

ALFRED SCHUBERT, DIETER ONKEN, RUDOLF SIEBERT
und KARL HELLER

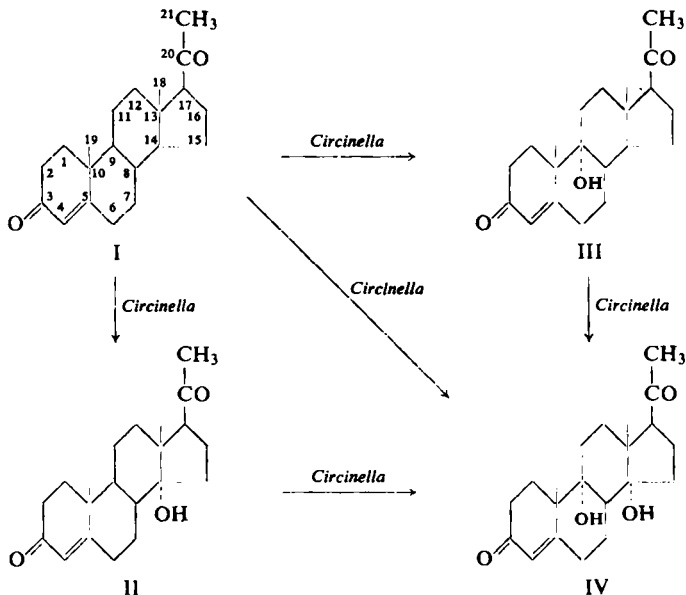
Mikrobielle Hydroxylierung von Steroiden in 9- und 14-Stellung

Aus den Wissenschaftlichen Laboratorien des VEB Jenapharm, Jena

(Eingegangen am 11. August 1958)

Durch mikrobielle Umsetzung von Steroiden mit einem speziellen *Circinella*-Stamm wird an C-9 und/oder an C-14 hydroxyliert. Die Konstitutionsaufklärung der erhaltenen Reaktionsprodukte wird beschrieben.

Bei der Inkubation von Progesteron mit einem speziellen *Circinella*-Stamm werden drei Umsetzungsprodukte isoliert.



Übersicht über die aus Progesteron erhaltenen mikrobiellen Umwandlungsprodukte

Substanz	Summenformel	Schmp.	$[\alpha]_D^{25}$
II	$C_{21}H_{30}O_3$	185–188°	+ 190° ($CHCl_3$)
III	$C_{21}H_{30}O_3$	190–192°	+ 204° ($CHCl_3$)
IV	$C_{21}H_{30}O_4$	272–273°	+ 179° ($CHCl_3$)

Substanz II ist *14α-Hydroxyprogesteron*, das als Nebenprodukt in etwa 5-proz. Ausbeute entsteht.

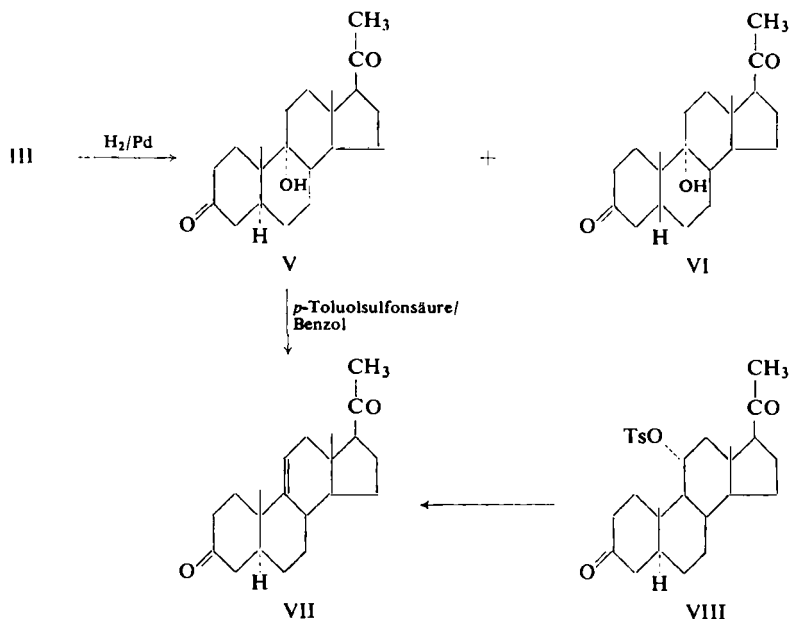
Substanz III ist sowohl chromatographisch als auch papierchromatographisch schwer von II zu trennen. Sie läuft nur sehr wenig langsamer als II. Die Konsti-

tutionsaufklärung dieser Substanz, die eine nicht oxydierbare und mit Pyridin/Acetanhydrid nicht acetylierbare Hydroxylgruppe enthält, wurde folgendermaßen durchgeführt:

Die neue Substanz III ist auf Grund des IR-Spektrums vom 14α -Hydroxyprogesteron verschieden. Die tertiäre Hydroxylgruppe kann sich deshalb nur an C-8 oder C-9 befinden.

J. FRIED¹⁾ beschreibt bereits eine Verbindung, die durch mikrobielle Umsetzung von Progesteron mit *Streptomyces aureofaciens* erhalten wird und deren physikalische Konstanten mit denjenigen von III weitgehend übereinstimmen. Die Frage der Zuordnung der Hydroxylgruppe zum C-Atom 8 oder 9 wird jedoch offen gelassen.

Nach der Abspaltung der Hydroxylgruppe mit *p*-Toluolsulfonsäure in Benzol entsteht eine Verbindung, deren neu gebildete Doppelbindung auf Grund der Analyse ihres Infrarotspektrums eine $-C=C-H$ -Gruppierung enthält. Infolgedessen kann sich die Doppelbindung nicht zwischen den C-Atomen 8 und 9 einerseits oder zwischen C-8 und C-14 andererseits befinden. Es kann auch keine Δ^7 -Doppelbindung vorliegen; dann müßte nach der Bildung des 3.20-Bisäthylenketals im Ring B ein konjugiertes System von Doppelbindungen entstehen, das eine Absorption zwischen 270 und 290 μ hat²⁾. Dieses Absorptionsmaximum wird nicht beobachtet. Damit scheidet die Möglichkeit aus, daß die tertiäre OH-Gruppe der Verbindung III an C-8 eingeführt wurde. Der direkte Beweis für die ausschließlich noch mögliche Substitution in 9-Stellung wird folgendermaßen geliefert:



1) J. FRIED und Mitarbb., *Recent Progr. Hormone Res.* 11, 155 [1955].

2) J. P. DORFMAN, *Chem. Reviews* 53, 47 [1953].

11 α -Tosyloxy-allopregnandion (VIII) wird nach Abspaltung der Tosyloxygruppe in Kollidin in 5 α . $\Delta^{9(11)}$ -Pregnendion-(3.20) (VII)³⁾ umgewandelt. VII entsteht auch, wenn die Δ^4 -Doppelbindung in III zunächst hydriert, die Alloverbindung V von der Normalform VI durch Kristallisation getrennt wird und die Abspaltung der tertiären Hydroxylgruppe mit *p*-Toluolsulfonsäure in Benzol erfolgt.

Demzufolge ist Verbindung III *9 α -Hydroxy-progesteron*. Die α -Konfiguration der 9-ständigen Hydroxylgruppe wird aus Analogiegründen formuliert, weil bekannt ist, daß die Hydroxylase dieser Schimmelpilze keine konfigurative Veränderung am jeweilig zu substituierenden C-Atom bewirkt⁴⁾.

Die Konstitutionsaufklärung der Verbindung IV ist nach der Kenntnis der genauen Struktur von III relativ einfach.

Aus den Werten der Elementaranalyse und aus dem Verhalten im Papierchromatogramm geht hervor, daß IV ein dihydroxyliertes Progesteron ist. Beide Hydroxylgruppen sind, da sie weder oxydierbar noch acetylierbar sind, tertiär gebunden. Die Auswertung des IR-Spektrums schließt eine Hydroxylgruppe an C-17 aus. Infolgedessen kommen für IV nur folgende Kombinationsmöglichkeiten für die beiden OH-Gruppen in Frage: 8 β -14 α , 9 α -14 α oder 8 β -9 α .

Wäre IV ein 1.2 Diol, d. h. 8 β .14 α - bzw. 8 β .9 α -Dihydroxy-progesteron, dann müßte nach der Hydrierung der Δ^4 -Doppelbindung und nachfolgender Behandlung des Reaktionsproduktes mit Bleitetraacetat in Eisessig oder in Benzol eine Ringspaltung eintreten. Nach der Oxydation mit Bleitetraacetat wird jedoch das Ausgangsmaterial unverändert zurückerhalten. Das bedeutet, daß IV ein 1.3-*cis*-Diol, nämlich das *9 α .14 α -Dihydroxy-progesteron* ist. Diese Konstitution wurde dadurch bewiesen, daß bei der Inkubation mit *Circinella* sowohl aus 14 α -Hydroxy-progesteron (II) als auch aus 9 α -Hydroxy-progesteron (III) die Substanz IV entsteht.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die mikrobiellen Umsetzungen mit *Circinella* werden nach der bereits an anderen Stellen beschriebenen Methode durchgeführt⁵⁾.

1. *14 α -Hydroxy-progesteron* (II): Aus 34 g I werden nach der Chromatographie in den Eluaten, die mit einem Lösungsmittelgemisch von 5–7.5 % Aceton und 95–92.5 % Chloroform erhalten werden, 1.3 g II isoliert. Prismen (aus Aceton), Schmp. 185–188°; $[\alpha]_D^{25}$: +190° (CHCl₃).

IR-Spektrum (Nujol) 3570 m, 1693 s. st., 1628 s, 1282 m, 1236 m, 1218 m, 1208 m, 1180 m, 1120 w, 925 w, 885 m, 870 w.

Die Grobschätzung der Intensität der Absorptionsbanden wird gegeben durch die Abkürzungen:

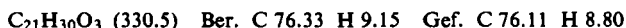
s. st. = sehr stark, s = stark, m = mittel, w = schwach.

³⁾ G. ROSENKRANZ, O. MANCERA und F. SONDHEIMER, J. Amer. chem. Soc. 76, 2227 [1954].

⁴⁾ M. HAYANO, M. GUT, R. I. DORFMAN, O. K. SEBEK und D. H. PETERSON, J. Amer. chem. Soc. 80, 2336 [1958]; S. BERGSTROM, S. LINDSTREDT, B. SAMUELSON, E. J. COREY und G. A. GREGORIOU, ebenda 80, 2337 [1958]; E. J. COREY, G. A. GREGORIOU und D. H. PETERSON, ebenda 80, 2338 [1958].

⁵⁾ A. SCHUBERT, G. LANGBEIN und R. SIEBERT, Chem. Ber. 90, 2576 [1957].

2. *9 α -Hydroxy-progesteron (III)*: Aus 34 g *I* werden nach der Chromatographie in den Eluaten, die mit einem Lösungsmittelgemisch von 10–17.5 % Aceton und 90–82.5 % Chloroform erhalten werden, 17.4 g *III* isoliert. Nadeln (aus Aceton), Schmp. 190–192°; $[\alpha]_D^{25}$: +204° (CHCl₃). Zur Analyse wird 2 Stdn. i. Vak. getrocknet.



IR-Spektrum (Nujol) 3395 m, 1708 s, 1645 s. st., 1612 w, 1248 s, 1198 m, 1170 m, 1112 m, 958 m, 898 w, 870 w.

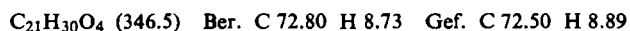
3. *9 α .14 α -Dihydroxy-progesteron (IV)*

a) Aus 34 g *I* werden nach der Chromatographie in den Eluaten, die mit einem Lösungsmittelgemisch von 20–22.5 % Aceton und 80–77.5 % Chloroform erhalten werden, 3.5 g *IV* isoliert. Derbe Nadeln (aus Aceton), Schmp. 272–273°; $[\alpha]_D^{25}$: +179° (CHCl₃).

b) Aus 2 g *II* werden nach der mikrobiellen Umsetzung und nach der üblichen Aufarbeitung 50 mg *IV* isoliert.

c) Aus 500 mg *III* werden ebenso 230 mg *IV* isoliert.

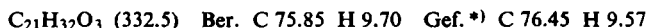
Zur Analyse wird 1 Stde. bei 78° i. Vak. getrocknet.



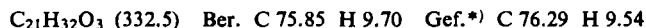
IR-Spektrum (Nujol) 3290 m, 1700 s, 1675 s. st., 1623 w, 1278 m, 1243 m, 1212 m, 1198 m, 1118 w, 1082 w, 1060 w, 960 m, 950 m, 932 m, 920 w, 904 w, 887 w, 862 m.

4. *9 α -Hydroxy-pregnandion-(3.20) (VI) und 9 α -Hydroxy-allopregnandion-(3.20) (V)*: 900 mg *III* werden in 27 ccm absol. Methanol gelöst und mit 45 mg Pd/CaCO₃ bei Zimmer-temperatur unter Normaldruck hydriert. Nach der Aufnahme von 61 ccm Wasserstoff wird der Katalysator abgesaugt und das Methanol i. Vak. abgedampft. Fraktionierte Kristallisation aus Aceton liefert 650 mg *V* und 200 mg *VI*.

VI: Schmp. 152–155°; $[\alpha]_D^{25}$: +207° (CHCl₃).



V: Schmp. 252–253°; $[\alpha]_D^{25}$: +207° (CHCl₃).



*) Zur Analyse wird 1 Stde. i. Vak. bei 78° getrocknet.

5. *5 α . Δ^9 (11)-Pregnendion-(3.20) (VII)*: 100 mg *V* werden mit 5 ccm Benzol und 30 mg *p*-Toluolsulfonsäure 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Man erhält 60 mg *VII* vom Schmp. 203–205°; $[\alpha]_D^{25}$: +113° (CHCl₃). *VII* ist identisch mit einem aus *VIII* gewonnenen authent. Präparat.

© Verlag Chemie, GmbH. 1958

Verantwortlich für den Inhalt: Prof. Dr. Rudolf Criegee, Karlsruhe. Redaktion: Dr. Wilhelm Merz, München. Verantwortlich für den Anzeigenteil: W. Thiel. Verlag Chemie, GmbH. (Geschäftsführer Eduard Kreuzhage), Weinheim/Bergstr., Pappelallee 3 · Fernsprecher Sammelnummer 3635 · Fernschreiber 0465516 chemieverl wnh. Telegramm-Adresse: Chemieverlag Weinheimbergstr.

Gesetzt aus der Monotype-Times-Schrift; Druck: Buchdruckerei Dr. Alexander Krebs, Weinheim/Bergstr. Printed in Germany. Alle Rechte vorbehalten, insbesondere die der Übersetzung. Kein Teil dieser Zeitschrift darf in irgendeiner Form – durch Photokopie, Mikrofilm oder irgendein anderes Verfahren – ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert werden. – All rights reserved (including those of translations into foreign languages). No part of this issue may be reproduced in any form, by photoprint, microfilm, or any other means, without written permission from the publishers. – Preis jährlich DM 190.–; Einzelheft DM 16.–. – Zahlungen an: Verlag Chemie, GmbH., Weinheim/Bergstr. – Postscheckkonten: Frankfurt a. M. Nr. 145314, Berlin-West Nr. 74 30, Wien 108750, Zürich VIII 47055, Stockholm 741 37. Banken: Volksbank eGmbH., Deutsche Bank AG., Weinheim/Bergstr., Dresdner Bank A. G., Mannheim, P 2, 10/13. – Abbestellungen nur bis spätestens 6 Wochen vor Ablauf eines Halbjahres. Gerichtsstand und Erfüllungsort Weinheim/Bergstr. Lieferung erfolgt auf Rechnung und Gefahr des Empfängers.