

245. Yoshihiro Sato, Tokuji Tanaka, Mitsugi Kato, und Kyosuke

Tsuda : Untersuchungen auf dem Gebiet der mikrobiologischen Umsetzung. XX.¹⁾ Hydroxylierung von Progesteron mittels *Syncepharastrum racemosum* COHN (5).²⁾

(Institut für angewandte Mikrobiologie der Universität Tokio*¹⁾)

In früheren Mitteilungen dieser Reihe²⁾ haben wir über die Einwirkung von *Syncepharastrum racemosum* in Schüttelkulturen auf Progesteron (I) (Pregn-4-en-3,20-dion) berichtet. Unter normalen Bedingungen wurde das Progesteron nach 6 Stunden gänzlich umgesetzt, und es ließen sich das 7 β ,15 β -Dihydroxyprogesteron (IV) (ca. 20%) und eine Spurenmenge von 7 β ,14 α ,15 β -Trihydroxyprogesteron (VII) gewinnen. Bei längerer Inkubation nahm das erstere langsam ab, und war nach 72 Stunden verschwunden, während das letztere entsprechend zunahm. In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die Resultate, welche wir bei der Umsetzung von Progesteron mit Gärtankkulturen von denselben Mikroorganismen erzielten.

Die Umsetzung wurde in Gärtankkulturen unter aeroben Bedingungen bei 28° durchgeführt, wobei eine Nährlösung von in früheren Mitteilungen²⁾ beschriebener Zusammensetzung verwendet wurde. Die Inkubation von I mit *Syncephalastrum racemosum* während 4 Stunden ergab einen guten Umsatz, wobei der Reaktionsablauf papierchromatographisch verfolgt wurde. Das erhaltene Umsetzungsprodukt wurde zuerst mit Chloroform behandelt, der schwerlösliche Anteil (siehe unten) entfernt und die Mutterlauge zur weiteren Reinigung gebracht. Die präparative Trennung an der Silikagel-Säule ergab also neben dem oben erwähnten Produkt (IV) (Ausbeute ca. 37%) noch vier neue Produkte, und zwar folgendermaßen : 1. Stoff vom Schmp. 201~202° (Ausbeute ca. 2.5%); 2. Stoff vom Schmp. 244~246° (Ausbeute ca. 0.5%); 3. Stoff vom Schmp. 267~272° (Ausbeute ca. 6%); 4. Stoff vom Schmp. 262~266° (Ausbeute ca. 2%); dabei ließ sich das oben erwähnte Trihydroxyprogesteron (VII) nur papierchromatographisch in der letzten Fraktion der Trennung nachweisen.

Jedem dieser vier neu gewonnenen Stoffe ließ sich die einzelne Formel (II, VI, V und III) auf Grund folgender Befunde erteilen. Bei dem erstgenannten Stoff vom Schmp. 201~202° handelte es sich um das bekannte 15 β -Hydroxyprogesteron (II),³⁾ das sich durch Einwirkung von *Helminthosporium sativum* auf I bereits in diesem Laboratorium gewinnen ließ.

Der zweite Stoff vom Schmp. 244~246° ließ sich auch aus dem in Chloroform schwerlöslichen Anteil durch Umkristallisation aus gleichem Lösungsmittel in reiner Form isolieren (Ausbeute ca. 4.5%). Nach dem Ultraviolettspektrum $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 236 m μ ($\epsilon=12800$) war das 4-En-3-on-System von I noch unversehrt. Die Analysenwerte paßten die Bruttoformel C₂₁H₃₀O₄, die mit der Formel des dihydroxylierten Progesterons im Einklang steht. Bei der Behandlung mit Acetanhydrid und Pyridin wurde ein Diacetat vom Schmp.

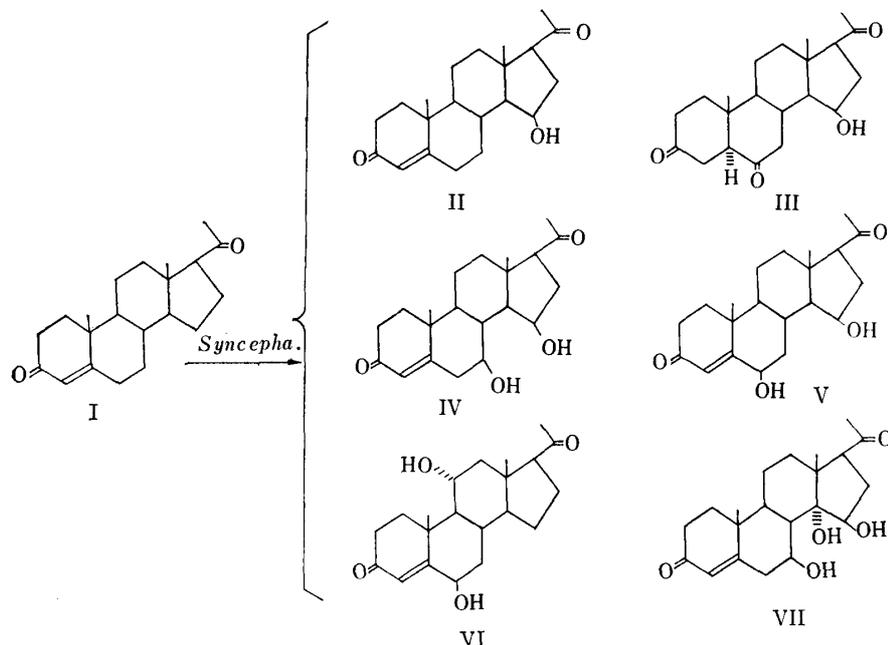
*¹⁾ Hongo, Bunkyo, Tokio (佐藤良博, 田中篤治, 加藤彌次, 津田恭介).

1) XIX Mit. : dieses Bulletin, 11, 356 (1963).

2) T. Asai, K. Aida, E. Ohki, T. Tanaka, M. Hattori : J. Gen. and Appl. Microbiol., 4, 79 (1958); K. Tsuda, T. Asai, E. Ohki, T. Tanaka, M. Hattori : dieses Bulletin, 6, 387 (1958); K. Tsuda, T. Asai, E. Ohki, T. Tanaka, T. Matsuhisa : *Ibid.*, 7, 369 (1959); K. Tsuda, T. Asai, Y. Sato, T. Tanaka, T. Matsuhisa, H. Hasegawa : *Ibid.*, 8, 626 (1960).

3) K. Tsuda, T. Asai, Y. Sato, T. Tanaka, H. Hasegawa : dieses Bulletin, 9, 735 (1961), vgl. auch W. J. Mc Aleer, T. A. Jacob, L. B. Turnbull, E. F. Schoenwaldt, T. H. Stoudt : Arch. Biochem. Biophys., 73, 127 (1958).

154~155° erhalten. Durch Erhitzen mit konz. Salzsäure und Methanol entstand ein Isomeres, dessen Struktur sich nach Ultraviolett- bzw. Infrarotspektrum als Monohydroxy-trioxo-pregnan erwies.



Schema 1.

Bei dieser Isomerisierung handelt es sich um eine spezifische Reaktion des 4-En-3-on-6-hydroxysteroids.⁴⁾ Somit wurde der zweite Stoff mit dem authentischen Präparat von 6 β ,11 α -Dihydroxyprogesteron (VI)⁵⁾ direkt verglichen, wobei sich die Identität beider Substanzen nachweisen ließ.

Dem dritten Stoff vom Schmp. 267~272° wurde die Struktur von 6 β ,15 β -Dihydroxyprogesteron (V) aus folgenden Gründen erteilt: die Analysenwerte ergaben die Bruttoformel C₂₁H₃₀O₄, die der Formel des dihydroxylierten Progesterons entspricht. Nach den Ultraviolett- bzw. Infrarotspektren war die 4-En-3-on-gruppierung intakt geblieben. Acetylierung mit ein Mol Acetanhydrid in Pyridin ergab das Monoacetat vom Schmp. 206~207°; mit überschüssigem Acetanhydrid aber das Diacetat vom Schmp. 159~162°. Beim Erhitzen mit konz. Salzsäure in Methanol ergab sich eine isomere Verbindung vom Schmp. 263~266°, die sich nach allen Daten als identisch mit dem oben erwähnten durch Chromatographie abgetrennten vierten Stoff erwies. Die spektroskopischen Messungen im Ultraviolett- sowie Infrarot-Gebiet zeigten, daß in der Molekel dieses Isomeren nicht mehr die 6-Hydroxy-4-en-3-on-gruppierung, sondern zwei Sechsring-Ketone existieren. Somit handelt es sich bei einer von beiden mikrobiologisch in die Progesteronmolekel eingeführten Sauerstofffunktionen um die in der 6-Stellung stehende Hydroxylgruppe.

Weitere Hinweise für die 6-Stellung der Hydroxylgruppe ergaben sich aus der reduktiven Entfernungsreaktion.⁶⁾ Mit Zinkstaub und Essigsäure bei Raumtemperatur, entsta-

4) P. T. Herzog, M. Ehrenstein : J. Org. Chem., **16**, 1050 (1951).

5) D. H. Peterson, H. C. Murry, S. H. Eppstein, L. M. Reineke, A. Weintraub, P. D. Meister, H. M. Leigh : J. Am. Chem. Soc., **74**, 5933 (1952); T. Asai, K. Aida, E. Ohki, T. Tanaka, M. Hattori : J. Agr. Chem. Soc. Japan., **32**, 723 (1958).

6) F. Sondheimer, S. Kaufmann, J. Romo, H. Martinez, G. Rosenkranz : J. Am. Chem. Soc., **75**, 4712 (1953).

nd, durch reduktive Elimination des 6-Hydroxyls, ein Monohydroxyprogesteron, das mit dem authentischen Präparat von 15 β -Hydroxyprogesteron (II)⁹⁾ übereinstimmte. Somit befindet sich in dem dritten Stoff eine Hydroxylgruppe tatsächlich in 6-Stellung und andere in 15-Stellung. Bei dem vierten Stoff handelt es sich dementsprechend um 15 β -Hydroxy-5 α -pregnen-3,6,20-trion (III).

Hinweise für die β -Konfiguration der 6-Hydroxylgruppe in V ergaben sich aus den Physikalischen Daten sowie dem chemischen Verhalten, und zwar folgendermaßen: etwas kürzerwelliges Absorptionsmaximum des 4-En-3-ons an 234,7 m μ läßt sich zunächst anführen, da das Ultraviolettabsorptionsmaximum eines 4-En-3-on-steroids durch Einführung der 6 β -Hydroxylgruppe eine hypochrome Verschiebung von ca. 5 m μ erfährt.⁷⁾ Der molekulare Drehungsbeitrag dieses Hydroxyls von -245° spricht auch für die 6 β -Konfiguration⁸⁾ (siehe Tabelle 1.). Wie in früherer Mitteilung⁹⁾ dieser Reihe beschrieben worden ist, steht die Interpretation der Protonen-Resonanzspektren von V mit der β -Konfiguration der Hydroxylgruppen in 6- und 15-Stellung in guter Übereinstimmung.

Entscheidend für die Feststellung des 6 β -Hydroxyls war die Epimerisierungsreaktion des Acetoxyls in 6-Monoacetats vom Schmp. 206~207° (VIIIb) mittels Chlorwasserstoff-Chloroform^{8,10)}; die Verknüpfungsposition des Acetylrests in VIIIb wurde dadurch bewiesen, daß das aus VIIIb durch Chromsäureanhydrid-Oxydation entstandene Keton XIIIa im Ultraviolettpektrum eine für 6 β -Hydroxy-4-en-3-on charakteristische Absorption und ferner im Infrarotspektrum neben der, von der Acetoxylgruppe herkommenden Bande noch eine Bande des Fünfring-Ketons auf dem Gebiet von 1720~1740 cm⁻¹ zeigte. Behandlung von VIIIb mit Chlorwasserstoff in Chloroform-Ethanol bei Raumtemperatur^{*2} ergab ein Isomeres vom Schmp. 191~192°. Dieses Isomere, dessen Struktur dem 6 α -Acetoxy-15 β -hydroxyprogesteron (IXa) entspricht, ergab durch Verseifung mittels Kalilauge 6 α , 15 β -Dihydroxyprogesteron (IXb) und III. IXb zeigte im Ultraviolettpektrum eine Absorption bei 240 m μ ($\epsilon=21954$). Die Berechnung des molekularen Drehungsbeitrags betreffs des 6 α -Acetoxyls ergab den Wert von -78° (ΔM_D für 6 β -Acetoxyl -198°) (siehe Tabelle I). Durch Acetylierung von IXa sowie IXb ergab sich das Diacetat (IXc).

Die Struktur von V wird ferner durch folgende Versuche gestützt. Bei der Oxydation von V mittels Natriumbichromat¹¹⁾ ergab sich ein Produkt vom Schmp. 247~251°, das sich nach allen Daten als identisch mit dem Verseifungsprodukt vom XIIIa, XIIIb, erwies.

TABELLE I. Molekulare Drehungsbeiträge der 6 β - sowie der 6 α -Hydroxylgruppe

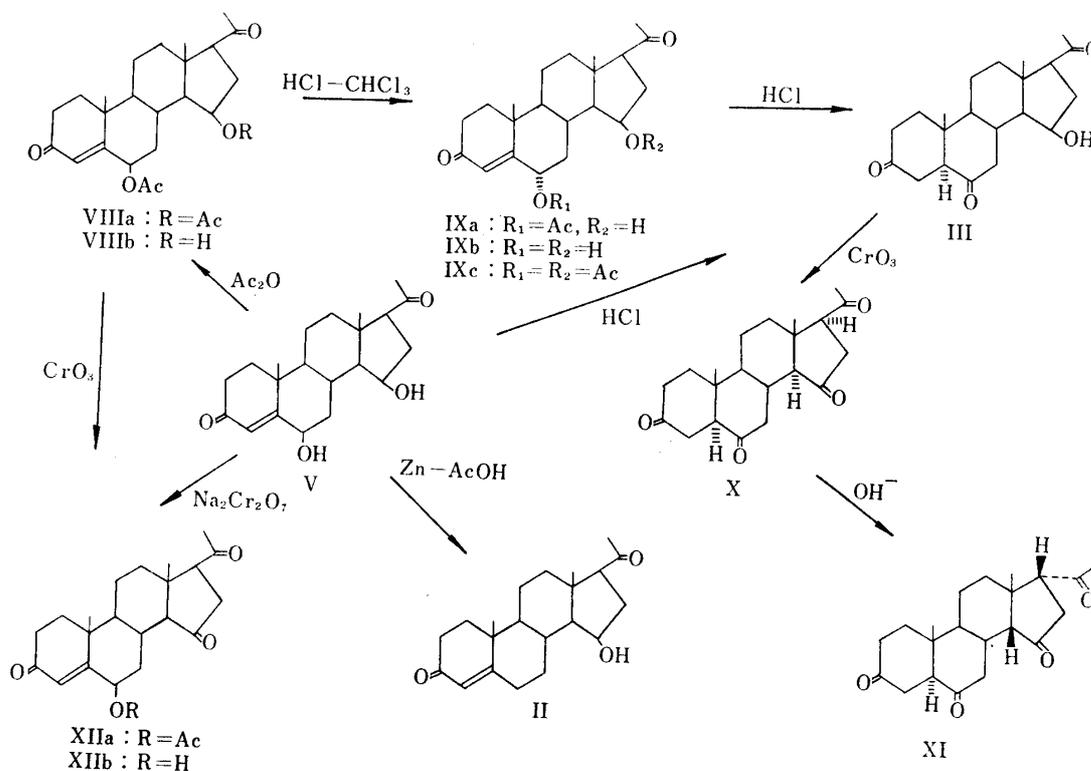
Grundmolekeln und ihre 6 β -bzw. 6 α -OH-Derivate	M _D ^{a)}	ΔM_D
15 β -Hydroxyprogesteron (II)	+ 492°	—
6 β ,15 β -Dihydroxyprogesteron (V)	+ 247°	- 245°
6 β -Acetoxy-15 β -hydroxyprogesteron (VIIIb)	+ 294°	- 198°
6 α -Acetoxy-15 β -hydroxyprogesteron (IXb)	+ 414°	- 78°
Pregn-4-en-3,15,20-trion	+ 647°	—
6 β -Hydroxypregn-4-en-3,15,20-trion (XIIb)	+ 441°	- 206°
6 β -Acetoxypregn-4-en-3,15,20-trion (XIIa)	+ 456°	- 191°

a) Für Lösungsmittel wird CHCl₃ verwendet.

*2 Bei der Einwirkung von Chlorwasserstoff auf 15 β -Hydroxyprogesteron unter denselben Bedingungen ergab sich das Ausgangsmaterial.

- 7) F. Sondheimer, O. Mancera, G. Rosenkranz: *Ibid.*, **76**, 5020 (1954).
 8) C.P. Balant, M. Ehrenstein: *J. Org. Chem.*, **17**, 1857 (1952); P.D. Meister, D.H. Peterson, S.H. Eppstein, H.C. Murray, L.M. Reineke, A. Weintraub, H.M. Leigh: *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 5679 (1954).
 9) Y. Kawazoe, Y. Sato, M. Natzume, H. Hasegawa, T. Okamoto, K. Tsuda: *dieses Bulletin*, **10**, 338 (1962).
 10) G.B. Spero, J.L. Thompson, B.J. Magerlein, A.R. Hanze, H.C. Murry, O.K. Sebek, J.A. Hogg: *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 6213 (1956).
 11) S.H. Eppstein, P.D. Meister, H.M. Leigh, D.H. Peterson, H.C. Murray, L.M. Reineke, A. Weintraub: *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3174 (1954).

Das aus V durch Einwirkung von Salzsäure entstandene obengenannte Isomere III ließ sich mittels Chromsäureanhydrid in das 5α -Pregnan-3,6,15,20-tetraon (X) überführen, das, wie erwartet,¹²⁾ durch Einwirkung von methanolischer Kalilauge in die 14-Iso-17-iso-Verbindung (XI) überging.



Schema 2.

Vor kurzem isolierten Tamm und Mitarbeiter¹³⁾ neben dem bekannten 15α -Hydroxyprogesteron noch ein neues dihydroxyliertes Progesteron-derivat nach Inkubation von I mit Kulturen von *Fusarium lini*. Sie erteilten diesem kristallinen Stoff vom Schmp. $192\sim 203^\circ$ die Struktur von $6\beta,15\alpha$ -Dihydroxyprogesteron aus folgenden Gründen: 1. selektive Oxydation mit Chromsäureanhydrid ergab ein Hydroxy-Keton vom Schmp. $184\sim 193^\circ$, das im Infrarotspektrum außer einer Hydroxylbande noch eine neue Bande, die von einem Fünfringketon herrührte, aufwies. 2. Ultraviolett-absorptionsmaxima des Dihydroxyprogesterons, d.h. $240\text{ m}\mu$ ($\log \epsilon=4.22$) und $285\sim 300\text{ m}\mu$ ($\log \epsilon=1.98$), veränderten sich beim Erwärmen in alkalischem Medium, wie es für 6β -Hydroxy-4-en-3-on charakteristisch ist.¹⁴⁾ 3. Der molekulare Drehungsbeitrag der Hydroxylgruppe von -277° sprach für die 6β -Konfiguration. 4. 15α -Hydroxyprogesteron wurde gleichzeitig als Hydroxylierungsprodukt isoliert.

Dementsprechend soll das obengenannte Hydroxy-Keton vom Schmp. $184\sim 193^\circ$ in jeder Hinsicht mit dem von uns gewonnenen Stoff (XIIb) identisch sein; jedoch stimmen die physikalischen Daten des Hydroxy-Ketons mit den unserigen nicht überein. Wir zweifeln daher an der Richtigkeit des Beweises für die β -Konfiguration der 6-Hydroxylgruppe, den die oben genannten Autoren erbrachten.

Im Zusammenhang mit der oben erwähnten Umsetzung von Progesteron (I) wurde das 15β -Hydroxyprogesteron (II) mit denselben Mikroorganismen umgesetzt; denn das

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

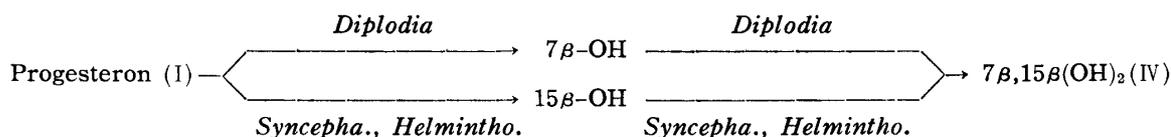
13) Ch. Tamm, A. Gubler, G. Juhász, E. Weiss-Berg, W. Zürcher : Helv., **46**, 889 (1963).

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

letztere schien das Zwischenprodukt in der Umwandlung von I zu $7\beta,15\beta$ -Dihydroxyprogesteron (IV) zu sein. Dabei entstand tatsächlich das IV. Daraus ist ersichtlich, daß bei der Umsetzung von I die Hydroxylase von *Syncephalastrum racemosum* die 15β -Stellung und dann die 7β -Stellung stufenweise angreift.

Die beschriebenen Oxygenierungen von C-7 und C-15 durch obengenannte Mikroorganismen sind nicht außergewöhnlich, da auch andere Mikroorganismen, wie aus den Ergebnissen der früheren Arbeiten in diesem Laboratorium ersichtlich ist, an diesen Stellungen Hydroxylgruppen einzuführen vermögen.

Helminthosporium sativum vermochten I sowie II in IV umzuwandeln,^{*3} und es lassen sich daher dieselbe Umsatzgänge vorschlagen. Dagegen bei der Umsetzung von I mit *Diplodia tubericola*¹⁵⁾ ließen sich zunächst die 7β und dann die 15β Stellung angreifen.



Experimentelles*4

Umsetzung von Progesteron (I) mit Gärtankkulturen von *Syncephalastrum racemosum*—Gärtank von 100 L mit 50 L Nährlösung (Glukose 5%, Pepton 2%, Corn-steep Liq. 0.3% (pH 5.2)) wurde bei 120° während 30 Min. mit Dampfstrom sterilisiert und mit Sporensuspension 24 Std. bei 28° inkubiert. Eine Lösung von I (40 g) in MeOH (400 ml) wurde diesen Kulturen hinzugefügt, und 4 Std. unter Belüftung fermentiert. Die Nährlösung wurde hierauf mit AcOEt (50 L) ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Es resultierten Rohprodukt (46 g), das durch Behandlung mit CHCl_3 das $6\beta,11\alpha$ -Dihydroxyprogesteron (VI) in reiner Form lieferte; Ausbeute 2.26 g. Das CHCl_3 -Filtrat wurde an Silikagel (800 g) chromatographiert, wobei zum Nachwaschen jeder Fraktion je (800 ml) Lösungsmittel dienten. Die Produkte in jeder Fraktion wurden vorläufig durch Papierchromatographie verfolgt.

Fraktionen 1~4 (eluiert mit CH_2Cl_2) ergaben Kristallinat (3 g), das aus 15β -Hydroxyprogesteron (II) und 15β -Hydroxy- 5α -pregnan-3,6,20-trion (III) bestanden.

Die Fraktionen 5~17 (eluiert mit CH_2Cl_2) ergaben 25 g rohen $7\beta,15\beta$ -Dihydroxyprogesterons (IV).

Die Fraktionen 18~19 (eluiert mit $\text{EtOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (3:97)) ergaben Kristallinat (0.9 g), dessen papierchromatographischen Untersuchungen das Dasein von IV und $6\beta,15\beta$ -Dihydroxyprogesteron (V) aufwiesen.

Die Fraktionen 20~24 (eluiert mit $\text{EtOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (5:95)) gaben 4.2 g (V).

Die Fraktion 25 (eluiert mit $\text{EtOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (10:90)) gab 0.3 g (VI).

Die Fraktionen 26~29 (eluiert mit $\text{EtOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (30:70)) ergaben eine Spurenmenge von $7\beta,14\alpha,15\beta$ -Trihydroxyprogesteron (VII), das sich nur papierchromatographisch nachweisen ließ.

Charakterisierung der bekannten Umwandlungsprodukte II, IV, VI und VII—1. Charakterisierung von II. Das von den Fraktionen 1~4 herkommende Rohprodukt ergab durch Umkristallisation aus Me_2CO 0.9 g schwerlöslichen Stoffes, der durch Umkristallisieren aus MeOH in die Prismen vom Schmp. 262~266° übergang. $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_4$ (III)—Ber.: C, 72.80; H, 8.73. Gef.: C, 72.51; H, 8.71. $[\alpha]_D^{27} +46.7^\circ$ ($c=0.985$, Pyridin). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 3500 (OH), 1704 (CO). Dieser Stoff war, wie unten erwähnt, mit 15β -Hydroxy- 5α -pregnan-3,6,20-trion (III) identisch.

Aus der Me_2CO -Mutterlauge ergab sich durch oftmalige Umkristallisationen noch ein Stoff vom Schmp. 201~202°, der sich nach Schmp., Misch-Schmp. und Infrarotspektrum als identisch mit II erwies; Ausbeute 1.2 g. $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_3$ (II)—Ber.: C, 76.32; H, 9.15. Gef.: C, 76.37; H, 9.10. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ 242 m μ (ϵ 17160). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$ cm^{-1} : 3450 (OH); 1693 (20-CO); 1655 (3-CO); 1612 (4-En).

2. Charakterisierung von IV. Die aus Fraktionen 5~17 gewonnenen Kristalle wurden aus Me_2CO umkristallisiert, wobei sich Blättchen vom Schmp. 231~232° ergaben; Ausbeute 18 g. Sie erwiesen sich

*3 Über die Hydroxylierungsprodukte von Progesteron ist bereits geschrieben worden, K. Tsuda, T. Asai, Y. Sato, T. Tanaka, H. Hasegawa, dieses Bulletin, 9, 735 (1961); aber die Hydroxylierung von 15β -Hydroxyprogesteron ist noch nicht veröffentlicht.

*4 Alle Schmp. wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Mikroanalysen und Infrarotspektren Messungen wurden in diesem Laboratorium ausgeführt. Dafür verdanken wir den Fräulein H. Yamanouchi, K. Hayashi und N. Kurosawa.

15) K. Tsuda, T. Asai, Y. Sato, T. Tanaka, T. Matsuhisa: dieses Bulletin, 8, 626 (1960); K. Tsuda, T. Asai, Y. Sato, T. Tanaka, M. Kato: J. Gen. Appl. Microbiol. 5, 1 (1959).

nach allen Daten als identisch mit $7\beta,15\beta$ -Dihydroxyprogesteron (IV). $C_{21}H_{30}O_4$ —Ber.: C, 72.80; H, 8.73. Gef.: C, 72.71; H, 8.70. UV λ_{\max}^{MeOH} 240.3 m μ (ϵ 17400). $[\alpha]_D^{16} + 132^\circ$ ($c=0.941$, $CHCl_3$). Die Fraktionen 18 und 19 wurden nochmals analog an Silikagel chromatographiert. Es resultierten 0.4 g (IV) und 0.35 g (V).

500 mg 15β -Hydroxyprogesteron (II) wurden mit den Kulturen von *Syncephalastrum racemosum* umgesetzt, und es entstanden auch 110 mg (IV).

3. Charakterisierung von VI. Die Fraktion 25 ergab aus Me_2CO 0.19 g (VI) vom Schmp. 244~246°. Es war mit authentischem Material identisch. $C_{21}H_{30}O_4$ —Ber.: C, 72.80; H, 8.73. Gef.: C, 72.40; H, 8.71. $[\alpha]_D^{27} + 136^\circ$ ($c=0.972$, Pyridin). UV: λ_{\max}^{MeOH} 236 m μ (ϵ 12800). IR ν_{\max}^{Nujol} cm^{-1} : 3460, 3395 (OH); 1695 (20-CO); 1668 (3-CO); 1614 (4-En). Diacetat:Nadeln*⁵ aus Me_2CO-Et_2O , Schmp. 154~155°. $C_{25}H_{34}O_6$ —Ber.: C, 69.74; H, 7.96. Gef.: C, 69.45; H, 7.88. IR ν_{\max}^{Nujol} cm^{-1} : 1731 (Acetyl-CO); 1703 (20-CO); 1680 (3-CO); 1620 (4-En); 1250 und 1025 (C-O.) 80 mg VI wurden in MeOH (7 ml) gelöst, mit konz. HCl (0.2 ml) versetzt, 2 Std. unter Rückfluß erhitzt, und das Reaktionsgemisch nach Zugabe von Eiswasser mit $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Die $CHCl_3$ -Auszüge wurden mit 10% $NaHCO_3$ und dann mit H_2O gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Es resultierten 78 mg Öl, das sich durch Behandlung mit Me_2CO sofort kristallisierte; Prismen aus Me_2CO , Schmp. 220~224°. $C_{21}H_{30}O_4$ —Ber.: C, 72.80; H, 8.73. Gef.: C, 72.27; H, 8.55. IR ν_{\max}^{Nujol} cm^{-1} : 3445 (OH); 17120 1704, 1692 (CO).

4. Charakterisierung von VII. Die Fraktionen 26~29 ergaben eine Spurenmenge der Kristalle. Sie waren nach Papierchromatogramm identisch mit VII, das mikrobiologisch aus I bzw. IV gewonnen worden war.

Charakterisierung der Unbekannten Produkte V und III—Die Fraktionen 20~24 ergaben aus Me_2CO 3.1 g Prismen vom Schmp. 267~272° (Zersetzung). $C_{21}H_{30}O_4$ —Ber.: C, 72.80; H, 8.73. Gef.: C, 72.19; H, 8.81. $[\alpha]_D^{28.5} + 71.2^\circ$ ($c=0.735$, $CHCl_3$). UV: λ_{\max}^{MeOH} 234.7 m μ (ϵ 16600). IR ν_{\max}^{Nujol} cm^{-1} : 3470 (OH); 1693 (20-CO); 1676 (3-CO); 1610 (4-En). Bei diesen Kristallen handelte es sich auf Grund folgender Versuche um $6\beta,15\beta$ -Dihydroxyprogesteron (V).

6-Monoacetat (VIIIb): Eine Lösung von 346 mg (1 Milimol) V in Dioxan (10 ml) und Pyridin (3 ml) wurde mit 112 mg (1.1 Milimol) Ac_2O versetzt und 4 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Zugabe von Eiswasser wurden die ausgeschiedenen Kristalle abfiltriert, wobei VIIIb (230 mg) gewonnen wurden; Blättchen aus Me_2CO , Schmp. 206~207°. $C_{23}H_{32}O_5$ —Ber.: C, 71.10; H, 8.30. Gef.: C, 71.01; H, 8.28. $[\alpha]_D^{29} + 75.8^\circ$ ($c=0.95$, $CHCl_3$). UV: λ_{\max}^{MeOH} 234.7 m μ (ϵ 12400). IR ν_{\max}^{Nujol} cm^{-1} : 3460 (OH); 1742 (Acetyl-CO); 1706 (20-CO); 1664 (3-CO); 1615 (4-En); 1240 (C-O).

Diacetat (VIIIa): V (330 mg) wurden zusammen mit 3 ml Pyridin und Ac_2O (3 ml) einer Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung ergab Rohprodukt (333 mg), das durch Umkristallisieren aus Me_2CO in Nadeln vom Schmp. 169~170° übergang. $C_{25}H_{34}O_6$ —Ber.: C, 69.74; H, 7.96. Gef.: C, 69.62; H, 7.95. $[\alpha]_D^{27.8} + 38.9^\circ$ ($c=1.436$, $CHCl_3$). UV: λ_{\max}^{MeOH} 233.4 m μ (ϵ 13300). IR $\nu_{\max}^{CHCl_3}$ cm^{-1} : 1742 (Acetyl-CO); 1710 (20-CO); 1682 (3-CO); 1622 (4-En). IR ν_{\max}^{Nujol} cm^{-1} : 1254, 1235, 1027 (C-O).

Darstellung von III durch Behandlung von V mit HCl: V (300 mg) wurden in MeOH (3 ml) gelöst, mit konz. HCl (0.3 ml) versetzt und 2 Std. auf dem Wasserbade unter Rückfluß gekocht, wobei sich kristallines Produkt ausschied. Nach Zugabe von Eiswasser wurden die Kristalle abfiltriert und aus MeOH umkristallisiert; Prismen vom Schmp. 263~266°; Ausbeute 278 mg. $C_{21}H_{30}O_4$ —Ber.: C, 72.80; H, 8.73. Gef.: C, 72.54; H, 8.70. Bei diesem Isomeren handelte es sich um 15β -Hydroxy- 5α -pregnan-3,6,20-trion (III). Dieser Stoff war mit dem aus Fraktionen 1~4 isolierten Hydroxylierungsprodukt vom Schmp. 262~266° identisch.

Reduktion von V mit Zn-AcOH: eine Lösung von V (100 mg) in AcOH (20 ml) und H_2O (6 ml) wurde zusammen mit 400 mg des mit HCl aktivierten Zinkstaubs 8 Min. bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Entfernung von Zn wurde AcOH im Vakuum abgedampft, der Rückstand mit H_2O versetzt und dann mit $CHCl_3$ ausgeschüttelt. Nach üblicher Aufarbeitung resultierten Produkt (71.5 mg), das sich an Silikagel (6 g) chromatographieren ließ. Beim Eluieren mit Benzol- CH_2Cl_2 (95:5) und (90:10) ergaben sich II (32 mg) vom Schmp. 205~206°. $C_{21}H_{30}O_3$ —Ber.: C, 76.32; H, 9.15. Gef.: C, 76.19; H, 9.06. IR ν_{\max}^{Nujol} cm^{-1} : 3470 (OH); 1695 (20-CO); 1656 (3-CO); 1612 (4-En).

CrO_3 -Oxydation von VIIIb: Eine Lösung von VIIIb (100 mg) in AcOH (3 ml) wurde mit einer Lösung von CrO_3 (19 mg) in AcOH (1 ml) und Spur H_2O versetzt und 2 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach Zugabe von MeOH (0.5 ml) und Stehen während 4 Std. wurde wie üblich gearbeitet. Es resultierten 6β -Acetoxypregn-4-en-3,15,20-trion (XIIa) (66.7 mg); Blättchen*⁵ von Schmp. 205~206°. $C_{23}H_{30}O_5$ —Ber.: C, 71.48; H, 7.82. Gef.: C, 70.97; H, 7.73. $[\alpha]_D^{25.5} + 118^\circ$ ($c=0.415$, $CHCl_3$). UV: λ_{\max}^{EtOH} 236.8 m μ (ϵ 12000). IR ν_{\max}^{Nujol} cm^{-1} : 1738 und 1724 (Acetyl-CO und 15-CO); 1705 (20-CO); 1679 (3-CO); 1626 (4-En); 1250 und 1235 (C-O).

Isomerisierung von VIIIb mit HCl- $CHCl_3$: Eine Lösung von VIIIb (300 mg) in $CHCl_3$ (300 ml) und abs. EtOH (3.5 ml) wurde mit getrocknetem HCl gesättigt. Nach Stehen während 2.5 Std. unter Leitung von HCl, wurde das HCl unter vermindertem Druck entfernt, die verbleibende $CHCl_3$ -Lösung mit H_2O , mit

*⁵ Dieser Stoff war gegen das Licht nicht beständig, sodaß er nach kurzem Stehen gelb gefärbt war.

10% NaHCO₃ und dann mit H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Es resultierten nach üblicher Aufarbeitung öligen Produktes (295 mg), das an 10 g Silikagel chromatographiert wurde. Beim Eluieren mit Benzol-CH₂Cl₂ (9:1) ergaben sich 207 mg kristallinen Produktes, das durch Umkristallisieren aus Me₂CO-Et₂O in Prismen vom Schmp. 191~192° überging. Bei diesem Produkt handelte es sich um 6 α ,15 β -Dihydroxyprogesteron-6-acetat (IXa). C₂₃H₃₂O₅-Ber.: C, 71.10; H, 8.30. Gef.: C, 70.99; H, 8.29. $[\alpha]_D^{20} + 106.6^\circ$ (c=1.20, CHCl₃). UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 236.8 m μ (ϵ 13580). IR $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ cm⁻¹: 3443 (OH); 1747 (Acetyl-CO); 1710 (20-CO); 1648 (3-CO); 1616 (4-En); 1240 (C-O).

6 α ,15 β -Dihydroxyprogesteron (XIb) und 6 α ,15 β -Diacetoxypregesteron (IXc): einer Lösung von IXa (200 mg) in EtOH (30 ml) wurde eine Lösung von KOH (335 mg) in EtOH (10 ml) im N₂-Strom unter Rühren bei Zimmertemperatur hinzugefügt. Nach 20-minütigem Rühren wurde unter Eiskühlung mit 2% H₂SO₄ neutralisiert, mit Eiswasser versetzt und mit CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Bei der üblicher Aufarbeitung ergaben sich Rohprodukt (120 mg), das an Silikagel (5 g) chromatographiert wurde. Zum Nachwaschen jeder Fraktion dienten je 10 ml Lösungsmittel. Die Fraktionen 1~4 (CH₂Cl₂) ergaben 90 mg kristallinen Produktes, das durch Umkristallisieren aus MeOH in Prismen vom Schmp. 261~265° (Zersetz.) überging. Dieses Produkt war mit III identisch. Die Fraktionen 8 und 9 (CH₂Cl₂-MeOH (95:5)) ergaben aus Me₂CO IXb (15 mg) vom Schmp. 234~235°. C₂₁H₃₀O₄-Ber.: C, 72.80; H, 8.73. Gef.: C, 72.28; H, 8.33. UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 240 m μ (ϵ 21954). IR $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ 3550, 3430 und 3240 (OH); 1690 (20-CO); 1658 (3-CO); 1615 (4-En). Im Papierchromatogramm nach der Methode von Zaffaroni (System: Propylenglykol-MeOH (3:7)/Toluol-Dioxan (4:1)) wies das IXb einen langsamer als V laufenden Fleck (R_v=0.77) auf.

IXa (62.6mg) wurden zusammen mit Ac₂O (0.5 ml) und Pyridin (0.5 ml) bei Zimmertemperatur 40 Std. stehengelassen. Die übliche Aufarbeitung gab 48 mg öligen Produktes, das im Papierchromatogramm neben dem Hauptfleck von Diacetat (IXc) noch einen schwachen Fleck von IXa aufwies. Beim Chromatographieren an 2 g Silikagel ergab sich ein Papierchromatographisch reines Produkt, das die der Struktur von IXc entsprechenden IR-Banden besitzte. IR $\nu_{\max}^{\text{Nujol}}$ cm⁻¹: 1743 (Acetyl-CO); 1710 (20-CO); 1670~1682 (3-CO); 1622 (4-En). Es ließ sich als ein amorphes Produkt erhalten. Acetylierung von IXb ergab auch das amorphe IXc.

Selektive Oxidation von V mittels Na₂Cr₂O₇: Eine Lösung von V (340 mg) in Benzol (50 ml) und AcOH (50 ml) wurde bei 0° gerührt. Hierauf wurde eine Lösung von Na₂Cr₂O₇·2H₂O (200 mg) in AcOH (5 ml) im Laufe einer 1/2 Std. unter Rühren allmählich hinzugefügt. Nach 2-stündigem Rühren bei 3° wurde mit Eiswasser (600 ml) versetzt und mit CH₂Cl₂ ausgeschüttelt. Die übliche Aufarbeitung ergab Produkt (325 mg), das durch Umkristallisieren aus Me₂CO die Kristalle vom Schmp. 252~253° überging. Bei diesem Produkt handelte es sich um 6 β -Hydroxypregn-4-en-3,15,20-trion (XIb). C₂₁H₂₈O₄·H₂O-Ber.: C, 69.58; H, 8.34. Gef.: C, 69.37; H, 8.21. $[\alpha]_D^{25} + 128^\circ$ (c=0.562, CHCl₃). UV: $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 235.8 m μ (ϵ 14700). IR $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹: 3650 und 3610 (OH); 1745 (15-CO); 1712 (20-CO); 1680 (3-CO); 1601 (4-En). Acetylierung von XIb mit Ac₂O und Pyridin ergab die Kristalle vom Schmp. 204~206°, die sich nach allen Daten als identisch mit XIIa erwiesen.

CrO₃-Oxydation von III: einer Lösung von III (692 mg) in AcOH (350 ml) wurde eine Lösung von CrO₃ (146 mg) in AcOH (30 ml) und H₂O (5 ml) im Laufe einer 1/2 Std. unter Schütteln allmählich hinzugefügt und 2 Std. stehengelassen. Nach Zugabe von MeOH (50 ml) und Stehen während 5 Std. wurde im Vakuum bis 150 ml eingengt, mit H₂O (200 ml) versetzt und die abgeschiedenen Kristalle abfiltriert; Ausbeute 510 mg. Bei der Umkristallisation aus MeOH ergab sich das reine 5 α -Pregnan-3,6,15,20-tetraon (X) vom Schmp. 275~277°. C₂₁H₂₈O₄-Ber.: C, 73.22; H, 8.19. Gef.: C, 72.97; H, 8.09. $[\alpha]_D^{27.5} + 96.4^\circ$ (c=0.562, CHCl₃). IR $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹: 1746 (15-CO); 1710 (3,6,20-CO).

Isomerisierung von X mit KOH: eine Lösung von X (100 mg) in MeOH (150 ml) (O₂ frei) wurde mit einer Lösung von KOH (100 mg) in MeOH (20 ml) (O₂ frei) versetzt und über Nacht in N₂-Atmosphäre bei 23° stehengelassen. Nach Zugabe von H₂O wurde mit CHCl₃ ausgeschüttelt. Nach üblicher Aufarbeitung ließen sich 95 mg 5 α ,14 β ,17 α -Pregnan-3,6,15,20-tetraon (XI) erhalten; es kristallisierte sich gut aus Me₂CO, Schmp. 224~226°. C₂₁H₂₈O₄-Ber.: C, 73.22; H, 8.19. Gef.: C, 72.89; H, 8.12. $[\alpha]_D^{20} + 9.9^\circ$ (c=0.86, CHCl₃). IR $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹: 1733 (15-CO); 1709 (3,6,20-CO).

Dem Fond zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Unterrichtsministerium) danken wir bestens für die Unterstützung dieser Arbeit. Wir danken den Herren Dr. K. Okazaki und Dr. R. Shirasaka (Takamine-Forschungslaboratorium) für ihre freundliche Hilfe bei der Massenkultivierung.

Zusammenfassung

Inkubation von Progesteron (I) mit Kulturen von *Syncephalastrum racemosum* COHN ergab neben den bekannten Produkten, nämlich 15 β -Hydroxyprogesteron (II), 6 β ,11 α -Dihydroxyprogesteron (VI), 7 β ,15 β -Dihydroxyprogesteron (IV) und 7 β ,14 α ,15 β -Trihydroxyprogesteron (VII), noch unbekannte Produkte, nämlich 6 β ,15 β -Dihydroxyprogesteron (V) und 15 β -Hydroxy-5 α -pregnan-3,6-20-trion (III).

(Eingegangen am 30, Juli 1963)