

cc. of dehyd. tetrahydrofuran, and the mixture was refluxed gently for 3 hr. After working up in the usual manner recrystallization of the product from MeOH yielded 36 mg. of plates, double m.p.  $117^{\circ}/186\sim 189^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{13} -150.1^{\circ} \pm 2^{\circ}$  ( $c=1.583$ ), which were identical with the authentic sample of the diol (XIV) by mixed melting point determination and by direct comparison of each infrared spectrum.

When ketol (IV) was refluxed in MeOH with  $\text{NaBH}_4$  for 5 hr., reduction did not proceed and only the starting material was recovered.

**Reduction of Ketol (V) with  $\text{LiAlH}_4$** —37 mg. of ketol (V) was reduced with  $\text{LiAlH}_4$  as above. Recrystallization of the product from MeOH gave 18 mg. of diol (XVI) as prisms, m.p.  $245\sim 247^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{13} +52.7^{\circ} \pm 2^{\circ}$  ( $c=1.294$ ). Anal. Calcd. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{O}_4$ : C, 76.02; H, 8.98. Found: C, 75.88; H, 9.13. IR  $\lambda_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3588 (OH), 1597, 1590 (benzene). The second crop (8 mg.), m.p.  $229\sim 240^{\circ}$  also gave identical infrared spectrum with the diol (XVI).

The author expresses his deep gratitude to Dr. K. Takeda, Director of this Laboratory, for his helpful guidance throughout the course of this work. Thanks are also due to Messrs. K. Miyahara, Y. Daikatsu and A. Takaoka and to Miss U. Kasugai for the microanalysis, to Messrs. Y. Matsui, I. Tanaka and M. Takasuka for spectral measurements and to Mr. H. Iwata for rotation measurements.

### Summary

When meteogenone (II) was refluxed in diluted alkaline solution, two kinds of ketols, (IV) and (V), in place of  $\text{C}_9$ -epimeteogenone were obtained in a good yield. The newly introduced hydroxyl groups were synthetically confirmed to be located at  $\text{C}_9$  and the conformations of those groups were also established from the infrared and ultraviolet spectra as well as from the rotation values.

(Received January 20, 1961)

UDC 577.176.52 : 542.98 : 576.882.8.095.3

**118. Kyosuke Tsuda, Toshinobu Asai, Yoshihiro Sato, Tokuji Tanaka und Hiroko Hasegawa**: Untersuchungen auf dem Gebiet der mikrobiologischen Umsetzung. XI.<sup>1)</sup> Hydroxylierung von Progesteron in der  $7\alpha$ -,  $7\beta$ -,  $14\alpha$ -,  $15\alpha$ - oder  $15\beta$ -Stellung durch *Helminthosporium sativum*.

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

In einer früheren Mitteilung<sup>2)</sup> berichteten wir über die Hydroxylierung in  $15\alpha$ -Stellung von Reichsteins Substanz S durch *Helminthosporium sativum* PAMMEL, KING et BAKKE. Inzwischen wurden die Studien über die Umsetzung von Progesteron mit diesen Mikroben fortgeführt. Im folgenden seien die Ergebnisse kurz zusammengefasst.

Bei der Inkubation von Progesteron (Pregn-4-en-3,20-dion) (I) mit *H. sativum* isolierten wir mittels der mit Silikagel durchgeführten Chromatographie zwei Monohydroxy- und drei Dihydroxy-Derivate des Progesterons. Das Monohydroxy-progesteron vom Schmp.  $228\sim 230^{\circ}$  und das vom Schmp.  $202\sim 204.5^{\circ}$  waren mit dem bekannten  $15\alpha$ -Hydroxy-(II),<sup>3,4)</sup>

\*<sup>1</sup> Yayoi-cho, Bunkyo-ku, Tokio (津田恭介, 朝井勇宣, 佐藤良博, 田中篤治, 長谷川弘子).

1) X. Mitt. K. Tsuda, T. Asai, Y. Sato, T. Tanaka, T. Matsuhisa, H. Hasegawa: Dieses Bulletin, 8, 626 (1960).

2) K. Tsuda, T. Asai, Y. Sato, T. Tanaka: *Ibid.*, 7, 534 (1959).

3) A. Gubler, Ch. Tamm: *Helv. Chim. Acta*, 41, 301 (1958).

4) J. Fried, R.W. Thoma, D. Perlman, J.E. Herz, A. Borman: *Recent Prog. in Hormone Research*, 11, 149 (1955); W.J. McAleer, T.A. Jacob, L.B. Turnbull, E.F. Schoenewardt, T.H. Stoudt: *Archiv. Biochem. Biophys.*, 73, 127 (1958).

bzw. dem 15 $\beta$ -Hydroxy-progesteron<sup>4)</sup> (III) identisch (Ausbeute 7% bzw. 2%). Der Identitätsbeweis stützt sich auf Schmp., spez. Drehung, Bruttoformel, IR-Spektrum und das chemische Verhalten; jedes 15-Monohydroxy-progesteron ergab sein Acetat sowie auch sein Mesylat, aber bei der Chromtrioxid-Oxydation dieser beiden 15-Epimere ergab sich dasselbe Produkt, nämlich 15-Oxo-progesteron<sup>4)</sup> (IV). Betreffs des stereochemischen Verhaltens der 15-Epimere berichten wir Näheres in einer anderen Mitteilung.

Das eine von den drei Dihydroxylierungsprodukten war identisch mit dem 7 $\beta$ ,15 $\beta$ -Dihydroxyprogesteron (V), das von uns durch Einwirkung von *Syncephalastrum racemosum* bzw. von *Diplodia tubericola* auf Progesteron bereits gewonnen worden war<sup>1)</sup> (Ausbeute 5%). Die übrigen zwei Dihydroxyprogesterone, d.h. Kristalle vom Schmp. 250~253° (Ausbeute 0,8%) und die vom Schmp. 259~263° (Ausbeute 1%), konnten mit keinem bekannten Stoff identifiziert werden. Dem Produkt vom Schmp. 250~253° erteilen wir jedoch die Konstitution von 7 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Dihydroxyprogesteron (VIa). (VIa) lieferte also mit einer Lösung von Kaliumhydrogencarbonat in Methanol-Wasser bei Siedehitze das 15 $\beta$ -Hydroxypregna-4,6-dien-3,20-dion (VII), das aus (V) in analoger Reaktion entstand.<sup>6)</sup> Eine Hydroxyl-Gruppe an C-7 $\alpha$  bzw. C-7 $\beta$  wird in Gegenwart von Säuren sowie von Basen unter Bildung des 4,6-dien-3-ons sehr leicht eliminiert, und aus den obenerwähnten Ergebnissen ist ersichtlich, daß an C-7 $\alpha$  und C-15 $\beta$  zwei Hydroxyl-Gruppen eingetreten sind. (VIa) lieferte mit Acetanhydrid und Pyridin bei Zimmertemperatur das Monoacetat (VIb) sowie auch das Diacetat (VIc). Bei der Behandlung des Monoacetats mit Chromtrioxyd-Pyridin ergab sich das entsprechende Ketoacetate (VIII), welches mittels methanolischer Salzsäure in das 14 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Pregna-4,6-dien-3,15,20-trion (IX) übergeführt wurde, was für die Anwesenheit einer 15-Keto-Gruppe charakteristisch ist.<sup>5)</sup>

Die Konstitution des (IX) stützt sich auf die gleichzeitige Gewinnung des (IX)<sup>6)</sup> aus dem dem (VII) entsprechenden Pregna-4,6-dien-3,15,20-trion (X) mittels methanolischer Salzsäure. Dementsprechend stellt das Monoacetat in jeder Hinsicht das 7 $\alpha$ -Acetoxy-15 $\beta$ -hydroxyprogesteron (VIb) dar. Die 15 $\beta$ -Hydroxyl-Gruppe ist durch die an C-7 $\beta$  gelagerte Hydroxyl-Gruppe sterisch stark behindert, so daß (V) bei der Acetylierung nur das 7 $\beta$ -Monoacetat liefert, dagegen ergeben (VIa), 2 $\beta$ ,15 $\beta$ -Dihydroxyprogesteron<sup>7)</sup> und 6 $\beta$ ,15 $\beta$ -Dihydroxyprogesteron<sup>\*2</sup> bei derselben Reaktion das entsprechende Diacetat.

Das unbekanntes Dihydroxyprogesteron vom Schmp. 259~263° blieb nach Siedehitze mit methanolischer Kalilauge unverändert und zeigte keine Farbenreaktion mit TPTZ, warum die Stellung 1, 2, 6, 7 und 21 für die in Progesteron eingeführten Hydroxyle ausscheiden. Die eine der beiden Hydroxyl-Gruppen ist acetylierbar; Behandlung mit Chromtrioxyd-Pyridin ergab das entsprechende Hydroxyketon. Im IR-Spektrum dieses Oxydationsprodukts war die CO-Bande sichtbar, die von einem 5-Ringketon herrührt. Dieses Produkt zeigte im UV-Spektrum<sup>9)</sup> keine charakteristische Absorptionsbande für die  $\beta$ -Diketon-Gruppierung, womit für die eine Hydroxyl-Gruppe im Dihydroxylierungsprodukt die 15-Stellung gesichert ist.

Inzwischen haben wir die Studien über die Stereochemie des 14,15-Dihydroxyprogesters untersuchen, wobei vier Isomere des zum Progesteron gehörigen 14,15-Diole synthetisch hergestellt<sup>9)</sup> und deren Raumstruktur eindeutig erklärt wurden. Das eine der vier Isomere, nämlich 14 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Dihydroxyprogesteron (XI) war nach Schmp., Mischprobe, Spez.

\*2 Diese Verbindung wurde neben den anderen Hydroxylierungsprodukten aus Progesteron durch die Einwirkung von *Syncephalastrum racemosum* erhalten. Wir werden darüber in einer anderen Mitteilung berichten.

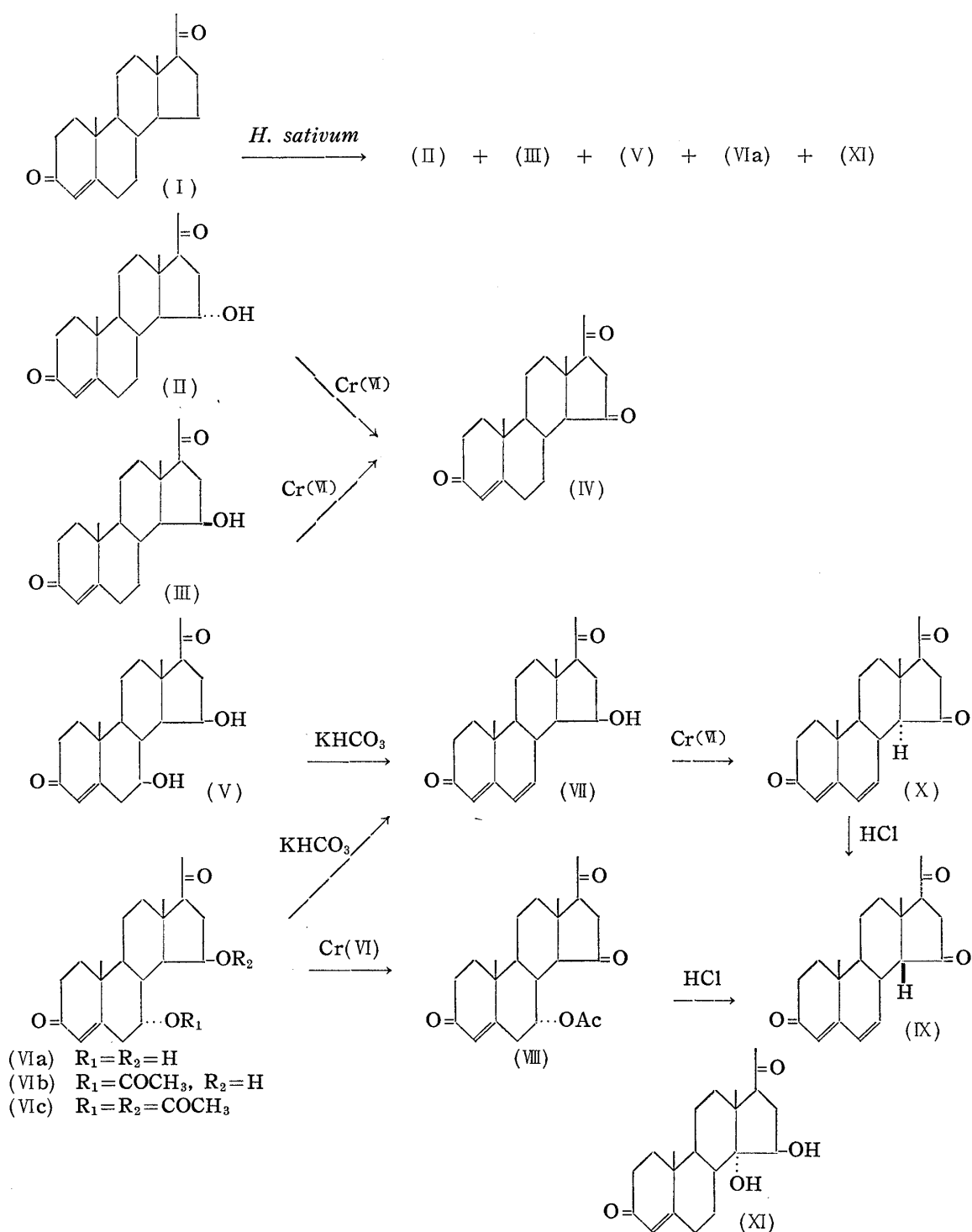
5) C. Djerassi, L.B. High, J. Fried, E.F. Sabo: J. Am. Chem. Soc., **77**, 3673 (1955).

6) K. Tsuda, T. Asai, E. Ohki, T. Tanaka, M. Hattori: Dieses Bulletin, **6**, 387 (1958).

7) T. Tanabe, R. Takasaki, R. Hayashi, M. Shirasaka: *Ibid.*, **7**, 804 (1959).

8) S. Bernstein, M. Heller, S.M. Stolar: J. Am. Chem. Soc., **77**, 5327 (1955).

9) H. Hasegawa, Y. Sato, K. Tsuda: Dieses Bulletin **9**, 409 (1961).



Drehung, Papierchromatographie, und IR-Spektrum mit dem obengenannten bisher unbekanntem Dihydroxyprogesteron identisch.

#### Experimentelles\*<sup>3</sup>

**Isolierung der Hydroxylierungsprodukte**—32 g Progesteron (I) wurden zur Kultur<sup>2)</sup> von *Helminthosporium sativum* zugegeben und 20 Stdn. lang bei 27° fermentiert. Die vom Myzel abgetrennte Flüssigkeit wurde mit AcOEt extrahiert und diese Auszüge, nach Waschen mit 2% NaHCO<sub>3</sub>-Lösung

\*<sup>3</sup> Die Schmp. sind auf dem Kofler-Block bestimmt und noch nicht korrigiert.

und dann mit Wasser, im Vakuum eingedampft. Der Rückstand betrug 46.4 g. Das ganze Rohprodukt wurde an der 20-fachen Menge Silica-gel chromatographiert, wobei für die Eluierung zuerst Benzol-Et<sub>2</sub>O-Gemische und dann Et<sub>2</sub>O-MeOH-Gemische verwendet wurden. Dabei ergaben sich die folgenden Fraktionen je nach Eluierungsmittel; Fr. 1 (Benzol), 4 g, Kristalle vom Schmp. 110~115° aus Me<sub>2</sub>CO; Fr. 2 (Benzol), 0.66 g, Kristalle vom Schmp. 202~204° aus Me<sub>2</sub>CO; Fr. 3 (Benzol-Et<sub>2</sub>O 99:1), 2.19 g, Kristalle vom 228~230° aus Me<sub>2</sub>CO; Fr. 4 (Et<sub>2</sub>O), 1.52 g, Kristalle vom 230~232° aus Me<sub>2</sub>CO; Fr. 5 (Et<sub>2</sub>O-MeOH 99:1), 0.27 g, Schmp. 250~253° aus Me<sub>2</sub>CO; Fr. 6 (Et<sub>2</sub>O-MeOH 95:5), 0.31 g, Krist. vom Schmp. 259~263° aus MeOH. Die aus Fr. 1 stammenden Krist. waren identisch mit (I).

**15 $\beta$ -Hydroxypregn-4-en-3,20-dion(15 $\beta$ -Hydroxyprogesteron)<sup>4)</sup> (III)**—Dis Struktur von (III) wurde den aus Fr. 2 stammenden Kristallen erteilt. C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>—Ber.: C, 76.32; H, 9.15. Gef.: C, 76.39; H, 9.11.  $[\alpha]_D^{20} + 149^\circ$  (c=1.035, CHCl<sub>3</sub>). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  240.8 m $\mu$  ( $\epsilon$  19,200). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 3470 (OH); 1697 (20-CO); 1660 (3-CO); 1616 (Doppelbindung).

Acetat: Bei der Acetylierung mit Ac<sub>2</sub>O-Pyridin und darauffolgender Reinigung durch Chromatographie ergab sich eine ölige Substanz. Im IR-Spektrum zeigte sie die für Acetat charakteristische Bande; durch Verseifen mittels MeOH-KHCO<sub>3</sub> ließ sie sich in das (III) umwandeln.

Mesylat: (III)-Mesylat wurde nach der Methode von Bernstein, *et al.*<sup>10)</sup> hergestellt. 100 mg (III) wurden in 3 ccm Pyridin gelöst, mit 0.15 ccm CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>Cl bei 0° versetzt und die Lösung 14 Stdn. bei -10° stehengelassen. Dann goß man sie in Eiswasser und saugte den kristallisierten Niederschlag ab. 71 mg Nadeln aus Me<sub>2</sub>CO-Et<sub>2</sub>O, Schmp. 121~122°. C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>S—Ber.: C, 64.67; H, 7.89; S, 7.86. Gef.: C, 64.34; H, 7.88; S, 7.60.  $[\alpha]_D^{17} + 94^\circ$  (c=1.024, CHCl<sub>3</sub>). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  240.2 m $\mu$  ( $\epsilon$  15,000). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 1707 (20-CO); 1675 (3-CO); 1620 (Doppelbindung); 1332 und 1170 (-OSO<sub>2</sub>-).

Pregn-4-en-3,15,20-trion<sup>4)</sup> (IV): Eine Lösung von 134 mg (III) in 1 ccm Pyridin wurde zur Lösung von 300 mg CrO<sub>3</sub> in 3 ccm Pyridin zugesetzt und die Reaktionslösung 40 Stdn. lang bei Zimmertemperatur stehengelassen. Man goß die Lösung in Eiswasser und das ausgeschiedene Produkt wurde mit CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Die übliche Aufarbeitung lieferte 58 mg von (IV). Prismen vom Schmp. 154.5~157° (Et<sub>2</sub>O). C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>—Ber.: C, 76.79; H, 8.59. Gef.: C, 76.64; H, 8.55.  $[\alpha]_D^{32} + 216^\circ$  (c=0.508, CHCl<sub>3</sub>). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  240 m $\mu$  ( $\epsilon$  17,000). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 1738 (15-CO); 1707 (20-CO); 1677 (3-CO); 1628 (Doppelbindung).

**15 $\alpha$ -Hydroxypregn-4-en-3,20-dion(15 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron)<sup>3,4)</sup> (II)**—Die Struktur von (II) wurde den aus Fr. 3 stammenden Kristallen erteilt. C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>—Ber.: C, 76.32; H, 9.15. Gef.: C, 76.33; H, 9.13.  $[\alpha]_D^{23.5} + 213^\circ$  (c=1.058, CHCl<sub>3</sub>). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  241.3 m $\mu$  ( $\epsilon$  19,100). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 3490 (OH); 1698 (20-CO); 1662 (3-CO); 1617 (Doppelbindung).

Acetat: 80 mg (II) wurden mit der Lösung von 3 ccm Pyridin und 3 ccm Ac<sub>2</sub>O behandelt. Die Reaktionslösung wurde 42 Stdn. lang stehengelassen und dann das Reaktionsprodukt nach üblicher Aufarbeitung zu prismatischen Kristallen gebracht. Schmp. 175~176°, 63 mg. C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>—Ber.: C, 74.16; H, 8.66. Gef.: C, 74.13; H, 8.66.  $[\alpha]_D^{25} + 173^\circ$  (c=0.927, CHCl<sub>3</sub>). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  240.2 m $\mu$  ( $\epsilon$  16,700). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 1740 (15-CO); 1702 (20-CO); 1668 (3-CO); 1618 (Doppelbindung).

Mesylat: 100 mg (II) wurden mit CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>Cl-Pyridin<sup>10)</sup> wie bei (III)-Mesylat behandelt. Dabei wurden 62 mg (II)-mesylat gewonnen. Schmp. 152~154° (Zers.). C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>S—Ber.: C, 64.67; H, 7.89; S, 7.85. Gef.: C, 64.73; H, 7.84; S, 7.56.  $[\alpha]_D^{17} + 150^\circ$  (c=0.588, CHCl<sub>3</sub>). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  240.2 m $\mu$  ( $\epsilon$  18,400). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 1697 (20-CO); 1658 (3-CO); 1612 (Doppelbindung); 1350, 1175 und 1165 (-OSO<sub>2</sub>-).

Pregn-4-en-3,15,20-trion<sup>4)</sup> (IV): Eine Lösung von 236 mg (II) in 5 ccm Pyridin wurde mit einer Lösung von 330 mg CrO<sub>3</sub> in 3.3 ccm Pyridin versetzt und 40 Stdn. lang bei Zimmertemperatur stehengelassen. Aus dem Reaktionsgemisch ließ sich eine Verbindung vom Schmp. 154~157° isolieren, welche sich nach allen Daten als identisch mit dem aus (III) gewonnenen (IV) erwies. Ausbeute 70 mg.

**7 $\beta$ ,15 $\beta$ -Dihydroxypregn-4-en-3,20-dion(7 $\beta$ ,15 $\beta$ -Dihydroxyprogesteron)<sup>1)</sup> (V)**—Die aus Fr. 4 stammenden Kristalle vom Schmp. 230~232° wurden mit (V)<sup>1)</sup> identifiziert. C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>—Ber.: C, 72.80; H, 8.73. Gef.: C, 72.69; H, 8.66.  $[\alpha]_D^{23} + 130^\circ$  (c=0.823, CHCl<sub>3</sub>). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  240.8 m $\mu$  ( $\epsilon$  16,600). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 3505 und 3365 (OH); 1704 (20-CO); 1679 (3-CO); 1627 (Doppelbindung).

**7 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Dihydroxypregn-4-en-3,20-dion(7 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Dihydroxyprogesteron) (VIa)**—Den aus Fr. 5 stammenden Kristallen erteilten wir nach folgenden Daten die Struktur von (VIa). C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>—Ber.: C, 72.80; H, 8.73. Gef.: C, 72.59; H, 8.69.  $[\alpha]_D^{30} + 121^\circ$  (c=0.562, MeOH). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  241.5 m $\mu$  ( $\epsilon$  18,000). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 3425 (OH); 1694 (20-CO); 1631 (3-CO); 1608 (Doppelbindung).

7-Acetat (VIb) und 7,15-Diacetat (VIc): 150 mg (VIa) wurden mit Ac<sub>2</sub>O-Pyridin bei Zimmertemperatur acetyliert und das erhaltene rohe Acetat aus Me<sub>2</sub>CO-Et<sub>2</sub>O umkristallisiert. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Me<sub>2</sub>CO-Et<sub>2</sub>O wurden Krist. vom Schmp. 232~238° (VIb) erhalten. C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub> (Monoacetat)—Ber.: C, 71.10; H, 8.30. Gef.: C, 71.28; H, 8.26.  $[\alpha]_D^8 + 51^\circ$  (c=0.977, CHCl<sub>3</sub>). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  238.8 m $\mu$  ( $\epsilon$  17,500). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 3530 (OH); 1732 (Acetyl-CO); 1698 (20-CO); 1657 (3-CO); 1618 (Doppelbindung); 1230 (C-O-).

10) S. Bernstein, M. Heller, L. I. Feldman, W. S. Allen, R. H. Blank, C. E. Linden: J. Am. Chem. Soc., 82, 3685 (1960).

Aus der Mutterlauge ergaben sich nach Umkristallisierung aus Et<sub>2</sub>O Krist. vom Schmp. 211~214° (Vic). C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub> (Diacetat)—Ber.: C, 69.74; H, 7.96. Gef.: C, 69.44; H, 7.96.  $[\alpha]_D^{25}$  -19° (c=0.966, CHCl<sub>3</sub>). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  237.7 m $\mu$  ( $\epsilon$  17,800). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 1733 (Acetyl-CO); 1705 (20-CO); 1670 (3-CO); 1620 (Doppelbindung); 1250 (C-O-).

**15 $\beta$ -Hydroxypregna-4,6-dien-3,20-dion<sup>6)</sup> (VII)**—100 mg (VIa) wurden in 20 ccm MeOH gelöst, mit einer Lösung von 120 mg KHCO<sub>3</sub> in 1 ccm H<sub>2</sub>O versetzt und 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach Neutralisieren mit 1N AcOH und Eindampfen der Reaktionslösung wurde die abgeschiedenen Krist. abgesaugt. 56 mg. Prismen aus Me<sub>2</sub>CO, Schmp. 225~226°. C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>—Ber.: C, 76.79; H, 8.57. Gef.: C, 76.56; H, 8.55.  $[\alpha]_D^{25}$  +168° (c=0.99, CHCl<sub>3</sub>). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  283.6 m $\mu$  ( $\epsilon$  24,000). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 3450 (OH); 1693 (20-CO); 1655 (3-CO); 1610, 1580 (4,6-Dien). Diese Substanz erwies sich nach Schmp., Mischprobe, UV- und IR-Spektren als identisch mit dem aus (V) übergeführten (VII).<sup>6)</sup>

**7 $\alpha$ -Hydroxypregna-4-en-3,15,20-trion acetat (VIII)**—70 mg (VIb) wurden in 4 ccm Pyridin gelöst, mit einer Lösung von 90 mg CrO<sub>3</sub> in 1 ccm Pyridin versetzt und 15 Stdn. lang bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Zusatz einiger Tropfen von MeOH wurde das Reaktionsgemisch in Eiswasser gegossen und das abgeschiedene Produkt mit CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Die übliche Aufarbeitung lieferte 40 mg (VIII). Prismen aus Et<sub>2</sub>O, Schmp. 198~205°. C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>—Ber.: C, 71.48; H, 7.82. Gef.: C, 71.27; H, 7.80.  $[\alpha]_D^{25}$  +88° (c=1.064, CHCl<sub>3</sub>). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  237.8 m $\mu$  ( $\epsilon$  15,800). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 1740 (Acetyl- und 15-CO); 1705 (20-CO); 1678 (3-CO); 1625 (Doppelbindung).

**14 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Pregna-4,6-dien-3,15,20-trion<sup>6)</sup> (IX)**—Zur Lösung von 35 mg (VIII) in 10 ccm MeOH wurde ein Tropfen von konz. HCl zugesetzt und die Lösung 24 Stdn. lang bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Zugabe von Wasser wurde das abgeschiedene Produkt mit CHCl<sub>3</sub> ausgezogen und mit Silicagel chromatographisch gereinigt. Prismen aus Et<sub>2</sub>O, Schmp. 204~208°. C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>—Ber.: C, 77.27; H, 8.03. Gef.: C, 77.25; H, 8.14.  $[\alpha]_D^{25}$  +245° (c=1.060, CHCl<sub>3</sub>). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  288 m $\mu$  ( $\epsilon$  26,000). IR (in CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 1745 (15-CO); 1708 (20-CO); 1658 (3-CO); 1618, 1585 (4,6-dien).

Zum direkten Vergleich haben wir nach der von uns berichteten Methode<sup>6)</sup> nochmals das (IX) hergestellt. 460 mg (VII) ergaben durch Behandlung mit Kiliani-Lösung 390 mg von Pregna-4,6-dien-3,15,20-trion (X), Schmp. 197~201°. Zur Lösung von 150 mg (X) in 30 ccm MeOH wurde ein Tropfen konz. HCl zugesetzt und 20 Stdn. lang bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das erhaltene Produkt (152 mg) wurde zuerst durch Chromatographie mittels Silikagel und dann Umkristallisation aus Et<sub>2</sub>O gereinigt. Das reine (IX) zeigte den Schmp. 204~209° und erwies sich nach allen Daten als identisch mit dem aus (VIII) gewonnenen (IX).

**14 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Dihydroxypregna-4-en-3,20-dion (XI)**—Aus Fr. 6 ergab sich das (XI). Schmp. 259~263°. C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>—Ber.: C, 72.80; H, 8.73. Gef.: C, 72.71; H, 8.68.  $[\alpha]_D^{30}$  +136° (c=0.5, MeOH). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  240.8 m $\mu$  ( $\epsilon$  17,300). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 3475 und 3380 (OH); 1696 (20-CO); 1642 (3-CO); 1618 (Doppelbindung).

Diese Substanz war identisch mit (XI), welches bei der Einwirkung von HClO<sub>4</sub> auf Progesteron-14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -epoxid bzw. -14 $\beta$ ,15 $\beta$ -epoxid entstand.<sup>9)</sup>

Acetat: 150 mg (XI) wurden in 3 ccm Pyridin gelöst, mit 3 ccm Ac<sub>2</sub>O versetzt und 48 Stdn. lang bei Zimmertemperatur stehengelassen. 100 mg amorpher Substanz wurden hierbei erhalten. IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 1732 (Acetyl-CO); 1705 (20-CO); 1660 (3-CO); 1610 (Doppelbindung).

**14 $\alpha$ -Hydroxypregna-4-en-3,15,20-trion**—Eine Lösung von 50 mg (XI) in 3 ccm Pyridin wurde mit einer Lösung von 100 mg CrO<sub>3</sub> in 1 ccm Pyridin versetzt und 40 Stdn. lang bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach der üblichen Aufarbeitung ergaben sich Krist. vom Schmp. 241~245°. Ausbeute: 10 mg. C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>—Ber.: C, 73.22; H, 8.19. Gef.: C, 72.90; H, 8.05.  $[\alpha]_D^{25}$  +236° (c=0.297, CHCl<sub>3</sub>). UV:  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  240.2 m $\mu$  ( $\epsilon$  16,300). IR (in Nujol) cm<sup>-1</sup>: 3530 (OH); 1738 (5-Ring-Keton); 1701 (20-CO); 1671 (3-CO); 1618 (Doppelbindung).

Diese Substanz war identisch mit dem 14 $\alpha$ -Hydroxypregna-4-en-3,15,20-trion, das sich aus 14 $\alpha$ ,15 $\alpha$ -Dihydroxypregna-4-en-3,20-dion durch CrO<sub>3</sub>-Pyridin-Oxydation ergab.<sup>9)</sup>

Dem Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Unterrichtsministerium) danken wir bestens für die Unterstützung dieser Arbeit. Wir danken Herrn Dr. K. Okazaki (Takamine Forschungslaboratorium) für seine 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

Bei der Inkubation von Progesteron mit *Helminthosporium sativum* ließen sich zwei Monohydroxy- und drei Dihydroxyprogesterone gewinnen. Drei davon erwiesen sich als identisch mit den bekannten Verbindungen, nämlich 15 $\alpha$ - und 15 $\beta$ -Hydroxyprogesteron, und 7 $\beta$ ,15 $\beta$ -Dihydroxyprogesteron. Für die übrigen Hydroxylierungsprodukte wurde nach dem chemischen Verhalten die Struktur von 7 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Dihydroxy- bzw. von 14 $\alpha$ ,15 $\beta$ -Dihydroxyprogesteron erteilt.

(Eingegangen am 4. Juli, 1961)