

ALFRED SCHUBERT und RUDOLF SIEBERT

**Mikrobielle Oxydation von Steroiden in 12- und 15-Stellung<sup>1)</sup>**

Aus den Wissenschaftlichen Laboratorien des VEB Jenapharm, Jena

(Eingegangen am 28. April 1958)

Die mikrobielle Umsetzung von Pregnenolon, Pregnandionverbindungen und *allo*-Pregnandionverbindungen mit *Calonectria decora* wird beschrieben.

D. H. PETERSON und Mitarbb.<sup>2)</sup> berichten über die Einführung der 11 $\alpha$ -Hydroxylgruppe in Pregnanverbindungen mit *Rhizopus nigricans* Ehrenberg. Die überwiegende Zahl der durch mikrobielle Prozesse umgewandelten Steroide besitzt dagegen im Ring A die  $\Delta^4$ -3-Ketogruppierung<sup>3)</sup>. Im Rahmen der Untersuchungen über die Spezifität der vom Pilz *Calonectria decora* produzierten, gegenüber Steroiden wirksamen Enzyme hat uns die Frage interessiert, wie diese auf strukturell unterschiedliche Steroide einwirken.

Bei der Inkubation von  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -Hydroxy-pregnenon-(20) (I) mit einer Kulturlösung von *Calonectria decora* wird nach 24 stdg. Fermentation, Extraktion und anschließender chromatographischer Trennung des Rohextraktes zunächst I wiedergewonnen. Als eigentliches Umsetzungsprodukt wird mit einer Ausbeute von ca. 10% 12 $\beta$ .15 $\alpha$ -Dihydroxy-progesteron (III)<sup>4)</sup> isoliert.

Dieser experimentelle Befund läßt den Schluß zu, daß I primär nicht hydroxyliert wird, sondern daß zunächst — und zwar in einer sehr langsam verlaufenden Reaktion im Sinne von P. TALALAY und V. S. WANG<sup>5)</sup> — die Dehydrierung der 3 $\beta$ -Hydroxylgruppe des Pregnenolons stattfindet. In einer zweiten enzymatischen Reaktion wird die Doppelbindung von  $\Delta^5$  nach  $\Delta^4$  verschoben. Das auf diese Weise gebildete Progesteron II wird dann seinerseits in das bekannte III<sup>1)</sup> umgewandelt. Diese enzymatische Reaktion kann — falls nur die Reaktionen im Ring A und B betrachtet werden — in Parallele gesetzt werden zu dem enzymatischen Abbau des Pregnenolons zum Androstendion, wie ihn E. VISCHER und A. WETTSTEIN<sup>3)</sup> beschrieben haben.

In Verbindung mit dem systematischen Studium der mikrobiellen Umsetzungen von Steroiden mit *Calonectria decora* wurden als Substrate Pregnan-dion-(3.20) (IV), *allo*-Pregnandion-(3.20) (VII), 11 $\alpha$ -Hydroxy-pregnan-dion-(3.20) (XVI) und 11 $\alpha$ -Hy-

<sup>1)</sup> I. Mitteil.: A. SCHUBERT, G. LANGBEIN und R. SIEBERT, Chem. Ber. **90**, 2576 [1957].

<sup>2)</sup> D. H. PETERSON und Mitarbb., J. Amer. chem. Soc. **75**, 421 [1953].

<sup>3)</sup> A. WETTSTEIN, Experientia [Basel] **11**, 465 [1955]; S. H. EPPSTEIN, P. D. MEISTER, H. C. MURRAY und D. H. PETERSON, Vitamins and Hormones Vol. XIV, S. 360ff., Academic Press Inc., Publishers, New York 1956; E. VISCHER und A. WETTSTEIN, Angew. Chem. **69**, 456 [1957]; D. H. PETERSON, Record of Chemical Progress **17**, 211 [1956]; GEORGE M. SHULL, Transaction of the New York Academy of Science **19**, 147 [1957].

<sup>4)</sup> Die Zuordnung der 15-Hydroxylgruppe erfolgt in Übereinstimmung mit A. WETTSTEIN, Experientia [Basel] **11**, 474 [1955], nach A. FRIED und Mitarbb., Recent Progr. Hormone Res. **11**, 149 [1955].

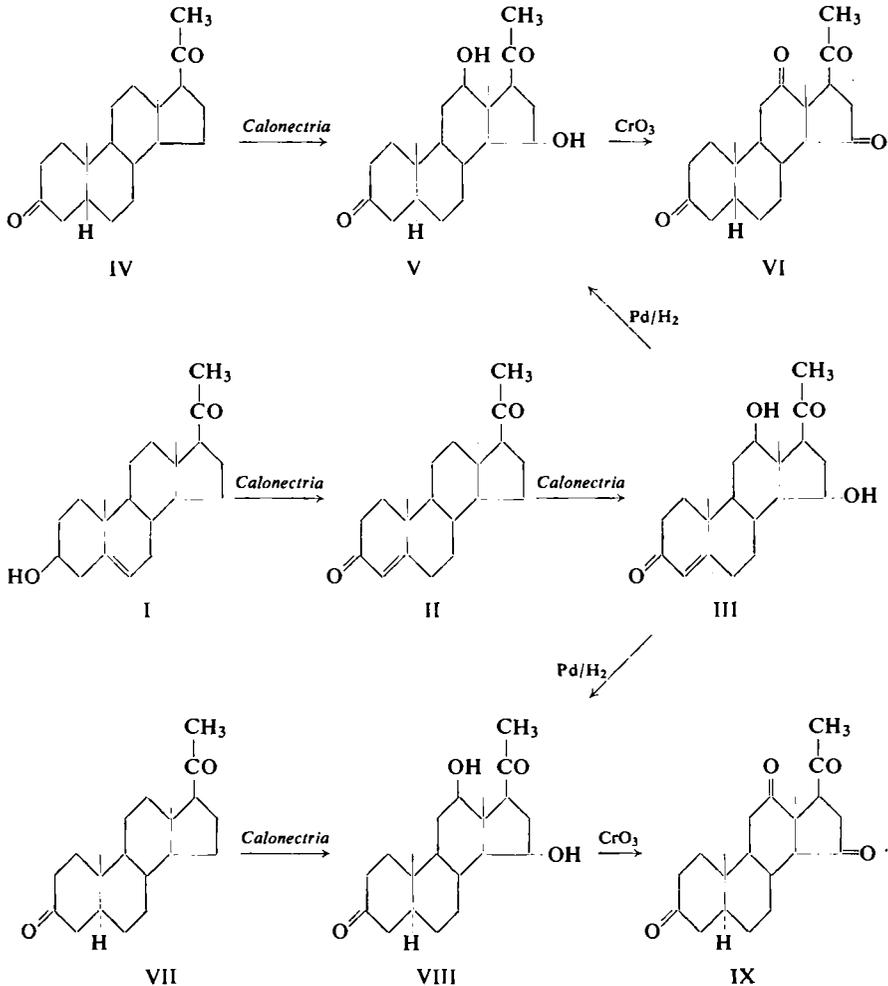
<sup>5)</sup> Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **18**, 300 [1955].

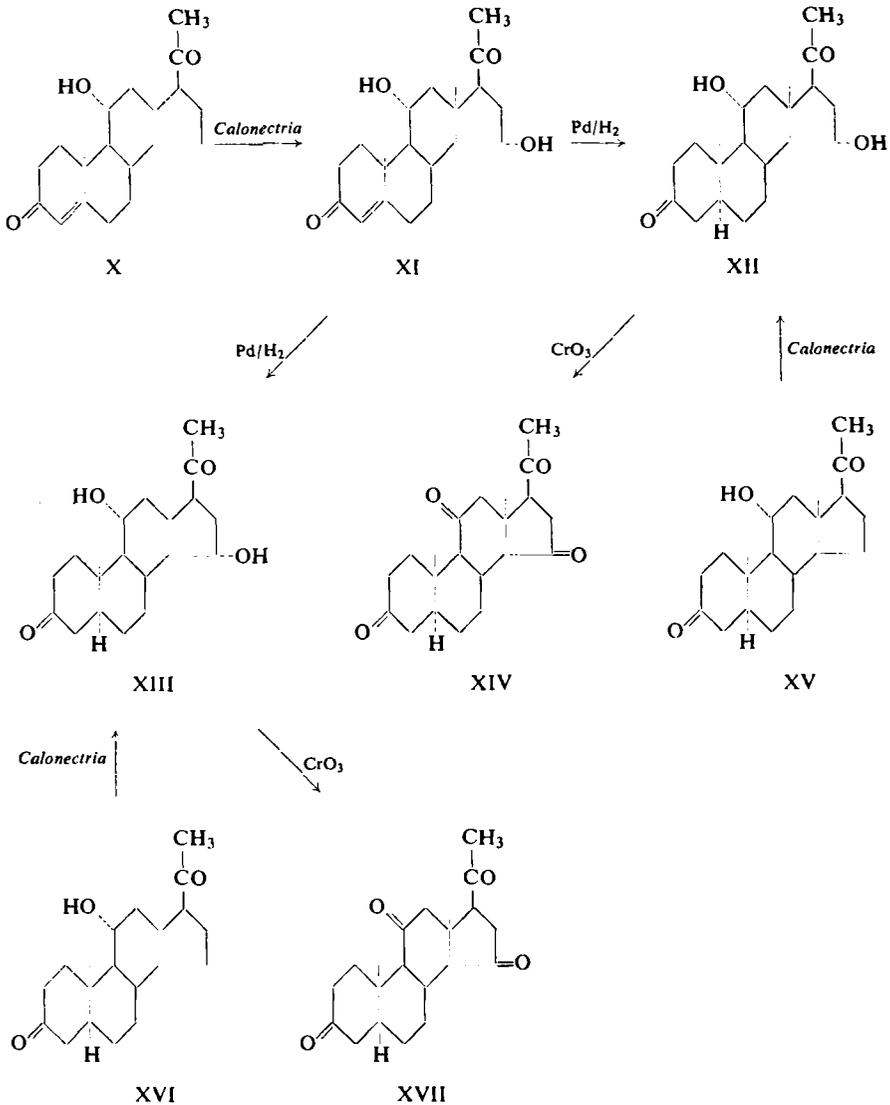
droxy-*allo*-pregnan-dion-(3.20) (XV) verwendet. Sämtliche 4 Verbindungen werden mit guter Ausbeute vom Pilz umgesetzt. Die physikalischen Daten der dargestellten Steroide und der aus ihnen mit Chromsäure/Eisessig gewonnenen Oxydationsprodukte sind in der Tabelle (S. 1859) zusammengefaßt.

Die Werte der Elementaranalyse bestätigen, daß in die Verbindungen IV und VII je 2 Hydroxylgruppen, in die Verbindungen XVI und XV je 1 Hydroxylgruppe eingeführt worden sind.

Im IR-Spektrum der erhaltenen Umwandlungsprodukte V und VIII wird im Keto-bereich eine Schulter bei  $1690\text{ cm}^{-1}$  festgestellt, wie sie für die  $12\beta$ -Hydroxylgruppe charakteristisch ist<sup>1)</sup>.

Aus V bzw. VIII werden mit Chromsäure/Eisessig die Oxydationsprodukte VI bzw. IX erhalten, in deren IR-Spektren die Bande eines 5-Ring-Ketons festgestellt wird.





Bei der Hydrierung der  $\Delta^4$ -Doppelbindung des 12 $\beta$ .15 $\alpha$ -Dihydroxy-progesterons (III) mit Palladium/Wasserstoff entsteht überraschenderweise in 97-proz. Ausbeute 12 $\beta$ .15 $\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-dion-(3.20) (V), das mit der auf mikrobiellem Wege aus IV gewonnenen Verbindung identisch ist. Substanz VIII entsteht bei der Hydrierung von III, allerdings in sehr geringem Maße. Sie ist in Aceton schwerer löslich als V. Wir konnten sie auch nach mehrmaliger fraktionierter Kristallisation und anschließender Chromatographie nicht rein isolieren. Für ihre Darstellung ist daher der Weg der mikrobiellen Umwandlung des *allo*-Pregnan-dions-(3.20) (VII) mit *Calonectria decora* die sicherste Methode.

In das  $11\alpha$ -Hydroxy-pregnan-dion-(3.20) (XVI) sowie in das  $11\alpha$ -Hydroxy-*allo*-pregnan-dion-(3.20) (XV) wird vom Schimmelpilz nur eine Hydroxylgruppe eingeführt.

Die Verbindungen XIII und XII sind identisch mit den nach der Hydrierung des  $11\alpha.15\alpha$ -Dihydroxy-progesterons (XI)<sup>1)</sup> erhaltenen und durch Chromatographie getrennten  $11\alpha.15\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-dion-(3.20) (XIII) und  $11\alpha.15\alpha$ -Dihydroxy-*allo*-pregnan-dion-(3.20) (XII). Durch Oxydation von XIII bzw. XII werden Pregnan-tetraon-(3.11.15.20) (XVII) bzw. *allo*-Pregnan-tetraon-(3.11.15.20) (XIV) erhalten.

Diese Tatsachen beweisen, daß die  $\Delta^4$ -Doppelbindung für den Ablauf der enzymatischen Hydroxylierung der untersuchten Steroide nicht erforderlich ist.

#### Übersicht über die dargestellten Steroide

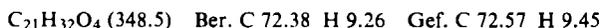
|  | Schmp.   | $[\alpha]_D$                    | IR-Banden in $\text{cm}^{-1}$  |
|--|----------|---------------------------------|--|
| $12\beta.15\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-dion-(3.20) (V)                  | 225–231° | +56° ( $\text{CHCl}_3$ )        | 3610; 1710; 1695 (Schulter); 1362; 1080; 1053; 1035; 1012 (in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )                         |
| Pregnan-tetraon-(3.12.15.20) (VI)                                      | 226–232° | +80° ( $\text{CHCl}_3$ )        | 1748; 1713; 1364; 1060 (in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )  |
| $12\beta.15\alpha$ -Dihydroxy- <i>allo</i> -pregnan-dion-(3.20) (VIII) | 253–257° | +70° ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) | 3200–3500; 1710; 1695 (Schulter); 1350; 1322; 1270; 1190; 1171; 1161; 1140; 1080; 1055; 1035; 1020; 1009 (Nujol) |
| <i>allo</i> -Pregnan-tetraon-(3.12.15.20) (IX)                         | 203–212° | +147° ( $\text{CHCl}_3$ )       | 1739; 1704; 1360; 1068; 1059 (in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )  |
| $11\alpha.15\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-dion-(3.20) (XIII)              | 175–177° | +108.5° ( $\text{CHCl}_3$ )     | 3610; 1708; 1363; 1060 (in $\text{CHCl}_3$ )   |
| Pregnan-tetraon-(3.11.15.20) (XVII)                                    | 224–228° | +130° ( $\text{CHCl}_3$ )       | 1750; 1715; 1363; 1112; 1090; 1060 (in $\text{CHCl}_3$ )   |
| $11\alpha.15\alpha$ -Dihydroxy- <i>allo</i> -pregnan-dion-(3.20) (XII) | 208–210° | +105° ( $\text{CHCl}_3$ )       | 3610; 1710; 1360; 1060; 1020 (in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )  |
| <i>allo</i> -Pregnan-tetraon-(3.11.15.20) (XIV)                        | 248–250° | +153° ( $\text{CHCl}_3$ )       | 1748; 1712; 1365; 1060 (in $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )  |

Wir danken Herrn Dr. K. HELLER für die Aufnahme der IR-Spektren.

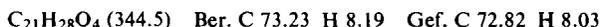
## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Apparatur, mit deren Hilfe die mikrobiellen Ansätze durchgeführt werden, sowie das Isolierungsverfahren sind bereits beschrieben worden, desgleichen die Oxydation mit  $\text{CrO}_3/\text{Eisessig}$ <sup>1)</sup>.

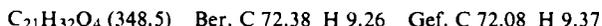
1. *12 $\beta$ .15 $\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-dion-(3.20) (V)*: Aus 2 g *IV* werden nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Aceton 880 mg der Substanz *V* erhalten, welche in Prismen kristallisiert. Schmp. 225–231°. Zur Analyse wird 1 Stde. i. Vak. bei 78° getrocknet.  $[\alpha]_D^{25}$ : +56° (in  $\text{CHCl}_3$ ). IR-Spektrum s. Tab.



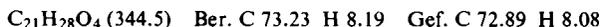
2. *Pregnan-tetraon-(3.12.15.20) (VI)*: Nach der bereits beschriebenen Oxydationsmethode<sup>1)</sup> werden mit 30-proz. Ausb. flache Stäbchen erhalten. Schmp. 226–232° (aus Isopropylalkohol). Zur Analyse wird 1 Stde. bei 78° i. Vak. getrocknet.  $[\alpha]_D^{25}$ : +80° (in  $\text{CHCl}_3$ ). IR-Spektrum s. Tab.



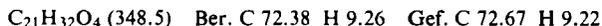
3. *12 $\beta$ .15 $\alpha$ -Dihydroxy-allo-pregnan-dion-(3.20) (VIII)*: Auch hier wurde eine rund 40-proz. Ausb. erzielt. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Aceton wurden Blättchen vom Schmp. 253–257° erhalten. Zur Analyse wurde 1 Stde. i. Vak. bei 78° getrocknet.  $[\alpha]_D^{25}$ : +70° (in  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). IR-Spektrum s. Tab.



4. *allo-Pregnan-tetraon-(3.12.15.20) (IX)*: Das aus *VIII* erhaltene Oxydationsprodukt kristallisiert in stark lichtbrechenden kurzen Säulen vom Schmp. 203–212°. Zur Analyse wird 1 Stde. i. Vak. bei 78° getrocknet.  $[\alpha]_D^{25}$ : +147° (in  $\text{CHCl}_3$ ). IR-Spektrum s. Tab.



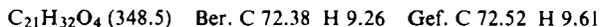
5. *11 $\alpha$ .15 $\alpha$ -Dihydroxy-pregnan-dion-(3.20) (XIII)*: Die Verbindung wird mit einer Ausb. von 40% isoliert und nach dem Umlösen als aus Aceton in kurzen Stäbchen krist. Verbindung rein erhalten. Schmp. 175–177°. Zur Analyse wird 1 Stde. i. Vak. bei 78° getrocknet.  $[\alpha]_D^{25}$ : +108.5° (in  $\text{CHCl}_3$ ). IR-Spektrum s. Tab.



6. *Pregnan-tetraon-(3.11.15.20) (XVII)*: Rhomben vom Schmp. 224–228° (aus Isopropylalkohol). Zur Analyse wird 1 Stde. i. Vak. bei 78° getrocknet.  $[\alpha]_D^{25}$ : +130° (in  $\text{CHCl}_3$ ). IR-Spektrum s. Tab.



7. *11 $\alpha$ .15 $\alpha$ -Dihydroxy-allo-pregnan-dion-(3.20) (XII)*: Schon beim Einengen des Extraktes aus der Kulturlösung fiel die Substanz aus. Durch Chromatographieren wurden weitere Mengen gewonnen, so daß die Ausbeute insgesamt 60% betrug. Prismen vom Schmp. 208–210° (aus Aceton). Zur Analyse wurde 1 Stde. i. Vak. bei 78° getrocknet.  $[\alpha]_D^{25}$ : +105° (in  $\text{CHCl}_3$ ). IR-Spektrum s. Tab.



8. *allo-Pregnan-tetraon-(3.11.15.20) (XIV)*: Dreieckige Kristalle vom Schmp. 248–250° (aus Isopropylalkohol). Zur Analyse wird 1 Stde. i. Vak. bei 78° getrocknet.  $[\alpha]_D^{25}$ : +153° (in  $\text{CHCl}_3$ ). IR-Spektrum s. Tab.

