

Mikrobiologische Umwandlung von Steroiden, XVI¹⁾

Synthese von 11 β ,21-Dihydroxy-6,16 α -dimethyl-1,4,6-pregnatrien-3,20-dion und dessen 11-Ketoverbindung

Klaus Kieslich*, Heinz Wiegelp und Georg-Alexander Hoyer

Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin/Bergkamen,
Müllerstr. 170 – 178, D-1000 Berlin 65

Eingegangen am 29. Mai 1978

21-Acetoxy-5 α ,6 α -epoxy-3 β -hydroxy-6 β ,16 α -dimethyl-20-pregnanon (**3a**), dargestellt aus 3 β -Hydroxy-6,16 α -dimethyl-5-pregnen-20-on (**1**) durch Epoxidierung und 21-Acetoxylierung, wurde mit *Flavobacterium dehydrogenans* zu 6 α ,21-Dihydroxy-6 β ,16 α -dimethyl-4-pregnen-3,20-dion (**4**) oxidiert und zu 21-Hydroxy-6,16 α -dimethyl-4,6-pregnadien-3,20-dion (**5**) dehydratisiert. Mit *Curvularia lunata* wurde die 11 β -Hydroxygruppe eingeführt zu **6**, während *Aspergillus ochraceus* die entsprechende 11 α -Hydroxyverbindung **8** ergab. Beide Verbindungen wurden mit *Bacillus lentus* zu **7** bzw. **9** dehydriert. Die 11 α -Hydroxyverbindung **9** wurde nach selektiver Acetylierung der 21-Hydroxygruppe zu **10** zum 11-Keton **11** oxidiert, dessen Verseifung **12** ergab.

Microbial Transformations of Steroids, XVI¹⁾

Synthesis of 11 β ,21-Dihydroxy-6,16 α -dimethyl-1,4,6-pregnatriene-3,20-dione and of its 11-Keto Compound

21-Acetoxy-5 α ,6 α -epoxy-3 β -hydroxy-6 β ,16 α -dimethyl-20-pregnanone (**3a**), prepared from 3 β -hydroxy-6,16 α -dimethyl-5-pregnen-20-one (**1**) by epoxidation and chemical introduction of the 21-acetoxy group, was oxidized to 6 α ,21-dihydroxy-6 β ,16 α -dimethyl-4-pregnene-3,20-dione (**4**) by *Flavobacterium dehydrogenans* and dehydrated to the 3-keto-4,6-diene **5**. The 11 β -hydroxy group was introduced by *Curvularia lunata* to give **6**, and the 11 α -hydroxy group by *Aspergillus ochraceus* to yield **8**. Both compounds were dehydrogenated with *Bacillus lentus* to form **7** and **9**. The 11 α -hydroxy compound **9** was selectively acetylated to **10**, which was oxidized to **11**. This on saponification yielded **12**.

Eine 6-Dehydro-6-methyl-Substitution soll die antiinflammatorische Aktivität von 16-Methyl-Corticoiden stark erhöhen^{2,3)} ohne gleichzeitige Steigerung einiger unerwünschter Nebenwirkungen⁴⁾. Diesen bei entsprechenden Hydrocortison- und Prednisolon-Verbindungen beschriebenen Befund wollten wir an 16 α -Methyl-1-dehydro-corticosteron-Strukturen überprüfen, die von uns^{5,6)} parallel zum Arbeitskreis von *Roussel-Uclaf*^{7,8)} entwickelt worden sind. Mit der Herstellung von 11 β ,21-Dihydroxy-6,16 α -dimethyl-1,4,6-pregnatrien-3,20-dion (**7**) strebten wir darüber hinaus ein völlig halogenfreies entzündungshemmendes Steroid an.

Zur Synthese dieser Verbindung wurde ein Weg gewählt, der von dem käuflichen Startprodukt 3 β -Hydroxy-6,16 α -dimethyl-5-pregnen-20-on (**1**)⁹⁾ ausging und somit wenig

Gemeinsamkeiten mit unserem Syntheseweg zur analogen 6,7-Dihydroverbindung¹⁰⁾ besaß.

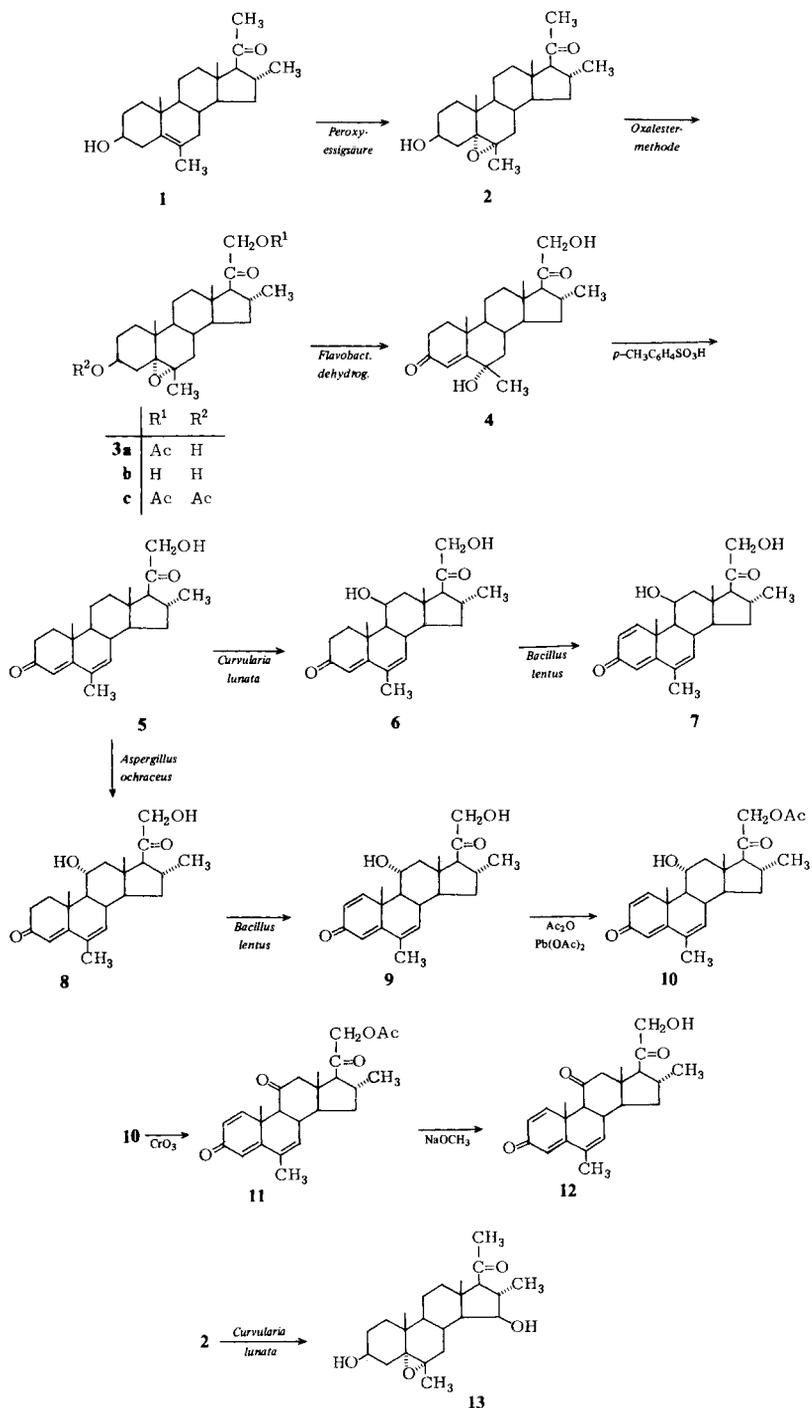
Da die mikrobiologische Einführung der 11-Hydroxygruppe durch ihre Abhängigkeit von der passenden Substratstruktur bei neuartig substituierten Steroiden problematisch ist, versuchten wir diese Reaktion auf eine ausreichend geeignete Stufe zu legen, die durch Vorprüfung unterschiedlicher Substrate zu ermitteln war.

Progesteron-Strukturen werden nach unseren Erfahrungen nur selten richtungsspezifisch in 11 β -Stellung hydroxyliert. Wesentlich günstiger verläuft eine 11 β -Hydroxylierung mit Pilzkulturen von *Curvularia lunata* an 16 α -Methyl-desoxycorticosteronen¹¹⁾. Deshalb wurde der mikrobiologische Hydroxyierungsschritt nach chemischer Einführung einer 21-Hydroxygruppe bevorzugt.

Durch Reaktion der Δ^5 -Verbindung **1** mit Peroxyessigsäure konnte das 5 α ,6 α -Epoxid **2** in 84proz. Ausbeute dargestellt werden. Mit Hilfe der Oxalestermethode wurde jetzt die 21-Acetoxygruppe in **2** eingeführt. Dabei wurde **3a** in 78proz. Ausbeute erhalten, was gegenüber dem üblichen Einsatz von 5-Pregnen-Strukturen, wie z. B. **1**, für diesen Reaktionsschritt abweicht. Durch mikrobiologische Umwandlung von **3a** mit *Flavobacterium dehydrogenans* war die 6 α -Hydroxy-3-keto-4-en-Verbindung **4** in einer Ausbeute von 64% nach einem bereits beschriebenen Reaktionstyp¹²⁾ zugänglich. **4** wurde anschließend sauer zur 3-Keto-4,6-dien-Verbindung **5** dehydratisiert.

Die Epoxidierung von **1** sollte aus sterischen Gründen von der α -Seite des Steroids aus erfolgen. Einen Beweis für die Konfiguration der Epoxygruppe in **2** liefern die Signal-lagen und Aufspaltungen (oder Signalbreiten) des 3 α -H im NMR-Spektrum in CDCl₃ (δ = 3.81, breites tt) und C₅D₅N (δ = 4.20, breites tt), die denen bei strukturell gesicherten 3 β -Hydroxy-5 α ,6 α -epoxysteroiden (CDCl₃: δ = 3.85–3.88, breites m; C₅D₅N: δ = 4.25–4.30, breites m)^{13,14)} entsprechen und nicht im Einklang sind mit denen von 3 β -Hydroxy-5 β ,6 β -Epoxiden (CDCl₃: δ = 3.68, breites m; C₅D₅N: δ = 3.91, breites m)¹⁵⁾. Vor allem wird die 5 α ,6 α -Epoxid-Konfiguration durch die eindeutig beweisbare α -Stellung der 6-Hydroxygruppe im Folgeprodukt **4** gesichert (s. u.). Die Verbindung **3a** besitzt eine 21-Acetoxygruppe, wie an den charakteristischen Signal- und Banden-lagen im NMR- (OAc: Singulett bei δ = 2.14; 21-H: AB-System bei δ = 4.41 und 4.66 mit einer Kopplung von 17 Hz)^{15, 16)} und IR-Spektrum (OAc: 1750, 1225 und 1055 cm⁻¹)¹⁷⁾ zu erkennen ist. Die übrigen NMR-Signallagen von **3a** sind gegenüber denen von **2** kaum verändert, so daß bei der Synthese von **3a** keine weiteren Veränderungen am Steroidgerüst stattgefunden haben. Bei der mikrobiologischen Dehydrierung von **3a** zu **4** wird die 5 α ,6 α -Epoxygruppe zum 6 α -Hydroxy-4-en-System isomerisiert. Die α -Stellung der 6-Hydroxygruppe folgt aus der starken paramagnetischen Verschiebung des 4-H-Signals um 1.2 ppm auf δ = 6.99 in C₅D₅N im NMR¹⁸⁾. Das 3-Keto-4-en-System zeigt sich an seiner charakteristischen Absorption bei 243 nm im UV¹⁹⁾. Zugleich wurde das 21-Acetat zur 21-Hydroxyverbindung verseift, wie das Fehlen der Acetatbanden im NMR und IR beweist. Das 6-Methyl-3-keto-4,6-dien-System von **5**, das auch noch die Monohydroxylierungsprodukte **6** und **8** besitzen, offenbart sich am besten im UV mit seiner Absorption bei 289 nm¹⁹⁾.

Somit waren die drei Substrate **3a**, **4** und **5** für die mikrobiologische 11-Hydroxylierung zu prüfen, wofür zur 11 β -Hydroxylierung *Curvularia lunata* (NRRL 2380) und zur 11 α -Hydroxylierung *Aspergillus ochraceus* (ATCC 1008) ausgewählt wurden.



Im Gegensatz zu mehreren untersuchten 3 β -Hydroxy-5 α ,6 α -epoxiden^{13, 14)} ließ sich das 6 β -methyl-substituierte Epoxid **3a** nicht in 11 β -Stellung hydroxylieren. Die Verbindung wurde nur enzymatisch verseift zum 21-Alkohol **3b** und zu geringen Anteilen umgewandelt in **4**. Offenbar ist eine 11 β -Hydroxylierung durch den axialen 6 β -Methylsubstituenten sterisch behindert, da auch die vergleichsweise untersuchte 21-Desoxy-Verbindung **2** nur schwer angegriffen wurde. Neben einer geringfügigen Oxidation zum Analogon von **4** wurde hier eine Hydroxylierung in einer Ausbeute von nur 2.2% ausschließlich in 15 β -Stellung zu **13** bewirkt. Das wird durch die starke paramagnetische Verschiebung des 18-H-Signals um 0.49 ppm bezüglich **2** in C₅D₅N im NMR bewiesen²⁰⁾. Auch die Kopplungskonstanten $J_{14,15} = 6$ und $J_{15,16} = 2$ Hz im Vergleich mit Literaturwerten²¹⁾ und nach Analyse von Dreiding-Modellen sowie die charakteristischen Fragmentierungen im MS, besonders die Peaks bei $m/e = 274, 245$ ²²⁾ und 85 (s. Exp. Teil), liefern starke Hinweise auf die 15 β -Hydroxysubstitution. Der negative Einfluß des 6 β -Methylsubstituenten auf die 11 β -Hydroxylierung mit dem *Curvularia*-Stamm bestätigte sich leider auch beim Substrat **4**, das bei der Fermentation unverändert blieb.

Das 3-Keto-4,6-dien-System **5** gibt dem 6-Methyl-Substituenten eine annähernd äquatoriale Stellung, wodurch die sterische Hinderung der 11 β -Hydroxylierung vermindert wird. Die Umwandlung von **5** war jedoch auch bei extrem verlängerten Fermentationszeiten noch unvollständig und ergab die 11 β -Hydroxyverbindung **6** in einer Ausbeute von 16%.

Bei der Vergleichsprüfung im analytischen Maßstab von über 30 weiteren Pilzarten, die nach Literaturangaben²³⁾ bei unterschiedlichen Steroidsubstraten 11 β -hydroxylierende Eigenschaften besitzen, zeigte sich bei den meisten Stämmen eine deutlich verzögerte 11 β -Hydroxylierung des Substrates **5** im Vergleich zu 6 α -Fluor-21-hydroxy-16 α -methyl-4-pregnen-3,20-dion. Als Ausnahmen fielen einige bekannte *Cunninghamella*-Spezies auf, von welchen *Cunninghamella elegans* (ATCC 9245) bei präparativem Ansatz neben 14% der 11 β -Hydroxyverbindung **6** 9% des 11 α -Hydroxyproduktes **8** lieferte.

Die allgemein richtungsspezifischere 11 α -Hydroxylierung bietet für die Herstellung der 11-Keto-Verbindungen **11** und **12** Vorteile. Im Gegensatz zur 11 β -Hydroxylierung verläuft die Einführung einer 11 α -Hydroxylgruppe bei Substrat **5** mit *Aspergillus ochraceus* normal und ergibt eine Ausbeute von 73% **8**. Überraschenderweise ist jedoch eine 11 α -Hydroxylierung beim Substrat **4** stark behindert, wofür vermutlich die äquatoriale 6 α -Hydroxygruppe verantwortlich ist.

Die 11-Hydroxyverbindungen **6** und **8** lassen sich mit *Bacillus lentus* (ATCC 13805) leicht in die 1,2-Didehydroverbindungen **7** und **9** überführen. Die Ausbeuten betragen 50% für **7** bzw. 61% für **9**.

Hydroxylierungen in 11 β - oder 11 α -Position lassen sich leicht durch die typischen Signallagen der geminal angeordneten Protonen und ihre Aufspaltungen im NMR erkennen (11 α -H: $\delta = 4.3 - 4.5$ q, $J = 3, 3$ Hz, in CDCl₃²⁴⁾; 11 β -H: $\delta 3.9 - 4.1$, dt, 5, 10, 10 Hz, in CDCl₃²⁴⁾; in C₅D₅N werden die Signale um ≈ 0.20 ppm paramagnetisch verschoben²⁵⁾). Danach gehören **6** und **7** der 11 β -Hydroxyreihe und **8**, **9** und **10** der 11 α -Hydroxyreihe an. Die 11 β -Hydroxyverbindungen sind außerdem an ihren großen Inkrementen zur Berechnung der NMR-Signallagen von 18-H und 19-H in C₅D₅N (jeweils zwischen 0.5 und 0.6 ppm²⁰⁾) leicht zu erkennen. Bei **6** und **7** liegen die Werte in der erwarteten Größenordnung. In den 11 α -Hydroxyverbindungen **8**, **9** und **10** kommt

die HO-Gruppe dem 1 β -H bzw. 1-H räumlich sehr nahe und bewirkt starke paramagnetische Verschiebungen der Signale dieser Protonen im NMR, die besonders augenfällig in C₅D₅N-Lösung sind.

Das 6-Methyl-3-keto-1,4,6-trien-System läßt sich im UV besonders gut an den drei Banden bei 228, 253 und 304 nm erkennen¹⁹⁾. Die Verbindungen **7**, **9**, **10**, **11** und **12** besitzen diesen Chromophor. Die Bandenlagen sind bei den 11 α -Hydroxy- **9** und **10** sowie den 11-Keto-Typen **11** und **12** leicht verschoben. Auch die NMR-Spektren dieser fünf Verbindungen belegen das 6-Methyl-3-keto-1,4,6-trien-System.

Die 11 α -Hydroxyverbindung **9** wurde nach partieller Acetylierung der 21-Hydroxygruppe mit Acetanhydrid unter Zusatz von Bleidiacetat zu **10** zum 11-Keton **11** mit Jones-Reagenz oxidiert. Anschließend Verseifung des 21-Acetats **11** mit NaOCH₃ lieferte die 21-Hydroxyverbindung **12**. Die 21-Acetoxygruppe bei **10** und **11** ist wieder an den charakteristischen Signal- und Bandenlagen im NMR^{15, 16)} und IR-Spektrum¹⁷⁾ zu erkennen (s. o.). Bei Oxidation der 11 α -Hydroxygruppe zu **11** verschwindet das 11 β -H-Signal im NMR und die HO-Bande im IR. Dafür erscheint ein 2-Protonensingulett bei $\delta = 2.55$ im NMR, das den beiden 12-H zuzuordnen ist²⁶⁾, und die 11-C=O-Bande bei 1710 cm⁻¹ im IR. Im IR- und NMR-Spektrum von **12** fehlen die charakteristischen Acetatbanden.

Über die pharmakologischen Daten wird an anderer Stelle berichtet.

Experimenteller Teil

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-F₂₅₄-Platten (Fa. Merck AG, Darmstadt) verwendet. Es wurde – wenn nicht anders angegeben – im System Chloroform + Methanol (95 + 5) mit Kammersättigung entwickelt. Zur Anfärbung wurde mit einem Reagenz aus 1 ml konz. Schwefelsäure und 9 ml 95proz. Ethanol angesprüht, 10 min bei 120°C getrocknet und im UV-Licht betrachtet. – Säulenchromatographie: Kieselgel G, Gradientenelutionen mit Hexan/Aceton-Mischungen. – IR-Spektren: Perkin-Elmer PE 621 in getemperten KBr-Tabletten. – UV-Spektren: Cary 14 in Methanol. – NMR-Spektren: Varian HA 100 mit TMS als internem Standard. Die Zuordnung einzelner Protonen erfolgte durch Entkopplungsexperimente. – Massenspektren: Varian MAT CH 4 bei 70 eV.

Epoxidierung von 3 β -Hydroxy-6,16 α -dimethyl-5-pregnen-20-on (1): Zu einer Lösung von 24.0 g **1**⁹⁾ in 840 ml Chloroform, versetzt mit 4.8 g Natriumsulfat sic. und 15.6 g Natriumacetat sic., wurden unter Rühren bei +2 bis +5°C 24 ml einer 40proz. Peroxyessigsäure getropft. Während des 20 min Zutropfens wurden weitere 4.8 g Natriumsulfat und 15.6 g Natriumacetat zugegeben. Nach 1 h Rühren bei 5°C und 1 h bei 15°C wurde mit 5proz. Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert und die Chloroformphase mit Wasser, 5proz. Eisen(II)-sulfat-Lösung und Wasser gewaschen. Die über Natriumsulfat getrocknete Lösung ergab nach Verdampfen 25 g Rohprodukt, das aus Essigester umkristallisiert wurde. Man erhielt 20.5 g 5 α ,6 α -Epoxy-3 β -hydroxy-6 β ,16 α -dimethyl-20-pregnanon (**2**), Schmp. 184/185–186°C. Mit einem Zweit-Kristallinat von 730 mg betrug die Ausb. 84%. Eine Probe wurde zur Analyse weiter umkristallisiert, Schmp. 190/191 bis 192°C, DC-R_F 0.58 (2mal entwickelt).

IR: 3480 (OH), 1680 cm⁻¹ (20-C=O). – NMR (CDCl₃): $\delta = 0.58$ (s, 3H, 18-H), 0.92 (d, $J = 7$ Hz, 3H, 16 α -CH₃), 1.02 (s, 3H, 19-H), 1.26 (s, 3H, 6 β -CH₃), 2.07 (s, 3H, 21-H), 2.07 (d, $J = 9$ Hz, 1H, 17 α -H), 2.60 (m, $W_{1/2} = 26$ Hz, 1H, 16 β -H), 3.81 (tt, $J = 10, 10, 5$ und 5 Hz, 1H, 3 α -H). – (C₅D₅N): $\delta = 0.64$ (s, 3H, 18-H), 0.97 (d, $J = 7$ Hz, 3H, 16 α -CH₃), 1.04 (s, 3H, 19-H), 1.30 (s, 3H, 6 β -CH₃),

2.09 (s, 3H, 21-H), 2.10 (d, $J = 9$ Hz, 1H, 17 α -H), 2.79 (m, $W_{1/2} = 26$ Hz, 1H, 16 β -H), 4.20 (tt, $J = 10, 10, 5$ und 5 Hz, 1H, 3 α -H).

$C_{23}H_{36}O_3$ (360.5) Ber. C 76.6 H 10.1 O 13.3 Gef. C 76.5 H 10.2 O 12.9

21-Acetoxylierung von 2: Zu einer Lösung von 25.0 g **2** in 350 ml trockenem Methylenchlorid wurden unter Stickstoffeinleiten und Rühren eine Lösung von 2.1 g Natrium in 60 ml Ethanol und anschließend 25 ml Oxalsäure-diethylester in 15 ml Methylenchlorid getropft. Die Reaktionsmischung wurde 8 h auf 60°C erwärmt und i. Vak. zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde mit 700 ml Hexan und 70 ml Methylenchlorid ausgekocht und ergab 39 mg kristallines Produkt. DC- R_F 0.46 (2 \times entwickelt). Die Lösung dieses Rohprodukts in 600 ml Methanol wurde auf -15°C gekühlt und unter Stickstoffeinleiten und Rühren innerhalb einer h tropfenweise mit einer Lösung von 19.5 g Iod in 250 ml Methanol versetzt. Nach 1.5 h Nachrühren wurden 4.3 g Natriummethylat in 45 ml Methanol in 40 min zugetropft. Nach weiteren 1.5 h wurden innerhalb von 2.5 h bei stetig bis auf 20°C gesteigerter Temperatur 1400 ml Wasser zugetropft. Das ausgefällte Produkt wurde in Aceton/Essigester aufgenommen, die Lösung filtriert und schonend i. Vak. eingengt (22 g noch feuchtes Rohprodukt). Die wäßrige Phase wurde zweimal mit Essigester extrahiert, der Extrakt mit Wasser gewaschen und i. Vak. eingengt (25 g feuchtes Rohprodukt). Das Rohprodukt wurde in 600 ml Aceton gelöst, unter Rühren und Kühlung auf 0°C wurde mit 38 ml Eisessig und 64 ml Triethylamin versetzt und 2 h zum Sieden erhitzt. Nach Abdestillieren von 350 ml Aceton wurde mit 1 l Wasser versetzt, die wäßrige Phase dekantiert und der Rückstand i. Vak. getrocknet. Nach intensivem Waschen mit Hexan wurde erneut i. Vak. getrocknet. Man erhielt 22.6 g (78%) *21-Acetoxy-5 α ,6 α -epoxy-3 β -hydroxy-6 β ,16 α -dimethyl-20-pregnanon (3a)*. DC- R_F 0.37 (Benzol/Essigester 1 + 4, 2 mal entwickelt), Zers. 75/80 – 85°C.

IR: 3440 (OH), 1750 (Acetat-C=O), 1720 (20-C=O), 1225 (O-COCH₃), 1055 cm⁻¹ (C-OCOCH₃). – NMR (CDCl₃): $\delta = 0.63$ (s, 3H, 18-H), 0.94 (d, $J = 7$ Hz, 3H, 16 α -CH₃), 1.02 (s, 3H, 19-H), 1.26 (s, 3H, 6 β -CH₃), 2.06 (d, $J = 9$ Hz, 1H, 17 α -H), 2.14 (s, 3H, 21-OAc), 2.68 (m, $W_{1/2} = 26$ Hz, 1H, 16 β -H), 3.81 (tt, $J = 10, 10, 5$ und 5 Hz, 1H, 3 α -H), 4.41 (d, $J = 17$ Hz, 1H, 21-H), 4.66 (d, $J = 17$ Hz, 1H, 21-H).

$C_{25}H_{38}O_5$ (418.6) Ber. C 71.8 H 9.1 O 19.1 Gef. C 71.4 H 9.3 O 19.2

Mikrobiologische Oxidation von 3a zu 6 α ,21-Dihydroxy-6 β ,16 α -dimethyl-4-pregnen-3,20-dion (4): Ein Glasfermenter mit 20 ml Fassungsvermögen wurde mit 15 l einer Nährlösung aus 0.3% Hefeeextrakt, 0.5% Cornsteep liquor und 0.2% Stärkezucker beschickt, durch halbstündiges Erhitzen auf 120°C sterilisiert und nach Abkühlen mit 250 ml einer 2 Tage alten Schüttelkolbenkultur von *Flavobacterium dehydrogenans* (ATCC 13930) beimpft. (Die Schüttelkolbenkultur wurde durch Inoculieren von 250 ml des gleichen Mediums mit der Abschwemmung einer 7 d alten Schrägagarkultur hergestellt.) Nach 24stündiger Vermehrung bei 30°C unter Rühren (220 U/min) wurden 1.8 l der erzeugten Kultur unter sterilen Bedingungen entnommen und in einen 50-l-Fermenter – beschickt mit 30 l des gleichen Mediums – übergeführt. Nach 6 h wurde eine sterilfiltrierte Lösung von 14 g **3a** in 200 ml Dimethylformamid zugesetzt und unter gleichen Bedingungen weitere 17 h fermentiert. Danach wurde die Kulturbrühe mit Isobutylmethylketon extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden i. Vak. zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit Hexan vom verwendeten Antischaummittel Silicon SH freigewaschen und aus Essigester umkristallisiert. Aus zwei vereinigten Ansätzen erhielt man 16 g (64%) **4**, Schmp. 219/220 – 223°C, DC- R_F 0.37. (Bei Einsatz des 3 β -Acetates **3c** betrug die Ausb. 74%.)

IR: 3420 (OH), 1700 (20-C=O), 1645 (3-C=O), 1605 cm⁻¹ (C=C). – UV: λ_{max} (ϵ) 243 nm (13800). – NMR (C₅D₅N): $\delta = 0.79$ (s, 3H, 18-H), 0.92 (d, $J = 7$ Hz, 3H, 16 α -CH₃), 1.20 (s, 3H, 19-H), 1.57 (s, 3H, 6 β -CH₃), 2.26 (d, $J = 9$ Hz, 1H, 17 α -H), 2.86 (m, $W_{1/2} = 26$ Hz, 1H, 16 β -H), 4.47 (s, 2H, 21-H), 6.99 (s, 1H, 4-H).

$C_{23}H_{34}O_4$ (374.5) Ber. C 73.8 H 9.1 O 17.0 Gef. C 72.8 H 9.4 O 17.2

Dehydratisierung von 4 zu 21-Hydroxy-6,16 α -dimethyl-4,6-pregnadien-3,20-dion (5): Die Lösung von 7.7 g **4** in 1.3 l trockenem Benzol wurde mit 3.5 g *p*-Toluolsulfonsäure versetzt 2 h zum Sieden erhitzt (Wasserabscheider). Die Lösung wurde filtriert, mit 5proz. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen und i. Vak. bei 50°C zur Trockne eingengt. Der Rückstand von 7.7 g wurde aus Diisopropylether unter Kohlezusatz umkristallisiert. Man erhielt 4.8 g (66%) **5**, Schmp. 122/123–125°C, DC- R_F 0.68 (Benzol/Essigester 1 + 4, 2mal entwickelt).

IR: 3450 (OH), 1700 (20-C=O), 1650 (3-C=O), 1620 und 1575 cm^{-1} (C=C). – UV: λ_{max} (ϵ) 289 nm (23500). – NMR (CDCl_3): δ = 0.78 (s, 3H, 18-H), 1.02 (d, J = 7 Hz, 3H, 16 α -CH₃), 1.09 (s, 3H, 19-H), 1.85 (d, J = 1.5 Hz, 3H, 6-CH₃), 2.10 (d, J = 9 Hz, 1H, 17 α -H), 2.80 (m, $W_{1/2}$ = 26 Hz, 1H, 16 β -H), 4.17 (s, 2H, 21-H), 5.86 (s, 1H, 4-H), 5.90 (m, $W_{1/2}$ = 6 Hz, 1H, 7-H). – MS: m/e = 356 (100%, M^+), 341 (6, M^+ – CH₃), 325 (44, M^+ – CH₂OH), 297 (51, M^+ – COCH₂OH), 256 (6, A^{27}), 241 (12, B^{27}), 187 (66, C^{27}), 175 (29, D^{27}).

$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_3$ (356.5) Ber. C 77.5 H 9.0 O 13.5 Gef. C 76.9 H 9.2 O 14.0

Fermentation von 3a mit Curvularia lunata: Mit einer Lyophilkultur von *Curvularia lunata* (NRRL 2380) wurden in einem 2-l-Erlenmeyerkolben 100 ml sterile Nährlösung aus 3% Stärkezucker, 1% Cornsteep liquor, 0.2% NaNO₃, 0.1% KH₂PO₄, 0.2% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ und 0.05% KCl beimpft. Die Kultur wurde 2 d bei 30°C mit einer Frequenz von 145 U/min geschüttelt. Je 2 ml Mycel-Suspension wurden in je 20 ml des gleichen sterilen Mediums übergeführt und unter gleichen Bedingungen angezüchtet. Nach 6 h wurden je 4 mg **3a** in 0.2 ml Dimethylformamid zugesetzt und fermentiert. Nach 24, 36, 48 und 60 h wurde die Kulturbrühe mit 4 ml Isobutylmethylketon extrahiert und eine Probe der Extraktlösung dünnschichtchromatographisch analysiert. Das Ausgangsmaterial **3a** war nach 24 h Kontaktzeit vollständig verseift zu **3b**, DC- R_F 0.55. Nach 36 h Kontaktzeit, verstärkt zu längeren Fermentationszeiten, trat ein UV-aktives Produkt auf, welches nach DC-Vergleich (DC- R_F 0.47) identisch mit **4** war.

Fermentationsversuch von 4 mit Curvularia lunata: Unter gleichen Fermentationsbedingungen blieb **4** in Versuchen bis zu 60 h Kontaktzeit unverändert.

Fermentation von 2 mit Curvularia lunata: Unter bereits früher beschriebenen Bedingungen²⁸⁾ wurden 3.0 g **2** bei einer Substratkonzentration von 200 mg/l mit *Curvularia lunata* 90 h fermentiert mit einer Kontaktzeit von 78 h. Die Schlußprobe zeigte nach DC-Analytik (Benzol/Essigester 1 + 4) noch 75% unumgewandeltes Ausgangsmaterial neben je ca. 3% von zwei polaren Umsetzungsprodukten. Aus dem durch übliche Aufarbeitung erhaltenen Rohprodukt wurden durch Kristallisation aus Essigester 1.14 g unumgewandeltes **2** abgetrennt. Die Mutterlauge wurde chromatographiert und ergab 283 mg eines Rohproduktes, welches nach Umkristallisieren aus Diisopropylether/Aceton 141 mg Reinprodukt lieferte, Schmp. 204–205°C. Das Produkt war identisch mit dem aus **2** durch Fermentation mit *Flavobacterium dehydrogenans* nach oben beschriebenen Bedingungen erhaltenen 6 α -Hydroxy-6 β ,16 α -dimethyl-4-pregnen-3,20-dion (DC- R_F 0.47). Aus den weiteren Fraktionen wurden 268 mg des zweiten Umwandlungsproduktes isoliert, das nach Umkristallisation aus Diisopropylether 123 mg (2.2%) 5 α ,6 α -Epoxy-3 β ,15 β -dihydroxy-6 β ,16 α -dimethyl-5 α -pregnan-20-on (**13**) ergab. Schmp. 144/146–148°C, DC- R_F 0.33.

IR: 3450 (OH), 1690 cm^{-1} (20-C=O). – NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ = 1.04 (s, 3H, 19-H), 1.06 (d, J = 7 Hz, 3H, 16 α -CH₃), 1.13 (s, 3H, 18-H), 1.26 (s, 3H, 6 β -CH₃), 2.13 (s, 3H, 21-H), 2.13 (d, J = 9 Hz, 1H, 17 α -H), 2.36 (dd, J = 13 und 6 Hz, 1H, 14 α -H), 3.03 (m, $W_{1/2}$ = 20 Hz, 1H, 16 β -H), 3.95 (dd, J = 6 und 2 Hz, 1H, 15 α -H), 4.22 (tt, J = 10, 10, 5 und 5 Hz, 1H, 3 α -H). – MS: m/e = 376 (100%, M^+), 358 (19, M^+ – H₂O), 340 (12, 358 – H₂O), 315 (19, 358 – CH₃CO), 300 (9, 358 – CH₃COCH₃), 297 (14, 358 – H₂O – H₃CCO), 282 (5, 358 – H₂O – H₃CCOCH₃), 274 (5, E^{27}), 256 (5, 274 – H₂O), 245 (6, F^{27}), 85 (13, CH₃ \dot{C} HCH=C(OH)CH₃), 43 (20, CH₃CO).

$\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_4$ (376.5) Ber. C 73.4 H 9.6 O 17.0 Gef. C 73.0 H 9.7 O 17.0

11 β -Hydroxylierung von 5 mit Curvularia lunata: In gleicher Weise wurden 5.0 g **5** in einer Substratkonzentration von 200 mg/l mit einer Kontaktzeit von 136 h über 148 h fermentiert. Das aus der Kulturbrühe und durch Auswaschen des Mycel erhaltenes Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie aufgetrennt und ergab nach Kristallisation aus Essigester 841 mg (16%) *11 β ,21-Dihydroxy-6,16 α -dimethyl-4,6-pregnadien-3,20-dion* (**6**), Schmp. 241/242–244°C, DC-R_F 0.30.

IR: 3470 (OH), 1705 (20-C=O), 1660 (3-C=O), 1620 und 1580 cm⁻¹ (C=C). – UV: λ_{\max} (ϵ) 289 nm (23200). – NMR (C₅D₅N): δ = 0.97 (d, J = 7 Hz, 3H, 16 α -CH₃), 1.26 (s, 3H, 18-H), 1.52 (s, 3H, 19-H), 1.85 (breites s, 3H, 6-CH₃), 2.28 (d, J = 9 Hz, 1H, 17 α -H), 2.90 (m, $W_{1/2}$ = 26 Hz, 1H, 16 β -H), 4.46 (m, $W_{1/2}$ = 5 Hz, 3H, 21- und 11 α -H), 6.02 (m, $W_{1/2}$ = 5 Hz, 2H, 4- und 7-H).

11 α -Hydroxylierung von 5 mit Aspergillus ochraceus: Ein 2-l-Erlenmeyerkolben mit 500 ml einer sterilen Nährlösung, bestehend aus 1% Cornsteep liquor, 1.25% Sojabohnenmehl und 0.005% Sojaöl, wurde mit der Abschwemmung einer 10 d alten, auf Maiskörnern gewachsenen Kultur von *Aspergillus ochraceus* (ATCC 1008) beimpft und 72 h bei 30°C und 165 U/min geschüttelt. Mit 250 ml dieser Anzuchtkultur wurde ein 20-l-Glasfermenter beimpft, der mit 15 l der gleichen Nährlösung beschickt und sterilisiert war. Nach 24stündiger Germination bei 30°C unter Rühren (220 U/min) und Belüftung (15 l/pro min) wurden 900 ml der erzeugten Kultur in einen gleich großen Fermenter übergeführt, der mit 14 l des gleichen Mediums beschickt und sterilisiert war. Nach 12 h wurde eine sterifiltrierte Lösung von 2.75 g **5** in 110 ml Dimethylformamid zugesetzt und unter gleichen Bedingungen 27 h weiter fermentiert. Die Schlußprobe zeigte nach DC-Analytik eine vollständige Umwandlung zu 80% Hauptprodukt und je 1 bis 2% zweier polarer Nebenprodukte. Durch übliche Aufarbeitung wurden 6.5 g Rohprodukt aus den Isobutylmethylketon-Extrakten von zwei gleichen Ansätzen isoliert, die nach Kristallisation aus Essigester unter Kohlezusatz 4.20 g (73%) *11 α ,21-Dihydroxy-6,16 α -dimethyl-4,6-pregnadien-3,20-dion* (**8**) ergaben. Schmp. 191/192–194°C, DC-R_F 0.15.

IR: 3430 (OH), 1705 (20-C=O), 1655 (3-C=O), 1625 und 1570 cm⁻¹ (C=C). – UV: λ_{\max} (ϵ) 289 nm (23000). – NMR (C₅D₅N): δ = 0.79 (s, 3H, 18-H), 0.94 (d, J = 7 Hz, 3H, 16 α -CH₃), 1.20 (s, 3H, 19-H), 1.81 (breites s, 3H, 6-CH₃), 2.39 (d, J = 9 Hz, 1H, 17 α -H), 2.48 (dd, J = 12 und 5 Hz, 1H, 12 β -H), 2.86 (m, $W_{1/2}$ = 26 Hz, 1H, 16 β -H), 3.08 (dt, J = 13.3 und 3 Hz, 1H, 1 β -H), 4.13 (dt, J = 5, 10 und 10 Hz, 1H, 11 β -H), 4.33 (d, J = 18 Hz, 1H, 21-H), 4.47 (d, J = 18 Hz, 1H, 21-H), 5.84 (m, $W_{1/2}$ = 5 Hz, 1H, 7-H), 6.02 (s, 1H, 4-H).

Fermentation von 5 mit Cunninghamella elegans: In gleicher Weise wie mit *Curvularia lunata* wurden 1.90 g **5**, gelöst in 60 ml Dimethylformamid, mit 10 l einer Kultur von *Cunninghamella elegans* (ATCC 9245) 62 h fermentiert (Kontaktzeit 50 h). Übliche Aufarbeitung ergab 1.5 g Rohproduktgemisch, das durch Säulenchromatographie getrennt wurde. Man erhielt 267 mg (14%) *11 β -Hydroxyprodukt 6* und 172 mg (9%) *11 α -Hydroxyprodukt 8*.

Dehydrierung von 6 mit Bacillus lentus: Eine Lyophilkultur von *Bacillus lentus* (ATCC 13805) wurde mit 200 ml eines Mediums aus 1.2% Cornsteep und 1.5% Pepton 2 d bei 30°C geschüttelt. Mit dieser Suspension wurden 10 l einer sterilen Nährlösung aus 0.1% Hefeextrakt, 0.5% Cornsteep liquor und 0.2% Glucose in einem 20-l-Glasfermenter beimpft. Nach 24stündiger Vermehrung unter Belüftung (10 l/min), 1.7 atü Druck und Rühren (220 U/min) wurde 1 l der Kultur in 7 l der gleichen Nährlösung in einen gleich großen Fermenter übergeführt. Nach 6 h Anzucht wurde eine Lösung von 800 mg **6** in 50 ml Dimethylformamid zugesetzt und weitere 20 h fermentiert. Man erhielt nach üblicher Aufarbeitung 800 mg hexangewaschenes Rohprodukt, das aus Diisopropylether/Methylenchlorid umkristallisiert 400 mg (50%) *11 β ,21-Dihydroxy-6,16 α -dimethyl-1,4,6-pregnatrien-3,20-dion* (**7**) ergab. Schmp. 136/140–143°C, DC-R_F 0.35.

IR: 3430 (OH), 1705 (20-C=O), 1650 (3-C=O), 1600 cm⁻¹ (C=C). – UV: λ_{\max} (ϵ) 227 (12900), 252 (8430), 303 nm (10400). – NMR (C₅D₅N): δ = 0.94 (d, J = 7 Hz, 1H, 16 α -CH₃), 1.19 (s, 3H,

18-H), 1.54 (s, 3H, 19-H), 1.87 (breites s, 3H, 6-CH₃), 2.23 (d, $J = 9$ Hz, 1H, 17 α -H), 2.84 (m, $W_{1/2} = 26$ Hz, 1H, 16 β -H), 4.32 (s, 2H, 21-H), 4.46 (q, $J = 3$ Hz, 1H, 11 α -H), 5.84 (m, $W_{1/2} = 5$ Hz, 1H, 7-H), 6.28 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 4-H), 6.34 (dd, $J = 10$ und 1.5 Hz, 1H, 2-H), 7.42 (d, $J = 10$ Hz, 1H, 1-H).

Dehydrierung von 8 mit Bacillus lentus: Unter gleichen Bedingungen wurden in einem 50-l-Fermenter aus nichtrostendem Stahl, in welchem 20 l einer Kultur von *Bacillus lentus* (ATCC 13805) angezüchtet waren, 4.0 g **8**, gelöst in 100 ml Dimethylformamid, eingesetzt und in einer Kontaktzeit von 30 h fermentiert. Das hexangewaschene Rohprodukt (4.6 g) wurde aus Essigester umkristallisiert. Man erhielt 1.5 g 11 α ,21-Dihydroxy-6,16 α -dimethyl-1,4,6-pregnatrien-3,20-dion (**9**). Schmp. 170/171 – 172 °C, DC- R_F 0.21. Durch Chromatographie der Mutterlaugen wurden weitere 920 mg **9** gewonnen (Gesamtausbe. 61%).

IR: 3480 und 3300 (OH), 1720 (20-C=O), 1650 (3-C=O), 1605 und 1580 cm⁻¹ (C=C). – UV: λ_{\max} (e) 225 (11800), 261 (11500), 300 nm (11100). – NMR (C₅D₅N): $\delta = 0.83$ (s, 3H, 18-H), 0.94 (d, $J = 7$ Hz, 3H, 16 α -CH₃), 1.24 (s, 3H, 19-H), 1.87 (breites s, 3H, 6-CH₃), 2.41 (d, $J = 9$ Hz, 1H, 17 α -H), 2.52 (dd, $J = 12$ und 5 Hz, 1H, 12 β -H), 2.87 (m, $W_{1/2} = 26$ Hz, 1H, 16 β -H), 4.20 (dt, $J = 5.10$ und 10 Hz, 1H, 11 β -H), 4.35 (d, $J = 18$ Hz, 1H, 21-H), 4.50 (d, $J = 18$ Hz, 1H, 21-H), 5.70 (m, $W_{1/2} = 5$ Hz, 1H, 7-H), 6.35 (dd, $J = 10$ und 1.5 Hz, 1H, 2-H), 6.39 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 4-H), 8.18 (d, $J = 10$ Hz, 1H, 1-H).

C₂₃H₃₀O₄ (370.5) Ber. C 74.6 H 8.2 O 17.2 Gef. C 74.1 H 8.4 O 18.1

21-Acetoxy-11 α -hydroxy-6,16 α -dimethyl-1,4,6-pregnatrien-3,20-dion (**10**): Die Lösung von 4.0 g **9** in 40 ml Dimethylformamid wurde mit 400 mg Bleiacetat und 8.3 ml Acetanhydrid versetzt und 1.5 h bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionslösung wurde in 300 ml 10proz. Natriumacetatlösung unter Rühren eingetropfelt und 1 h nachgerührt. Die Ausfällung wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Man erhielt 4.32 g Rohprodukt. Nach Umkristallisieren aus Essigester/Diisopropylether Ausb. 3.74 g (84%), Schmp. 164/166 – 167 °C.

IR: 3500 (OH), 1750 (Acetat-C=O), 1720 (20-C=O), 1650 (3-C=O), 1605 und 1580 (C=C), 1240 (O – COCH₃), 1045 cm⁻¹ (C – OCOCH₃). – UV: λ_{\max} (e) 226 (11500), 262 (11400), 300 nm (11100). – NMR (C₅D₅N): $\delta = 0.89$ (s, 3H, 18-H), 0.94 (d, $J = 7$ Hz, 3H, 16 α -CH₃), 1.24 (s, 3H, 19-H), 1.86 (breites s, 3H, 6-CH₃), 2.08 (s, 3H, 21-OAc), 2.34 (d, $J = 9$ Hz, 1H, 17 α -H), 2.70 (dd, $J = 12$ und 5 Hz, 1H, 12 β -H), 2.79 (m, $W_{1/2} = 26$ Hz, 1H, 16 β -H), 4.24 (dt, $J = 5, 10$ und 10 Hz, 1H, 11 β -H), 4.65 (d, $J = 17$ Hz, 1H, 21-H), 4.89 (d, $J = 17$ Hz, 1H, 21-H), 5.70 (m, $W_{1/2} = 5$ Hz, 1H, 7-H), 6.36 (dd, $J = 10$ und 1.5 Hz, 1H, 2-H), 6.39 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 4-H), 8.19 (d, $J = 10$ Hz, 1H, 1-H).

C₂₅H₃₂O₅ (412.5) Ber. C 72.8 H 7.8 O 19.4 Gef. C 72.3 H 8.0 O 19.6

*Oxidation zu 21-Acetoxy-6,16 α -dimethyl-1,4,6-pregnatrien-3,11,20-trion (**11**):* Zu einer Lösung von 2.0 g **10** in 40 ml 90proz. Essigsäure wurde in 2 h eine Lösung von 533 mg CrO₃ in 25 ml 90proz. Essigsäure getropft und 4.5 h nachgerührt. Die Reaktionslösung wurde in 800 ml 8proz. Natriumhydrogencarbonatlösung eingeführt, der Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet (1.62 g Rohprodukt). Durch Extrahieren der wäßrigen Phase mit Methylenchlorid wurden weitere 330 mg erhalten. Die vereinigten Rohprodukte mußten durch Säulenchromatographie aufgereinigt werden. Nach Kristallisation aus Diisopropylether/Hexan Ausb. 1.42 g (47%), Schmp. 121/122 – 123 °C, DC- R_F 0.58.

IR: 1750 (Acetat-C=O), 1725 (20-C=O), 1710 (11-C=O), 1655 (3-C=O), 1610 und 1580 (C=C), 1230 (O – COCH₃), 1050 cm⁻¹ (C – OCOCH₃). – UV: λ_{\max} (e) 226 (10800), 258 (8830), 294 nm (12100). – NMR (CDCl₃): $\delta = 0.79$ (s, 3H, 18-H), 1.07 (d, $J = 7$ Hz, 3H, 16 α -CH₃), 1.36 (s, 3H, 19-H), 1.95 (breites s, 3H, 6-CH₃), 2.16 (s, 3H, 21-OAc), 2.38 (d, $J = 9$ Hz, 1H, 17 α -H), 2.55 (s, 2H, 12-H), 2.81 (m, $W_{1/2} = 26$ Hz, 1H, 16 β -H), 4.44 (d, $J = 17$ Hz, 1H, 21-H), 4.59 (d, $J = 17$ Hz, 1H,

21-H), 5.76 (m, $W_{1,2} = 5$ Hz, 1H, 7-H), 6.21 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 4-H), 6.24 (dd, $J = 10$ und 1.5 Hz, 1H, 2-H), 7.75 (d, $J = 10$ Hz, 1H, 1-H).

Verseifung zu 21-Hydroxy-6,16 α -dimethyl-1,4,6-pregnatrien-3,11,20-trion (12): Zu 500 mg **11** in 35 ml Methanol wurden unter Stickstoffatmosphäre und Rühren bei Raumtemp. 132 mg Natrium-methylat gegeben. Nach 5 min wurde mit 0.13 ml Wasser versetzt und mit Eisessig neutralisiert. Nach Konzentrieren i. Vak. wurde mit Wasser verdünnt und mit Essigester extrahiert. Aus dem zur Trockne eingeeigneten Extrakt erhielt man 450 mg Rohprodukt, nach Umkristallisation aus Diisopropylether/Aceton Ausb. 155 mg (35%), Schmp. 162–164°C, DC- R_F 0.42.

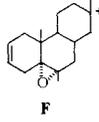
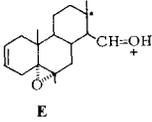
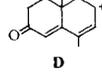
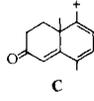
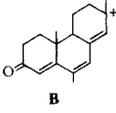
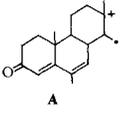
IR: 3450 (OH), 1710 (20-C=O und 11-C=O), 1655 (3-C=O), 1610 und 1580 cm^{-1} (C=C). – UV: λ_{max} (ϵ) 226 (10200), 258 (8600), 293 nm (11800). – NMR (CDCl_3): $\delta = 0.79$ (s, 3H, 18-H), 1.09 (d, $J = 7$ Hz, 3H, 16 α -CH₃), 1.36 (s, 3H, 19-H), 1.95 (breites s, 3H, 6-CH₃), 2.33 (d, $J = 9$ Hz, 1H, 17 α -H), 2.47 (s, 2H, 12-H), 2.85 (m, $W_{1,2} = 26$ Hz, 1H, 16 β -H), 4.16 (s, 2H, 21-H), 5.76 (m, $W_{1,2} = 5$ Hz, 1H, 7-H), 6.21 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 4-H), 6.24 (dd, $J = 10$ und 1.5 Hz, 1H, 2-H), 7.74 (d, $J = 10$ Hz, 1H, 1-H).

Literatur

- ¹⁾ XV. Mitteil.: H. J. Vidic, D. Rosenberg und K. Kieslich, Chem. Ber. **111**, 2143 (1978).
- ²⁾ K. H. Bork, F. V. Werder, H. Meth, K. Brückner und M. Baumgarth, *Excerpta Medica*, International Congress Series No. 210, Third International Congress on Hormonal Steroids, Hamburg, Referat No. 157, S. 83.
- ³⁾ S. L. Steelman, E. R. Morgan und M. S. Glitzer, Steroids **18**, 129 (1971).
- ⁴⁾ J. Harting und H. G. Kraft in Lit.²⁾, Referat No. 366, S. 176.
- ⁵⁾ G. Raspé, K. Kieslich und U. Kerb, *Arzneim.-Forsch.* **14**, 450 (1964).
- ⁶⁾ A. Domenico, H. Gibian, U. Kerb, K. Kieslich, M. Kramer, F. Neumann und G. Raspé, *Arzneim.-Forsch.* **15**, 3 (1965).
- ⁷⁾ D. Branceni, G. Rousseau und R. Jequier, Steroids **6**, 451 (1965).
- ⁸⁾ R. Joly, J. Warnant, B. Goffinet, J. Jelly und J. Prost-Maréchal, *Arzneim.-Forsch.* **24**, 1 (1974).
- ⁹⁾ Kaufware der Fa. Searle.
- ¹⁰⁾ K. Kieslich, H. Wiegglepp, K. Petzoldt und F. Hill, *Tetrahedron* **27**, 445 (1971).
- ¹¹⁾ K. Kieslich und G. Raspé, DBP 1226575 (1960). [*Chem. Abstr.* **66**, 38165 k (1967)].
- ¹²⁾ K. Kieslich, *Tetrahedron* **25**, 5863 (1969).
- ¹³⁾ K. Kieslich und H. Wiegglepp, Chem. Ber. **104**, 205 (1971).
- ¹⁴⁾ G. Cleve, G.-A. Hoyer, K. Kieslich und H. Wiegglepp, Chem. Ber. **105**, 658 (1972).
- ¹⁵⁾ G.-A. Hoyer, Schering-Spektrensammlung.
- ¹⁶⁾ C. J. Pouchert und J. R. Campbell, *The Aldrich Library of NMR Spectra*, Vol. X, 115 D, Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee 1974.
- ¹⁷⁾ K. Nakanishi, *Infrared Absorption Spectroscopy-Practical*, S. 44, Holden Day, Inc., San Francisco, und Nankodo Company Ltd., Tokyo 1962.
- ¹⁸⁾ K. Tori und E. Kondo, Steroids **4**, 713 (1964).
- ¹⁹⁾ W. Neudert und H. Röpke, *Steroid-Spektrenatlas*, S. 319ff., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1965.
- ²⁰⁾ K. Tori und K. Aono, *Annu. Rep. Shionogi Res. Lab. (Osaka)* **14**, 136 (1964) [*Chem. Abstr.* **67**, 27508s (1967)].
- ²¹⁾ A. D. Boul, J. W. Blunt, J. W. Browne, V. Kumar, G. D. Meakins, J. T. Pinhey und V. E. M. Thomas, *J. Chem. Soc. C* **1971**, 1130.
- ²²⁾ Z. V. Zaretskii, *Mass Spectrometry of Steroids*, S. 72, John Wiley & Sons, New York-Toronto, und Israel Universities Press, Jerusalem 1976.
- ²³⁾ W. Charney und H. L. Herzog, *Microbial Transformations of Steroids*, Academic Press, New York/London 1967.
- ²⁴⁾ 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.* **1970**, 250.
- ²⁵⁾ P. V. Demarco, E. Farkas, D. Doddrell, B. L. Mylari und E. Wenkert, *J. Am. Chem. Soc. C* **90**, 5480 (1968).

²⁶⁾ *N. S. Bhacca* und *D. H. Williams*, *Applications of NMR-Spectroscopy in Organic Chemistry*, S. 175, Holden Day, Inc., San Francisco-London-Amsterdam 1964.

²⁷⁾



²⁸⁾ Siehe in Lit.¹³⁾, S. 208.

[203/78]