

Palmitic Acid—The slightly yellow crystals deposited from fraction II of Fukuoka product were recrystallized from MeOH to colorless lustrous scales, m.p. 62.5~63.2°. The mixed melting point with palmitic acid did not show any depression. *Anal.* Calcd. for $C_{16}H_{32}O_2$: C, 74.94; H, 12.58; mol. wt., 256.4. Found: C, 75.02; H, 12.63; mol. wt. (titration), 253.9.

Its *p*-Bromophenacyl ester: m.p. 85.3~86.0°. *Anal.* Calcd. for $C_{24}H_{37}O_3Br$: C, 63.57; H, 8.23. Found: C, 63.71; H, 8.32. Mixed melting point with the authentic sample did not show any depression and their UV and IR spectra agreed completely.

The author wishes to express his gratitude to Dr. T. Ukai, President of this College, for his encouragement, and to the late Prof. T. Harada and Dr. Y. Kishimoto for their support and helpful discussions. The author is also indebted to Dr. T. Yoshida, Takasago Perfumery Co. Ltd., and Dr. I. Nishioka, Kyushu University, for giving him samples. Thanks are also due to Sankyo Co. Ltd., and Dr. Takahashi and Miss Suzuki of Osaka University for recording infrared spectra, to Miss Saito of this College for elemental analyses, and to Messrs. K. Aoyama, M. Sagara, Y. Tomisawa, M. Ide, and Y. Watanabe of this College, for their technical assistances.

Summary

Three new compounds, peucedalactone, $C_{16}H_{18}O_5$, m.p. 159.0°, isopeucedalactone, $C_{16}H_{18}O_5$, m.p. 122.5°, and peucin, $C_{15}H_{14}O_4$, m.p. 291.5~292.0°, were isolated from the ether extract of *Peucedanum japonicum* THUNB. Peucedalactone and isopeucedalactone were obtained, together with a short-chain fatty acid (*p*-acid), after saponification of a resinous distillate, b.p. 210~220°, of the extract. All these three new compounds were optically active and seemed to have coumarin-like skeleton. Some of their properties were also described. Bergapten and palmitic acid were isolated besides above compounds.

(Received August 23, 1960)

UDC 542.98[576.851.5]:547.92:557.17

143. Kyosuke Tsuda, Hiroshi Iizuka, Yoshihiro Sato, Atsushi Naito, and Mitsugi Kato: Untersuchungen auf dem Gebiet der mikrobiologischen Umsetzung. XIV.¹⁾ C_1 -Dehydrierung von Reichsteins Substanz S Hydrocortison, Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron durch *Bacillus pulvifaciens*. (1).

(Institut für angewandte Mikrobiologie,*¹ Universität Tokio)

Betreffs der mikrobiologischen C_1 -Dehydrierung des 3-Oxo-4-en-steroids sind von anderen Autoren schon die folgenden Mikroben als nutzbar angegeben worden: *Alternaria* Arten,²⁾ *Calonectria decora*,²⁾ *Didymella lycopersici* KLEB.,³⁾ *Fusarium solani*,⁴⁾ *Bacillus sphäricus* ATCC No. 7055,⁵⁾ *Corynebacterium simplex*⁶⁾ und *Pseudomonas testosteroni* ATCC No. 11996.⁷⁾

*¹ Yayoi-cho, Bunkyo-ku, Tokio (津田恭介, 飯塚 広, 佐藤良博, 内藤 敦, 加藤彌次).

1) XIII. Mitt: H. Iizuka, A. Naito, Y. Sato: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **7**, 118 (1961).

2) E. Vischer, Ch. Mystre, A. Wettstein: *Helv. Chim. Acta*, **38**, 835 (1955).

3) *Idem*: *Ibid.*, **38**, 1502 (1955).

4) S. A. Szpilfogel, P. A. van Hemert, M. S. Dewinter: *Rec. trav. chim.*, **75**, 1227 (1956).

5) T. H. Stout, W. J. McAleer, J. M. Chemerda, M. A. Kozlowski, R. F. Hirschmann, V. Marlatt, R. Miller: *Arch. Biochem. Biophys.*, **59**, 304 (1955).

6) A. Nobile, W. Charney, P. L. Perlman, H. L. Herzog, C. C. Payne, M. E. Tully, M. A. Jevnik, E. B. Hershberg: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4184 (1955).

7) H. Levy, P. Talalay: *Ibid.*, **79**, 2685 (1957).

Im folgenden berichten wir über die Resultate, die erhalten wurden, wenn 3-Oxo-4-en-steroider der C₁₉- und C₂₁-Reihe mit Kulturen von *Bacillus pulvifaciens* IAM N-19-2 umgesetzt wurden. Die Versuche wurden bei 27~30° unter aeroben Konditionen in Schüttelkulturen durchgeführt. Die Umsetzungen wurden zunächst papierchromatographisch verfolgt und hierauf in präparativem Masstab vorgenommen. Aus 17,21-Dihydroxypregn-4-en-3,20-dion (Reichsteins Substanz S) (I) erhielten wir ein Reaktionsprodukt vom Schmp. 217.5~219° mit 42% Ausbeute. Aus den Analysenresultaten, spez. Drehung,⁸⁾ Papierchromatographie,⁹⁾ UV-Spektrum⁹⁾ und IR-Spektrum¹⁰⁾ konnte die Einführung einer Doppelbindung an die C₁-Stellung entnommen werden. Somit ergab sich dafür die Struktur von 17,21-Dihydroxypregna-1,4-dien-3,20-dion (II), welche dem von Vischer, *et al.*²⁾ aus (I) durch Einwirkung von *Fusarium solani* gewonnenen Produkt gegeben wurde. Zur weiteren Bestätigung der Struktur von (II) wurde das Produkt (II) durch Chromtrioxyd-Oxydation in das bekannte Androsta-1,4-dien-3,17-dion (III)¹¹⁾ übergeführt und mit dem authentischen Präparat direkt verglichen.

11 β ,17,21-Trihydroxypregn-4-en-3,20-dion (Hydrocortison) (IV) lieferte bei der Umsetzung mit denselben Mikroben das C₁-Dehydrierungsprodukt vom Schmp. 220~222°, welches sich in allen Daten mit 11 β ,17,21-Trihydroxypregna-1,4-dien-3,20-dion (Prednisolon) (Va)¹²⁾ identisch erwies (Ausbeute 46%). Dieses Produkt ergab bei der Acetylierung das Monoacetat (Vb) vom Schmp. 228~229°, das durch Chromtrioxyd-Oxydation in das bekannte 17,21-Dihydroxypregna-1,4-dien-3,11,20-trion¹³⁾ (VI) übergeführt wurde. Andererseits lieferte das Produkt bei der Behandlung mit Natriumbismuthat das 11 β -Hydroxyandrosta-1,4-dien-3,17-dion¹³⁾ (VII).

Zum dritten Substrat der mikrobiologischen Umsetzung wurde das 3 β -Hydroxypregn-5-en-20-on (Pregnenolon) (VIIIa) verwendet. Dabei entstanden zwei krist. Stoffe mit der Ausbeute von je 50% bzw. 30%. Dem Hauptprodukt vom Schmp. 150~151° erteilten wir die Struktur von Pregna-1,4-dien-3,20-dion²⁾ (X). Diese Struktur ergab sich aus den Analysenresultaten, den UV-, IR-Spektren und der Dienon-Phenol-Umlagerung;¹⁴⁾ bei der Behandlung dieses Produkts mit Acetanhydrid und Schwefelsäure entstand ein Phenolacetat (XIa) vom Schmp. 156.5~158°, welches durch methanolische Kalilauge ein Verseifungsprodukt vom Schmp. 263~267°, nämlich 1-Hydroxy-4-methyl-17 β -acetylestera-1,3,5(10)-trien (XIb), lieferte. Das zweite Produkt vom Schmp. 129~130°, das bei dieser Pregnenolon Umsetzung gewonnen wurde, wurde auf direktem Wege mit dem Progesteron (Pregn-4-en-3,20-dion) (IX) verglichen und mit demselben identifiziert. Bei der mikrobiologischen Umsetzung von Pregnenolon-acetat (VIIIb) wurde als Reaktionsprodukt eine Spuren-Menge des (IX) bzw. des (X) papierchromatographisch festgestellt.

Für das letzte Substrat bei der Umsetzung wurde das 3 β -Hydroxyandrost-5-en-17-on (Dehydroepiandrosteron) (XII) verwendet. Dabei wurden je nach Kultivierungsbedingung sieben krist. Stoffe erhalten. Die Ausbeute der einzelnen Produkte unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen wird in Tabelle I gezeigt.

-
- 8) L. M. Reineke : *Anal. Chem.*, **28**, 1853 (1956).
 9) C. Djerassi, E. Ryan : *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 1000 (1949). Vgl. auch (5).
 10) R. N. Jones, K. Dobriner : *Vitamins and Hormones*, **7**, 293 (1949); R. N. Jones, F. Herling : *J. Org. Chem.*, **19**, 1252 (1954); R. N. Jones, F. Herling, Z. Katzenellenbogen : *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 651 (1955).
 11) C. Djerassi, C. R. Scholz : *J. Org. Chem.*, **13**, 697 (1948).
 12) A. Nobile, W. Charney, P. L. Perlman, H. L. Herzog, C. C. Payne, M. E. Tully, M. A. Jevnik, E. B. Hershberg : *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4184 (1955); J. A. Hogg, F. H. Lincoln, A. H. Nathan, A. R. Hanze, W. P. Schneider, P. E. Beal, J. Korman : *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4438 (1955).
 13) H. L. Herzog, C. C. Payne, M. A. Jevnik, D. Gould, E. L. Shapiro, E. P. Oliveto, E. B. Hershberg : *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4781 (1955).
 14) L. F. Fieser, M. Fieser : "Steroids," 327 (1959). Reinhold Publishing Corporation, New York.

Das erste Produkt vom Schmp. 169~170°, das beim chromatographischen Reinigungsversuch mit Silicagel die kleinste Polarität zeigt, war nach allen Daten mit dem bekannten Androst-4-en-3,17-dion¹⁵⁾ (XIII) identisch. Das zweite Produkt vom Schmp. 139.5~140°, das die nächstkleinste Polarität hat, erwies sich nach Schmp., Mischprobe und den physikalischen Daten als identisch mit dem (III). Zur weiteren Bestätigung der Struktur wurde dieses Produkt der Dienon-Phenol-Umlagerungsreaktion¹⁶⁾ unterworfen und in das 1-Hydroxy-4-methylestra-1,3,5(10)-trien-17-on (XIXb) übergeführt.

Das dritte Produkt mit drittkleinsten Polarität besaß einen Schmp. von 196~196.5° und eine Bruttoformel (C₁₉H₂₆O₃). Im IR-Spektrum (in Chloroform) dieses Produkts waren eine 5-gliedrig Ring-Keton-Bande (1737 cm⁻¹) und eine 6-gliedrig Ring-Keton-Bande (1713 cm⁻¹), aber keine OH-Bande sichtbar. Das UV-Spektrum dieses Produkts in Methanol-Lösung wies bei 290.5 m μ eine schwache Absorption (ϵ 93.6) auf, die von einer Keton-Gruppe herrührt. Aber wenn das Produkt in 2-proz. methanolischer Kalilauge gelöst und 1.5 Stdn. stehengelassen wurde, so wurden zwei UV-Absorptionsmaxima bei 370 und 257 m μ (ϵ 2700 und 3600) sichtbar. Aus diesen Daten folgt, daß die Struktur dieses dritten Produktes mit dem 5 α -Androstan-3,6,17-trion¹⁷⁾ (XIV) identisch ist. Dementsprechend wurde das (XIV) aus dem (XIII) über das 6-Brom-Derivat^{18,19)} hergestellt und mit dem mikrobiologischen Umsetzungsprodukt identifiziert. Das Produkt (XIV) führte durch Behandlung mit der 0.2N methanolischer Kalilauge zu dem Androst-4-en-3,6,17-trion²⁰⁾ (XXI), welches mit dem aus

TABELLE I. Reaktionsprodukte und deren Ausbeute bei der Umsetzung von Dehydroepiandrosteron (C₁₉H₂₈O₂) mit *Bacillus pulvificiens*

Produkte	XIII	III	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII
Bruttoformel	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	C ₁₉ H ₂₄ O ₂	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	C ₁₉ H ₂₆ O ₄	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	C ₁₉ H ₂₆ O ₄
Reihenfolge des Abwärtswanderns der einzelnen Produkte bei der Chromatographie	1	2	3	4	5	6	7
Ausbeute je nach Kultivierungs-Konditionen ^{a)}			9%			5%	
		45%	7%				
	18%	25%					
		0.4%	8%	0.3%	4%	0.3%	Spur

a) Zur Nährlösung wurde die folgende Zusammensetzung verwendet: Glukose 1%, Pepton 1%, Bouillon 1% und NaCl 0.3%. Diese Lösung wurde mit N NaOH-Lösung zu pH 7.4 gebracht und zur Kultivierung verwendet; Beispiel A—15 Schüttelkolben (500 ccm) wurden mit je 60 ccm Nährlösung beschickt, bei 120° und 15 lb. sterilisiert, mit je 1 ccm einer Lösung von 500 mg Dehydroepiandrosteron in 17 ccm Methanol versetzt und gleichzeitig mit einer Sporenaufschwemmung von *B. pulvificiens* geimpft. Die Kulturflüssigkeit wurde 88 Std. auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 30° geschüttelt. Beispiel B—5 Schüttelkolben von 5 L Inhalt wurden mit je 1 L Nährlösung beschickt, sterilisiert, mit einer Lösung von 390 mg Dehydroepiandrosteron in 13 ccm Methanol versetzt und mit einer Sporenaufschwemmung geimpft. Die Kultivierung dauerte 90 Std. bei 30°. Der pH-Wert der Kulturflüssigkeit war am Ende der Kultivierung 8.6. Beispiel C—In diesem Fall wurden 50 Schüttelkolben mit 500 ccm Inhalt verwendet. Andere Bedingungen waren fast gleich mit Beispiel A. Beispiel D—Ein Kultivierungstank von 200 L Inhalt wurde mit 100 L Nährlösung beschickt, sterilisiert, mit 80 g Dehydroepiandrosteron versetzt und mit einer Sporenaufschwemmung geimpft. Die Kultivierung dauerte 75 Std. bei 30°.

15) L. Ruzicka, A. Wettstein: *Helv. Chim. Acta*, **18**, 986 (1935).

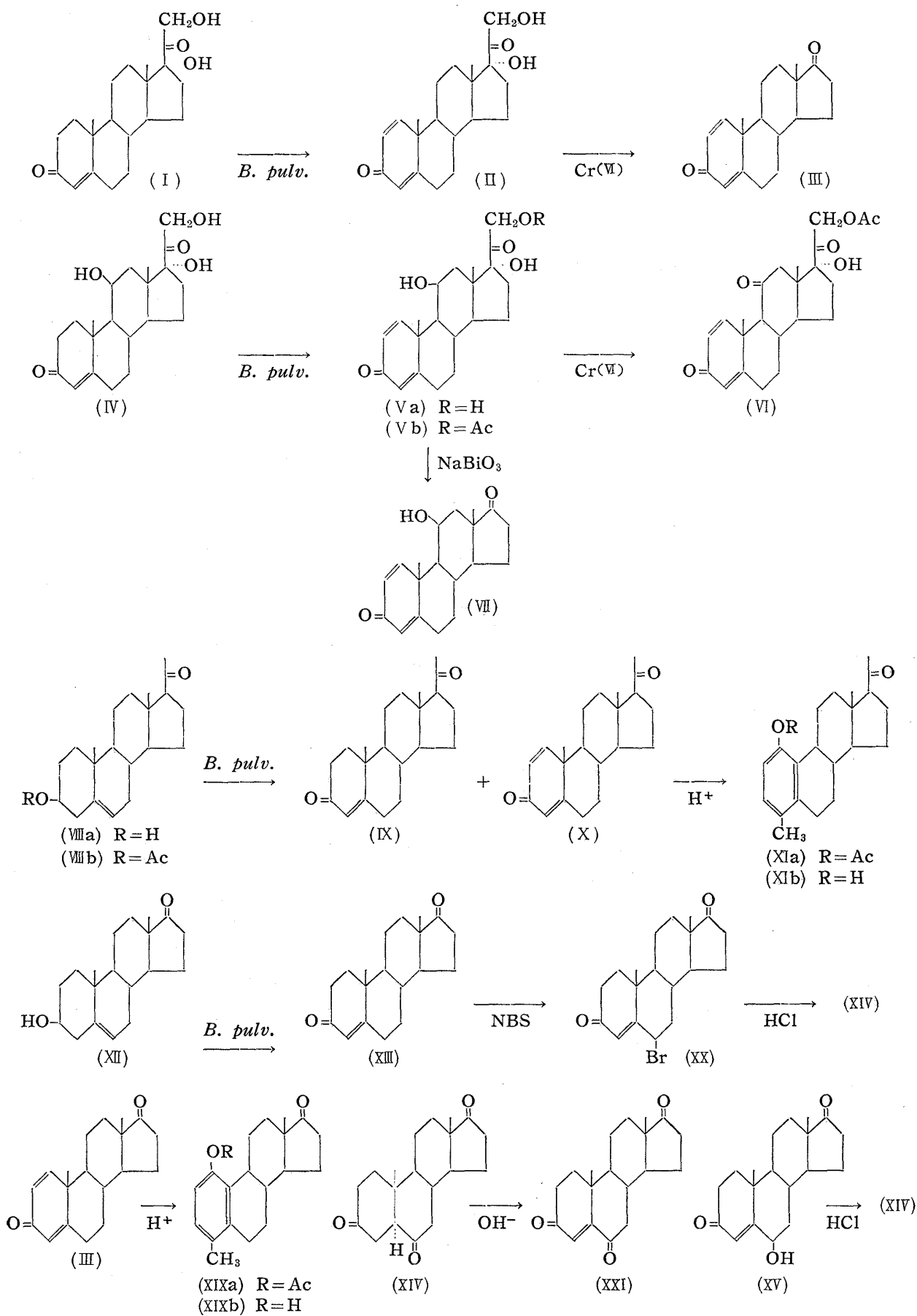
16) A. S. Dreiding, A. Voltman: *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 537 (1954); C. Djerassi, C. Scholz: *J. Org. Chem.*, **13**, 705 (1948).

17) M. Davis, V. Petrov: *J. Chem. Soc.*, **1949** 2563; C. P. Balant, M. Ehrenstein: *J. Org. Chem.*, **17**, 1587 (1952).

18) D. H. R. Barton, E. Miller: *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1066 (1950); C. Djerassi, G. Rosenkranz, J. Romo, St. Kaufmann, J. Pataki: *Ibid.*, **72**, 4534 (1950).

19) F. Sondheimer, St. Kaufmann, J. Romo, H. Martin, G. Rosenkranz: *Ibid.*, **75**, 4712 (1953).

20) M. Ehrenstein: *J. Org. Chem.*, **4**, 506 (1939); Vgl. D. H. R. Barton, J. F. McGhie, M. K. Pradhan, S. A. Knight: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 876 (1955).



6 β -Hydroxy-(I) durch Chromtrioxyd-Oxydation gewonnenen Produkt²¹⁾ identisch war.

Dem vierten Umsetzungsprodukt vom Schmp. 194~195° erteilen wir die Struktur des 6 β -Hydroxyandrost-4-en-3,17-dions²²⁾ (XV). (XV) lieferte mit Acetanhydrid und Pyridin das Monoacetat. Die Struktur von (XV) ergab sich aus den Analysenresultaten, dem IR-Spektrum und dem folgenden chemischen Verhalten. Die Feststellung der 6 β -Stellung der neuen OH-Gruppe basiert auf der Tatsache, daß sich das (XV) durch Behandlung mit methanolischer Salzsäure in das (XIV) verwandelte, und daß die 6 β -Acetoxy-Gruppe von (XIV) durch Behandlung mit dem getrockneten Chlorwasserstoff in Chloroform-Ethanol zur stabileren 6 α -Lage invertiert wurde.

Bei der Umsetzung von (XII) erhielten wir neben den obengenannten vier Produkten noch drei krist. Stoffe vom Schmp. 260~261.5° (XVI, C₁₉H₂₆O₃), vom Schmp. 284~287° (XVII, C₁₉H₂₄O₃) und vom Schmp. 271~273° (XVIII, C₁₉H₂₆O₄). Über die Struktur dieser Verbindungen berichten wir in der folgenden Mitteilung.

Experimentelles*2

Umsetzung von 17,21-Dihydroxypregn-4-en-3,20-dion(Reichsteins Substanz S) (I)—1.5 g (I) wurden der Kultur¹⁾ von *Bacillus pulvifaciens* zugegeben und 96 Std. lang bei 30° fermentiert. Das Reaktionsgemisch wurde mit AcOEt extrahiert und Auszüge, nach Waschen mit NaHCO₃-Lösung und dann mit Wasser, im Vakuum eingedampft. Das erhaltene Produkt (0.85 g) wurde an der 20-fachen Menge Silicagel chromatographiert, wobei sich zuerst mit CH₂Cl₂ die Krist. vom Schmp. 203~204° und dann mit CH₂Cl₂-EtOH (99.5:0.5 bzw. 99:1) die Krist. vom Schmp. 210~212° eluieren ließen. Die ersteren waren mit (I) identisch (55 mg); die letzteren wiesen nach Umkristallisieren aus Aceton den Schmp. 217.5~219° (Zers.) auf, und waren identisch mit 17,21-Dihydroxypregna-1,4-dien-3,20-dion²⁾ (II) (630 mg). C₂₁H₂₈O₄-Ber.: C, 73.22; H, 8.19. Gef.: C, 73.17; H, 8.23. $[\alpha]_D^{24} + 69.6^\circ$ (c=1.005 in CHCl₃). UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 244.5 m μ (ϵ 17900). IR (in Nujol) cm⁻¹: 3401, 3333 (OH); 1712 (20-CO); 1664, 1621, 1610 (1,4-dien-3-on). Acetat: 130 mg (II) wurden mit 2 ccm Ac₂O und 3 ccm Pyridin behandelt. Die übliche Aufarbeitung lieferte 159 mg des rohen Acetats, das nach Umkristallisieren aus Me₂CO den Schmp. 211~213° zeigte. C₂₃H₃₀O₅ (21-Acetat)-Ber.: C, 71.48; H, 7.82. Gef.: C, 71.23; H, 7.90. $[\alpha]_D^{30} + 103^\circ$ (c=0.545 in Dioxan). UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 244 m μ (ϵ 18700). IR (in Nujol) cm⁻¹: 3425 (OH); 1745 (Acetyl-CO); 1721 (20-CO); 1661, 1616, 1608, 896 (1,4-Dien-3-on); 1245 (C-O-). CrO₃-Oxydation von (II): 95 mg (II) wurden in 6 ccm AcOH gelöst, mit einer Lösung von 95 mg CrO₃ in 6 ccm AcOH versetzt und 48 Std. bei Zimmertemperatur stengelassen. Die übliche Aufarbeitung lieferte eine Verbindung vom Schmp. 139~140°, die sich als identisch mit Androsta-1,4-dien-3,17-dion¹¹⁾ (III) erwies. C₁₉H₂₄O₂-Ber.: C, 80.24; H, 8.51. Gef.: C, 79.96; H, 8.44. $[\alpha]_D^{28} + 109.3^\circ$ (c=0.703 in Dioxan). UV: $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ 243 m μ (ϵ 16500). IR (in Nujol) cm⁻¹: 1736 (17-CO); 1658, 1626, 1608, 896 (1,4-Dien-3-on).

Umsetzung von 11 β ,17,21-Trihydroxypregn-4-en-3,20-dion(Hydrocortison) (IV)—1.8 g (IV) wurden in analoger Weise mit Kulturen von *Bacillus pulvifaciens* umgesetzt, wobei sich das Produkt vom Schmp. 203~206° gewinnen ließ (1.1 g). Die durch Chromatographieren mit Silicagel gereinigten Krist. (0.82 g) wurden aus Me₂CO umkristallisiert; Prismen vom Schmp. 220~222°. Dieses Produkt war identisch mit 11 β ,17,21-Trihydroxypregna-1,4-dien-3,20-dion (Prednisolon)¹²⁾ (Va). C₂₁H₂₈O₅-Ber.: C, 69.97; H, 7.83. Gef.: C, 69.60; H, 7.81. $[\alpha]_D^{31} + 99^\circ$ (c=0.44 in Dioxan). UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 243 m μ (ϵ 13700). IR (in Nujol) cm⁻¹: 3497, 3448, 3401 (OH); 1712 (20-CO); 1658, 1618, 1603, 888.8 (1,4-Dien-3-on). Acetat: 590 mg (Va) wurden mit 4 ccm Pyridin und 4 ccm Ac₂O behandelt. Das erhaltene rohe Acetat wurde zuerst durch Chromatographieren mit Florisil und dann durch Umkristallisieren aus Me₂CO gereinigt, wobei sich das 21-Monoacetat vom Schmp. 228~229° (Vb) gewinnen ließ. C₂₃H₃₀O₆-Ber.: C, 68.63; H, 7.51. Gef.: C, 68.59; H, 7.62. $[\alpha]_D^{32} + 118.9^\circ$ (c=0.555 in Dioxan). UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 243 m μ (ϵ 15300). IR (in Nujol) cm⁻¹: 3425, 3300 (OH); 1742 (Acetyl-CO); 1718 (20-CO); 1650, 1605, 1592, 869,6 (1,4-Dien-3-on); 1232 (C-O-). CrO₃-Oxydation von (Vb): 157 mg (Vb) wurden in 30 ccm AcOH gelöst, mit einer Lösung von 21 mg CrO₃ in 4 ccm AcOH versetzt und 20 Std. lang bei Zimmertemperatur stengelassen. Die übliche Aufarbeitung ergab das rohe Produkt (146 mg), welches nach Umkristallisation aus Me₂CO den Schmp. 222~224° zeigte. Dieses Produkt war identisch mit 17,21-Dihydroxypregna-1,4-dien-3,11,20-trion-21-acetat¹³⁾ (VI). C₂₃H₂₈O₆-Ber.: C, 69.98; H, 7.05. Gef.: C, 69.95; H, 7.21. $[\alpha]_D^{32} + 174^\circ$ (c=0.690 in Dioxan). UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 238

*2 Die Schmp. sind auf dem Kofler-Block bestimmt und noch nicht korrigiert.

21) K. Tsuda, H. Iizuka, E. Ohki, Y. Sato, A. Naito, M. Hattori: J. Gen. Appl. Microbiol., 5, 7 (1959).

22) C. P. Balont, C. P. Ehrenstein: J. Org. Chem., 17, 1587 (1952).

$m\mu$ (ϵ 16800). IR (in Nujol) cm^{-1} : 3436 (OH); 1739 (Acetyl-CO); 1709, 1704 (20-,11-CO); 1667, 1631, 1610, 887 (1,4-dien-3-on); 1233 (C-O). NaBiO₃-Oxydation von (Va): 166 mg (Va) wurden in 30 ccm 50 proz. AcOH gelöst, mit 2.56 g NaBiO₃ versetzt und 8 Stdn. bei 10~11° geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 60 ccm H₂O verdünnt, mit 64 ccm 3N KOH neutralisiert und das Produkt mit Benzol extrahiert. Die übliche Aufarbeitung ergab 140 mg Krist., die nach Umkristallisation aus Me₂CO-Et₂O den Schmp. 188~191° zeigten. Sie waren identisch mit 11 β -Hydroxyandrosta-1,4-dien-3,17-dion¹³⁾(VII). C₁₉H₂₄O₃-Ber.: C, 75.97; H, 8.05. Gef.: C, 75.40; H, 8.20. UV: λ_{max}^{EtOH} 242.3 $m\mu$ (ϵ 14400). IR (in Nujol) cm^{-1} : 3480, 3440, 3390 (OH); 1748 (17-CO); 1664, 1614, 1602, 890 (1,4-Dien-3-on).

Umsetzung von 3 β -Hydroxypregn-5-en-20-on (Pregnenolon) (VIIIa)—1.5 g (VIIIa) wurden mit Kulturen von *Bacillus pulvifaciens* umgesetzt und das Reaktionsprodukt auf die übliche Weise mit AcOEt extrahiert. Aus den AcOEt-Auszüge ergaben sich nach Abdampfen des Lösungsmittels Krist. vom Schmp. 142~144° (0.75 g), die nach Umkristallisation aus AcOEt den Schmp. 150~155° zeigten. Sie waren identisch mit Pregna-1,4-dien-3,20-dion²⁾(X). C₂₁H₂₈O₂-Ber.: C, 80.73; H, 9.03. Gef.: C, 80.55; H, 9.07. $[\alpha]_D^{25} + 112^\circ$ ($c=0.843$ in EtOH). UV: λ_{max}^{MeOH} 244.5 $m\mu$ (ϵ 16100). IR (in Nujol) cm^{-1} : 1695 (20-CO); 1661, 1623, 1600, 885 (1,4-Dien-3-on).

Die von den obengenannten Krist. abgetrennten Mutterlaugen wurden vereinigt und eingedampft, wobei sich ein öliges Produkt gewinnen ließ. Es wurde an 40 g Silicagel chromatographiert, wobei folgende Fraktionen getrennt aufgefangen wurden: Frakt. 1 (Benzol~Benzol-2% Et₂O) 40 mg; Frakt. 2 (Benzol-2% Et₂O) 494 mg; Frakt. 3 (Benzol-2% Et₂O~Benzol-5% Et₂O) 513 mg. Frakt. Nr. 1 zeigte nach Umkristallisation aus Et₂O den Schmp. 185~190° und war identisch mit dem Ausgangsmaterial (VIIIa). Frakt. 2 wurde aus EtOH-MeOH-H₂O umkristallisiert, wobei sich Prismen vom Schmp. 129~130° gewinnen ließen. Diese Krist. waren identisch mit Progesteron (IX). C₂₁H₃₀O₂-Ber.: C, 80.21; H, 9.62. Gef.: C, 80.17; H, 9.50. $[\alpha]_D^{25} + 175^\circ$ ($c=0.758$ in Dioxan). UV λ_{max}^{MeOH} 241 $m\mu$ (ϵ 17500). IR (in Nujol) cm^{-1} : 1706 (20-CO); 1669 (3-CO); 1619 (Doppelbindung). Frakt. 3 zeigte nach Umkristallisation aus AcOEt den Schmp. 150~151° und war identisch mit (X). Dienon-Phenol-Umlagerung von (X). Der Lösung von 300 mg (X) in 20 ccm Ac₂O wurde eine Lösung von 20 mg H₂SO₄ in 5.9 ccm Ac₂O zugegeben und 3 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Zugabe von Wasser wurden die abgeschiedenen Krist. abgesaugt und die erhaltenen Krist. vom Schmp. 145~146° (280 mg) aus MeOH umkristallisiert; Nadeln vom Schmp. 156.5~158°. C₂₃H₃₀O₃(4-Methyl-17 α -acetylestera-1,3,5(10)-trien-1-ol acetat (XIa)).-Ber.: C, 77.93; H, 8.58. Gef.: C, 77.90; H, 8.53. UV: λ_{max}^{EtOH} 275.5 (Schulter), 268 $m\mu$ (ϵ 210, 270) und λ_{min}^{EtOH} 252.8 $m\mu$ (ϵ 100). IR (in Nujol) cm^{-1} : 1759 (Acetyl-CO); 1710 (20-CO); 1597, 1586 (Aromatenring); 1211 (C-O-); 828 (Waggingschwingung der 2 benachbarten freien CH). 4-Methyl-17 β -acetylestera-1,3,5(10)-trien-1-ol (XIb): (XIa) wurde durch Einwirkung von MeOH-KOH in das (XIb) vom Schmp. 263~267° (Nadeln aus Me₂CO) verwandelt. C₂₁H₂₈O₂-Ber.: C, 80.73; H, 9.03. Gef.: C, 80.49; H, 9.02. $[\alpha]_D^{25} + 292^\circ$ ($c=0.226$ in CHCl₃). UV: λ_{max}^{EtOH} 285 $m\mu$ (ϵ 1800) und λ_{min}^{EtOH} 249 $m\mu$ (ϵ 60); $\lambda_{max}^{2.5\% KOH-EtOH}$ 303, 248 $m\mu$ (ϵ 3560, 6770) und $\lambda_{min}^{2.5\% KOH-EtOH}$ 273.5, 234.5 $m\mu$ (ϵ 720, 4250). IR (in Nujol) cm^{-1} : 3430 (OH); 1692 (20-CO); 1590 (Aromatenring); 808 (Waggingschwingung der 2 benachbarten freien CH).

Umsetzung von Pregnenolon-acetat (VIIIb)—450 mg (VIIIb) wurden in analoger Weise mit den gleichen Mikroorganismen behandelt. Das hierbei erhaltene Produkt (445 mg) wurde an 30 g Silicagel chromatographiert, wobei sich mit Benzol-Et₂O (99.1:97.3) 139 mg von (VIIIb), mit Benzol-Et₂O (19:1) 10 mg von (IX) und mit Benzol-Et₂O (14:1) 5 mg von (X) eluieren ließen.

Umsetzung von 3 β -Hydroxyandrost-5-en-17-on (Dehydroepiandrosteron) (XII)—Bei der mikrobiologischen Umsetzung von (XII) mit *Bacillus pulvifaciens* ergaben sich untenstehende Produkte. Die Ausbeute der einzelnen Produkte veränderten sich nach den Kultivierungsbedingungen (Tabelle I). Die einzelnen Produkte wurden durch Chromatographie an der 20-fachen Menge Silicagel getrennt.

Androst-4-en-3,17-dion¹⁵⁾ (XIII)—(XIII) ließ sich beim Chromatographieren mit Benzol~Benzol-Et₂O (99:1) eluieren. Prismen vom Schmp. 169~170° (MeOH). C₁₉H₂₆O₂-Ber.: C, 79.68; H, 9.15. Gef.: C, 79.55; H, 9.12. $[\alpha]_D^{25} + 216^\circ$ ($c=1.132$ in CHCl₃). UV: λ_{max}^{EtOH} 239.3 $m\mu$ (ϵ 19500). IR (in Nujol) cm^{-1} : 1740 (17-CO); 1663 (3-CO); 1615 (Doppelbindung). (XIII) wurde mit dem authentischen Präparat direkt verglichen und identifiziert.

Androsta-1,4-dien-3,17-dion¹¹⁾ (III)—Beim Chromatographieren wurde (III) mit Benzol-Et₂O (49:1~25:1) eluiert. Blättchen vom Schmp. 139.5~140° (Me₂CO-Et₂O). C₁₉H₂₄O₂-Ber.: C, 80.24; H, 8.51. Gef.: C, 80.29; H, 8.51. (III) wurde mit dem authentischen Präparat verglichen und identifiziert. Zur weiteren Bestätigung der Struktur wurde (III) der Dienon-Phenol-Umlagerung unterworfen: Der Lösung von 179 mg (III) in 12 ccm Ac₂O wurde eine Lösung von 12 mg H₂SO₄ in 3.5 ccm Ac₂O zugegeben und 3 Stdn. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dieses Reaktionsgemisch wurde auf Eiswasser gegossen und die abgeschiedene Substanz mit Benzol extrahiert. Nach der üblichen Aufarbeitung ließen sich 147 mg eines öligen Produkts gewinnen. Bei der Chromatographie an 15 g Silicagel wurde das Reaktionsprodukt mit Benzol~Benzol-Et₂O (98:2) eluiert; Ausbeute 108 mg. Diese Substanz lieferte nach Verseifung mit KOH-MeOH eine Verbindung vom Schmp. 249~251° (EtOH), die sich nach allen Daten als identisch mit 1-Hydroxy-4-methylestera-1,3,5(10)-trien-17-on (XIXb) erwies.

$C_{19}H_{24}O_2$ -Ber.: C, 80.24; H, 8.51. Gef.: C, 80.12; H, 8.53. UV: λ_{\max}^{EtOH} 285 m μ (ϵ 2240) und λ_{\min}^{EtOH} 249 m μ (ϵ 120). $\lambda_{\max}^{2.5\% KOH-EtOH}$ 303, 248 m μ (ϵ 3970, 7270) und $\lambda_{\min}^{2.5\% KOH-EtOH}$ 273.5 m μ (ϵ 1250). IR (in Nujol) cm^{-1} : 3260 (OH); 1712 (17-CO); 1590 (Aromatenring); 816 (Waggingsschwingung der 2 benachbarten freien CH).

5 α -Androstan-3,6,17-trion¹⁷ (XIV)—Bei der Chromatographie wurde (XIV) mit Benzol-Et₂O (49:1~24:1) eluiert. Nach Umkristallisation aus Me₂CO-Et₂O zeigte (XIV) den Schmp. 196~196.5°. $C_{19}H_{26}O_3$ -Ber.: C, 75.46; H, 8.67. Gef.: C, 75.29; H, 8.63. $[\alpha]_D^{25} +79.5^\circ$ ($c=0.881$ in CHCl₃). UV: λ_{\max}^{MeOH} 290.5 m μ (ϵ 93.6); In 2% KOH-MeOH Lösung veränderte sich das UV-Spektrum in Abhängigkeit von der Zeit. Nach 1.5 Stdn., λ_{\max} 370, 257 m μ (ϵ 2700, 3600) und λ_{\min} 303 m μ (ϵ 630); Nach 18 Stdn., λ_{\max} 371, 261 (Schulter), 258, 253 (Schulter) m μ (ϵ 3470, 4050, 4200, 253) und λ_{\min} 302 m μ (ϵ 780); Nach 64 Stdn., λ_{\max} 370, 267, 263, 259, 253 m μ (ϵ 2600, 2540, 2600, 2570, 2300) und λ_{\min} 296 m μ (ϵ 450). IR (in Nujol) cm^{-1} : 1742 (17-CO); 1720, 1701 (3-, 6-CO). IR (in CHCl₃) cm^{-1} : 1737 (17-CO); 1713 (3-, 6-CO). Zur weiteren Bestätigung der Struktur von (XIV) wurde dieselbe Verbindung nach bekannter Methode^{18,19} hergestellt: (XIII) wurde mit NBS bromiert und das erhaltene 6 β -Bromandrost-4-en-3,17-dion (XX) (Schmp. 162~163°) mit HCl-MeOH behandelt. Das hierbei erhaltene (XIV) war identisch mit dem obengenannten Gährungsprodukt.

Behandlung von (XIV) mit KOH-MeOH: 302.4 mg (XIV) wurden in 30 ccm 0.2N KOH-MeOH gelöst und 14 Std. bei 29~30° stehengelassen. Das hierbei erhaltene Reaktionsgemisch wurde mit 10-proz. AcOH neutralisiert und das MeOH unter verringertem Druck abdestilliert. Aus dem Rückstand wurde das Produkt mit AcOEt extrahiert und mit 10 g Silicagel chromatographisch gereinigt. Das Produkt, Androst-4-en-3,6,17-trion (XXI), wurde dabei mit Benzol-Et₂O (32:1~19:1) eluiert (65 mg). Nach Umkristallisation aus Me₂CO zeigte das (XXI)²⁰ den Schmp. 217~220°. $C_{19}H_{24}O_3$ -Ber.: C, 75.97; H, 8.05. Gef.: C, 75.84; H, 8.10. $[\alpha]_D^{25} +72.5^\circ$ ($c=0.421$ in Me₂CO). UV: λ_{\max}^{MeOH} 250.5 m μ (ϵ 12100); $\lambda_{\max}^{1.5\% KOH-MeOH}$ m μ (ϵ): 256.5 (11400), 370 (8100) und $\lambda_{\min}^{0.5\% KOH-MeOH}$ 300 m μ (ϵ 3160). IR (in Nujol) cm^{-1} : 1739 (17-CO); 1688, 1671 (3,6-Diketon); 1600 (Doppelbindung). (XXI) wurde mit dem authentischen Präparat identifiziert.

6 β -Hydroxyandrost-4-en-3,17-dion (XV)—Bei der Chromatographie ließ sich das (XV) mit Benzol-Et₂O (4:1~3:1) eluieren; aus Me₂CO kristallisierte es sich prismatisch. Schmp. 194~195°. $C_{19}H_{26}O_3$ -Ber.: C, 75.46; H, 8.67. Gef.: C, 75.64; H, 8.72. $[\alpha]_D^{16} +115.5^\circ$ ($c=1.453$ in CHCl₃). UV: λ_{\max}^{MeOH} 235 m μ (ϵ 16000). IR (in Nujol) cm^{-1} : 3470 (OH); 1738 (17-CO); 1680 (3-CO); 1612 (Doppelbindung). (XV) wurde mit dem authentischen Präparat von (XV)²² identifiziert. Acetat: Prismen vom Schmp. 202~202.5° (Me₂CO).

Behandlung von (XV) mit HCl: 100 mg (XV) wurden mit 1.5 ccm MeOH und 0.1 ccm konz. HCl unter Rückfluß gekocht. Nach 1 Std. wurde das Reaktionsgemisch auf Wasser gegossen und die abgetrennten Krist. abfiltriert. Sie zeigten nach Umkristallisation aus Me₂CO-Et₂O den Schmp. 192~193° und waren identisch mit (XIV).

Behandlung von (XV)-Acetat mit HCl-CHCl₃: Zur Lösung von 100 mg (XV)-Acetat in 100.7 ccm CHCl₃-EtOH (100:07) wurde das HCl-Gas 2 Std. bei -5° zu 0° eingeleitet. Nach üblicher Aufarbeitung wurde ein krist. Produkt erhalten, welches nach Umkristallisation aus MeOH Prismen vom Schmp. 175~176° ergab. Es stellte das 6 α -Hydroxyandrost-4-en-3,17-dion dar. UV: λ_{\max}^{MeOH} 236.6 m μ (ϵ 21400). IR (in Nujol) cm^{-1} : 1737 (Schulter), 1733 (Acetyl-, 17-CO); 1665 (3-CO); 1616 (Doppelbindung); 1233, 1055 (C-O-).

Dem Fond zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Unterrichtsministerium) danken wir bestens für die Unterstützung dieser Arbeit. Wir danken auch den Herren Dr. K. Okazaki und R. Shirasaka (Takamine Forschungslaboratorium) für ihre freundliche Hilfe bei der Massenkultivierung. Ferner möchten wir für die Ausführung der Mikroanalysen Frl. H. Yamanouchi und K. Hayashi (Mikrolabor dieses Instituts) und für die Aufnahme der IR-Spektren Frl. N. Kurosawa (IR-Labor dieses Instituts) herzlich danken.

Zusammenfassung

Es wird die C₁-Dehydrierungsfähigkeit von *Bacillus pulvifaciens* beschrieben. Reichsteins Substanz S und Hydrocortison ergeben durch Einwirkung dieser Mikroorganismen die entsprechenden C₁-Dehydro-Derivate. Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron ergeben außer dem C₁-Dehydro-Derivat noch verschiedene Umsetzungsprodukte.

(Eingegangen am 4. August 1961)