

Mikrobiologische Umwandlung von Steroiden, XVII¹⁾

Darstellung von unterschiedlichen Mono- und Diketostrukturen von *D*-Homo-4-pregnen-3,20-dion und *D*-Homo-1,4-pregnadien-3,20-dion

Klaus Kieslich, Georg-Alexander Hoyer, Arne Seeger, Rudolf Wiechert* und Ulrich Kerb

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

Eingegangen am 2. April 1979

Durch mikrobiologische Umwandlung von *D*-Homoprogesteron (1) mit verschiedenen Pilzstämmen wurden 11 α - (2) und 15 α -Monohydroxy- (3), 6 β ,11 α - (4), 11 α ,15 α - (5), 12 β ,15 α - (6), 15 α ,16 α - (7), 7 β ,11 α - (8), 11 β ,17 α - (9), 7 β ,17 α -Dihydroxy- (11) und 17 α -Hydroxy-11-oxo-*D*-homoprogesteron (10) hergestellt. Die Verbindungen wurden vor und nach mikrobiologischer 1,2-Dehydrierung mit *Bacillus lentus* zu den entsprechenden Ketostrukturen 12–17 und 20 bzw. 26–30 nach Jones oxidiert. Ein 14 α -Hydroxy-11-keton 18 und 7 α ,14 α -Dihydroxy-11-keton 19 wurden durch mikrobiologische Zweihydroxylierung des 11-Ketons 12 mit *Curvularia lunata* erhalten. *Penicillium lilacinum* baute *D*-Homoprogesteron (1) zu *D*-Homotestosteron ab.

Microbial Transformations of Steroids, XVII¹⁾

Preparation of Several Mono- and Diketo-structures of *D*-Homo-4-pregnene-3,20-dione and *D*-Homo-1,4-pregnadiene-3,20-dione

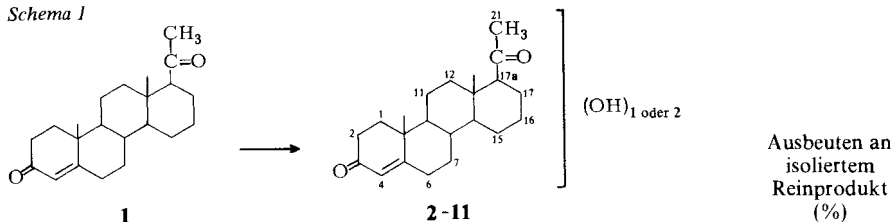
11 α - (2) and 15 α -monohydroxy- (3), 6 β ,11 α - (4), 11 α ,15 α - (5), 12 β ,15 α - (6), 15 α ,16 α - (7), 7 β ,11 α - (8), 11 β ,17 α - (9), 7 β ,17 α -dihydroxy- (11), and 17 α -hydroxy-11-oxo-*D*-homoprogesterone (10) were prepared by microbiological transformations of *D*-homoprogesterone (1) with various fungi. The compounds were oxidized by the method of Jones before and after microbiological 1,2-dehydrogenation with *Bacillus lentus* to the corresponding keto-structures 12 to 17 and 20 respectively 26 to 30. The 14 α -hydroxy-11-ketone 18 and 7 α ,14 α -dihydroxy-11-ketone 19 were obtained by microbiological hydroxylation of the 11-ketone 12 with *Curvularia lunata*. *Penicillium lilacinum* degraded *D*-homoprogesterone (1) to *D*-homotestosterone.

Nach Untersuchungen von Tweit und Kagawa²⁾ besitzt ein 1,4-Pregnadien-3,15,20-trion hohe antimineralocorticoide Wirkung. Durch den neu entwickelten Zugang zu *D*-Homopregnanen³⁾ erschien die Darstellung der analogen *D*-Homo-Struktur sowie weiterer *D*-Homo-1,4-pregnadien-3,20-dione mit zusätzlichen Ketogruppen an unterschiedlichen Positionen des Steroidskeletts interessant.

Die Einführung der Sauerstofffunktionen wurde durch mikrobiologische Hydroxylierung angestrebt mit anschließender Oxidation zu entsprechenden Ketonen vor oder nach mikrobiologischer 1,2-Dehydrierung.

Von 80 analytisch geprüften Pilzstämmen, die erfahrungsgemäß hydroxylierende Eigenschaften bei einfachen Steroids substraten besitzen, wurden die bestgeeigneten Mikroorganismen zur präparativen Umwandlung des Substrates *D*-Homoprogesteron (**1**) eingesetzt. Dabei wurden die Ergebnisse von Schema 1 erhalten.

Schema 1



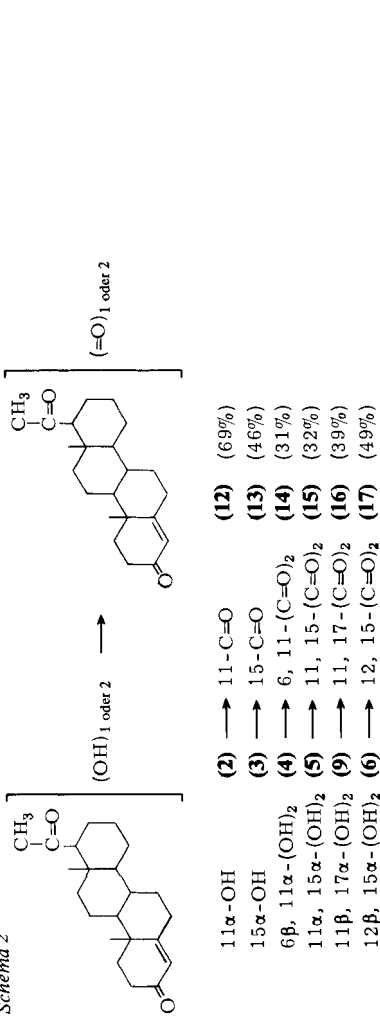
<i>Aspergillus giganteus</i> (ATCC 10059)	2 : 11 α -OH	3
<i>Aspergillus ochraceus</i> (ATCC 1008)	2	26.5
	+4 : 6 β ,11 α -(OH) ₂	8.2
<i>Fusarium lini</i> (CBS 2538)	3 : 15 α -OH	13
<i>Fusarium lini</i> (CBS 713)	3	4
<i>Fusarium oxysporum</i> (ATCC 7601)	3	3
<i>Colletotrichum phomoides</i> (IFO 5257)	3	5
<i>Helminthosporium sativum</i> (CBS 32568)	3	2.9
<i>Rhizopus arrhizus</i> (ATCC 10260)	4 : 6 β ,11 α -(OH) ₂	51.5
<i>Cunninghamella echinulata</i> (NRRL 1386)	4	7.2
<i>Glomerella cingulata</i> (ATCC 10534)	5 : 11 α ,15 α -(OH) ₂	45
<i>Colletotrichum lini</i> (CBS 11221)	5	40
<i>Calonectria decora</i> (ATCC 14767)	6 : 12 β ,15 α -(OH) ₂	23
<i>Fusarium ciliatum</i> (CBS 13235)	6	16.5
<i>Gibberella zeae</i> (IFO 5269)	7 : 15 α ,16 α -(OH) ₂	3
	+3 : 15 α -OH	12
<i>Fusarium oxysporum f. sp. pisi</i> (ATCC 9991)	7 : 15 α ,16 α -(OH) ₂	3.5
	+3 : 15 α -OH	2.5
<i>Penicillium janthinellum</i> (ATCC 10455)	8 : 7 β ,11 α -(OH) ₂	12
	+2 : 11 α -OH	13
<i>Pellicularia filamentosa f. sp. sasakii</i> (ATCC 13289)	9 : 11 β ,17 α -(OH) ₂	21.6
	+11 : 7 β ,17 α -(OH) ₂	1.8
	+10 : 17 α -OH, 11-C=O	1.7

Penicillium lilacinum (ATCC 10114) zeigt wie bei Progesteron⁴⁾ auch bei *D*-Homoprogesteron (**1**) eine *Bayer-Villiger*-Oxidation der Seitenkette, wobei *D*-Homotestosteron isoliert werden konnte.

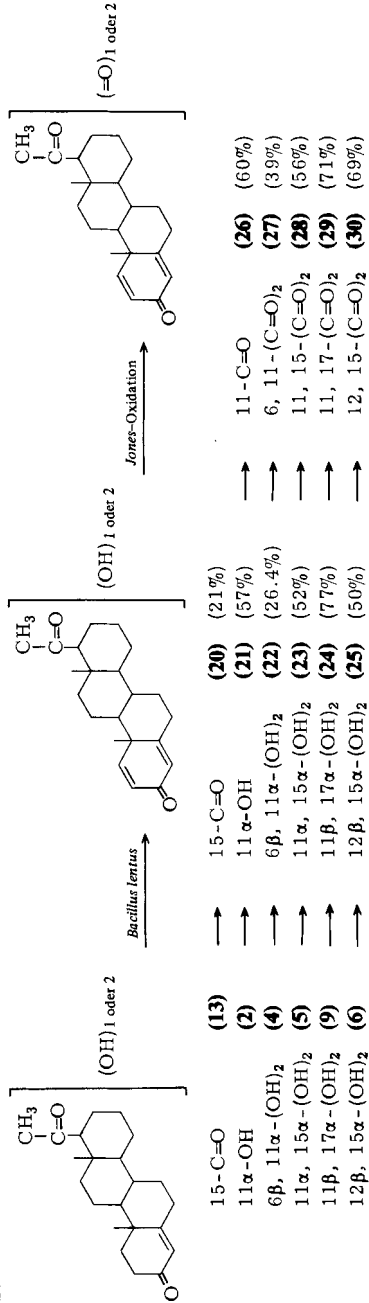
Durch *Jones*-Oxidation wurden aus den erhaltenen Hydroxylierungsprodukten die entsprechenden Mono- und Diketo-*D*-homoprogesterone hergestellt (Schema 2).

Die fehlenden Kombinationen des 11-Ketons mit Sauerstofffunktionen des *D*-Ringes wurden durch eine zweite Hydroxylierungsstufe eines monooxygenierten *D*-Homoprogesterons angestrebt. Dabei wurde *D*-Homo-4-pregnen-3,11,20-trion (**12**) durch *Curvularia lunata* (NRRL 2380) wie erwünscht in 14 α -Stellung zu **18** hydroxyliert mit der Bildung eines 7 α ,14 α -Dihydroxy-*D*-homo-4-pregnen-3,11,20-trions (**19**) als Nebenprodukt.

Schema 2



Schema 3



Der bekanntlich in 15 α -Stellung hydroxylierende Pilz *Calonectria decora* (ATCC 14767) griff das Substrat 11 α -Hydroxy-*D*-homo-4-pregnen-3,20-dion (**2**) wie erwartet in 15 α -Stellung an, wodurch nur das bereits durch Dihydroxylierung erhaltene 11 α ,15 α -Dihydroxyprodukt **5** entstand. Der alternative Weg einer 11-Hydroxylierung eines 15-oxigenierten *D*-Homoprogesterons wurde hier nicht geprüft.

Die Einführung der 1,2-Doppelbindung wurde mit dem für diese Reaktion bewährten Bakterium *Bacillus lentus* (ATCC 13805) durchgeführt. Mit Ausnahme des *D*-Homo-4-pregnen-3,15,20-trions (**13**), das auf der Ketostufe zu **20** dehydriert wurde, waren die hydroxylierten *D*-Homoprogesterone als Substrate besser geeignet und wurden mit den in Schema 3 aufgeführten Ausbeuten umgewandelt.

Die erhaltenen dehydrierten Formen **21** – **25** wurden nach Jones zu den Ketostrukturen **26** – **30** oxidiert.

Konstitutionsanalysen

Die wesentlichen spektroskopischen Daten (¹H-NMR, UV, IR) sind in der Tabelle zusammengefaßt.

Die geminal zu den mikrobiologisch eingeführten Hydroxygruppen stehenden Protonen zeigen im NMR die erwarteten Signallagen und Aufspaltungen. Diese Werte führen zu Aussagen, ob es sich um ein axiales oder äquatoriales Proton handelt und wieviele Protonen benachbart sind. Mit diesen Hinweisen ist Stellung und Konfiguration der Hydroxygruppen schon fast festgelegt, oder es bleiben nur wenige Möglichkeiten der Substitution übrig. Es gibt jedoch weitere spektroskopische Hinweise, die es gestatten, die Stellung der Hydroxygruppen eindeutig zu bestimmen.

- 6 β -OH:** 1. Starke Entschirmung von 19-H und mittelstarke Entschirmung von 4-H im NMR in Pyridin⁵⁾.
 2. Fehlen der allylischen Kopplung $J_{4-H,6\beta-H}$, deswegen Erscheinen des 4-H als Singulett.
 3. Starke hypsochrome Verschiebung des UV-Maximums⁶⁾.
- 7 β -OH:** 1. Starke Entschirmung von 15 α -H im NMR in Pyridin, so daß dieses Proton als breites Multiplett erkennbar ist.
 2. Deutliches Erkennen der beiden 6-H als Dublett mit einer Aufspaltung von 8 Hz ($(J_{7\alpha-H,6\alpha-H} + J_{7\alpha-H,6\beta-H})/2$).
- 7 α -OH:** 1. Erscheinen des äquatorialen 7 β -H bei sehr tiefem Feld wegen der sterischen Wechselwirkung mit dem 15 α -H. Analoge Verhältnisse gelten für ein 11 α -H (Wechselwirkung mit 1 β -H) bei Vorliegen einer 11 β -Hydroxygruppe.
 2. Starke Entschirmung von 9 α -H um 0.51 ppm im NMR in Pyridin beim Übergang von **18** zu **19**.
- 11 β -OH:** 1. Starke Entschirmung von 18-H und 19-H im NMR in Pyridin⁵⁾.
 2. Charakteristische Lage des 11 α -H bei sehr tiefem Feld (vgl. 7 α -OH)⁷⁾.
- 11 α -OH:** Starke Entschirmung von 19-H⁵⁾ und 1 β -H bzw. 1-H (bei Vorliegen einer Δ^1 -Doppelbindung) im NMR in Pyridin.
- 12 β -OH:** Mittelstarke Entschirmung von 18-H⁵⁾ und starke Entschirmung von 21-H im NMR in Pyridin.
- 14 α -OH:** Mittelstarke Entschirmung von 18-H⁵⁾ und starke Entschirmung von 9 α -H und 17 α -H im NMR in Pyridin, so daß diese Protonen deutlich zu erkennen sind.

- 15 α -OH:** Starke Entschirmung von 7 β -H im NMR in Pyridin, so daß dieses Proton mit seinen charakteristischen Aufspaltungen gut sichtbar ist.
- 16 α -OH:** Bei 7 läßt sich an den Multiplizitäten der Signale im NMR erkennen, daß neben einer 15 α -Hydroxygruppe eine benachbarte axiale 16 α -Hydroxygruppe vorhanden ist. Außerdem wird das 17 α -H durch 1,3-diaxiale Wechselwirkung stark entschirmt.
- 17 α -OH:** 1. Erscheinen des 17 α -H im NMR als Dublett mit einer Kopplung von 11 Hz.
2. Starke Entschirmung von 21-H im NMR in Pyridin.
3. Verschiebung der 20-Ketobande im IR von 1705 zu 1675–1685 cm⁻¹ wegen des Vorliegens einer Wasserstoffbrücke zur äquatorialen 17 α -Hydroxygruppe.

Bei räumlicher Nähe von Hydroxygruppen zu weiteren Protonen im Molekül werden im NMR vor allem in Pyridin starke paramagnetische Signalverschiebungen dieser Protonen beobachtet^{5, 8, 9}. Dieses Kriterium wurde bei der Zuordnung der Position und Konfiguration der Hydroxygruppen meistens verwendet (s. o.).

Die durch Oxidation entstandenen Ketoverbindungen bieten zusätzliche Zuordnungsmöglichkeiten.

- 6-Keto:** 1. Starke Entschirmung von 4-H im NMR. Außerdem erscheint das 4-H im 3-Keto- Δ^4 -System als Singulett und im 3-Keto- $\Delta^{1,4}$ -System als klares Dublett wegen der fehlenden Kopplung zu den Protonen in 6-Position.
2. Das 3,6-Diketo- Δ^4 -System kann leicht an der bathochromen Verschiebung des UV-Hauptmaximums und der starken Reduktion der Extinktion gegenüber dem 3-Keto- Δ^4 -System erkannt werden⁶.
- 11-Keto:** 1. Starke Entschirmung von 19-H⁸) und 1 β -H bzw. 1-H^{10, 11}) (bei Vorliegen einer Δ^1 -Doppelbindung) im NMR sowohl in Chloroform als auch in Pyridin.
2. Hypsochrome Verschiebung des UV-Maximums sowohl beim 3-Keto- Δ^4 - als auch 3-Keto- $\Delta^{1,4}$ -System auf 238–239 nm⁶.
- 12-Keto:** Starke Entschirmung von 17 α -H und 21-H durch die räumlich nahe Ketogruppe mit ihrer magnetischen Anisotropie.
- 15-Keto:** Mittelstarke Entschirmung von 17 α -H und 21-H.
- 17-Keto:** Erscheinen des 17 α -H bei $\delta = 3.58$ als Singulett.

Das 3-Keto- Δ^4 - bzw. 3-Keto- $\Delta^{1,4}$ -System läßt sich durch die charakteristischen Signale im UV⁶, IR¹²) und NMR^{7, 13}) eindeutig bestimmen.

Außerdem wurden die NMR-Signallagen von 4-H, 18-H und 19-H mit Substituentenkonstanten^{5, 8, 14–16}) berechnet, indem die Werte für *D*-Homo-4-pregnen-3,20-dion (**1**) und *D*-Homo-1,4-pregnen-3,20-dion als Ausgangsbasis genommen wurden. Die Übereinstimmung mit den gefundenen Daten ist gut. Stärkere Abweichungen treten nur für 18-H ein, wenn eine 12- bzw. 17-Ketogruppe vorhanden ist (**16**, **17**, **29**, **30**). In diesen Fällen kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den genannten Ketogruppen und der 20-Ketogruppe, so daß die 17 β -Acetylseitenkette ihre relative Konformation zum Steroidgerüst ändert und die Basiswerte nicht mehr für 18-H gelten.

Für *D*-Homotestosteron ergab sich die 17 $\alpha\beta$ -Stellung der Hydroxygruppe anhand eines geeigneten Vergleichs (s. Tab.).

Für einige Verbindungen wurden die zugeordneten Konstitutionen durch die Massenspektren weiter abgesichert. In jedem Fall entsprechen die Molekül- und Fragmentionen der Erwartung. Die Fragmentierungen stimmen mit Angaben von *Spiteller*¹⁷)

Tab.: Spektrometrische Daten (¹H-NMR, UV, IR) von D-Homoprogesteronen (A) und D-Homoandrostanen (B)

Verb.	Konstitution	Lösungs- mittel	NMR ^{a)}										UV ^{b)} λ _{max} (ε)	IR ^{c)} ν̄		
			19-H gef. (ber.)	18-H gef. (ber.)	21-H	1-H	2-H	4-H gef. (ber.)	7-H	11-H	15-H	17-H			17α-H	verschie- dene H
1	A	CDCl ₃ C ₃ D ₃ N	1.16 s	0.98 s	2.13 s			5.70 m (3)							241	1705 (20-C=O)
			0.99 s	0.99 s	2.12 s			5.83 m (3)							(16.800)	1665 (3-C=O)
			1.20 s	1.02 s	2.12 s	7.03 d (10)	6.21 dd (10; 2)	6.06 m (4)							245	1705 (20-C=O)
			1.05 s	1.01 s	2.11 s	6.99 d (10)	6.39 dd (10; 2)	6.20 m (4)							(15.100)	1670 (3-C=O)
2	A + 11α-OH	C ₃ D ₃ N	1.33 s	1.07 s	2.07 s	3.15 ddd (13; 5; 3)		5.88 m (3)	4.08 dt (5; 10; 10)			2.30 dd (12; 4)		241	1605 (Δ ¹)	
			(1.29)	(1.07)			(5.89)						(15.600)	3450 (OH)		
3	A + 15α-OH	C ₃ D ₃ N	1.04 s	1.09 s	2.12 s			5.81 m (3)	4.25 dt (5; 10; 10)	3.90 dt (5; 10; 10)				243	1615 (Δ ⁴)	
			(1.02)	(1.06)			(5.85)				(16.000)				3530 (OH)	
4	A + 11α-OH + 6β-OH	C ₃ D ₃ N	1.81 s	1.11 s	2.08 s	3.38 dt (13; 4; 4)		6.05 s (6.07)				2.23 dd (12; 4)	6α-H; 4.56 t (3)	236	1685 (3-C=O)	
			(1.78)	(1.13)									(13.100)	1700 (20-C=O)		
5	A + 11α-OH + 15α-OH	C ₃ D ₃ N	1.38 s	1.17 s	2.08 s	3.13 ddd (13; 5; 3)		5.87 m (3)	4.13 dt (5; 10; 10)	3.89 dt (5; 10; 10)				244	1620 (Δ ⁴)	
			(1.32)	(1.14)			(5.91)				(16.000)				3515 (OH)	
6	A + 12β-OH + 15α-OH	C ₃ D ₃ N	1.05 s	1.30 s	2.36 s			5.81 m (3)	4.03 dt (5; 10; 10)	4.03 dt (5; 10; 10)				243	1655 (3-C=O)	
			(1.03)	(1.27)			(5.85)							(16.600)	1705 (20-C=O)	
7	A + 15α-OH + 16α-OH	C ₃ D ₃ N	1.03 s	1.11 s	2.12 s			5.81 m (3)	3.87 dd (3; 10)	3.87 dd (3; 10)		3.19 dd (12; 4)	16β-H; 4.21 q (3)	243	1670 (3-C=O)	
			(1.02)	(1.09)			(5.85)						(16.800)	3540 (OH)		
8	A + 11α-OH + 7β-OH	C ₃ D ₃ N	1.39 s	1.16 s	2.05 s			5.96 m (3)	4.12 dt (5; 10; 10)	2.96 m (16)		2.22 dd (12; 4)	6αβ-H; 2.72 d (8)	244	1620 (Δ ⁴)	
			(1.30)	(1.09)			(5.96)							(15.700)	3370 (OH)	
9	A + 11β-OH + 17α-OH	C ₃ D ₃ N	1.56 s	1.56 s	2.35 s			5.85 m (3)	4.44 q (3)	4.48 dt (5; 10; 11)				242	1660 (3-C=O)	
			(1.56)	(1.57)			(5.85)							(15.900)	1715 (20-C=O)	
															1650 (3-C=O)	
															1615 (Δ ⁴)	
															3430 (OH)	
															3400 (OH)	
															1675 (20-C=O)	
															1660 (3-C=O)	
															1620 (Δ ⁴)	

Tab. (Fortsetzung)

Verb.	Konstitution	Lösungs- mittel	NMR ^{a)}										UV ^{b)} λ_{\max} (ϵ)	IR ^{c)} $\tilde{\nu}$
			19-H gef. (ber.)	18-H gef. (ber.)	21-H	1-H	2-H	4-H gef. (ber.)	7-H	11-H	15-H	17-H		
10	A + 11-Keto + 17 α -OH	C ₃ D ₃ N	1.39 s (1.37)	1.04 s (1.03)	2.29 s	2.76 dt (13:4:4)		5.82 m (3) (5.83)		4.32 dt (5:10:11)	2.74 d (11)	12-H: 2.10 d (13) 2.74 d (13)	238 (14700)	3340 (OH) 1705 (11-C=O) 1685 (20-C=O) 1655 (3-C=O) 1615 (Δ^4)
11	A + 7 β -OH + 17 α -OH	C ₃ D ₃ N	1.04 s (1.00)	1.14 s (1.08)	2.36 s		5.91 m (3) (5.90)	3.65 dt (10:8:8)		4.40 dt (5:10:11)	2.60 d (11)	6 α -H: 2.70 d (8)	243 (15600)	3410 (OH) 3370 (OH) 1680 (20-C=O) 1670 (3-C=O) 1615 (Δ^4)
18	A + 11-Keto + 14 α -OH	C ₃ D ₃ N	1.44 s (1.43)	1.19 s (1.19)	2.06 s	2.91 dt (13:4:4)	5.81 m (3) (5.84)			3.57 dd (12:4)		9 α -H: 2.80 d (12) 12 α -H: 3.24 d (13)	238 (15200)	3450 (OH) 1700 (20-C=O) 1700 (11-C=O) 1660 (3-C=O) 1620 (Δ^4)
19	A + 11-Keto + 14 α -OH + 7 α -OH	C ₃ D ₃ N	1.47 s (1.47)	1.15 s (1.15)	2.03 s	3.00 dt (13:4:4)	5.89 m (3) (5.96)	4.73 q (3)		3.44 d (12:4)		9 α -H: 3.31 d (12) 12 α -H: 3.28 d (13)	238 (14900)	3420 (OH) 3350 (OH) 1700 (20-C=O) 1700 (11-C=O) 1665 (3-C=O) 1620 (Δ^4)
12	A + 11-Keto	CDCl ₃	1.42 s (1.38)	0.94 s (0.93)	2.12 s	2.72 dt (13:4:4)	5.70 m (3) (5.70)					12 α -H: 2.30 s	238 (15400)	1705 (20-C=O) 1705 (11-C=O) 1660 (3-C=O) 1615 (Δ^4)
13	A + 15-Keto	C ₃ D ₃ N	0.98 s (0.98)	0.96 s (0.98)	2.20 s		5.80 m (3) (5.83)			2.91 dd (12:4)			240 (16900)	1705 (20-C=O) 1705 (15-C=O) 1675 (3-C=O) 1615 (Δ^4)
14	A + 11-Keto + 6-Keto	C ₃ D ₃ N	1.33 s (1.36)	1.00 s (0.95)	2.06 s	2.92 dt (13:4:4)	6.42 s					12 α -H: 2.44 2.49 s 9 α -H: 3.10 2.99 d (12)	244 (9770) 310 (1870)	1705 (20-C=O) 1705 (11-C=O) 1675 (6-C=O) 1635 (3-C=O) 1585 (Δ^4)
15	A + 11-Keto + 15-Keto	CDCl ₃	1.44 s (1.39)	0.87 s (0.89)	2.20 s	2.72 dt (13:4:4)	5.70 m (3) (5.70)			3.04 t (8)		12 α -H: 2.34 s	238 (15000)	1725 (20-C=O) 1710 (11-C=O) 1710 (15-C=O) 1670 (3-C=O) 1615 (Δ^4)
16	A + 11-Keto + 17-Keto	CDCl ₃	1.41 s (1.38)	1.06 s (0.90)	2.12 s	2.72 dt (13:4:4)	5.70 m (3) (5.70)			3.58 s		12-H: 2.30 d (13) 2.54 d (13)	238 (15200)	1725 (20-C=O) 1705 (17-C=O) 1665 (3-C=O) 1615 (Δ^4)

Tab. (Fortsetzung)

Verb.	Konstitution	Lösungs- mittel	19-H		18-H		21-H		1-H		2-H		4-H		NMR ^{a)}				UV ^{b)} λ_{\max} (ε)	IR ^{c)} $\tilde{\nu}$	
			gef. (ber.)	gef. (ber.)	gef. (ber.)	gef. (ber.)	gef. (ber.)	gef. (ber.)	gef. (ber.)	gef. (ber.)	gef. (ber.)	gef. (ber.)	gef. (ber.)	gef. (ber.)	7-H	11-H	15-H	17-H			17 α -H
17	A + 12-Keto + 15-Keto	C ₅ D ₅ N	1.02 s (1.01)	1.41 s (1.23)	2.42 s								5.79 m (3) (5.83)						3.30 dd (13: 4)	239 (16 600)	1725 (20-C=O) 1715 (12-C=O) 1705 (15-C=O) 1670 (3-C=O) 1620 (Δ^1)
21	A + Δ^1 + 11 α -OH	C ₅ D ₅ N	1.30 s (1.35)	1.07 s (1.09)	2.06 s				8.38 d (10)				6.28 m (4) (6.26)						d)	248 (17 400)	3400 (OH) 1715 (20-C=O) 1655 (3-C=O) 1615 (Δ^1) 1600 (Δ^1)
23	A + Δ^1 + 11 α -OH + 15 α -OH	C ₅ D ₅ N	1.36 s (1.38)	1.18 s (1.16)	2.06 s				8.36 d (10)				6.27 m (4) (6.28)	4.20 dt (5: 10: 10)	4.20 dt (5: 10: 10)	3.88 dt (5: 10: 10)			d)	249 (17 400)	3400 (OH) 1710 (20-C=O) 1655 (3-C=O) 1615 (Δ^1) 1595 (Δ^1)
24	A + Δ^1 + 11 β -OH + 17 α -OH	C ₅ D ₅ N	1.38 s (1.62)	1.56 s (1.59)	2.30 s				7.41 d (10)				6.20 m (4) (6.22)						4.47 dt (5: 10: 11)	244 (14 600)	3430 (OH) 3400 (OH) 1685 (20-C=O) 1660 (3-C=O) 1620 (Δ^1) 1605 (Δ^1)
25	A + Δ^1 + 12 β -OH + 15 α -OH	C ₅ D ₅ N	1.10 s (1.09)	1.33 s (1.29)	2.37 s				7.03 d (10)				6.20 m (4) (6.22)	4.02 dt (5: 10: 10)					d)	245 (14 600)	3440 (OH) 3350 (OH) 1705 (20-C=O) 1660 (3-C=O) 1615 (Δ^1) 1595 (Δ^1)
26	A + Δ^1 + 11-Keto	CDCl ₃	1.43 s (1.42)	0.96 s (0.97)	2.11 s				7.60 d (10)				6.06 m (4) (6.06)						d)	238 (14 800)	1705 (20-C=O) 1705 (11-C=O) 1665 (3-C=O) 1625 (Δ^1) 1605 (Δ^1)
20	A + Δ^1 + 15-Keto	C ₅ D ₅ N	1.03 s (1.04)	0.96 s (1.00)	2.18 s				6.99 d (10)				6.17 m (4) (6.20)							244 (15 500)	1710 (20-C=O) 1710 (15-C=O) 1660 (3-C=O) 1625 (Δ^1) 1605 (Δ^1)
27	A + Δ^1 + 11-Keto + 6-Keto	CDCl ₃	1.36 s (1.37)	0.98 s (0.99)	2.11 s				7.72 d (10)				6.39 d (2)						d)	243 (12 400)	1700 (20-C=O) 1700 (11-C=O) 1685 (6-C=O) 1660 (3-C=O) 1625 (Δ^1 , ⁴)

Tab. (Fortsetzung)

Verb.	Konstitution	Lösungs- mittel	NMR ^{a)}										IR ^{e)} $\bar{\nu}$			
			19-H gef. (ber.)	18-H gef. (ber.)	21-H	1-H	2-H	4-H gef. (ber.)	7-H	11-H	15-H	17-H		17a-H	verschie- dene H	UV ^{b)} λ_{\max} (ε)
28	A + Δ^1 + 11-Keto + 15-Keto	CDCl ₃	1.47 s (1.43)	0.90 s gef. (0.93)	2.19 s	7.56 d (10)	6.18 dd (10:2)	6.05 m (4) (6.06)	7-H	11-H	15-H	17-H	17a-H	verschie- dene H	UV ^{b)} λ_{\max} (ε)	IR ^{e)} $\bar{\nu}$
29	A + Δ^1 + 11-Keto + 17-Keto	CDCl ₃	1.46 s (1.42)	1.10 s (0.94)	2.13 s	7.59 d (10)	6.22 dd (10:2)	6.11 m (4) (6.06)	7-H	11-H	15-H	17-H	17a-H	verschie- dene H	UV ^{b)} λ_{\max} (ε)	IR ^{e)} $\bar{\nu}$
30	A + Δ^1 + 12-Keto + 15-Keto	C ₅ D ₂ N	1.09 s (1.07)	1.40 s (1.25)	2.39 s	6.84 d (10)	6.29 dd (10:2)	6.15 m (4) (6.20)	7-H	11-H	15-H	17-H	17a-H	verschie- dene H	UV ^{b)} λ_{\max} (ε)	IR ^{e)} $\bar{\nu}$
o)	B + 17a β -OH	C ₅ D ₂ N	0.75 s	1.01 s					7-H	11-H	15-H	17-H	17a-H	verschie- dene H	UV ^{b)} λ_{\max} (ε)	IR ^{e)} $\bar{\nu}$
	B + Δ^4 + 3-Keto + 17a β -OH	C ₅ D ₃ N	1.02 s (1.02)	1.03 s (1.03)				5.84 m (3) (5.83)	7-H	11-H	15-H	17-H	17a-H	verschie- dene H	UV ^{b)} λ_{\max} (ε)	IR ^{e)} $\bar{\nu}$

^{a)} Chemische Verschiebungen δ mit Tetramethylsilan als internem Standard; die eingeklammerten Zahlen hinter den Multiplizitäten sind die Kopplungskonstanten J in Hz; bei m bedeutet die Hz-Angabe die Halbwertsbreite $W_{1/2}$. — ^{b)} Wellenlängen λ in nm in Methanol. — ^{c)} Wellenzahlen $\bar{\nu}$ in cm^{-1} in getemperten KBr-Tabletten. — ^{d)} Nicht zuordbar. — ^{e)} 17a β -Hydroxy-D-homo-4-androsten-3-on.

und Zaretskii¹⁸⁾ überein. Konstitutionsvorschläge für die charakteristischen Fragmentationen sind im Experimentellen Teil bei den einzelnen Verbindungen enthalten.

Alle spektrometrischen Befunde greifen lückenlos ineinander. Restzweifel bleiben nicht bestehen, so daß die zugeordneten Konstitutionen mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit vorliegen.

Experimenteller Teil

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-F₂₅₄-Platten (Fa. Merck AG, Darmstadt) verwendet. Es wurde – wenn nicht anders angegeben – im System Cyclohexan/Essigester (1 + 9) mit Kammersättigung zweimal 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. – Für die Säulenchromatographie diente Kieselgel G mit Gradientenelution von 5 l Hexan + 5 l Essigester. – UV-Spektren: Cary 14, in Methanol. – IR-Spektren: Perkin-Elmer PE 621, in getemperten KBr-Tabletten. – NMR-Spektren: Varian HA 100 mit TMS als internem Standard. – Massenspektren: Varian MAT CH 7A bei 70 eV.

Mikrobiologische Hydroxylierungen der *D*-Homoprogesteron-Substrate

In einem 2-l-Erlenmeyerkolben wurden 500 ml eines sterilen Mediums (Nr. 1), bestehend aus 3.0% Glucose, 1.0% Cornsteep liquor, 0.2% NaNO₃, 0.1% KH₂PO₄, 0.2% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7aq, 0.05% KCl und 0.002% FeSO₄ · 7aq, mit einer Abschwemmung der jeweiligen 10 Tage alten Schrägagarkultur beimpft und 2.5 bis 5 d (abhängig vom Wachstum) bei 30°C auf einem Rotationsschüttler (145 U/min) geschüttelt. Mit 250 ml dieser Anzuchtkultur wurde jeweils ein 20-l-Glas-Fermenter (Fa. Marubishi), beschickt mit 15 l einer sterilen Nährlösung der gleichen Zusammensetzung, inoculiert und 24 h (bei schlechter Entwicklung auch 48 h) bei 29°C unter Belüftung von 30 l Luft/min bei 0.7 atü ohne Rühren germiniert. 0.9 l der Kulturbrühe wurden in einen gleichgroßen Fermenter übergeführt, der mit 14 l des gleichen Mediums oder ersatzweise mit einer Nährlösung (Nr. 2), bestehend aus 2.0% Glucose, 1.0% Cornsteep liquor, 1.0% Sojapuder, 0.2% NaNO₃, 0.1% KH₂PO₄, 0.2% K₂HPO₄, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄ · 7aq und 0.002% FeSO₄ · 7aq, beschickt war, und unter gleichen Bedingungen germiniert. Nach 12 h wurde die sterilfiltrierte Lösung von 3.0 g *D*-Homo-4-pregnen-3,20-dion (1) oder des jeweiligen Ersatzsubstrates in 75 ml Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid zugesetzt. Nach der jeweiligen Kontaktzeit wurde die Kulturbrühe zur Abtrennung des Mycels zentrifugiert oder filtriert und danach zweimal mit je 5 l Isobutylmethylketon extrahiert. Die Extrakte wurden i. Vak. eingengt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie aufgetrennt, wobei in den Vorläufen größere Anteile unumgewandeltes Ausgangsmaterial abgetrennt wurden, oder konnte bei hohen Ausbeuten auch direkt durch Umkristallisation gereinigt werden. Für alle Kristallisationen wurde Essigester verwendet.

Durch Fermentation von *D*-Homo-4-pregnen-3,20-dion (1) wurden erhalten:

*11*α-Hydroxy-*D*-homo-4-pregnen-3,20-dion (2)

a) Mit *Aspergillus giganteus* (ATCC 10059) in Medium 2 nach 43 h Kontaktzeit, 94 mg (3%), Schmp. 213–214°C.

C₂₂H₃₂O₃ (344.5) Ber. C 76.70 H 9.36 O 13.93 Gef. C 76.65 H 9.32 O 13.89

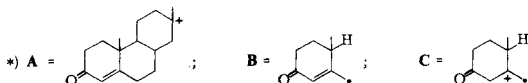
b) Mit *Aspergillus ochraceus* (ATCC 1008) in Medium 1 nach 42 h Kontaktzeit, 825 mg (26.5%), Schmp. 201–203°C.

Als Zweitprodukt wurden 270 mg (8.2%) *6*β,*11*α-Dihydroxy-*D*-homo-4-pregnen-3,20-dion (4) mit Schmp. 223–225°C isoliert. (Strukturdaten siehe gezielte Herstellung der Verbindung.)

15 α -Hydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion (3)

a) Mit *Fusarium lini* (CBS 2538) in Medium 2 nach 32 h Kontaktzeit, 580 mg (13%), Schmp. 156–157°C.

MS: m/e = 344 (100; M^+), 329 (10; $M^+ - CH_3$), 326 (15; $M^+ - H_2O$), 311 (5.1; $M^+ - H_2O - CH_3$), 302 (26; $M^+ - CH_2CO$), 284 (20; $M^+ - CH_2CO - H_2O$), 269 (6.2; $284 - CH_3$), 241 (18; $284 - CH_3CO$), 231 (4.8; **A***), 203 (9.6; $326 - \mathbf{B}^*$), 124 (75; **C***), 43 (69; $H_3CC \equiv O^+$).



$C_{22}H_{32}O_3$ (344.5) Ber. C 76.70 H 9.36 O 13.93 Gef. C 76.68 H 9.33 O 13.96

b) Mit *Fusarium lini* (CBS 713) in Medium 2 nach 100 h Kontaktzeit, 123 mg (4%), Schmp. 153–154°C.

c) Mit *Fusarium oxysporum* (ATCC 7601) in Medium 1 nach 79 h Kontaktzeit, 94 mg (3%), Schmp. 152–154°C.

d) Mit *Colletotrichum phomoides* (IFO 5257) in Medium 2 nach 40 h Kontaktzeit, 157 mg (5%), Schmp. 151–152°C.

e) Mit *Helminthosporium sativum* (CBS 32568) in Medium 2 nach 44 h Kontaktzeit, 90 mg (2.9%), Schmp. 157–158°C.

6 β ,11 α -Dihydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion (4)

a) Mit *Rhizopus arrhizus* (ATCC 10260) in Medium 1 nach 22 h Kontaktzeit. Die als Biosyntheseprodukt gebildete Fumarsäure kristallisierte aus dem Isobutylmethylketon-Extrakt aus und wurde durch Filtration abgetrennt. Kristallisation des Extraktrückstandes lieferte 1.7 g (51.5%), Schmp. 223–225°C.

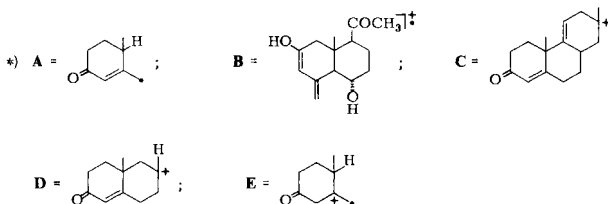
$C_{22}H_{32}O_4$ (360.5) Ber. C 73.30 H 8.94 O 17.75 Gef. C 73.27 H 8.89 O 17.80

b) Mit *Cunninghamella echinulata* (NRRL 1386) in Medium 2 nach 16 h Kontaktzeit, 236 mg (7.2%), Schmp. 221–222°C.

11 α ,15 α -Dihydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion (5)

a) Mit *Glomerella cingulata* (ATCC 10534) in Medium 1 nach 16 h Kontaktzeit, 1.48 g (45%), Schmp. 166–167°C.

MS: m/e = 360 (34; M^+), 342 (99; $M^+ - H_2O$), 332 (4.1; $M^+ - CO$), 327 (7.6; $342 - CH_3$), 324 (16; $342 - H_2O$), 314 (13; $342 - CO$), 309 (5.1; $342 - H_2O - CH_3$), 300 (6.6; $342 - CH_2CO$), 299 (6.5; $342 - CH_3CO$), 281 (11; $342 - CH_3CO - H_2O$), 237 (21; $M^+ - \mathbf{A}^*$), 236 (31; **B***), 229 (7.1; **C***), 163 (27; **D***), 124 (93; **E***), 43 (100; $CH_3C \equiv O^+$).



$C_{22}H_{32}O_4$ (360.5) Ber. C 73.30 H 8.94 O 17.75 Gef. C 73.27 H 8.96 O 17.69

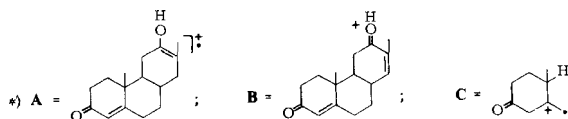
b) Mit *Colletotrichum lini* (CBS 11221) in Medium 1 nach 18 h Kontaktzeit, 1.32 g (40%), Schmp. 167–168 °C.

c) Mit *Calonectria decora* (ATCC 14767) in Medium 2 nach 16 h Kontaktzeit aus dem Substrat 11 α -Hydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion (**2**), 1.76 g (56%), Schmp. 160–162 °C.

12 β ,15 α -Dihydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion (**6**)

a) Mit *Calonectria decora* (ATCC 14767) in Medium 2 nach 45 h Kontaktzeit, 770 mg (23%), Schmp. 211–212 °C.

MS: m/e = 360 (16; M⁺), 342 (48; M⁺ – H₂O), 327 (18; 342 – CH₃), 324 (30; 342 – H₂O), 309 (8.0; 342 – H₂O – CH₃), 300 (9.2; 342 – CH₂CO), 299 (9.3; 342 – CH₃CO), 282 (16; 342 – CH₂CO – H₂O), 281 (26; 342 – H₃CCO – H₂O), 267 (34; 282 – CH₃), 246 (100; A^{*}), 245 (52; B^{*}), 228 (19; 246 – H₂O), 227 (11; 245 – H₂O), 124 (63; C^{*}), 43 (85; H₃CC \equiv O⁺).



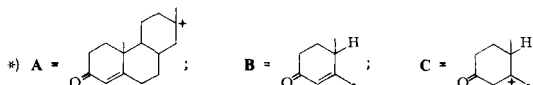
C₂₂H₃₂O₄ (360.5) Ber. C 73.30 H 8.94 O 17.75 Gef. C 73.21 H 8.97 O 17.72

b) Mit *Fusarium ciliatum* (CBS 13235) in Medium 2 nach 44 h Kontaktzeit, 495 mg (16.5%), Schmp. 207–208 °C.

15 α ,16 α -Dihydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion (**7**)

a) Mit *Gibberella zeae* (IFO 5269) in Medium 2 nach 20 h Kontaktzeit, 104 mg (3%), Schmp. 261–262 °C.

MS: m/e = 360 (88; M⁺), 345 (10; M⁺ – CH₃), 342 (32; M⁺ – H₂O), 327 (5.2; 342 – CH₃), 324 (7.0; 342 – H₂O), 318 (26; M⁺ – CH₂CO), 309 (3.0; 342 – H₂O – CH₃), 300 (13; 342 – CH₂CO), 299 (8.9; 342 – CH₃CO), 282 (10; 342 – CH₂CO – H₂O), 281 (6.6; 342 – CH₃CO – H₂O), 267 (4.0; 282 – CH₃), 257 (6.5; 300 – H₃CCO), 239 (10; 282 – H₃CCO), 231 (8.9; A^{*}), 219 (28; 342 – B^{*}), 124 (100; C^{*}), 43 (74; H₃CC \equiv O⁺).



C₂₂H₃₂O₄ (360.5) Ber. C 73.30 H 8.94 O 17.75 Gef. C 73.22 H 8.82 O 17.81

Aus Chromatographie-Vorfraktionen wurden 351 mg (12%) **3** als Zweitprodukt isoliert.

b) Mit *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (ATCC 9991), 115 mg (3.5%), Schmp. 268–269 °C.

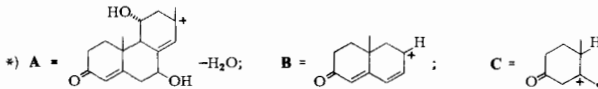
Aus Chromatographie-Vorfraktionen wurden 80 mg (2.5%) **3** als Zweitprodukt isoliert.

Fermentation von D-Homo-4-pregnen-3,20-dion (1) mit Penicillium janthinellum (ATCC 10455): In Medium 2 nach 22 h Kontaktzeit und Säulenchromatographie mit Gradient 51 Hexan + 51 Essigester:

Fr. 141–165 = 650 mg Rohprodukt; aus Essigester 439 mg (13%) **2**, Schmp. 204–205 °C.

Fr. 166–200 = 550 mg Rohprodukt; aus Essigester 376 mg (12%) 7 β ,11 α -Dihydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion (**8**), Schmp. 217–218 °C.

MS: m/e = 360 (9.5; M⁺), 342 (95; M⁺ – H₂O), 327 (21; 342 – CH₃), 324 (68; 342 – H₂O), 309 (22; 342 – H₂O – CH₃), 299 (14; 342 – H₃CCO), 281 (21; 342 – H₃CCO – H₂O), 243 (17; A^{*}), 225 (40; 243 – H₂O), 161 (41; B^{*}), 124 (100; C^{*}), 43 (90; H₃CC \equiv O⁺).

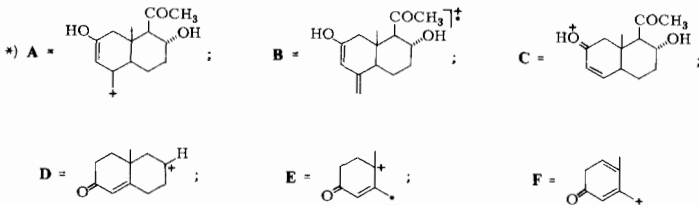


C₂₂H₃₂O₄ (360.5) Ber. C 73.30 H 8.94 O 17.75 Gef. C 73.32 H 8.96 O 17.78

Fermentation von *D-Homo-4-pregnen-3,20-dion* (**1**) mit *Pellicularia filamentosa* f.sp. *sasakii* (ATCC 13289): In Medium 1 nach 15 h Kontaktzeit (2 Ansätze vereinigt) und Säulenchromatographie mit Gradient 5 l Methylchlorid + 5 l Methylchlorid/Aceton (2:1):

Fr. 190–205 = 200 mg Rohprodukt; aus Isopropylether/Aceton 110 mg (1.67%) *17α-Hydroxy-D-homo-4-pregnen-3,11,20-trion* (**10**), Schmp. 193–195°C.

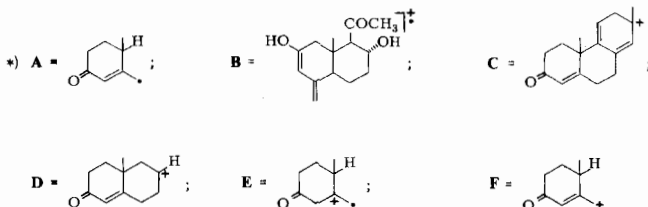
MS: *m/e* = 358 (98; M⁺), 343 (17; M⁺ - CH₃), 340 (16; M⁺ - H₂O), 330 (7.4; M⁺ - CO), 325 (7.1; M⁺ - H₂O - CH₃), 322 (4.4; M⁺ - 2 H₂O), 315 (4.1; M⁺ - CO - CH₃), 312 (4.1; M⁺ - CO - H₂O), 298 (6.1; 340 - CH₂CO), 297 (9.5; 340 - CH₃CO), 283 (8.4; 298 - CH₃), 255 (11; 340 - CH₂CO - H₃CCO), 237 (29; A*), 236 (11; B*), 223 (22; C*), 219 (8.1; 237 - H₂O), 205 (13; 223 - H₂O), 163 (28; D*), 122 (96; E*), 121 (81; F*), 43 (100; H₃CC≡O⁺).



C₂₂H₃₀O₄ (358.5) Ber. C 73.72 H 8.43 O 17.85 Gef. C 73.74 H 8.40 O 17.82

Fr. 252–295 = 1.65 g Rohprodukt; aus Essigester 1.42 g (21.6%) *11β,17α-Dihydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion* (**9**), Schmp. 205–206°C.

MS: *m/e* = 360 (84; M⁺), 342 (52; M⁺ - H₂O), 332 (3.9; M⁺ - CO), 327 (6.7; 342 - CH₃), 324 (35; 342 - H₂O), 314 (6.6; 342 - CO), 309 (6.2; 342 - H₂O - CH₃), 300 (6.7; 342 - CH₂CO), 299 (12; 342 - H₃CCO), 282 (9.8; 342 - CH₂CO - H₂O), 281 (19; 342 - H₃CCO - H₂O), 267 (9.8; 282 - CH₃), 237 (11; M⁺ - A*), 236 (10; B*), 227 (12; C*), 163 (3.8; D*), 124 (59; E*), 123 (46; F*), 43 (100; H₃CC≡O⁺).



C₂₂H₃₂O₄ (360.5) Ber. C 73.30 H 8.94 O 17.75 Gef. C 73.36 H 8.93 O 17.73

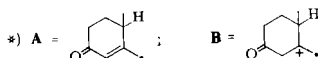
Fr. 325–340 = 400 mg Rohprodukt; aus Essigester 120 mg (1.8%) *7β,17α-Dihydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion* (**11**), Schmp. 212–214°C.

C₂₂H₃₂O₄ (360.5) Ber. C 73.30 H 8.94 O 17.75 Gef. C 73.18 H 8.90 O 17.71

Fermentation von *D-Homo-4-pregnen-3,20-dion* (**1**) mit *Penicillium lilacinum* (ATCC 10114): In Medium 2 nach Kontaktzeit von 37 h und Säulenchromatographie mit Gradient 5 l Hexan +

51 Essigester: Fr. 91–125 = 200 mg Rohprodukt; aus Essigester 51 mg (1.5%) 17 α -Hydroxy-D-homo-4-androsten-3-on, Schmp. 200–201°C.

MS: m/e = 302 (41; M⁺), 287 (6; M⁺ – CH₃), 284 (11; M⁺ – H₂O), 260 (47; M⁺ – CH₂CO), 245 (2; 260 – CH₃), 242 (6; 260 – H₂O), 227 (4; 260 – H₂O – CH₃), 217 (10; 260 – C₃H₇), 199 (5; 260 – H₂O – C₃H₇), 179 (12; M⁺ – A*), 161 (35; 179 – H₂O), 124 (100; B*).

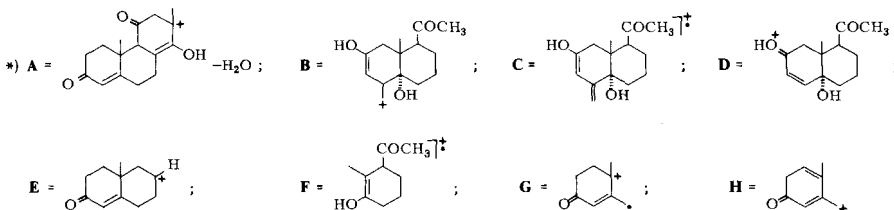


C₂₀H₃₀O₂ (302.5) Ber. C 79.41 H 10.00 O 10.59 Gef. C 79.29 H 9.97 O 10.56

Fermentation von D-Homo-4-pregnen-3,11,20-trion (12) mit *Curvularia lunata* (NRRL 2380): In Medium 1 nach 19 h Kontaktzeit (3 Ansätze vereinigt) und Säulenchromatographie mit Gradient 5 l Methylchlorid + 5 l Methylchlorid/Aceton (9:1):

Fr. 300–310 = 1.8 g Rohprodukt; aus Essigester 925 mg (4%) 14 α -Hydroxy-D-homo-4-pregnen-3,11,20-trion (18), Schmp. 259–260°C.

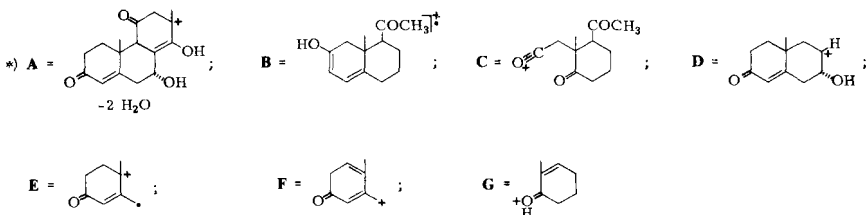
MS: m/e = 358 (55; M⁺), 340 (43; M⁺ – H₂O), 325 (9.5; 340 – CH₃), 322 (9.1; 340 – H₂O), 315 (8.7; M⁺ – H₃CCO), 312 (15; 340 – CO), 298 (8.9; 340 – CH₂CO), 297 (17; 340 – H₃CCO), 279 (8.1; 340 – H₃CCO – H₂O), 255 (21; 340 – CH₂CO – H₃CCO), 241 (17; A*), 237 (13; B*), 236 (6.0; C*), 223 (14; D*), 219 (13; 237 – H₂O), 205 (25; 223 – H₂O), 163 (100; E*), 154 (28; F*), 136 (26; 154 – H₂O), 122 (30; G*), 121 (25; H*), 111 (81; 154 – H₃CCO), 43 (43; H₃CC \equiv O⁺).



C₂₂H₃₀O₄ (358.5) Ber. C 73.72 H 8.43 O 17.85 Gef. C 73.69 H 8.32 O 17.87

Fr. 341–500 = 1.0 g; mehrmals aus Aceton umkristallisiert 148 mg (0.4%) 7 α ,14 α -Dihydroxy-D-homo-4-pregnen-3,11,20-trion (19), Schmp. 249–250°C.

MS: m/e = 374 (45; M⁺), 356 (46; M⁺ – H₂O), 341 (12; 356 – CH₃), 338 (28; 356 – H₂O), 323 (11; 356 – H₂O – CH₃), 320 (2.8; 356 – 2 H₂O), 314 (3.7; 356 – CH₂CO), 313 (9.4; 356 – H₃CCO), 305 (2.7; 356 – 2 H₂O – CH₃), 296 (5.4; 356 – CH₂CO – H₂O), 295 (12; 356 – H₃CCO – H₂O), 281 (7.1; 296 – CH₃), 253 (15; 356 – CH₂CO – H₃CCO – H₂O), 239 (14; A*), 206 (37; B*), 195 (64; C*), 179 (27; D*), 161 (100; 179 – H₂O), 122 (45; E*), 121 (47; F*), 111 (40; G*), 43 (61; H₃CC \equiv O⁺).

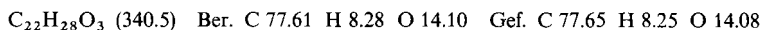


C₂₂H₃₀O₅ (374.5) Ber. C 70.56 H 8.05 O 21.39 Gef. C 70.48 H 8.12 O 21.43

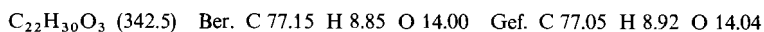
Mikrobiologische Einführung der 1,2-Doppelbindung in die mono- und dihydroxylierten D-Homo-4-pregnen-3,20-dione

In einem 2-l-Erlenmeyerkolben wurden 500 ml eines sterilen Mediums, bestehend aus 1.2% Cornsteep und 1.5% Pepton, mit einer Lyophilkultur von *Bacillus lentus* (ATCC 13805) 2 d bei 30°C geschüttelt. Mit 200 ml dieser Bakteriensuspension wurde ein 20-l-Glas-Fermenter (Fa. Marubishi) beimpft, der mit 15 l einer sterilen Nährlösung (Nr. 3), bestehend aus 0.1% Hefeextrakt, 0.5% Cornsteep liquor und 0.2% Glucose, beschickt war. Nach 24stdg. Vermehrung unter Belüftung (10 l/min), 1.7 atü Druck und Rühren (220 U/min) wurde 1 l der Kultur in 10 l der gleichen Nährlösung in einen gleichgroßen Fermenter übergeführt. Nach 6 h Anzucht wurde eine sterilfiltrierte Lösung von 2.0 g des jeweiligen Substrates in 40 ml Dimethylformamid zugesetzt. Nach der jeweils angegebenen Kontaktzeit wurde die Kulturbrühe mit Isobutylmethylketon extrahiert. Die Extrakte wurden i. Vak. eingedunstet, die Rückstände aus Essigester umkristallisiert.

Fermentation von D-Homo-4-pregnen-3,15,20-trion (13): Substrateinsatz 1.0 g, Kontaktzeit 15 h, Rohprodukt 500 mg; aus Essigester 212 mg (21%) *D-Homo-1,4-pregnadien-3,15,20-trion (20)*, Schmp. 163–164°C.

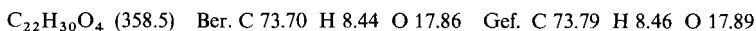


Fermentation von 11 α -Hydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion (2): Kontaktzeit 21 h, Rohprodukt 2.0 g; aus Essigester 1.145 g (57%) *11 α -Hydroxy-D-homo-1,4-pregnadien-3,20-dion (21)*, Schmp. 159–160°C.



Fermentation von 6 β ,11 α -Dihydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion (4): Kontaktzeit 84 h, Rohprodukt 2.9 g; aus Essigester 580 mg (26.4%) *6 β ,11 α -Dihydroxy-D-homo-1,4-pregnadien-3,20-dion (22)*. Die Substanz wurde als Rohprodukt zur Oxidation eingesetzt.

Fermentation von 11 α ,15 α -Dihydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion (5): Kontaktzeit 23 h, Rohprodukt 2.0 g; aus Essigester 1.05 g (52%) *11 α ,15 α -Dihydroxy-D-homo-1,4-pregnadien-3,20-dion (23)*, Schmp. 229–230°C.

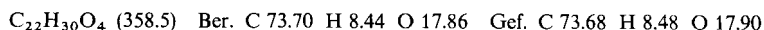
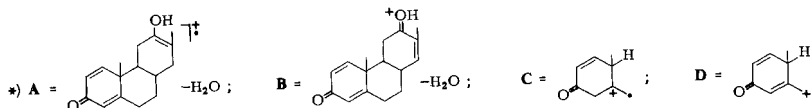


Fermentation von 11 β ,17 α -Dihydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion (9): Kontaktzeit 19 h, Rohprodukt 2.3 g; aus Essigester 1.54 g (77%) *11 β ,17 α -Dihydroxy-D-homo-1,4-pregnadien-3,20-dion (24)*, Schmp. 245–246°C.



Fermentation von 12 β ,15 α -Dihydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion (6): Kontaktzeit 20 h, Rohprodukt 2.0 g; aus Essigester 1.003 g (50%) *12 β ,15 α -Dihydroxy-D-homo-1,4-pregnadien-3,20-dion (25)*, Schmp. >300°C.

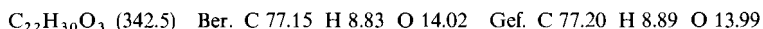
MS: $m/e = 358$ (25; M^+), 340 (20; $M^+ - H_2O$), 325 (13; 340 - CH_3), 322 (6.2; 340 - H_2O), 315 (2.9; $M^+ - H_3CCO$), 307 (2.2; 340 - $H_2O - CH_3$), 297 (12; 340 - H_3CCO), 279 (13; 340 - $H_3CCO - H_2O$), 226 (32; A^*), 225 (12; B^*), 122 (53; C^*), 121 (100; D^*), 43 (35; $H_3CC \equiv O^+$).



Oxidationen mit $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$

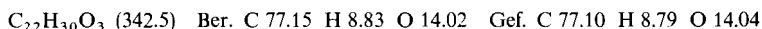
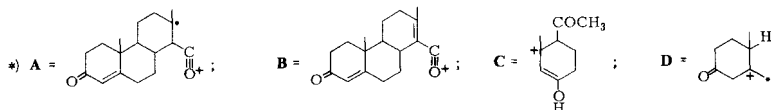
800 mg Hydroxyverbindung wurden in 60 ml Aceton gelöst, mit 2.5 ml Chromschwefelsäure (2.67 g CrO_3 in 10 ml konz. H_2SO_4) versetzt und 1.5 h bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung wurde in Wasser eingegossen und mit Methylenchlorid extrahiert. Die Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde umkristallisiert.

Oxidation von *11 α -Hydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion* (**2**): Aus 3.0 g **2** 2.7 g Rohprodukt; aus Isopropylether/Essigester 2.080 g (69%) *D-Homo-4-pregnen-3,11,20-trion* (**12**), Schmp. 220 bis 221 °C.

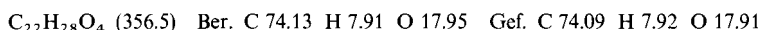


Oxidation von *15 α -Hydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion* (**3**): Aus 2.0 g **3** 1.9 g Rohprodukt; aus Essigester 915 mg (46%) *D-Homo-4-pregnen-3,15,20-trion* (**13**), Schmp. 162–163 °C.

MS: $m/e = 342$ (95; M^+), 327 (6.6; $\text{M}^+ - \text{CH}_3$), 324 (6.2; $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 314 (12; $\text{M}^+ - \text{CO}$), 300 (64; $\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{CO}$), 299 (4.7; $\text{M}^+ - \text{H}_3\text{CCO}$), 285 (5.5; $300 - \text{CH}_3$), 282 (8.2; $300 - \text{H}_2\text{O}$), 258 (5.9; **A***), 257 (5.5; **B***) und/oder $300 - \text{H}_3\text{CCO}$, 239 (7.7; $300 - \text{H}_3\text{CCO} - \text{H}_2\text{O}$), 230 (10; $258 - \text{CO}$), 229 (6.1; $257 - \text{CO}$), 188 (29; $230 - \text{CH}_2\text{CO}$), 187 (12; $229 - \text{CH}_2\text{CO}$), 153 (35; **C***), 124 (77; **D***), 43 (100; $\text{H}_3\text{CC} \equiv \text{O}^+$).

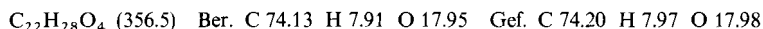
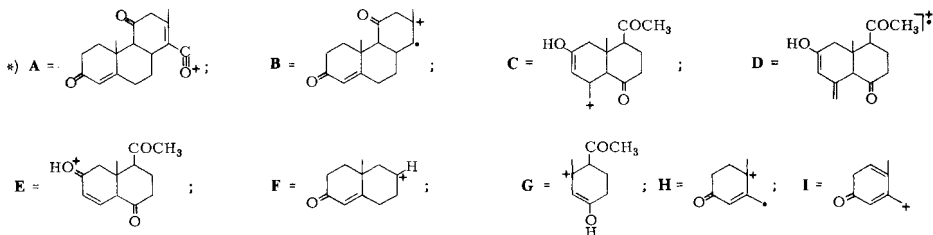


Oxidation von *6 β ,11 α -Dihydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion* (**4**): Aus 820 mg **4** 700 mg Rohprodukt; aus Ethanol 250 mg (31%) *D-Homo-4-pregnen-3,6,11,20-tetraon* (**14**), Schmp. 219–220 °C.

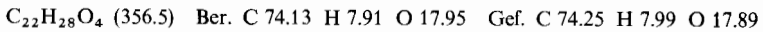


Oxidation von *11 α ,15 α -Dihydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion* (**5**): Aus 1.0 g **5** 1.0 g Rohprodukt; aus Essigester 325 mg (32%) *D-Homo-4-pregnen-3,11,15,20-tetraon* (**15**), Schmp. 235–236 °C.

MS: $m/e = 356$ (80; M^+), 341 (4.5; $\text{M}^+ - \text{CH}_3$), 338 (7.6; $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 328 (35; $\text{M}^+ - \text{CO}$), 323 (3.3; $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3$), 320 (2.2; $\text{M}^+ - 2 \text{H}_2\text{O}$), 314 (6.0; $\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{CO}$), 313 (8.6; $\text{M}^+ - \text{H}_3\text{CCO}$), 299 (8.1; $314 - \text{CH}_3$), 295 (3.5; $313 - \text{H}_2\text{O}$), 286 (2.5; $\text{M}^+ - \text{CO} - \text{CH}_2\text{CO}$), 285 (3.9; $\text{M}^+ - \text{CO} - \text{CH}_3\text{CO}$), 271 (5.1; **A***) und/oder $286 - \text{CH}_3$, 268 (16; $286 - \text{H}_2\text{O}$), 253 (37; $286 - \text{CH}_3 - \text{H}_2\text{O}$), 244 (6.0; **B***), 243 (8.2; $271 - \text{CO}$), 235 (29; **C***), 234 (28; **D***), 221 (51; **E***), 163 (13; **F***), 153 (8.9; **G***), 122 (100; **H***), 121 (44; **I***), 43 (36; $\text{H}_3\text{CC} \equiv \text{O}^+$).

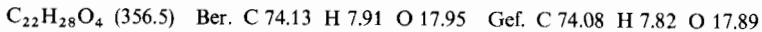
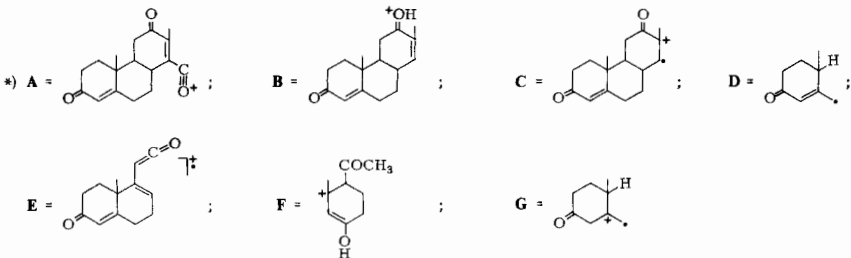


Oxidation von $11\beta,17\alpha$ -Dihydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion (**9**): Aus 400 mg **9** 350 mg Rohprodukt; aus Isopropylether/Essigester 155 mg (39%) *D-Homo-4-pregnen-3,11,17,20-tetraon* (**16**), Schmp. 210–212°C.

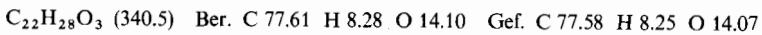


Oxidation von $12\beta,15\alpha$ -Dihydroxy-D-homo-4-pregnen-3,20-dion (**6**): Aus 1.0 g **6** 950 mg Rohprodukt; aus Essigester 493 mg (49%) *D-Homo-4-pregnen-3,12,15,20-tetraon* (**17**), Schmp. 231 bis 232°C.

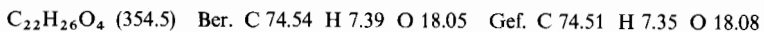
MS: $m/e = 356$ (31; M^+), 341 (5.8; $\text{M}^+ - \text{CH}_3$), 338 (6.7; $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 328 (6.0; $\text{M}^+ - \text{CO}$), 323 (2.8; $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3$), 320 (1.9; $\text{M}^+ - 2 \text{H}_2\text{O}$), 314 (20; $\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{CO}$), 313 (58; $\text{M}^+ - \text{H}_3\text{CCO}$), 299 (8.6; 314 - CH_3), 295 (7.0; 313 - H_2O), 286 (3.0; $\text{M}^+ - \text{CO} - \text{CH}_2\text{CO}$), 285 (4.3; $\text{M}^+ - \text{CO} - \text{CH}_3\text{CO}$), 271 (3.2; **A***) und/oder 286 - CH_3), 268 (5.9; 286 - H_2O), 253 (6.4; 286 - $\text{CH}_3 - \text{H}_2\text{O}$), 245 (6.4; **B***), 244 (6.8; **C***), 243 (5.9; 271 - CO), 233 (12; $\text{M}^+ - \text{D}^*$), 205 (12; 233 - CO), 202 (24; **E***), 153 (13; **F***), 124 (27; **G***), 43 (100; $\text{H}_3\text{CC}\equiv\text{O}^+$).



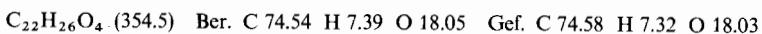
Oxidation von 11α -Hydroxy-D-homo-1,4-pregnadien-3,20-dion (**21**): Aus 1.2 g **21** 960 mg Rohprodukt; aus Essigester/Isopropylether 720 mg (60%) *D-Homo-1,4-pregnadien-3,11,20-trion* (**26**), Schmp. 170–171°C.



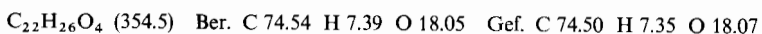
Oxidation von $6\beta,11\alpha$ -Dihydroxy-D-homo-1,4-pregnadien-3,20-dion (**22**): Aus 210 mg **22** 150 mg Rohprodukt; aus Essigester/Isopropylether 83 mg (39%) *D-Homo-1,4-pregnadien-3,6,11,20-tetraon* (**27**), Schmp. 148–149°C.



Oxidation von $11\alpha,15\alpha$ -Dihydroxy-D-homo-1,4-pregnadien-3,20-dion (**23**): Aus 800 mg **23** 700 mg Rohprodukt; aus Isopropylether/Methylenchlorid 450 mg (56%) *D-Homo-1,4-pregnadien-3,11,15,20-tetraon* (**28**), Schmp. 188–189°C.



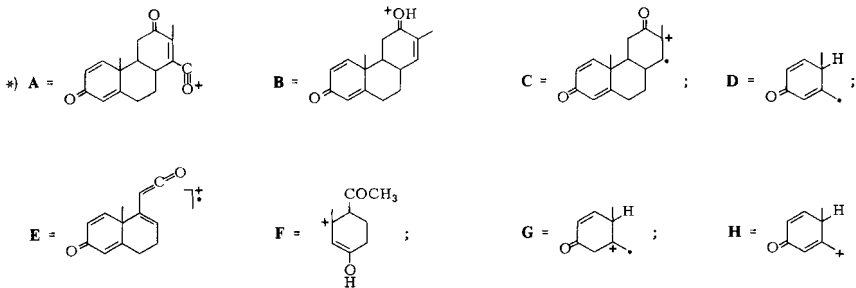
Oxidation von $11\beta,17\alpha$ -Dihydroxy-D-homo-1,4-pregnadien-3,20-dion (**24**): Aus 800 mg **24** 750 mg Rohprodukt; aus Isopropylether/Methylenchlorid 566 mg (71%) *D-Homo-1,4-pregnadien-3,11,17,20-tetraon* (**29**), Schmp. 234–236°C.



Oxidation von $12\beta,15\alpha$ -Dihydroxy-D-homo-1,4-pregnadien-3,20-dion (**25**): Aus 1.0 g **25** 820 mg Rohprodukt; aus Ethanol 694 mg (69%) *D-Homo-1,4-pregnadien-3,12,15,20-tetraon* (**30**), Schmp. 236–237°C.

MS: $m/e = 354$ (43; M^+), 339 (2.9; $\text{M}^+ - \text{CH}_3$), 336 (2.9; $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 326 (2.6; $\text{M}^+ - \text{CO}$), 321 (2.6; $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3$), 311 (2.5; $\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{CO}$), 293 (4.6; 311 - H_2O), 283 (4.1; $\text{M}^+ -$

CO-CH₃CO), 269 (2.0; A*), 265 (4.1; 283 - H₂O), 251 (2.4; 269 - H₂O), 243 (1.9; B*), 242 (2.3; C*), 241 (4.1; 269 - CO), 233 (100; M⁺ - D*), 220 (16), 205 (9.5; 233 - CO), 200 (14; E*), 174 (13); 173 (14), 153 (5.1; F*), 122 (28; G*), 121 (65; H*), 43 (22; H₃CC≡O⁺).



C₂₂H₂₆O₄ (354.5) Ber. C 74.54 H 7.39 O 18.05 Gef. C 74.51 H 7.37 O 18.03

Literatur

- ¹⁾ XVI. Mitteil.: K. Kieslich, H. Wiegand und G.-A. Hoyer, Chem. Ber. **112**, 979 (1979).
- ²⁾ C. Tweit und C. M. Kagawa, J. Med. Chem. **7**, 524 (1964); C. M. Kagawa, Endocrinology **74**, 724 (1964).
- ³⁾ U. Kerb, K. Kieslich, K. Petzoldt, R. Wiechert, A. Fürst und M. Müller, J. Steroid Biochem. **5**, 298 (1974).
- ⁴⁾ H. C. Murray und D. H. Peterson, US-Pat. 2762747 (11. Sept. 1956) [Chem. Abstr. **51**, 5131 (1957)].
- ⁵⁾ K. Tori und E. Kondo, Steroids **4**, 713 (1964).
- ⁶⁾ W. Neudert und H. Röpke, Steroidspektrenatlas, S. 319f., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1965.
- ⁷⁾ B. Hampel und J. M. Krämer, Tetrahedron **22**, 1601 (1966).
- ⁸⁾ K. Tori und K. Aono, Annu. Rep. Shionogi Res. Lab. **14**, 136 (1964) [Chem. Abstr. **67**, 27508 s (1967)].
- ⁹⁾ P. V. Demarco, E. Farkas, D. Dodrell, B. L. Mylari und E. Wenkert, J. Am. Chem. Soc. **90**, 5480 (1968).
- ¹⁰⁾ H.-P. Husson, L. Fernandes, Ch. Kan-Fan, P. Potier und J. Le Men, Bull. Soc. Chim. Fr. **1971**, 1686.
- ¹¹⁾ s. Lit.⁶⁾, NMR-Spektrum 607 und 610.
- ¹²⁾ s. Lit.⁶⁾, S. 292/3.
- ¹³⁾ s. Lit.⁶⁾, NMR-Spektren.
- ¹⁴⁾ R. F. Zürcher, Helv. Chim. Acta **46**, 2054 (1963).
- ¹⁵⁾ W. Arnold, W. Meister und G. Englert, Helv. Chim. Acta **57**, 1559 (1974).
- ¹⁶⁾ G.-A. Hoyer, Substituenteninkremente für Steroide und D-Homosteroide, bislang unveröffentlicht.
- ¹⁷⁾ M. Spittler-Friedmann und G. Spittler, Fortschr. Chem. Forsch. **12**, 439 (1969).
- ¹⁸⁾ Z. V. Zaretskii, Mass Spectrometry of Steroids, John Wiley & Sons, New York-Toronto, und Israel Universities Press, Jerusalem 1976.