

UDC 542.98[576.851.5] : 547.92 : 577.17

**144. Yoshihiro Sato, Atsushi Naito, Mitsugi Kato, Hiroshi Iizuka, und Kyosuke Tsuda :** Untersuchungen auf dem Gebiet der mikrobiologischen Umsetzung. XV.<sup>1)</sup> C<sub>1</sub>-Dehydrierung von Reichsteins Substanz S Hydrocortison, Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron durch *Bacillus pulvifaciens*. (2).<sup>1)</sup>

(Institut für angewandte Mikrobiologie, Universität Tokio\*<sup>1)</sup>)

In der vorigen Mitteilung dieser Reihe<sup>1)</sup> beschrieben wir die mikrobiologische Dehydrierung an C<sub>1</sub> des C<sub>19</sub>- bzw. des C<sub>21</sub>-Steroids mittels *Bacillus pulvifaciens*. Wenn das Dehydroepiandrosteron (I) dabei für das Substrat verwendet wurde, so konnten je nach Kultivierungskondition sieben Produkte isoliert werden, und ferner auch vier davon mit den Strukturformeln von (II), (III), (IV) und (V) aufgewiesen werden.<sup>1)</sup> In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über die Strukturen der übrigen drei Produkte.

Das fünfte Produkt vom Schmp. 260~261,5° stellt nach Analysenresultat, IR-Spektrum, UV-Spektrum und dem Acetylierungsversuch das mit einer nicht acetylierbaren Hydroxyl-Gruppe verknüpfte Androst-4-en-3,17-dion dar. Wir gewannen dieselbe Verbindung durch die Oppenauer-Oxydation des nach der Methode von André, *et al.*<sup>2)</sup> hergestellten 3β,14-Dihydroxyandrost-5-en-17-ons (IX), so daß für das fünfte Produkt die Struktur von (VI) festgestellt wurde. Dem sechsten Produkt vom Schmp. 283~287° erteilten wir die Struktur von 14-Hydroxyandrost-1,4-dien-3,17-dion (VII). Im IR-Spektrum (Nujol) dieses Produkts waren eine OH-Bande (3590 cm<sup>-1</sup>), die 17 CO-Bande (1746 cm<sup>-1</sup>) und die für das 3-Oxo-1,4-dien-System charakteristische Banden<sup>3)</sup> (1658, 1615, 1600 und 897 cm<sup>-1</sup>) sichtbar. Die entsprechende Hydroxyl-Gruppe ist tertiär, da sie gegen das Acetylierungsreagens bzw. das Chromtrioxyd intakt blieb. Bei der katalytischen Hydrierung mit 1 Mol Wasserstoff in Gegenwart von einem Palladium-Kohle-Katalysator entstanden ein Tetrahydro-Derivat A und zwei Dihydro-Derivate C und D. Die katalytische Hydrierung mittels 2 Mol Wasserstoff lieferte zwei Tetrahydro-Derivate, nämlich A und B. Das Dihydro-Derivat C war in jeder Hinsicht identisch mit dem 14-Hydroxypregn-4-en-3,17-dion<sup>2)</sup> (VI). Somit ergibt sich für das sechste Produkt die Struktur von (VII). Das Tetrahydro-Derivat A war identisch mit dem aus (IX)<sup>2)</sup> durch katalytische Hydrierung und darauffolgende Chromtrioxyd-Oxydation gewonnenen 14-Hydroxy-5α-androstan-3,17-dion (XII). Dementsprechend stellt das Tetrahydro-Derivat B das 5β-Isomer von (XII), nämlich das (XI), dar. Dem Dihydro-Derivat D wurde die Struktur von 14-Hydroxy-5β-androst-1-en-3,17-dion (X) gegeben. Die Bestätigung der Struktur von (X) basierte auf UV-Spektrum, IR-Spektrum und dem chemischen Verhalten: Katalytische Hydrierung von D mittels Palladium-Kohle lieferte das (XI).

Das siebente Produkt vom Schmp. 271~273° wurde nur in sehr geringer Menge erhalten, so daß die vollkommene Erklärung der Struktur nicht möglich war. Das Analysenresultat stimmte mit der Formel von Dihydroxyandrost-4-en-3,17-dion überein. Bei der Acetylierung mit Acetanhydrid und Pyridin ergaben sich ein Monoacetat und ein Diacetat. Nach dem UV-Spektrum (234 mμ, ε 17500) trat eine neue OH-Gruppe, wahrscheinlich an C-6β, hinzu, da das dem 3-Oxo-4-en-System anstammende UV-Absorptionsmaximum sich nach kürzerer Wellenlänge verschob. Außerdem trat beim mehrstündigen

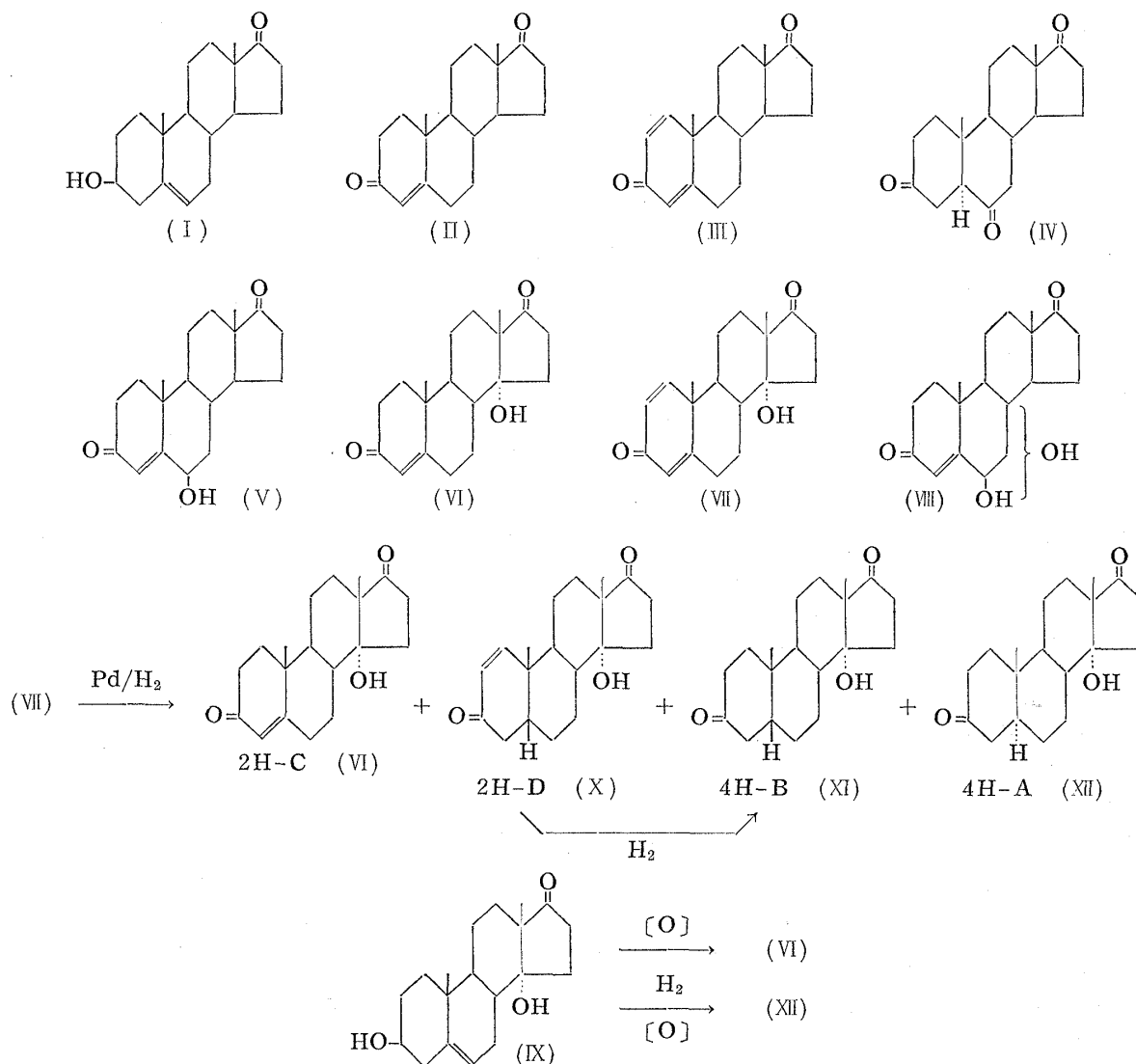
\*<sup>1)</sup> Yayoicho, Bunkyo, Tokio (佐藤良博, 内藤 敦, 加藤彌次, 飯塚 広, 津田恭介).

1) XIV Mitt.: K. Tsuda, H. Iizuka, Y. Sato, A. Naito, M. Kato: Dieses Bulletin, 9, 925 (1961).

2) A. F. St. André, H. B. MacPhillamy, J. A. Nelson, A. C. Shabica, C. R. Scholz: J. Am. Chem. Soc., 74, 5506 (1952).

3) R. N. Jones: Vitamins and Hormones, 7, 293 (1949).

Stehenlassen in alkalischer Lösung auf 20° eine Veränderung ein, wie dies nach Meyer<sup>4)</sup> auch für andere Vertreter dieser Stoffklasse typisch ist. Wir erteilen dem siebenten Produkt deshalb die Formel (VIII).



### Experimentelles\*<sup>2</sup>

Die Trennung der einzelnen Umsetzungsprodukte, (II)~(VIII), wurde in der vorigen Mitteilung<sup>1)</sup> beschrieben.

**14-Hydroxyandrost-4-en-3,17-dion (VI)**—(VI) ließ sich bei der Chromatographie mit Benzol-Et<sub>2</sub>O (4:1~3:2) eluieren und aus Me<sub>2</sub>CO umkristallisieren. Prismen vom Schmp. 260~261.5°. C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>-Ber.: C, 75.46; H, 8.67. Gef.: C, 75.22; H, 8.62.  $[\alpha]_D^{30} +162^\circ$  (c=2.16 in CHCl<sub>3</sub>). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  240.2 m $\mu$  ( $\epsilon$  20600). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 3430 (OH); 1746 (17-CO); 1660 (3-CO); 1612 (Doppelbindung). Dieses Gährungsprodukt war identisch mit dem aus 3 $\beta$ ,14-Dihydroxyandrost-5-en-17-on (IX) durch die Openauer-Oxydation hergestellten (VI).

**14-Hydroxyandrost-1,4-dien-3,17-dion (VII)**—(VII) wurde bei der Chromatographie mit Benzol-Et<sub>2</sub>O (1:1) eluiert. Prismen vom Schmp. 284~287° (Zers.) (Me<sub>2</sub>CO). C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>-Ber.: C, 75.97; H, 8.05. Gef.: C, 75.86; H, 8.02.  $[\alpha]_D^{16} +69.2^\circ$  (c=0.515 in Me<sub>2</sub>CO). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  245 m $\mu$  ( $\epsilon$  16100). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 3415 (OH); 1750 (17-CO); 1656, 1609, 1603, 892 (1,4-Dien-3-on).

\*<sup>2</sup> Die Schmp. sind auf dem Kofler-Block bestimmt und noch nicht korrigiert.

4) A. S. Meyer: J. Org. Chem., **20**, 1240 (1955).

**Katalytische Hydrierung von (VII)**—a) Im neutralen Medium: 600.8 mg (VII) wurden in 110 ccm 95-proz. EtOH gelöst, mit 30 mg 5-proz. Pd-C versetzt und unter H<sub>2</sub> geschüttelt. Nach 18 Min. wurden 47 ccm H<sub>2</sub> zur Reaktion verbraucht; das theoretische Volumen für 2 Mol H<sub>2</sub> ist 46.1 ccm. Nach üblicher Aufarbeitung wurden Krist. vom Schmp. 230~243° erhalten (605 mg). Sie wurden in Benzol gelöst und an 50 g Silikagel chromatographiert, wobei Fraktionen von je 50 ccm getrennt aufgefangen wurden: Frakt. Nr. 1~10 (Benzol~Benzol-Et<sub>2</sub>O (7:3)), Spur; Frakt. Nr. 11~12 (Benzol-Et<sub>2</sub>O (3:2)), 203 mg, Schmp. 190~193°; Frakt. Nr. 13 (Benzol-Et<sub>2</sub>O (3:2)), 151 mg, Schmp. 218~221°, UV:  $\lambda_{\max}$  239 m $\mu$ ; Frakt. Nr. 14~19 (Benzol-Et<sub>2</sub>O (3:2)), 224 mg, Schmp. 265~283°, UV:  $\lambda_{\max}$  243~243.6 m $\mu$ . Krist. aus Frakt. Nr. 11~12 wurden in Benzol gelöst und nochmals mit 10 g Silikagel chromatographiert, wobei folgende zwei Produkte isoliert wurden.

Tetrahydroderivat A (XII): (XII) wurde mit Benzol-Et<sub>2</sub>O (4:1) eluiert, und zuerst aus MeOH und dann aus Et<sub>2</sub>O umkristallisiert; Prismen vom Schmp. 225~226° (45 mg). C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>-Ber.: C, 74.96; H, 9.27. Gef.: C, 74.66; H, 9.25.  $[\alpha]_D^{25} + 94.2^\circ$  ( $c=0.436$  in CHCl<sub>3</sub>). UV: Keine Absorption auf dem Gebiet 220~340 m $\mu$ . IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 3445 (OH); 1729 (17-CO); 1708 (3-CO). (XII) wurde nach folgender Methode hergestellt und seine Struktur, nämlich 14-Hydroxy-5 $\alpha$ -androst-3,17-dion, bestimmt: Das aus Dehydroepiandrosteronacetat nach der Methode von André<sup>2)</sup> hergestelltem 3 $\beta$ ,14-Dihydroxyandrost-5-en-17-on (IX) wurde in EtOH in Gegenwart eines 10-proz. Pd-C Katalysators katalytisch hydriert. 170 mg des hierbei erhaltenen Reduktionsprodukts wurden in 3 ccm AcOH gelöst, mit einer Lösung von 100 mg CrO<sub>3</sub> in AcOH-H<sub>2</sub>O (3 ccm: 6 Tropfen) versetzt und 50 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung wurden 90 mg der Krist. vom Schmp. 207~209° erhalten. Nach Chromatographieren und Umkristallisieren aus MeOH zeigten sie den Schmp. 222~224°. C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub> (14-Hydroxy-5 $\alpha$ -androst-3,17-dion (XII))-Ber.: C, 74.96; H, 9.27. Gef.: C, 74.71; H, 9.24. Beide Präparate von (XII) waren in jeder Hinsicht identisch.

Dihydroderivat D (X): Nach dem (XII) wurde (X) mit gleichem Lösungsmittel eluiert. Nadeln vom Schmp. 256~257° (MeOH) (5 mg). C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub> (14-Hydroxyandrost-1-en-3,17-dion)-Ber.: C, 75.46; H, 8.67. Gef.: C, 75.37; H, 8.44.  $[\alpha]_D^{18} + 340^\circ$  ( $c=0.153$  in CHCl<sub>3</sub>). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  228.6 m $\mu$  ( $\epsilon$  20100). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 3530 (OH); 1745 (17-CO); 1670 (3-CO); 1612 (Doppelbindung).

Dihydroderivat C (VI): (VI) wurde aus Frakt. Nr. 13 erhalten. Nach mehrmaligem Chromatographieren und Umkristallisieren zeigte das (VI) den Schmp. 256~258° und war identisch mit dem 14-Hydroxyandrost-4-en-3,17-dion (VI).

b) Im alkalischen Medium: 600.8 mg (VII) wurden in 110 ccm 95-proz. EtOH gelöst, mit 60 mg KOH und 100 mg 1-proz. Pd-C versetzt und mit H<sub>2</sub> geschüttelt. Nach dem Verbrauch von 2 Mol H<sub>2</sub> (46.7 ccm) war der Reduktionsversuch beendet. Die übliche Aufarbeitung ergab 602 mg des Reduktionsprodukts. Dieses Produkt wurde mit Benzol behandelt, wobei sich die in kaltem Benzol schwer löslichen Krist. leicht abtrennen ließen. Diese Krist. wurden mit MeOH umkristallisiert, wobei 31 mg Ausgangsmaterial (VII) und 21 mg Dihydroderivat C (VI) getrennt aufgefangen wurden. Die Benzol-Mutterlauge wurde mit 60 g Silikagel chromatographiert, wobei als Eluierungsmittel Benzol-Et<sub>2</sub>O (3:2) verwendet wurde. Aus Frakt. Nr. 1 (79.3 mg) ergab sich Tetrahydroderivat A (XII). Aus Frakt. Nr. 2 (90 mg) bzw. Frakt. Nr. 4~7 (142 mg) ließ sich Dihydroderivat D (X) bzw. Dihydroderivat C (VI) gewinnen.

c) Im alkalischen Medium: Hydrierung mit überschüssigem H<sub>2</sub>: 300 mg (VII) wurden in 60 ccm 95-proz. EtOH gelöst, mit 30 mg KOH und 50 mg 1-proz. Pd-C versetzt und mit H<sub>2</sub> geschüttelt. Nach 1.5 Std. endete die H<sub>2</sub>-Aufnahme (97 ccm). Das rohe Reduktionsprodukt wurde an 13 g Silikagel chromatographiert, wobei Fraktionen von je 50 ccm getrennt aufgefangen wurden. Frakt. Nr. 1~4 (Benzol~Benzol-Et<sub>2</sub>O (19:1)), spur.; Frakt. Nr. 5~6 (Benzol-Et<sub>2</sub>O (9:1)), 97 mg, Schmp. 215~217°; Frakt. Nr. 7 (Benzol-Et<sub>2</sub>O (9:1)), 40 mg, Schmp. 170~174°; Frakt. Nr. 8~11 (Benzol-Et<sub>2</sub>O (9:1)), Schmp. 149~200°; Frakt. Nr. 12~13 (Benzol-Et<sub>2</sub>O (8.5:1.5)), Schmp. 194~197°; Frakt. Nr. 14~15 (Benzol-Et<sub>2</sub>O (4:1)), Schmp. 192~197°. Krist. aus Frakt. Nr. 8~15 betragen insgesamt 87 mg. Aus Frakt. Nr. 5~6 ergaben sich nach Umkristallisation aus MeOH die Krist. vom Schmp. 223~224°, die sich als identisch mit dem Tetrahydroderivat A erwies. Aus Frakt. Nr. 8~15 ergaben sich nach Umkristallisation aus MeOH-Et<sub>2</sub>O das Tetrahydroderivat B (XI) vom Schmp. 198~201°. C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub> (14-Hydroxy-5 $\beta$ -androst-3,17-dion)-Ber.: C, 74.96; H, 9.27. Gef.: C, 75.03; H, 9.21. IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 3540 (OH); 1728 (17-CO); 1710 (3-CO). Die Beobachtung im IR-Spektrum bewies, daß Krist. aus Frakt. Nr. 7 ein Gemisch von Tetrahydroderivat A und B (4:1) darstellte. Dieses (XI) wurde aus (X) durch katalytische Hydrierung hergestellt: 2.149 mg (X) wurden in 2 ccm 95-proz. EtOH gelöst, mit 2.5 mg 10-proz. Pd-C versetzt und in dem Hydrierungsapparat von Clauson-Kaas<sup>5)</sup> katalytisch hydriert. Nach dem Verbrauch von 0.188 ccm H<sub>2</sub> endete die Reduktion. Der H<sub>2</sub>-Verbrauch entspricht dem 1.02 Mol H<sub>2</sub>. Nach üblicher Aufarbeitung ließen sich Krist. vom Schmp. 194~198° isolieren. Nach dem IR-Spektrum und der Mischprobe erwies sich dieses Reduktionsprodukt als identisch mit dem Tetrahydroderivat B (XI).

5) N. Clausen-Kaas, F. Limborg: Acta chem. scand., 1, 884 (1947).

**6 $\beta$ ,x-Dihydroxyandroster-4-en-3,17-dion (VIII)**—(VIII) ließ sich bei der Chromatographie mit Benzol-Et<sub>2</sub>O (1:1~1:9) eluieren. Aus Me<sub>2</sub>CO kristallisierte sich das (VIII) als nadelförmige Krist. Schmp. 271~273°. C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>-Ber.: C, 71.67; H, 8.23. Gef.: C, 71.82; H, 8.19.  $[\alpha]_D^{15} + 86^\circ$  (c=0.653 in MeOH). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  234 m $\mu$  ( $\epsilon$  17500). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 3410 (OH); 1740 (17-CO); 1667 (3-CO); 1611 (Doppelbindung). Monoacetat: Schmp. 238~245°. IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 3400 (OH); 1742 (Acetyl-CO, 17-CO); 1667 (3-CO); 1622 (Doppelbindung); 1239, 1011 (C-O-). Diacetat: Schmp. 198~200°. IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 1742, 1730 (Acetyl-, 17-CO); 1684 (3-CO); 1620 (Doppelbindung); 1238 (C-O-). C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub>-Ber.: C, 68.63; H, 7.51. Gef.: C, 67.83; H, 7.39. UV-Messung nach der Methode von Meyer<sup>4)</sup>: (VIII) wurde in 0.066N KOH-EtOH gelöst und nach 30 Min. bzw. nach 24 Std. zur UV-Messung gebracht. Nach 30 Min:  $\lambda_{\max}$  237 m $\mu$  ( $\epsilon$  13150). Nach 24 Std.:  $\lambda_{\max}$  239.5, 380 m $\mu$  ( $\epsilon$  7930, 3350) und  $\lambda_{\min}$  304 m $\mu$  ( $\epsilon$  470).

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 Fr. H. Yamanouchi und K. Hayashi (Mikrolabor dieses Instituts) und für die Aufnahme der IR-Spektren Fr. N. Kurosawa (IR-Labor dieses Instituts) herzlich danken.

### Zusammenfassung

Es wird die Methode der Strukturbestimmung der drei Umsetzungsprodukte von Dehydroepiandrosteron beschrieben. Aus der Struktur aller Umsetzungsprodukte wird entnommen, daß *Bacillus pulvifaciens* auf Dehydroepiandrosteron hauptsächlich C<sub>1</sub>-dehydrierend, daneben auch 6-hydroxylierend bzw. 14-hydroxylierend wirkt.

(Eingegangen am 4. August 1961)