmp. $216\sim 218^\circ$; $[\alpha]_D^{30} + 145^\circ$ ($c=0.75$, MeOH). Zur Analyse wurden sie 10 Std. lang im Hochvakuum bei 80° getrocknet. $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_5$ —Ber.: C, 69.58; H, 8.34. Gef.: C, 69.51; H, 8.32. UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 241.7 $\text{m}\mu$ (ϵ 14900). IR (in Nujol) cm^{-1} : 3500, 3450, 3390 (HO); 1710 (20-CO); 1665 (3-CO); 1620 (4-en). IR (in Dioxan) cm^{-1} : 3470 (HO); 1712 (20-CO); 1678 (3-CO); 1623 (4-en).

Diacetat von (II)²⁾—682 mg (II) wurden 40 Std. lang mit 16 ccm abs. Pyridin und 16 ccm Ac_2O bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann goss man sie in 20 ccm Eiswasser und saugte den weissen, kristallisierten Niederschlag ab. Das Rohprodukt (800 mg) wurde aus MeOH kristallisiert und schmolz dann bei $196\sim 199^\circ$. Zur Analyse wurden sie bei 60° im Hochvakuum getrocknet. $[\alpha]_D^{15} + 134^\circ$ ($c=0.7$, CHCl_3). $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_7$ —Ber.: C, 67.24; H, 7.68. Gef.: 66.90; H, 7.76. UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 240 $\text{m}\mu$ (ϵ 20100). IR (in Nujol) cm^{-1} : 3330 (HO); 1758, 1743 (Acetyl-CO); 1737 (20-CO); 1644 (3-CO); 1628 (4-en); 1251, und 1235 (Acetat C-O-). IR (in CHCl_3) cm^{-1} : 3450 (HO); 1750 (Schulter), 1744 (Schulter), und 1736 (Acetyl-, 20-CO); 1667 (3-CO); 1621 (4-en).

Monoacetat von (II)—660 mg (II) wurden 60 Std. lang mit 13 ccm abs. Pyridin, 25 ccm abs. Dioxan und 194 mg Ac_2O bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Mischung wurde mit Eiswasser versetzt, mit verd. HCl neutralisiert und mehrmals mit AcOEt ausgeschüttelt. Die AcOEt-Auszüge wurden mit Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft, wobei 810 mg öliges Produkt gewonnen wurde. Es enthielt nach papierchromatographischer Untersuchung zwei neue Verbindungen ausser (II) und (III). Aus dem Rohprodukt liessen sich durch Kristallisieren aus 40 ccm Benzol 110 mg des schwer löslichen Diols (II) isolieren. Die Mutterlaugen wurden an 15 g Silicagel chromatographiert, wobei Fraktionen von je 50 ccm getrennt aufgefangen wurden. Das Resultat wird in Tabelle I gezeigt.

TABELLE I.

Frakt. Nr.	Eluierungsmittel	Eluat (mg)	Papierchromatogramm ^{a)}	
			Rf ^{b)}	Färbung mit SbCl_5
1~5	Benzol	0	—	—
6~7	Benzol-Äther (1 : 1)	125	1 ^{c)}	violett
8	Äther	72	0.73~0.75	gelbbraun
9	Äther	105	{ 0.73~0.75 und 0.28~0.30	gelbbraun gelbbraun-grünbraun
10	Äther	13	0.28~0.30	gelbbraun-grünbraun
11~12	Äther	0	—	—
13	Äther-MeOH (9 : 1)	12	0.03 ^{d)}	grünbraun

a) Propylenglykol-Toluol-System.⁴⁾

b) Die Laufstrecken der Flecke wurden mit derjenige des Fleckes von Diacetat (III) verglichen, da die letztere am schnellsten lief.

c) 15 α -Hydroxyliertes Reichsteins Substanz S-Diacetat (III).

d) 15 α -Hydroxyliertes Reichsteins Substanz S (II).

Die Fraktionen 6 und 7 bestanden aus (III), welches nach Umkristallisation aus Aceton den Schmp. $197\sim 198^\circ$ zeigte. Die Fraktion 8 enthielt nach papierchromatographischer Untersuchung eine neue Verbindung, die durch Umkristallisieren aus Aceton gereinigt wurde. 15 α -Acetoxy-17 α ,21-dihydroxypregn-4-en-3,20-dion (VI) vom Schmp. $212\sim 214^\circ$ wurde damals als prismatische Kristalle erhalten. $[\alpha]_D^{15} + 119^\circ$ ($c=0.85$, CHCl_3). Zur Analyse wurden sie bei 60° im Hochvakuum getrocknet. $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_6$ —Ber.: C, 68.29; H, 7.97. Gef.: C, 68.32; H, 7.89. IR (in Nujol) cm^{-1} : 3500 (HO); 1745 (Acetyl-CO); 1705 (20-CO); 1660 (3-CO); 1617 (4-en); 1245 (Acetat C-O-). IR (in CHCl_3) cm^{-1} : 3510~3450 (HO); 1735 (Acetyl-CO); 1720 (20-CO); 1667 (3-CO); 1618 (4-en).

Die Fraktion 9 enthielt nach papierchromatographischer Untersuchung zwei Verbindungen, nämlich (VI) und eine neue Verbindung. Diese kristalline Fraktion (Schmp. $187\sim 190^\circ$) wurde daher an 2 g Silicagel wieder chromatographiert, wobei mit Benzol-Äther-Gemischen steigenden Äthergehalts eluiert wurde. Die Fraktionen von Benzol-Äther (von 4 : 1 bis 7 : 3) ergaben 50 mg Kristalle, die nach Umkristallisieren aus Aceton Schmp. $210\sim 212^\circ$ zeigten und mit (VI) identisch waren. Aus der Fraktionen von Benzol-Äther (von 3 : 2 bis 2 : 3) wurden 41 mg Kristalle vom Schmp. 200° gewonnen, die nach zweimaligem Umkristallisieren aus Aceton Schmp. $202\sim 205^\circ$ zeigten. Das hierbei erhaltene

21-Monoacetat (VII) wurde bei 60° im Hochvakuum getrocknet und analysiert. $C_{23}H_{32}O_6$ —Ber.: C, 68.29; H, 7.97. Gef.: C, 68.12; H, 7.95. $[\alpha]_D^{18} + 181^\circ$ ($c=0.78$, $CHCl_3$). UV: λ_{max}^{MeOH} 242 m μ (ϵ 18400). IR (in Nujol) cm^{-1} : 3535 und 3445 (HO); 1742 (Acetyl-CO); 1720 (20-CO); 1645 (3-CO); 1611 (4-en); 1250 (Acetat C-O-). IR (in $CHCl_3$) cm^{-1} : 3500~3460 (HO); 1751 (Acetyl-CO); 1736 (20-CO); 1662 (3-CO); 1618 (4-en).

Die Fraktion 10 war papierchromatographisch einheitlich. Daraus ergab sich nach Umkristallisation aus Aceton das (VII) vom Schmp. 202~205°. Die Fraktion 13 bestand aus unveränderten (II).

NaBiO₃-Oxydation von (II)—258 mg (II) wurden in 50 ccm einer 50-proz. AcOH gelöst, mit 4 g NaBiO₃ versetzt und 4.5 Std. lang bei Zimmertemperatur geschüttelt. Dann wurde die Mischung mit 100 ccm H₂O versetzt, mit 108 ccm 3N KOH neutralisiert und mit Benzol geschüttelt. Die entstehende Niederschläge wurden durch Filtrieren entfernt und aus dem Filtrat wurde die Benzol-Schicht abgetrennt. Hierauf wurde die Benzol-Lösung mit Wasser gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft. 160 mg Kristalle vom Schmp. 185~188° wurden gewonnen. Das erhaltene 15 α -Hydroxyandrost-4-en-3,17-dion (IV)³ wies nach Umkristallisieren aus Aceton-Äther Schmp. 196~197.5° auf. $[\alpha]_D^{15.5} + 223^\circ$ ($c=0.7$, MeOH). $C_{19}H_{26}O_3$ —Ber.: C, 75.46; H, 8.67. Gef.: C, 75.61; H, 8.67. UV: λ_{max}^{MeOH} 241 m μ (ϵ 18400). IR (in Nujol) cm^{-1} : 3410 (HO); 1746 (17-CO); 1664 (3-CO); 1616 (4-en).

178 mg (IV) wurden in 1.7 ccm Pyridin aufgenommen und zu einer Suspension von Pyridin-CrO₃-Komplex (178 mg CrO₃ in 1.7 ccm Pyridin) gegeben. Das Gemisch wurde 10 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt, in Eiswasser gegossen und in üblicher Weise aufgearbeitet. Das resultierende ölige Rohprodukt (76 mg) chromatographierte man an 1.5 g Silicagel. Mit Benzol liessen sich 55 mg (IV) und 11 mg Androst-4-en-3,15,17-trion (V)³ isolieren. Nach Umkristallisieren aus Äther schmolz das (V) bei 169~171°. UV: λ_{max}^{MeOH} 241 m μ (ϵ 21000); UV (in 2% KOH) λ_{max}^{MeOH} m μ (ϵ): 244 (16100), 276 (20500).

Hydrolyse von Diacetat (III)—334 mg (III) wurden in 100 ccm MeOH aufgenommen, mit der Lösung von 340 mg KHCO₃ in 6 ccm H₂O versetzt und 17 Std. lang bei Zimmertemperatur stengelassen. Hierauf wurde MeOH im Vakuum gedampft und der Rückstand mit $CHCl_3$ extrahiert. Nach der Aufarbeitung in üblicher Weise wurden 280 mg der rohen Kristalle gewonnen, die nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Aceton das 15-Monoacetat (VI) vom Schmp. 212~214° lieferte (124 mg). Die Mutterlauge wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand durch Chromatographieren mit Silicagel gereinigt, wonach 85 mg von (VI) und 45 mg von (II) erhalten wurden.

CrO₃-Oxydation von (VII)—30 mg (VII) wurden in 0.5 ccm AcOH gelöst, mit der Lösung von 5.5 mg CrO₃ in 0.15 ccm AcOH versetzt und 1 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach Zugabe von Eiswasser wurde das Produkt mit AcOEt extrahiert. Das resultierende Produkt zeigte nach einmaligem Umkristallisieren aus AcOEt den Schmp. 251~253.5° (13 mg) und stellte das 21-Acetoxy-17 α -hydroxypregn-4-en-3,15,21-trion (IX)³ dar. Zur Analyse wurde es bei 40° im Hochvakuum getrocknet. $[\alpha]_D^{20} + 124^\circ$ ($c=0.64$, $CHCl_3$). $C_{23}H_{30}O_6$ —Ber.: C, 68.63; H, 7.51. Gef.: C, 68.51; H, 7.53. UV λ_{max}^{MeOH} 241 m μ (ϵ 15300). IR (in Nujol) cm^{-1} : 3370 (HO); 1758 und 1748 (15-CO und Acetyl-CO); 1727 (20-CO); 1647 (3-CO); 1617 (4-en); 1234 (Acetat C-O-).

NaBiO₃-Oxydation von (VI)—94 mg (VI) wurden in 18 ccm 50-proz. AcOH gelöst, mit 1.4 g NaBiO₃ versetzt und 6 Std. lang bei Zimmertemperatur geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde mit H₂O verdünnt, mit 40 ccm 3N KOH neutralisiert und mit Benzol extrahiert. Nach üblicher Arbeitung wurde ein öliges Produkt (40 mg) gewonnen, welches nach Chromatographie an Silicagel ein amorphes (VIII) lieferte. Im IR zeigte das (VIII), gelöst in $CHCl_3$, Banden bei 1743 (17-CO und Acetyl-CO), 1667 (3-CO), 1616 (4-en) und 1249 cm^{-1} (Acetat C-O-). Aus (IV) ergab sich durch Acetylierung ein amorphes Produkt, welches sich in seinen IR-Spektren als völlig identisch mit (VIII) erwies. Damit war bewiesen, dass (VIII) das 15 α -Acetoxyandrost-4-en-3,17-dion darstellt.

(Eingegangen am 11. Mai, 1959)