

Gerhard Cleve, Georg-Alexander Hoyer, Klaus Kieslich und Heinz Wieglepp

Mikrobiologische Hydroxylierung von 3 β -Hydroxy-5 α .6 α -epoxy-5 α -pregnanon-(20) mit Folgereaktionen

Aus den Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin/Bergkamen

(Eingegangen am 5. Oktober 1971)

Der Pilz *Curvularia lunata* wandelt 3 β -Hydroxy-5 α .6 α ;16 α .17 α -diepoxy-5 α -pregnanon-(20) (1) bei verlängerter Inkubationszeit über die primär entstehende 11 β -Hydroxystruktur 2 in die 5 β -H-6-Ketone 3 und 4 um. 3 β -Hydroxy-5 α .6 α -epoxy-5 α -pregnanon-(20) (6) wird zu 14 α - oder 17 α -Hydroxy-11-ketonen (8—10, 12) oxydiert, wobei gleichzeitig noch eine Änderung des Substitutionsmusters am A- und B-Ring eintreten kann, während die entsprechende 16 α -Methylverbindung 14 über verschiedene Zwischenstufen zum stabilen Endprodukt 3 β .15 β -Dihydroxy-5 α .6 α -epoxy-16 α -methyl-5 α -pregnandion-(11.20) (18) transformiert wird. Die Konstitutionen der isolierten Verbindungen wurden durch NMR-, IR-, MS- und CD-Untersuchungen gesichert.

Microbiological Hydroxylation of 5 α .6 α -Epoxy-3 β -hydroxy-5 α -pregnane-20-ones with further Transformations

The fungus *Curvularia lunata* transforms in prolonged incubation time 5 α .6 α ;16 α .17 α -diepoxy-3 β -hydroxy-5 α -pregnane-20-one (1) to the 5 β -H-6-ketones 3 and 4 through the primarily formed 11 β -hydroxy-structure 2. 5 α .6 α -Epoxy-3 β -hydroxy-5 α -pregnane-20-one (6) is oxidized to 14 α - or 17 α -hydroxy-11-ketones (8—10, 12). During this reaction a change of the substitution pattern of the rings A and B is sometimes observed. The corresponding 16 α -methyl-substituted substrate 14 is transformed through some intermediates to the stable product 5 α .6 α -epoxy-3 β .15 β -dihydroxy-16 α -methyl-5 α -pregnane-11.20-dione (18). The constitutions of the isolated compounds were elucidated by n.m.r., i.r., mass spectroscopic, and c.d. investigations.

Die in einer früheren Mitteilung¹⁾ beschriebene Fermentation von 3 β -Hydroxy-5 α .6 α -epoxy-steroiden mit *Curvularia lunata* führt richtungsspezifisch zu 11 β -hydroxylierten Verbindungen ohne nennenswerte Bildung von Nebenprodukten. Eine abnorm verlängerte Fermentationszeit verminderte zwar bei einigen der untersuchten Substrate durch üblichen unkontrollierten Abbau die Ausbeute und Stoffbilanz, ließ aber keine definierbaren Intermediärprodukte erkennen.

Als Ausnahme fiel die Hydroxylierung von 3 β -Hydroxy-5 α .6 α ;16 α .17 α -diepoxy-5 α -pregnanon-(20) (1) auf. Bereits nach 20 Stdn. Kontaktzeit (mit einer bei Beginn 12 Stdn. alten Kulturbrühe) wurden bei vollständiger Umwandlung des Substrats neben der gewünschten 11 β -Hydroxystruktur 2 polare und weniger polare Neben-

¹⁾ K. Kieslich und H. Wieglepp, Chem. Ber. 104, 205 (1971).

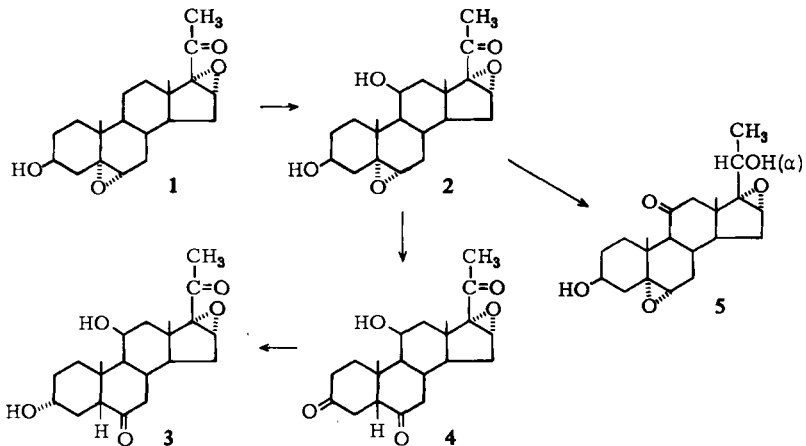
produkte beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt kann **2** noch als Hauptprodukt mit einer Ausbeute von 45% isoliert werden. Bei verlängerter Kontaktzeit (83 Std.) können jedoch nur noch folgende Verbindungen isoliert werden (s. Schema 1):

3 α .11 β -Dihydroxy-16 α .17 α -epoxy-5 β -pregnandion-(6.20) (**3**), 11 β -Hydroxy-16 α -17 α -epoxy-5 β -pregnantrion-(3.6.20) (**4**), 3 β .20 α -Dihydroxy-5 α .6 α ;16 α .17 α -diepoxy-5 α -pregnanon-(11) (**5**).

Das primär 11 β -hydroxylierte 5 α .6 α -Epidoxid **2** ist im Gegensatz zu vielen ähnlichen Strukturen der gleichen Klasse relativ instabil und erleidet eine Epoxidöffnung. Über einige Zwischenstufen bildet sich unter Umkehrung der AB-*trans*- zur AB-*cis*-Verknüpfung eine 3 α -Hydroxy-5 β -H-on-(6)-Struktur **3** aus. Als Intermediärprodukt konnte das entsprechende 3.6-Diketon **4** isoliert werden, das bei einem Wiedereinsatz als Substrat ebenfalls in **3** umgewandelt wurde. Die überraschende Umwandlung der 3 β - in die 3 α -Hydroxystruktur kann durch das Vorliegen eines reversiblen Redoxgleichgewichts erklärt werden, das in der 5 β -H-Reihe zur stabileren 3 α -Hydroxyverbindung mit äquatorialer HO-Gruppe führt.

Die Dismutation des Primärproduktes **2** zur 11-Keto-20 α -hydroxy-Verbindung **5** muß als untergeordneter, sporadisch auftretender Zweigweg aufgefaßt werden.

Schema 1



Als weitere Ausnahme der stabilen 5 α .6 α -Epidoxidsubstrate wurde auch beim einfachen Grundkörper der Pregnanreihe, bei 3 β -Hydroxy-5 α .6 α -epoxy-5 α -pregnanon-(20) (**6**; Pregnanolonepidoxid), eine schnelle Weiterreaktion des primär entstehenden 11 β -Hydroxyprodukts **7** zu mehreren Folgemetaboliten beobachtet.

Neben **7**, welches nur bei sehr kurzer Fermentationszeit gewonnen werden kann, wurden drei Hauptprodukte isoliert (s. Schema 2):

3 β .14 α -Dihydroxy-5 α .6 α -epoxy-5 α -pregnandion-(11.20) (**8**), 3 β .17 α -Dihydroxy-5 α .6 α -epoxy-5 α -pregnandion-(11.20) (**9**), 3 β .5 α .14 α -Trihydroxy-6 β -methoxyacetoxy-5 α -dion-(11.20) (**10**).

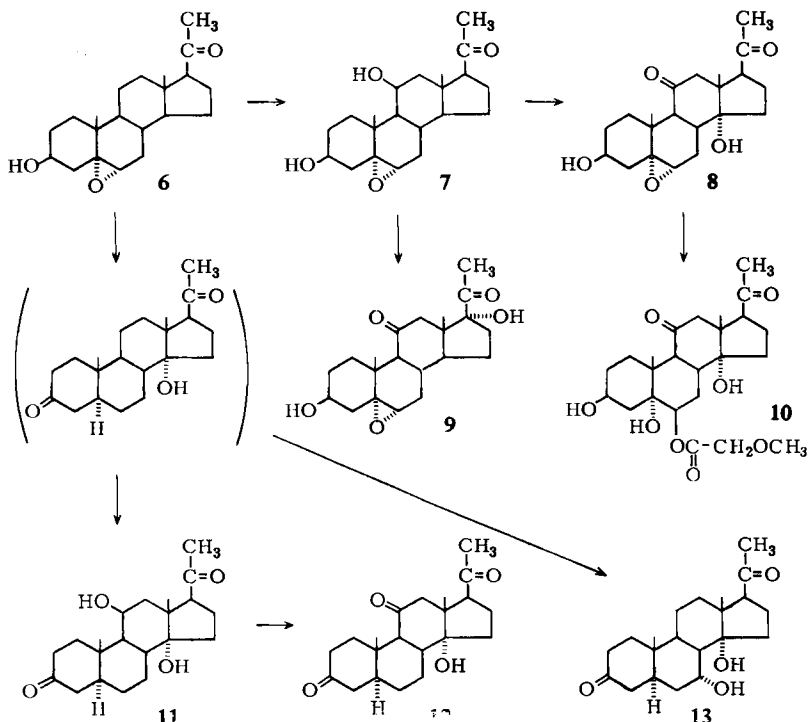
Daneben wurden in geringen Anteilen einige weniger polare Nebenprodukte abgetrennt, deren Konstitutionen wegen des Fehlens einer Substitution in 5- und 6-Stellung überraschen (s. Schema 2):

11 β .14 α -Dihydroxy-5 α -pregnandion-(3.20) (11), 14 α -Hydroxy-5 α -pregnantrion-(3.11.20) (12), 7 α .14 α -Dihydroxy-5 α -pregnandion-(3.20) (13).

Zwei weitere sehr polare Fraktionen, die als Rohprodukte zusammen 37% der eingesetzten Substratmenge betragen, lösten sich nur noch in sehr stark polaren Solventien und wurden als vermutlich stark abgebaute Metaboliten nicht näher untersucht.

Zusammen mit dem Ergebnis der dünn-schichtchromatographischen Kontrolle des Fermentationsverlaufes (s. Abbild.) sind die isolierten Produkte wahrscheinlich in folgender Beziehung verknüpft:

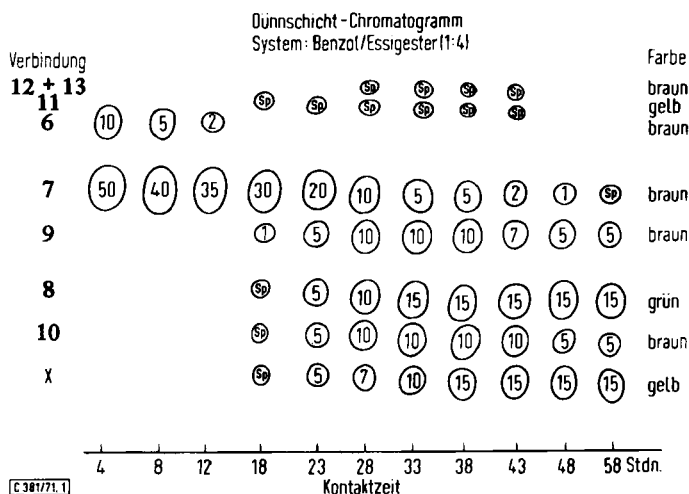
Schema 2



Die primär gebildete 11 β -Hydroxyverbindung 7 wird weitestgehend zur 11-Keto-verbindung oxydiert und diese sofort in 14 α - oder 17 α -Stellung zu 8 oder 9 hydroxyliert. Der als Substratlösungsmittel verwendete Glykolmonomethyläther wird bei langen Fermentationszeiten enzymatisch zu Methoxyessigsäure oxydiert²⁾, die den

²⁾ J. de Flines, Koninklijke Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek N. V. Delft, Privatmitteilung.

Epoxidring der 11-Keto-14 α -hydroxy-Verbindung **8** zur 5 α -Hydroxy-6 β -methoxy-acetoxy-Struktur **10** spaltet. Der weitere Abbau dieser Substanz sowie der 11-Keto-17 α -hydroxy-Verbindung **9** ist bisher ungeklärt.



Abbild. Dünnschichtchromatographische Kontrolle des zeitlichen Ablaufs der Fermentation von Pregnanolonepoxid (**6**) (Alter der Pilzkultur bis **6**-Zusatz 12 Stdn. = Kontaktzeit 0 Stdn.)*)

In sehr geringem Maße wird das Ausgangsmaterial offenbar auch in 14 α -Stellung hydroxyliert und zugleich die 3 β -Hydroxy-5 α .6 α -epoxid- in die 5 α -Pregnanon-(3)-Struktur umgewandelt. Ausgehend von der letzteren Verbindung kann durch 7 α -Hydroxylierung **13** und durch 11 β -Hydroxylierung **11** gebildet werden, wobei die 11 β -Hydroxystruktur **11** noch zur entsprechenden 11-Ketoverbindung **12** oxydiert werden kann. Ein anderer Bildungsweg kann ausgeschlossen werden, da im Ausgangsmaterial **6** nach NMR, MS und GC keine Beimengungen erkennbar sind.

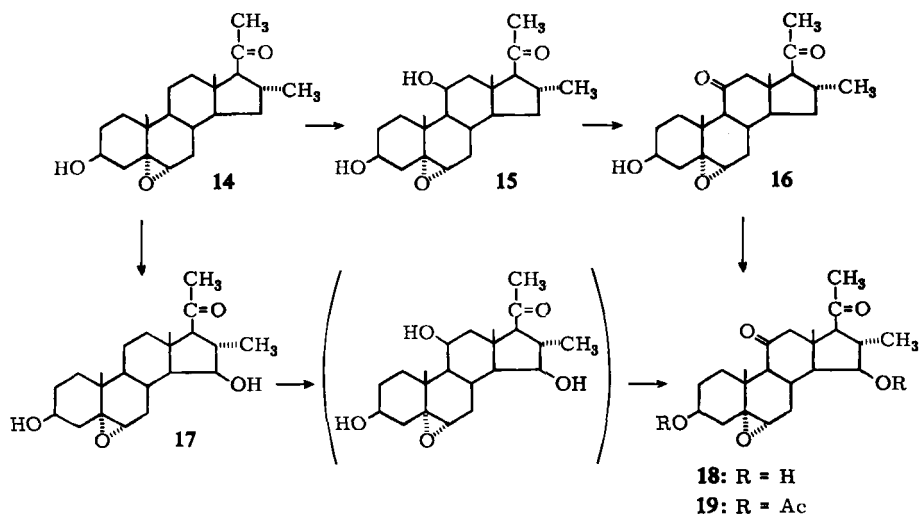
Gegenüber den weitergehenden Metabolisierungen der beiden ersten Beispiele, die in relativ kurzer Zeit in stärkerem Abbau des Steroidgerüsts enden, zeichnet sich ein letztes Ausgangsmaterial durch die Bildung eines einzigen recht stabilen Endproduktes aus.

3 β -Hydroxy-5 α .6 α -epoxy-16 α -methyl-5 α -pregnanon-(20) (**14**) wird zwar ebenfalls über die primär entstehende 11 β -Hydroxyverbindung **15** weiter umgewandelt, führt aber bei verlängerter Fermentation ausschließlich zu 3 β .15 β -Dihydroxy-5 α .6 α -epoxy-16 α -methyl-5 α -pregnandion-(11.20) (**18**). Bei mittlerer Fermentationszeit konnten die beiden folgenden Intermediärprodukte isoliert werden (s. Schema 3):

3 β -Hydroxy-5 α .6 α -epoxy-16 α -methyl-5 α -pregnandion-(11.20) (**16**), 3 β .15 β -Dihydroxy-5 α .6 α -epoxy-16 α -methyl-5 α -pregnanon-(20) (**17**).

*) Die Ziffern in den Flecken bedeuten Prozentzahlen, bezogen auf entsprechende zum Vergleich parallel aufgetragene Standardsubstanzen. Zone X wurde auf Einsatzprodukt **6** bezogen.

Schema 3



Spektroskopische Untersuchungen

Die Konstitutionen der Verbindungen 1–19 wurden durch NMR-, MS-, IR- und CD-Untersuchungen aufgeklärt.

In der Tab. sind die NMR-Daten aller Verbindungen enthalten. Die MS-, IR- und CD-Daten werden im Versuchsteil bei den einzelnen Verbindungen aufgeführt. Von den ersteren werden nur die charakteristischen und intensiven Ionen (Molekül- und Bruchstück-Ionen) mit einer Erklärung ihrer Entstehung wiedergegeben. Der Basispeak ist jeweils kursiv gedruckt. Aussagekräftige Fragment-Ionen der massenspektrometrischen Zerfälle können Schema 4 entnommen werden. Besonders die Zerfälle zu A, B und C sind typisch für 17-substit. Steroide, von denen bei den untersuchten Verbindungen nur die Möglichkeiten A und C angetroffen wurden.

Für die Verbindungen 1–19 wurden die gefundenen Signallagen der 18- und 19-Wasserstoffatome den mit Hilfe von Inkrementensätzen^{3–9)} berechneten Werten gegenübergestellt (s. Tab.). Die gute Übereinstimmung stellt schon eine Bestätigung der formulierten Konstitutionen dar.

³⁾ R. F. Zürcher, *Helv. chim. Acta* **46**, 2054 (1963).

⁴⁾ A. I. Cohen und S. R. Rock, *Steroids* **3**, 243 (1964).

⁵⁾ K. Tori und K. Aono, *Annu. Rep. Shionogi Res. Lab. [Osaka]* **14**, 136 (1964), C. A. **67**, 27508s (1967).

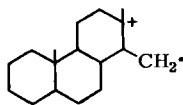
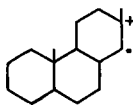
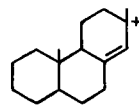
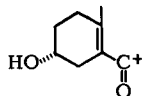
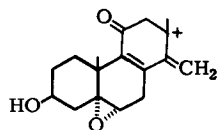
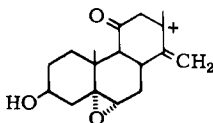
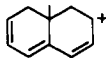
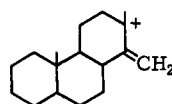
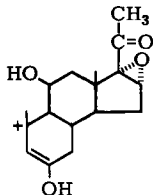
⁶⁾ K. Tori und K. Aono, *Annu. Rep. Shionogi Res. Lab. [Osaka]* **15**, 130 (1965), C. A. **65**, 8220d (1966).

⁷⁾ K. Tori und E. Kondo, *Steroids* **4**, 713 (1964).

⁸⁾ J. E. Bridgeman, P. C. Cherry, A. S. Clegg, J. M. Evans, E. R. H. Jones, A. Kasal, V. Kumar, G. D. Meakins, Y. Morisawa, E. E. Richards und P. D. Woodgate, *J. chem. Soc. [London] C* **1970**, 250.

⁹⁾ G.-A. Hoyer, bislang unveröffentlichte Inkrementensätze.

Schema 4. Fragment-Ionen der massenspektrometrischen Zerfälle

**A** *m/e* 232**B** *m/e* 218**C** *m/e* 217**A**₁ *m/e* 278 3-O; 11 β -OH; 14 α -OH**A**₂ *m/e* 276 3-O; 11-O; 14 α -OH**A**₃ *m/e* 278 3-O; 7 α -OH; 14 α -OH**A**₄ *m/e* 278 3 β -OH; 5 α .6 α -O; 15 β -OH**A**₅ *m/e* 292 3 β -OH; 5 α .6 α -O; 11-O; 15 β -OH**A**₆ *m/e* 376 3 β -OAc; 5 α .6 α -O; 11-O; 15 β -OAc**C**₁ *m/e* 277 3 β -OH; 5 α .6 α -O;
11-O; 14-OH**C**₂ *m/e* 263 3-O; 11 β -OH; 14-OH**C**₃ *m/e* 261 3-O; 11-O; 14-OH**C**₄ *m/e* 263 3-O; 7 α -OH; 14-OH**D** *m/e* 139**E** *m/e* 95**F** *m/e* 273**G** *m/e* 275**H** *m/e* 145**I** *m/e* 231**K** *m/e* 291**L** *m/e* 97**I**₁ *m/e* 277 3 β -OH; 5 α .6 α -O; 15-OH**I**₂ *m/e* 291 3 β -OH; 5 α .6 α -O; 11-O;
15-OH**I**₃ *m/e* 375 3 β -OAc; 5 α .6 α -O; 11-O;
15-OAc

Die Verbindungen 1, 2, 5–9 und 14–18 enthalten die 3 β -Hydroxy-5 α .6 α -epoxid-Struktur, wie das Erscheinen von Signalen bei δ 2.88–2.95 bzw. 3.85–3.88 in CDCl₃ und bei δ 2.85–3.01 bzw. 4.25–4.30 in Pyridin-d₅ als Dublett mit einer Aufspaltung von $J = 3.5$ –4.0 Hz bzw. mit einer Halbwertsbreite von ~ 25 Hz beweist. Das jeweils erstere Signal entspricht dem 6-H. Seine Signallage mit der angegebenen Aufspaltung korreliert sehr gut mit den Werten von Cross¹⁰ und Kieslich¹¹ für 6-H von 5 α .6 α -Epiden (δ 2.83–2.86, $J = 3.3$ –4.1 Hz) und ist nicht in Einklang mit den entsprechenden Werten für 5 β .6 β -Epiden (δ 3.05–3.09, $J = 2.1$ –2.7 Hz). Auch liefert die Berechnung von δ 19-H nur mit dem Inkrement für das 5 α .6 α -Epiden-Strukturelement vernünftige Werte. Das jeweils letztere Signal ist 3-H zuzuordnen. Lage und Halb-

¹⁰ A. D. Cross, J. Amer. chem. Soc. **84**, 3206 (1962).

wertsbreite sind typisch für ein axialständiges Proton neben einer 3β -OH-Gruppe bei A/B-*trans*-Verknüpfung. Die paramagnetische Signalverschiebung beim Übergang von CDCl_3 zu Py-d_5 ist nach *Demarco*¹¹⁾ und *Hampel*¹²⁾ als Lösungsmittelverschiebungseffekt zu interpretieren.

Die Verbindungen **1**–**4** besitzen eine 16α . 17α -Epoxy- 17β -acetyl-Gruppierung, wie das Erscheinen des 16-H-Signals bei δ 3.68–3.75 als Singulett und der 3 21-H bei δ 2.01–2.04 ebenfalls als Singulett sowohl in CDCl_3 als auch Py-d_5 beweist. Ähnliche Signallagen wurden auch von *Hampel*¹²⁾ (δ 21-H 2.02 in CDCl_3 , 2.01 in Py-d_5 ; δ 16-H 3.71–3.73 in Py-d_5) und *Jankowski*¹³⁾ (δ 21-H 2.08 in CDCl_3 ; δ 16-H 3.6–3.7 in CDCl_3) gefunden.

Bei den Verbindungen **2**–**4**, **7**, **11** und **15** ist eine 11β -OH-Gruppe eingeführt worden, worauf das Auftauchen eines Signals bei δ 4.28–4.48 in CDCl_3 und 4.43–4.56 in Py-d_5 mit einer Halbwertsbreite von 9 Hz hindeutet. Diese Signallagen mit ihren geringen Halbwertsbreiten sind typisch für ein äquatorialständiges H-Atom in 11α -Stellung^{1,8,12)}. Die Stellung der 11β -OH-Gruppe folgt weiter aus der starken Entschirmung von 19-H bzw. 18-H um ca. 0.24 bzw. 0.26 ppm in CDCl_3 und 0.53 bzw. 0.49 ppm in Py-d_5 ^{3,5,7,8)}.

Daraus folgt, daß bei **2** nur eine 11β -OH-Gruppe in **1** eingeführt worden ist. Bei **3** und **4** ist zwar eine 11β -OH-Gruppe vorhanden, jedoch fehlt die 3β -Hydroxy- 5α . 6α -epoxid-Gruppierung. Die Berechnung von δ 19-H und δ 18-H mit Strukturelementinkrementen (s. o.) deutet bei **3** das Vorliegen einer 3α -Hydroxy- 5β -H-6-keto- und bei **4** das einer 5β -H-3.6-Diketo-Struktur an. Bei **3** erscheint ein Multiplett bei δ 3.79 mit einer Halbwertsbreite von 20 Hz in Py-d_5 , was bei der angenommenen Konstitution mit der Lage von 3-H übereinstimmt. Bestätigung der Strukturen liefern hier die CD-Daten, die nur mit der 5β -H-6-Keto- bzw. 5β -H-3.6-Diketo-Konfiguration erklärbar sind, und die massenspektrometrische Untersuchung. Die CD-Kurven eines 5β -H-6-Ketons bzw. eines 5β -H-3.6-Diketons ergaben sich bei **3** bzw. **4** eindeutig nach Subtraktion der Kurve eines 20-Keto- 16α . 17α -epoxy-steroids. Nach Subtraktion verblieb bei **3** λ_{max} 297 und 306 nm, $\Delta\epsilon$ –2.88 und –2.86 und bei **4** λ_{max} 300 und 308 nm, $\Delta\epsilon$ –5.83 und –6.18. Diese Werte stimmen mit Literaturdaten überein^{14,15,16)}. Das MS von **3** weist 3 Fragment-Ionen m/e 273 ($\text{K}-\text{H}_2\text{O}$), 255 ($\text{K}-2\text{H}_2\text{O}$) und 139 (**D**) (s. Schema 4) auf, die beweisend für eine 6-Ketogruppierung sind¹⁷⁾. Im MS von **4** fehlen diese Schlüsselbruchstücke. Dafür treten die für eine 5β -H-3.6-Diketo-Gruppierung spezifischen Fragment-Ionen m/e 246 und 203 auf¹⁸⁾, die durch einen Verlust von 96 Masseneinheiten (entsprechend $\text{C}_5\text{H}_4\text{O}_2$) aus den Ionen m/e 342 bzw. 299 durch Spaltung des A- und B-Rings entstehen.

11) P. V. Demarco, E. Farkas, D. Doddrell, B. L. Mylari und E. Wenkert, J. Amer. chem. Soc. **90**, 5480 (1968).

12) B. Hampel und J. M. Kraemer, Tetrahedron [London] **22**, 1601 (1966).

13) K. Jankowski und J.-Y. Daigle, Synthesis **1971**, 32.

14) G. Cleve und G.-A. Hoyer, in Vorbereitung.

15) L. Velluz, M. Legrand und M. Grosjean, Optical Circular Dichroism, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. und Academic Press Inc., New York/London 1965.

16) S. Julia und J. P. Lavaux, Bull. Soc. chim. France **1963**, 1223.

17) M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, Fortschr. chem. Forsch. **12**, 441 (1969).

18) H. Obermann, M. Spiteller-Friedmann und G. Spiteller, Chem. Ber. **103**, 1497 (1971).

Die Verbindungen **5**, **8**–**10**, **12**, **16**, **18** und **19** besitzen eine 11-Ketogruppe, was aus dem Erscheinen eines Singulett bei δ 2.50–2.52 in CDCl₃ und 2.55–2.63 in Py-d₅ bei Fehlen einer 14 α -OH- oder 17 α -OH-Gruppe und dem eines AM-Systems mit einer Kopplung von 13 Hz bei δ 3.20–3.50 und 2.44–2.60 in Py-d₅ bei Anwesenheit dieser Gruppen für die beiden 12-H folgt. Außerdem läßt sich eine 11-Ketogruppe an der charakteristischen paramagnetischen Verschiebung des 19-H-Signals^{3,5,8)} leicht erkennen.

Bei **5** liegt zwar ein 16 α .17 α -Epoxid vor, was an dem Singulett bei δ 3.86 für 16-H erkannt werden kann. Es fehlt jedoch die 17 β -Acetylgruppe. Dafür erscheint ein Quartett für 1 Proton bei δ 4.48 und ein Dublett für 3 Protonen bei δ 1.42. Das deutet auf das Vorliegen einer 17 β -CH(OH)CH₃-Seitenkette der 20S-Reihe hin, wie der Vergleich mit ähnlichen Verbindungen zeigt¹⁹⁾.

Die Verbindungen **6**–**8** und **10**–**13** weisen unbeeinflusste 17 β -Acetylgruppen auf. Die Signale für 21-H erscheinen bei δ 2.10 in CDCl₃ und 2.04–2.10 in Py-d₅ jeweils als Singulett. Ähnliche Signallagen wurden auch von *Hampel*¹²⁾ (δ 21-H 2.12 in CDCl₃, 2.07 in Py-d₅) und *Jankowski*²⁰⁾ (δ 21-H 2.15 in CDCl₃) gefunden. Bei **9** erscheint das 21-H-Signal bei δ 2.27 in Py-d₅. Dies deutet auf eine 17 β -COCH₃-17 α -OH-Gruppierung hin (vgl. *Hampel*¹²⁾, δ 21-H 2.36 in Py-d₅). Bei **10** ließen sich die beiden Carbonylgruppen an C-11 und C-20 durch das CD-Spektrum bestätigen. Der CD der 11-Ketogruppe mit λ_{\max} 302 nm, $\Delta\epsilon \approx 0.8$ wurde nach Subtraktion der Kurve eines 20-Keto-14 α -hydroxy-steroids sichtbar.

Die Verbindungen **14**–**19** besitzen alle eine unbeeinflusste 17 β -COCH₃-16 α -CH₃-Gruppierung. Das folgt aus dem Erscheinen des 21-H-Signals bei δ 2.09–2.11 in CDCl₃ und 2.11–2.13 in Py-d₅. Diese Werte entsprechen sehr genau denen von *Hampel*¹²⁾ (δ 21-H 2.12 in CDCl₃, 2.12 in Py-d₅) und *Jankowski*²⁰⁾ (δ 21-H 2.11 in CDCl₃). Die 16 α -Methylgruppe ist bei $\delta \sim 1$ als Dublett zu erkennen.

Daraus ergibt sich, daß bei **7** nur eine 11 β -OH-Gruppe in **6** eingeführt worden ist. Bei den Verbindungen **8** und **9** ist die Hydroxygruppe zur 11-Ketofunktion oxidiert worden (s. o.). Außerdem enthält **8** eine 14 α -OH-Gruppe, wie sie auch bei den Verbindungen **10**–**13** vorkommt. Sie kann an der charakteristischen Lage des 17 α -H-Signals bei δ 3.51–3.66 als Triplet in Py-d₅ erkannt werden, wie auch von *Hikino*²¹⁾ (δ 17 α -H 3.52 t, $J = 8.8$ Hz in Py-d₅) angegeben wird. **9** enthält dagegen eine zusätzliche 17 α -OH-Gruppe, erkennbar an der typischen Signallage der 21-Protonen (s. o.). Diese Zuordnungen werden durch die massenspektrometrische Untersuchung gestützt. Es treten bei **8** die Fragment-Ionen m/e 273 (F), 255 (F–H₂O) und 237 (F–2 H₂O) auf, während die entsprechenden Ionen für **9** die Massenzahlen m/e 275 (G), 257 (G–H₂O) und 239 (G–2 H₂O) aufweisen (s. Schema 4). Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß beide Verbindungen ein Ion bei m/e 145 (H) und nur **8** eines bei m/e 85, das die Atome C-15, C-16, C-17, C-20 und C-21 enthält, liefern, kann man ableiten, daß **8** eine Hydroxygruppe im C-Ring und **9** eine im D-Ring tragen muß.

¹⁹⁾ G.-A. Hoyer, in Vorbereitung.

²⁰⁾ K. Jankowski und C. Berse, *Canad. J. Chem.* **47**, 751 (1969).

²¹⁾ H. Hikino, K. Nomoto und T. Takemoto, *Steroids* **16**, 393 (1970).

Die NMR- und MS-Daten für **10** sind nur vereinbar mit einer 3 β .5 α -Dihydroxy-6 β -methoxyacetoxy-Gruppierung. Das Signal bei δ 4.64 mit einer Halbwertsbreite von 20 Hz weist auf ein axialständiges 3 α -H bei A/B-*trans*-Verknüpfung hin, das durch die 5 α -Hydroxygruppe stark in seiner chemischen Verschiebung beeinflusst ist. Das Erscheinen des 6-H-Signals bei δ 5.48 mit einer Halbwertsbreite von 6 Hz legt eine β -ständige Acyloxygruppe nahe. Deren Konstitution ergibt sich aus der Lage eines 2-Protonensingulets bei δ 4.20 und eines 3-Protonensingulets bei δ 3.41 als Methoxyacetoxyrest. Im MS ist diese Gruppe an den Peaks m/e 380 ($M^+ - \text{CH}_3\text{OCHCO}$), 362 ($M^+ - \text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 45 (CH_3OCH_2) und 31 (CH_3O) leicht zu erkennen. Das MS von **10** zeigt nach Abspaltung der Methoxyessigsäure auffallende Ähnlichkeit mit dem von **8**, so daß nur eine Öffnung des 5 α .6 α -Epoxydrings von **8** durch Methoxyessigsäure stattgefunden haben kann. Dieser Vorgang wird im Massenspektrometer in umgekehrter Richtung durchlaufen.

Die Verbindungen **11**–**13** besitzen keine 3 β -Hydroxy-5 α .6 α -epoxid-Gruppierung mehr, denn die typischen NMR-Signale für 3-H und 6-H fehlen. Die berechneten Signallagen für 19-H deuten auf das Vorliegen einer 3-Keto-5 α -H-Struktur hin, was durch die CD-Untersuchung bestätigt wird. In den CD-Spektren von **11** und **13** ist nach Subtraktion der Kurve von 11 β .14 α -Dihydroxy-pregnen-(4)-dion-(3.20) die Kurve eines 3-Keto-5 α -steroids mit λ_{max} 295 nm, $\Delta\epsilon \approx +1.2$ (Lit.¹⁵⁾: λ_{max} 295 nm, $\Delta\epsilon +1.05$) erkennbar. Eine 6-Ketogruppe kann nicht vorliegen. Nach den schon diskutierten NMR-Ergebnissen enthält **11** eine 11 β - und 14 α -Hydroxygruppe, während bei **12** die 11 β -Hydroxyfunktion zur 11-Ketogruppe oxydiert worden ist. **13** besitzt neben einer 14 α - eine zusätzliche 7 α -Hydroxygruppe. Das 7 β -H-Signal erscheint bei δ 4.28 mit der erwarteten Halbwertsbreite von 9 Hz. Wie wir an ähnlichen Verbindungen feststellen konnten, tritt das 7 β -H-Signal bei unbeeinflusster 7 α -Hydroxygruppe bei $\delta \sim 4.14$ in Py- d_5 auf, während die Einführung einer 14 α -Hydroxyfunktion das Signal nach $\delta \sim 4.30$ in Py- d_5 verschiebt²²). Die Massenspektren zeigen als charakteristische Bruchstücke solche längs der Bindungen C-13–C-17 und C-15–C-16 (A_1, A_2, A_3) bzw. C-13–C-17 und C-14–C-15 (C_2, C_3, C_4) (s. Schema 4). Zusammen mit den Fragment-Ionen m/e 84 und 85 (enthalten C-15, C-16, C-17, C-20 und C-21) und der Eliminierung von Aceton¹⁷) ergeben diese Befunde, daß die Hydroxy- und Ketofunktionen in den Ringen A, B und C vorkommen müssen. Bei **15** ist nur eine 11 β -Hydroxygruppe in **14** eingeführt worden, die bei **16** zur 11-Ketofunktion oxydiert worden ist (s. o.). **17** und **18** enthalten offensichtlich eine 15 β -Hydroxygruppe, wie an dem Erscheinen des 15 α -H-Signals bei δ 3.94–4.08 als doppeltes Dublett mit den Kopplungen 6 und 2 Hz⁸) und dem charakteristischen Bruch längs der C-13–C-17- und C-15–C-16-Bindungen im Massenspektrum ($A_4 - 2\text{H}_2\text{O}$, $A_4 - 3\text{H}_2\text{O}$, $A_5 - 2\text{H}_2\text{O}$, $A_5 - 3\text{H}_2\text{O}$, $I_1 - 2\text{H}_2\text{O}$, $I_1 - 3\text{H}_2\text{O}$, $I_2 - 2\text{H}_2\text{O}$, $I_2 - 3\text{H}_2\text{O}$, s. Schema 4; m/e 85, enthält C-16, C-17, C-20, C-21 und 16 α -CH₃) zu erkennen ist. Die Verbindung **19** ist das Diacetat von **18**. Das 3-H- und 15-H-Signal werden um jeweils ~ 1 ppm zu tieferem Feld verschoben, wie es für sekundäre Hydroxygruppen zu erwarten ist. Auch das MS von **19** zeigt die Anwesenheit von 2 Acetoxygruppen und ähnelt erwartungsgemäß dem von **18**.

²²) G.-A. Hoyer, bislang unveröffentlicht.

Tab. NMR-Daten von 20-Keto- und 20-Hydroxy-pregnanen (chem. Verschiebungen δ in ppm, TMS interner Standard, J in Hz)

Verb.	LSM	19-H	18-H	19-H	18-H	21-H	3-H	6-H	7-H	11-H	12-H	15-H	16-H	17-H	20-H
1	CDCl ₃	1.06 s	0.98 s	1.08 s	0.98 s	2.01 s	3.88 m (25)	2.91 d (3.5)					3.68 s		
2	Py-d ₅	1.59 s	1.50 s	1.65 s	1.53 s	2.01 s	4.23 m (26)	2.85 d (3.5)		4.43 m (9)			3.70 s		
3	Py-d ₅	1.44 s	1.54 s	1.42 s	1.54 s	2.04 s	3.79 m (20)			4.54 m (9)			3.75 s		
4	CDCl ₃	1.25 s	1.32 s	1.23 s	1.33 s	2.02 s				4.48 m (9)			3.75 s		
5	Py-d ₅	1.38 s	0.80 s	1.36 s	0.82 s	1.42 d (6)	4.30 m (24)	2.94 d (3.5)			2.55 s		3.86 s		4.48 q (6)
6	CDCl ₃	1.05 s	0.57 s	1.05 s	0.57 s	2.10 s	3.85 m (26)	2.90 d (3.5)		4.53 m (9)	3.42 d (13) ^{c)}				
7	Py-d ₅	1.54 s	1.07 s	1.63 s	1.08 s	2.07 s	4.30 m (25)	2.96 d (3.5)			3.20 d (13)				
8	Py-d ₅	1.44 s	0.78 s	1.39 s	0.76 s	2.04 s	4.25 m (25)	3.01 d (3.5)			2.44 d (13)				
9	Py-d ₅	1.41 s	0.64 s	1.36 s	0.65 s	2.27 s	4.25 m (25)	2.91 d (3.5)			2.60 d (13)				
10	Py-d ₅	1.71 s	0.88 s	1.73 s	0.85 s	2.05 s	4.64 m (20)	5.48 m (6)		4.56 m (9)	3.44 d (13) ^{c)}				
11	Py-d ₅	1.46 s	1.35 s	1.48 s	1.31 s	2.07 s								3.51 t (8)	
12	Py-d ₅	1.31 s	0.83 s	1.28 s	0.82 s	2.07 s								3.66 t (8)	
13	Py-d ₅	0.97 s	0.82 s	0.98 s	0.82 s	2.10 s			4.28 m (9)					3.52 t (8)	
14	CDCl ₃	1.04 s	0.58 s	1.04 s	0.58 s	2.10 s	3.88 m (24)	2.89 d (3.5)					0.93 d (7) ^{b)}		
15	CDCl ₃	1.30 s	0.82 s	1.32 s	0.83 s	2.10 s	3.87 m (24)	2.88 d (3.5)					0.93 d (7) ^{b)}		
16	CDCl ₃	1.26 s	0.54 s	1.23 s	0.54 s	2.09 s	3.88 m (24)	2.95 d (4)					1.01 d (7) ^{b)}		
17	Py-d ₅	1.08 s	1.05 s	1.12 s	1.05 s	2.13 s	4.30 m (25)	2.96 d (4)			2.50 s		3.94 dd (6;2)		
18	Py-d ₅	1.44 s	1.02 s	1.38 s	1.08 s	2.11 s	4.28 m (25)	3.01 d (3.5)					4.08 dd (6;2)		
19	CDCl ₃	1.32 s	0.77 s	1.30 s	0.74 s	2.11 s	5.11 m (25)	2.94 d (3.5)					4.84 m (9)		

Die eingeklammerte Hz-Angabe bei m bedeutet die Halbwertsbreite $W_{1/2}$; q = Quartett.

a) s. Text.

b) Die Angabe bezieht sich auf die 16 α -Methylgruppe.

c) A-Teil eines AM-Spektrums.

Die IR-Daten und die übrigen MS-Befunde, insbesondere die Molekül-Ionen, sind mit den getroffenen Zuordnungen in Einklang und stützen weiter die formulierten Strukturen.

Die IR-Banden der 20-Keto-16 α .17 α -epoxy-sterioide liegen in KBr bei 1682 bis 1693/cm, die der anderen 20-Ketone bei 1667–1700/cm (in CHCl₃ und in Pyridin 1695/cm), die der 11-Ketone bei 1688–1709/cm. Die Bandenlagen entsprechen den Werten von Neudert und Röpke²³⁾. Für die Epoxidbanden konnten keine charakteristischen Zuordnungen gefunden werden.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden im Apparat nach Tottoli bestimmt und sind unkorrigiert. Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Fertigplatten (Fa. Merck AG, Darmstadt) verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurde im System Benzol/Essigester (1 : 4) aufsteigend entwickelt. Zur Aufarbeitung wurde mit einem Reagenz aus 1 ccm konz. Schwefelsäure und 20 ccm 95proz. Äthanol angesprüht, 30 Min. bei 140° getrocknet und im UV-Licht betrachtet. Für die Säulenchromatographien dienten Kieselgel G. Die NMR-Spektren wurden in CDCl₃ und Pyridin-d₂ im Varian A 60 und HA 100, die Massenspektren im Varian MAT CH4, die IR-Spektren in KBr mit einem Perkin-Elmer-Modell 621, die CD-Spektren in Dioxan auf dem Dichrograph CD 185 von Jouan aufgenommen. Die Mikroanalysen wurden in unserem Kontrollaboratorium unter Leitung von Dipl.-Ing. J. Huber durchgeführt. Außerdem danken wir Herrn Dr. G. Schulz für seine Mithilfe bei der Aufnahme und Interpretation der NMR- und Massen-Spektren.

3 β .11 β -Dihydroxy-5 α .6 α ; 16 α .17 α -diepoxy-5 α -pregnanon-(20) (2): Unter den bereits früher¹⁾ beschriebenen Bedingungen wurde eine Lösung von 7.5 g *3 β -Hydroxy-5 α .6 α ; 16 α .17 α -diepoxy-5 α -pregnanon-(20)* (1) in 250 ccm Methylcellosolve zu einer 12 Stdn. alten Kulturbrühe von *Curvularia lunata* gegeben und 20 Stdn. inkubiert. Die eingeeengten Methylisobutylketon-Extrakte ergaben 7.3 g festes Rohprodukt, das nach Waschen mit kaltem Hexan zweimal aus Essigester umkristallisiert wurde. 3.3 g (45%) 2, Schmp. 243–245°, DC-R_F 0.37, IR: 3460 (OH), 1692/cm (20-C=O).

C₂₁H₃₀O₅ (362.5) Ber. C 69.58 H 8.34 O 22.07 Gef. C 69.31 H 8.50 O 21.94

Langzeit-Inkubation von 3 β -Hydroxy-5 α .6 α ; 16 α .17 α -diepoxy-5 α -pregnanon-(20) (1): Unter gleichen Bedingungen wurde die Inkubation auf 83 Stdn. verlängert. Die analytische Kontrolle des Verlaufes zeigte folgende Schätzwerte:

R _F	0.83	0.53	0.31	0.23	0.17
31 Stdn.	—	40%	2%	5%	1%
55 Stdn.	—	20%	2%	10%	1%
83 Stdn.	15%	12%	—	8%	1%

Man erhielt 5 g mit Hexan gewaschenes Rohprodukt, das an Silicagel chromatographiert wurde. Durch Elution mit Hexan, dem mit linearem Gradienten ansteigend bis zu 100% Aceton zugemischt wurde, wurden folgende Produkte isoliert und durch Umkristallisieren aus Aceton/Isopropyläther gereinigt:

²³⁾ W. Neudert und H. Röpke, Steroid-Spektrenatlas, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York 1965.

249 mg (445 mg roh) 11 β -Hydroxy-16 α .17 α -epoxy-5 β -pregnantrion-(3.6.20) (4), Schmp. 252–254°, DC- R_F 0.83.

$C_{21}H_{28}O_5$ (360.4) Ber. C 69.98 H 7.83 O 22.19 Gef. C 70.05 H 7.84 O 22.69

IR: 3520 (OH), 1715 (3-C=O), 1693/cm (6- und 20-C=O).

CD: λ_{max} 300 und 308 nm, $\Delta\epsilon$ –6.05 und –6.42.

MS: m/e 360 (M^+), 342 ($M^+ - H_2O$), 299 ($M^+ - H_2O - COCH_3$), 270 ($M^+ - H_2O - CH_3COCHO$), 246 ($M^+ - H_2O - COCH=CHCOCH_2$), 203 ($M^+ - H_2O - COCH=CHCOCH_2 - COCH_3$), 55, 43 (CH_3CO).

120 mg (793 mg roh) 3 α .11 β -Dihydroxy-16 α .17 α -epoxy-5 β -pregnandion-(6.20) (3), Schmp. 255–257°, DC- R_F 0.53.

$C_{21}H_{30}O_5$ (362.5) Ber. C 69.59 H 8.34 O 22.07 Gef. C 69.07 H 8.53 O 22.78

IR: 3405 (OH), 1708 (6-C=O), 1682/cm (20-C=O).

CD: λ_{max} 297 und 306 nm, $\Delta\epsilon$ –3.13 und –3.13.

MS: m/e 362 (M^+), 344 ($M^+ - H_2O$), 326 ($M^+ - 2H_2O$), 311 ($M^+ - 2H_2O - CH_3$), 301 ($M^+ - H_2O - COCH_3$), 283 ($M^+ - 2H_2O - COCH_3$), 273 ($K - H_2O$), 265 (283 – H_2O), 255 ($K - 2H_2O$), 189, 139 (D), 95 (E), 55, 43 (CH_3CO).

113 mg (713 mg roh) 3 β .20 α -Dihydroxy-5 α .6 α ;16 α .17 α -diepoxy-5 α -pregnanon-(11) (5), Schmp. 258–260°, DC- R_F 0.23, IR: 3400 (OH), 1709/cm (11-C=O).

$C_{21}H_{30}O_5$ (362.5) Ber. C 69.59 H 8.34 O 22.07 Gef. C 68.90 H 8.51 O 22.58

Langzeit-Inkubation von 3 β -Hydroxy-5 α .6 α -epoxy-5 α -pregnanon-(20) (6): 6 bzw. 7.5 g Substrat wurden zur 12 Stdn. alten Pilzkultur gegeben. Dann wurde 63 bzw. 36 Stdn. inkubiert. Die Ansätze wurden zusammen aufgearbeitet und ergaben ein Rohprodukt von 18 g, das an Silicagel mit Hexan, dem mit linearem Gradienten ansteigend bis zu 100% Aceton zugemischt wurde, chromatographiert wurde. Man erhielt folgende Produkte:

430 mg roh, aus Aceton/Essigester umkristallisiert 146 mg mit Schmp. 235/238–240°, DC- R_F 0.6.

$C_{21}H_{32}O_4$ (348.5) Ber. C 72.38 H 9.26 O 18.36 Gef. C 72.25 H 9.32 O 18.55

Das gereinigte Rohprodukt, das uneinheitliche Spektren zeigte, wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie, System Chloroform/Methanol (95 : 5) (2malige Entwicklung), getrennt. Die separierten Zonen R_F 0.35 und R_F 0.55 wurden mit Chloroform/Äthanol ausgezogen und die Extraktstückstände aus Diisopropyläther umkristallisiert.

14 mg 7 α .14 α -Dihydroxy-5 α -pregnandion-(3.20) (13), Schmp. 269/272–274°, DC- R_F 0.35. IR: 3450 und 3410 (OH), 1705 (3-C=O), 1677/cm (20-C=O).

CD: λ_{max} 293 nm, $\Delta\epsilon$ +4.28.

MS: m/e 348 (M^+), 330 ($M^+ - H_2O$), 320 ($M^+ - CO$), 315 ($M^+ - H_2O - CH_3$), 312 ($M^+ - 2H_2O$), 302 ($M^+ - H_2O - CO$), 297 ($M^+ - 2H_2O - CH_3$), 287 ($M^+ - H_2O - COCH_3$), 277 ($M^+ - CO - COCH_3$), 269 ($M^+ - 2H_2O - COCH_3$), 262 (320 – CH_3COCH_3), 260 ($A_3 - H_2O$), 245 ($C_4 - H_2O$), 244 (302 – CH_3COCH_3), 242 ($A_3 - 2H_2O$), 227 ($C_4 - 2H_2O$), 191, 189, 159, 145, 135, 97 (L), 43 (CH_3CO).

20 mg 14 α -Hydroxy-5 α -pregnantrion-(3.11.20) (12), DC- R_F 0.55.

IR: 3555 (OH), 1710 und 1688/cm (3-, 11- und 20-C=O).

MS: *m/e* 346 (M⁺), 328 (M⁺-H₂O), 318 (M⁺-CO), 313 (M⁺-H₂O-CH₃), 303 (M⁺-CH₃CO), 285 (M⁺-H₂O-COCH₃), 258 (A₂-H₂O), 243 (C₃-H₂O), 207, 159, 145, 135, 85 (CH₃COCHC₂H₅), 84 (H₃C-C-CH=CH-CH₂•), 43 (CH₃CO).



1.34 g roh, aus Diisopropyläther/Essigester mehrmals umkristallisiert: 196 mg 11 β -14 α -Dihydroxy-5 α -pregnandion-(3.20) (11), Schmp. 248–249°, DC-R_F 0.53.

C₂₁H₃₂O₄ (348.5) Ber. C 72.38 H 9.26 O 18.36 Gef. C 71.80 H 9.24 O 18.93

IR: 3530 und 3480 (OH), 1700/cm (3- und 20-C=O).

CD: λ_{max} 294 nm, $\Delta\epsilon$ +4.25.

MS: *m/e* 348 (M⁺), 330 (M⁺-H₂O), 315 (M⁺-H₂O-CH₃), 312 (M⁺-2H₂O), 297 (M⁺-2H₂O-CH₃), 294 (M⁺-3H₂O), 287 (M⁺-H₂O-COCH₃), 279 (M⁺-3H₂O-CH₃), 269 (M⁺-2H₂O-COCH₃), 254 (312-CH₃COCH₃), 253, 242 (A₁-2H₂O), 239 (254-CH₃), 227 (C₂-2H₂O), 159, 145, 135, 85 (CH₃COCHC₂H₅), 84 (H₃C-C-CH=CH-CH₂•), 43 (CH₃CO).



810 mg roh, aus Aceton/Diisopropyläther zweimal umkristallisiert: 100 mg 3 β -11 β -Dihydroxy-5 α -6 α -epoxy-5 α -pregnanon-(20) (7), Schmp. 231/233–235°, DC-R_F 0.39, IR (in CHCl₃): 1700/cm (20-C=O).

C₂₁H₃₂O₄ (348.5) Ber. C 72.38 H 9.26 O 18.36

Gef. C 72.80 H 9.67 O 18.13

1.45 g roh, zweimal umkristallisiert aus Essigester: 183 mg 3 β -17 α -Dihydroxy-5 α -6 α -epoxy-5 α -pregnandion-(11.20) (9), Schmp. 257–259°, DC-R_F 0.33.

C₂₁H₃₀O₅ (362.5) Ber. C 69.59 H 8.34 O 22.07 Gef. C 69.51 H 8.47 O 21.60

IR: 3390 (OH), 1700/cm (11- und 20-C=O).

MS: *m/e* 362 (M⁺), 344 (M⁺-H₂O), 326 (M⁺-2H₂O), 311 (M⁺-2H₂O-CH₃), 308 (M⁺-3H₂O), 283 (M⁺-2H₂O-COCH₃), 275 (G), 265 (M⁺-3H₂O-COCH₃), 257 (275-H₂O), 239 (275-2H₂O), 209, 145 (H), 43 (COCH₃).

1.34 g roh, umkristallisiert aus Aceton/Diisopropyläther und danach Essigester: 139 mg 3 β -14 α -Dihydroxy-5 α -6 α -epoxy-5 α -pregnandion-(11.20) (8), Schmp. 256–259°, DC-R_F 0.2.

C₂₁H₃₀O₅ (362.5) Ber. C 69.59 H 8.34 O 22.07 Gef. C 69.42 H 8.54 O 21.70

IR: 3520 und 3455 (OH), 1697/cm (11- und 20-C=O).

MS: *m/e* 362 (M⁺), 344 (M⁺-H₂O), 326 (M⁺-2H₂O), 311 (M⁺-2H₂O-CH₃), 308 (M⁺-3H₂O), 293 (M⁺-3H₂O-CH₃), 283 (M⁺-2H₂O-COCH₃), 273 (F), 265 (M⁺-3H₂O-COCH₃), 255 (273-H₂O), 241 (C₁-2H₂O), 237 (273-2H₂O), 223 (C₁-3H₂O), 221, 209, 145 (H), 85 (CH₃COCHC₂H₅), 43 (CH₃CO).

1.58 g roh, rechromatographiert und mehrmals umkristallisiert aus Diisopropyläther/Aceton: 90 mg 3 β -5 α -14 α -Trihydroxy-6 β -methoxyacetoxy-5 α -pregnandion-(11.20) (10), Schmp. 211–214°, DC-R_F 0.18.

C₂₄H₃₆O₈ (452.5) Ber. C 63.70 H 8.02 O 28.28

Gef. C 63.44, 63.49, 63.36 H 8.14, 8.10, 8.19 O 26.87

IR: 3550 und 3410 (OH), 1734 (Ester-C=O), 1691 und 1667 (11- und 20-C=O), 1191 (Ester-C=O). In Pyridin: 1747, 1727 (Schulter) und 1695/cm.

CD: λ_{max} 294 nm, $\Delta\epsilon$ +3.46.

MS: *m/e* 452 (M⁺), 434 (M⁺-H₂O), 424 (M⁺-CO), 416 (M⁺-2H₂O), 380 (M⁺-CH₃OCHCO), 362 (M⁺-CH₃OCH₂CO₂H), 344 (362-H₂O), 334 (362-CO), 326 (362-2H₂O), 319 (362-CH₃CO), 301 (362-H₂O-COCH₃), 283 (362-2H₂O-COCH₃), 273 (F), 259 (C₁-H₂O), 255 (273-H₂O), 241 (C₁-2H₂O), 237 (273-2H₂O), 223 (C₁-3H₂O), 209, 145 (H), 85 (CH₃CO $\overset{\oplus}{\text{C}}$ HC₂H₅), 45 (CH₃OCH₂), 43 (CH₃CO), 31 (CH₃O).

1.77 g roh, durch Umkristallisieren aus Äthanol nicht weiter zu reinigen: DC-R_F 0.10.

3.3 g roh, durch Umkristallisieren aus Äthanol (sehr schwer löslich) nicht weiter zu reinigen: DC-R_F 0.06.

Umwandlung von 3 β -Hydroxy-5 α .6 α -epoxy-16 α -methyl-5 α -pregnanon-(20) (14): Unter gleichen Bedingungen wurden 7.5 g 14 9 Stdn. inkubiert (Pilzkultur bei Beginn 12 Stdn. alt). Die Schlußanalyse zeigte Umwandlungsprodukte mit folgenden R_F-Werten:

R_F 0.75 (Spuren), R_F 0.5 AM (-), R_F 0.40 (65%), R_F 0.25 (15%).

Weitgehend gleiche Ergebnisse erhielt man bei Einsatz des analogen 3-Acetats als Substrat. Der Extraktrückstand wurde mit Hexan gewaschen und aus Essigester unter Kohlezusatz umkristallisiert.

3.3 g 3 β .11 β -Dihydroxy-5 α .6 α -epoxy-16 α -methyl-5 α -pregnanon-(20) (15), Schmp. 214-216°, DC-R_F 0.43, IR: 3500 (OH), 1683/cm (20-C=O).

C₂₂H₃₄O₄ (362.5) Ber. C 72.92 H 9.53 O 17.67 Gef. C 72.85 H 9.57 O 18.21

Die Kristallisationsmutterlaugen wurden an Silicagel mit Hexan, dem mit linearem Gradienten ansteigend bis zu 100% Aceton zugemischt wurde, chromatographiert, wobei zusätzlich folgende Verbindungen abgetrennt und aus Essigester bzw. Essigester/Diisopropyläther umkristallisiert wurden.

79 mg 3 β -Hydroxy-5 α .6 α -epoxy-16 α -methyl-5 α -pregnandion-(11.20) (16), Schmp. 225 bis 226°, DC-R_F 0.71, IR: 3300 (OH), 1688 und 1703/cm (20- und 11-C=O).

C₂₂H₃₂O₄ (360.5) Ber. C 73.34 H 8.91 O 17.82 Gef. C 73.90 H 9.50 O 16.59

152 mg (730 mg roh) 3 β .15 β -Dihydroxy-5 α .6 α -epoxy-16 α -methyl-5 α -pregnanon-(20) (17), Schmp. 235-236°, DC-R_F 0.25.

C₂₂H₃₄O₄ (362.5) Ber. C 72.98 H 9.50 O 17.61 Gef. C 73.40 H 9.90 O 16.48

IR: 3530 und 3490 (OH), 1680/cm (20-C=O).

MS: *m/e* 362 (M⁺), 344 (M⁺-H₂O), 326 (M⁺-2H₂O), 311 (M⁺-2H₂O-CH₃), 308 (M⁺-3H₂O), 301 (M⁺-H₂O-COCH₃), 293 (M⁺-3H₂O-CH₃), 283 (M⁺-2H₂O-COCH₃), 265 (M⁺-3H₂O-COCH₃), 242 (A₄-2H₂O), 241 (I₁-2H₂O), 224 (A₄-3H₂O), 223 (I₁-3H₂O), 145 (H), 85 (CH₃CO $\overset{\oplus}{\text{C}}$ HCH₂CH₃), 43 (CH₃CO).

Langzeit-Inkubation von 14: Die Inkubation unter gleichen Bedingungen wurde auf 20 Stdn. verlängert. Die Abbruchanalyse zeigte neben ca. 2% einer Verbindung mit R_F 0.25 nur ein Umwandlungsprodukt mit R_F 0.2. Das isolierte, mit Hexan gewaschene Rohprodukt (7.5 g) wurde aus Essigester/Diisopropyläther unter Kohlezusatz umkristallisiert: 3.3 g 3 β .15 β -Dihydroxy-5 α .6 α -epoxy-16 α -methyl-5 α -pregnandion-(11.20) (18), Schmp. 232-234°, DC-R_F 0.21.

C₂₂H₃₂O₅ (376.5) Ber. C 70.21 H 8.67 O 21.20 Gef. C 70.34 H 8.81 O 20.91

IR: 3500 (OH), 1690/cm (11- und 20-C=O).

MS: *m/e* 376 (M^+), 361 ($M^+ - CH_3$), 358 ($M^+ - H_2O$), 348 ($M^+ - CO$), 343 ($M^+ - H_2O - CH_3$), 340 ($M^+ - 2H_2O$), 333 ($M^+ - COCH_3$), 330 ($M^+ - H_2O - CO$), 315 ($M^+ - H_2O - COCH_3$), 297 ($M^+ - 2H_2O - COCH_3$), 256 ($A_5 - 2H_2O$), 255 ($I_2 - 2H_2O$), 238 ($A_5 - 3H_2O$), 237 ($I_2 - 3H_2O$), 145 (**H**), 85 ($CH_3CO\overset{\oplus}{C}HCH_2CH_3$), 43 (CH_3CO).

Mit *Acetanhydrid* in *Pyridin* bei Raumtemp. (1 Stde.) wurde *3β.15β-Diacetoxy-5α.6α-epoxy-16α-methyl-5α-pregnandion-(11.20)* (**19**) hergestellt. Schmp. 236–237°, DC- R_F 0.85.

$C_{26}H_{36}O_7$ (460.6) Ber. C 67.88 H 7.92 O 24.37 Gef. C 68.51 H 8.22 O 24.18

IR: 1735 (Ester-C=O), 1700 (11- und 20-C=O), 1240 und 1258/cm (C–O).

MS: *m/e* 460 (M^+), 400 ($M^+ - CH_3CO_2H$), 385 ($M^+ - CH_3CO_2H - CH_3$), 382 ($M^+ - CH_3CO_2H - H_2O$), 372 ($M^+ - CH_3CO_2H - CO$), 340 ($M^+ - 2 CH_3CO_2H$), 297 ($M^+ - 2 CH_3CO_2H - COCH_3$), 256 ($A_6 - 2 CH_3CO_2H$), 255 ($I_3 - 2CH_3CO_2H$), 238 ($A_6 - H_2O - 2CH_3CO_2H$), 237 ($I_3 - H_2O - 2CH_3CO_2H$), 145 (**H**), 85 ($CH_3CO\overset{\oplus}{C}HCH_2CH_3$), 43 (CH_3CO).

[381/71]