

312. Mikrobiologische Umwandlung eines 11, 18-dioxygenierten Progesteron-Derivates¹⁾²⁾

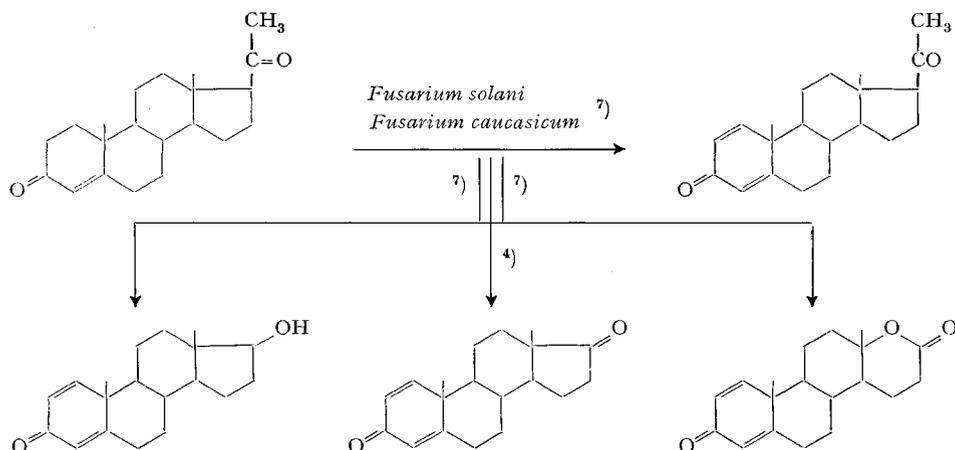
Mikrobiologische Reaktionen, 11. Mitteilung³⁾

von J. Urech, E. Vischer und A. Wettstein

(2. X. 63)

Der mikrobielle Abbau von Pregnanverbindungen zu Androstanderivaten wurde vor zehn Jahren im Zusammenhang mit den Bemühungen um die enzymatische Dehydrierung in Stellung 1(2) von Δ^4 -3-Oxosteroiden gefunden⁴⁾⁵⁾⁶⁾. Etliche Mikroorganismen, welche zu diesem Abbau befähigt sind, z. B. *Cylindrocarpum radicola* WR.⁵⁾, *Fusarium solani* (MART.) APP. et WR.⁴⁾⁷⁾, *Fusarium caucasicum* LET.⁴⁾ oder *Streptomyces lavendulae* (WAKSMAN et CURTIS)⁵⁾, führen denn auch tatsächlich eine Doppelbindung in Stellung 1 ein, wenn Δ^4 -3-Oxosteroide oder Δ^5 -3 β -Hydroxysteroidoide eingesetzt werden. Die 1-Dehydrierung scheint in den meisten Fällen dem Seitenketten-Abbau vorauszugehen, lassen sich doch je nach den Versuchsbedingungen neben 1-dehydrierten 17-Oxosteroiden, 17-Hydroxysteroiden und Verbindungen vom Testolactontypus⁵⁾⁷⁾ vielfach die nur 1-dehydrierten Pregnanverbindungen erhalten, wie im Schema 1 am Beispiel des Abbaus von Progesteron mit

Formelschema 1



¹⁾ 202. Mitt. über Steroide; 201. Mitt. siehe HEUSLER & J. KALVODA, *Helv.* **46**, 2732 (1963).

²⁾ Vorgetragen von J. URECH vor der Schweiz. Chem. Gesellschaft, Sommer-Versammlung, 23. Sept. 1961, Biel.

³⁾ 10. Mitt. siehe E. VISCHER & A. WETTSTEIN, *Experientia* **16**, 355 (1960).

⁴⁾ E. VISCHER & A. WETTSTEIN, *Experientia* **9**, 371 (1953).

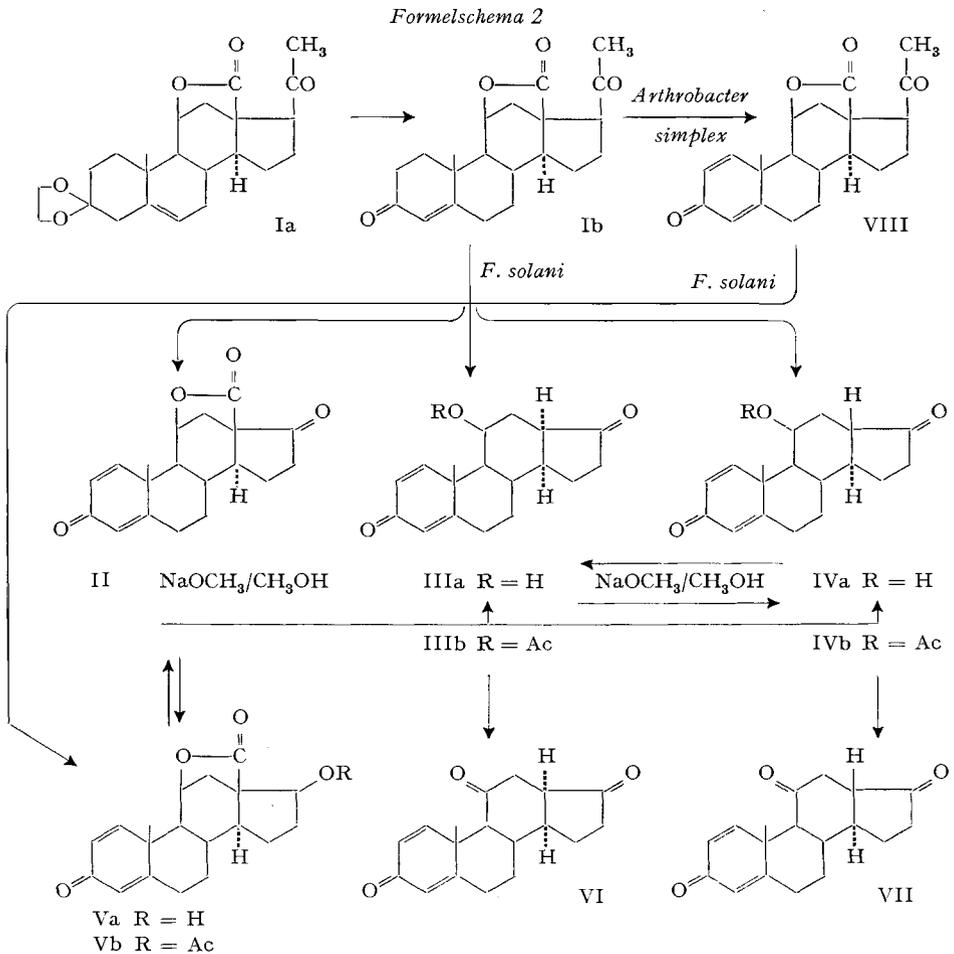
⁵⁾ J. FRIED, R. W. THOMA & A. KLINGSBERG, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 5764 (1953).

⁶⁾ D. H. PETERSON, S. H. EPPSTEIN, P. D. MEISTER, H. C. MURRAY, H. M. LEIGH, A. WEINTRAUB & L. M. REINKE, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 5768 (1953).

⁷⁾ M. NISHIKAWA, S. NOGUCHI & T. HASEGAWA, *Pharmaceut. Bull. (Japan)* **3**, 322 (1955).

Fusarium-Arten gezeigt wird. Immerhin sind auch mikrobielle Seitenketten-Abspaltungsreaktionen von Δ^4 -3-Oxopregnenen bekannt, bei welchen keine Doppelbindung in Stellung 1 eingeführt wird, so der Abbau von Progesteron zu Δ^4 -Androsten-3,17-dion⁶⁾ mit *Penicillium lilacinum* THOM und *Gliocladium catenulatum* GILMAN *et* ABBOTT. Andererseits unterbleibt der enzymatische Abbau der Seitenkette, wenn 17α -hydroxylierte Δ^4 -3,20-Dioxopregnenverbindungen mit den oben erwähnten *Fusarium*-Arten inkubiert werden^{4) 8)}, und man erhält in diesen Fällen nur die entsprechenden 1-Dehydrosteroidoide.

Wir haben nun untersucht, ob sich auch 11,18-bifunktionelle Progesteron-Derivate in der Seitenkette abbauen lassen. Im folgenden wird über die Ergebnisse bei der Einwirkung von Submerskulturen von *Fusarium solani* (MART.) APP. *et* WR. auf das Lacton der 11β -Hydroxyprogesteron-18-säure (Ib) berichtet. Das erwähnte Ausgangsmaterial lässt sich durch Ketalsspaltung von Ia, einem nunmehr gut



⁸⁾ E. VISCHER, CH. MEYSTRE & A. WETTSTEIN, *Helv.* 38, 835 (1955).

zugänglichen Zwischenprodukt unserer Aldosteron-Partialsynthese⁹⁾, gewinnen (Formelschema 2).

In orientierenden Versuchen wurde das Methylketonlacton Ib mit zwei Tage alten Schüttelkulturen von *F. solani* inkubiert und das zeitliche Fortschreiten der Umwandlung verfolgt. Dabei konnte im absteigenden Papierchromatogramm (Fig. 1)

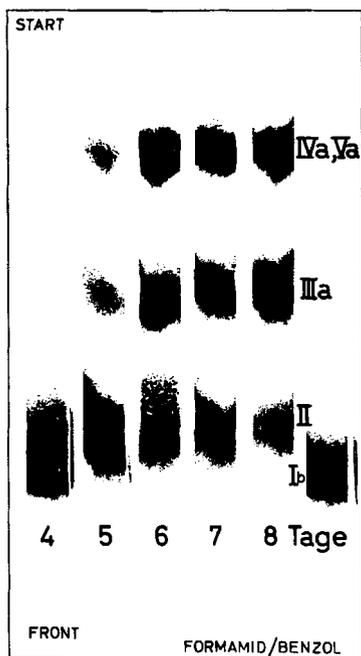


Fig. 1. Zeitlicher Verlauf der Umsetzung des Methylketonlactons Ib mit Submerskulturen von *Fusarium solani*

das Auftreten von drei UV.-absorbierenden Umwandlungsprodukten beobachtet werden: eine Substanz II, die nach 5tägiger Inkubation das Hauptprodukt darstellt, eine Substanz IIIa mittlerer Polarität und ein hoch polarer Fleck, die beide erst bei längerer Inkubation auftreten. Im Verlauf der späteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der hoch polare Fleck einem Gemisch der Substanzen IVa und Va zugeschrieben werden muss. Da keines der UV.-absorbierenden Umwandlungsprodukte, im Gegensatz zum Ausgangslacton Ib, die für Δ^4 -3-Oxosteroide typische gelbe UV.-Fluoreszenz mit Natronlauge¹⁰⁾ mehr gab, konnte angenommen werden, dass es sich durchwegs um 1-Dehydroderivate handelte. Die Substanzen II, IIIa sowie das Gemisch der Umwandlungsprodukte IVa und Va

⁹⁾ K. HEUSLER, J. KALVODA, CH. MEYSTRE, P. WIELAND, G. ANNER, A. WETTSTEIN, G. CAINELLI, D. ARIGONI & O. JEGER, *Experientia* **16**, 21 (1960); *Helv.* **44**, 502 (1961); CH. MEYSTRE, K. HEUSLER, J. KALVODA, P. WIELAND, G. ANNER & A. WETTSTEIN, *Helv.* **45**, 1317 (1962).

¹⁰⁾ I. E. BUSH, *Rec. Progr. Hormone Research* **9**, 321 (1954); vgl. auch R. NEHER, *Chromatographie von Sterinen, Steroiden und verwandten Verbindungen*, Elsevier Publishing Company 1958, S. 57 und dort zitierte Literaturstellen.

liessen sich nach Umsetzung grösserer Mengen des Substrats Ib chromatographisch an entaktiviertem Silicagel voneinander trennen. Die Substanzen IVa und Va konnten durch anschliessende fraktionierte Kristallisation aus Aceton in reinem Zustand isoliert werden.

Die bei der Inkubation primär auftretende Verbindung II vom Smp. 320–322° analysiert auf die Formel $C_{19}H_{20}O_4$. Im Infrarotspektrum erkennt man immer noch die γ -Lactonbande bei 5,66 μ sowie ein für $\Delta^{1,4}$ -3-Oxosteroide typisches Triplett¹¹⁾ bei 6,01, 6,14 und 6,21 μ . Anstelle der Carbonylabsorption bei 5,85 μ im Ausgangslacton Ia tritt eine neue Bande bei 5,74 μ , welche einem Fünfringketon zugeordnet werden muss. Die Substanz gibt mit alkalischem *m*-Dinitrobenzol¹²⁾ eine purpurviolette Farbreaktion, wie sie bei 17-Oxosteroiden beobachtet wird¹³⁾. Diese Befunde führen zur Formel des (18 \rightarrow 11)-Lactons der 3,17-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-18-säure (II).

Die Verbindung IIIa vom Smp. 248–251° weist im Infrarotspektrum ebenfalls das für die $\Delta^{1,4}$ -3-Oxogruppierung typische Triplett in der 6 μ -Region sowie eine Fünfringketon-Bande bei 5,78 μ auf. Die (18 \rightarrow 11)-Lactongruppierung ist auf Grund des Spektrums nicht mehr vorhanden. Dafür erkennt man eine Hydroxylbande bei 2,92 μ . Unter Berücksichtigung der Analysenwerte, welche überraschenderweise auf eine Bruttoformel von $C_{18}H_{22}O_3$ hinweisen, ergibt sich die Struktur eines monohydroxylierten 1-Dehydro-18-norandrostendions. Auf die gleiche Summenformel $C_{18}H_{22}O_3$ analysiert auch das bei 199–202° schmelzende Abbauprodukt IVa. Es besitzt nach Infrarotspektrum, wie IIIa, das $\Delta^{1,4}$ -3-Oxosystem sowie eine Fünfringketon-Gruppe, und die (18 \rightarrow 11)-Lactongruppe ist ebenfalls nicht mehr vorhanden.

Behandelt man das Ketolacton II mit Natriummethylat in Methanol, so erhält man ein Gemisch zweier Substanzen, welche sich mit den auf mikrobiellem Wege erhaltenen Verbindungen IIIa und IVa identisch erwiesen. Die naheliegende Annahme, dass es sich bei IIIa und IVa um 11 β -hydroxylierte 18-Norandrostadiendione, also Decarboxylierungsprodukte handelt, wurde einerseits durch ihre Dehydrierbarkeit mit Chrom(VI)-oxid zu den hydroxylfreien Triketonen VI und VII gestützt, welche beide eine zusätzliche Sechsringketon-Bande aufweisen; andererseits wurde eine sehr leichte Isomerisierbarkeit von IIIa in IVa und umgekehrt unter dem Einfluss von Basen beobachtet. Unter Anwendung von 20 Äquivalenten Natriummethylat in Methanol gelangt man bei einer Reaktionstemperatur von 45° sowohl ausgehend vom Ring C/D-*cis*-Isomeren IIIa als auch vom C/D-*trans*-Isomeren IVa sehr rasch zu einem ca. 1:1-Gemisch der beiden, wobei sich die Zusammensetzung nach 10 Min. nicht mehr ändert.

Eine Modellbetrachtung der zwei isomeren 18-Norsteroide lässt für das C/D-*cis*-Isomere IIIa eine wesentlich grössere sterische Hinderung der 11 β -Hydroxylgruppe erwarten als für das *trans*-verknüpfte IVa, indem nämlich durch die *cis*-Verknüpfung der Ring D fast senkrecht zum Ring C zu stehen kommt. Dieser Unterschied äussert sich stark in den Acetylierungsgeschwindigkeiten: beide 11 β -Hydroxy-

¹¹⁾ R. N. JONES & K. DOBRINER, *Vitamins and Hormones* 7, 293 (1949); R. N. JONES & F. HERLING, *J. org. Chemistry* 19, 1252 (1954).

¹²⁾ G. OERTEL, *Acta endocrinol.* 16, 263 (1954).

¹³⁾ W. ZIMMERMANN, *Z. physiol. Chem.* 233, 275 (1935); 245, 47 (1937).

steroide lassen sich mit Essigsäureanhydrid in Pyridin bei Raumtemperatur acetylieren, das *trans*-Isomere IVa jedoch etwa zehnmal rascher als das *cis*-Isomere IIIa. Auf Grund dieses Verhaltens haben wir der höher schmelzenden Verbindung IIIa die C/D-*cis*-, der niedriger schmelzenden IVa die C/D-*trans*-Verknüpfung zugeschrieben. Die vorgenommene Zuordnung wird durch die Rotationsdispersion der zwei Substanzen bestätigt. KLYNE hat die Anwendung der Oktantenregel, welche für die Interpretation der Rotationsdispersion von substituierten gesättigten Sechsringketonen mit grossem Erfolg herangezogen worden ist, auch für gesättigte Fünfringketone diskutiert¹⁴). Auf Grund seiner Überlegungen, welche durch Messungen von Rotationsdispersionen von Hexahydroindanonon und z. T. auch von Steroid-Ring-D-Ketonen bestätigt worden sind, weisen normale 17-Oxosteroide, welche keine weiteren Substituenten am Ring D tragen, einen positiven COTTON-Effekt auf, während am Kohlenstoff 13 isomere 17-Ketone einen negativen COTTON-Effekt ergeben (vgl. Fig. 2). Bei 18-Norsteroiden (R = H) muss sich der COTTON-Effekt

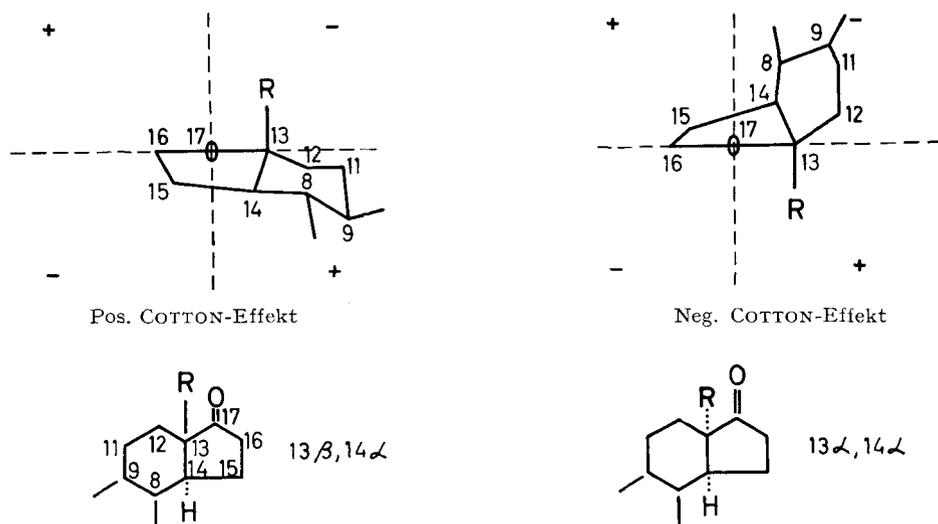


Fig. 2. COTTON-Effekt und Konfiguration an C-13

noch ausgeprägter manifestieren, da der vorzeichenmässig entgegengesetzte kleine Beitrag der 18-Methylgruppe bei der Substitution durch Wasserstoff noch kleiner wird. Der Verlauf der Kurven¹⁵) (vgl. Fig. 3) stimmt mit unseren Erwartungen überein¹⁶). Die geringe Inflektion im 360 $m\mu$ -Gebiet in beiden Kurven dürfte einem kleinen überlagerten COTTON-Effekt zuzuschreiben sein, welcher durch die Asymmetrie in der Umgebung des Dienonsystems bedingt ist¹⁷).

¹⁴) W. KLYNE, *Tetrahedron* **13**, 29 (1961).

¹⁵) Wir danken Herrn Prof. W. KLYNE, Westfield College, University of London, für die Aufnahme der Dispersionskurven.

¹⁶) N. L. ALLINGER, R. B. HERMANN & C. DJERASSI, *J. org. Chemistry* **25**, 922 (1960), vgl. Verbindungen V, S. 923.

¹⁷) C. DJERASSI, R. RINIKER & B. RINIKER, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 6377 (1956), vgl. Verbindung XLIX.

Als letztes Umwandlungsprodukt sei das 11,18-disubstituierte 1-Dehydrotestosteron Va erwähnt, welches mit Essigsäureanhydrid-Pyridin leicht acetyliert wird und dessen Struktur sich im übrigen aus seinem Infrarotspektrum sowie aus seiner Oxydierbarkeit mit Chrom(VI)-oxid-Pyridin-Komplex zum 17-Ketolacton II ergibt. Das Ketolacton II lässt sich umgekehrt mit Natriumborhydrid bei 0° selektiv zum 17-Hydroxylacton Va reduzieren.

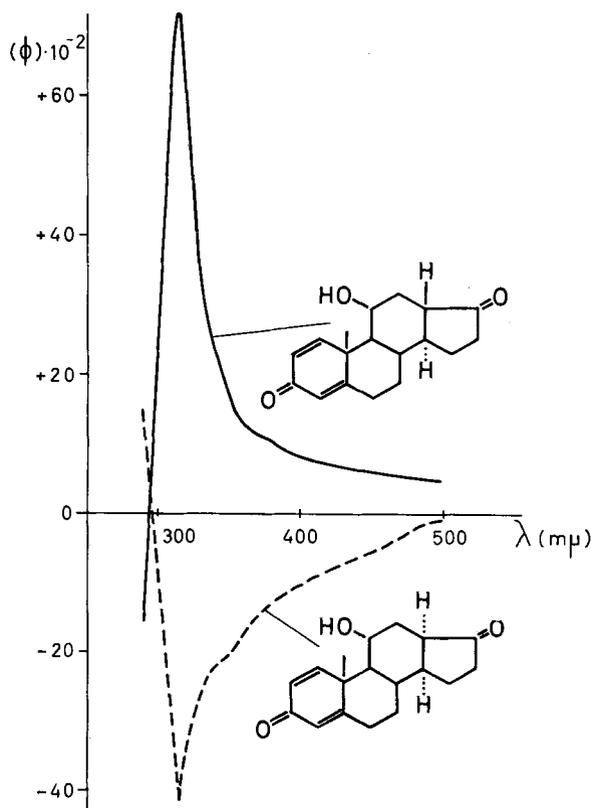


Fig. 3. Rotationsdispersionskurven (in Methanol)

oben: 3,17-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -18-nor-androstadien (IVa)

unten: 13-Iso-3,17-dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -18-nor-androstadien (IIIa)

Trotz sorgfältiger Untersuchung der Mutterlaugen der vier Umsetzungsprodukte II, IIIa, IVa und Va gelang es nie, das (18 \rightarrow 11)-Lactonderivat des 1-Dehydroprogesterons VIII zu fassen. Dieses liess sich jedoch in fast 80-proz. Ausbeute bei der Inkubation unseres Ausgangslactons Ib mittels *Arthrobacter simplex* (JENSEN) LOCHHEAD als einziges Konversionsprodukt isolieren. Die Tatsache, dass diese Verbindung ihrerseits durch Enzyme von *F. solani* ebenfalls zu den Androstan- bzw. 18-Norandrostan-Derivaten II, IIIa, IVa und Va abgebaut wird, lässt sie als ein mögliches – wenn auch wahrscheinlich sehr kurzlebiges – Zwischenprodukt zu den erwähnten Steroiden erscheinen.

Zur Abklärung der Frage, ob die beiden 18-Norsteroiden IIIa und IVa durch enzymatische oder rein chemische Decarboxylierung des Ketolactons II entstehen, haben wir dieses einerseits mit einer Kultur von *F. solani* inkubiert, andererseits lediglich mit der sterilen Nährlösung unter sonst gleichen Bedingungen behandelt. Es liessen sich sowohl im Inkubationsversuch als auch im Blindversuch beide 18-Norsteroiden isolieren, wobei der Anteil der beiden Isomeren allerdings etwas verschieden war. Das Ketolacton II dürfte somit im wesentlichen rein chemisch decarboxyliert werden.

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass das (18 → 11)-Lacton der 11 β -Hydroxyprogesteron-18-säure mit Kulturen von *F. solani* in der Seitenkette in ähnlicher Weise abgebaut wird wie Progesteron selbst. Ein dem 1-Dehydro-testololacton⁵⁾ entsprechendes (17 → 13), (18 → 11)-Dilacton konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Von besonderem Interesse sind die zwei 18-Norsteroiden, die aus einem heute gut zugänglichen Ausgangsstoff relativ einfach herstellbar sind.

Experimenteller Teil¹⁸⁾

(18 → 11)-Lacton der 3,20-Dioxo-11 β -hydroxy- Δ^4 -pregnen-18-säure (Ib). Dieses Lacton wurde aus dem (18 → 11)-Lacton der 3,3-Äthylendioxy-11 β -hydroxy-20-oxo- Δ^5 -pregnen-18-säure durch Ketalspaltung nach HEUSLER *et al.*¹⁹⁾ erhalten; Smp. 189,5–191°.

Inkubation des (18 → 11)-Lactons der 3,20-Dioxo-11 β -hydroxy- Δ^4 -pregnen-18-säure (Ib) mit Kulturen von *Fusarium solani*. Zwei 10-l-Schüttelgefässe mit je 4 l Nährlösung, welche pro 15 ml Maisquellwasser, 20 g Pepton und 50 mg Glucose enthielt und mit verd. Natronlauge auf pH 6,2 eingestellt war, wurden 30 Min. bei 1,1 atü sterilisiert und nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit einer vegetativen Kultur von *F. solani* beimpft. Man schüttelte unter oberflächlicher Belüftung 26 Std. bei 26–28°, gab dann unter sterilen Bedingungen zu den gut entwickelten Kulturen je 2 g (18 → 11)-Lacton der 3,20-Dioxo-11 β -hydroxy- Δ^4 -pregnen-18-säure, gelöst in 50 ml Aceton, zu und liess unter gleichen Temperaturbedingungen weiter schütteln. Die Umsetzung des Substrats wurde papierchromatographisch verfolgt. Zu diesem Zweck wurden abgemessene Proben aus der Kultur entnommen, mit Äthylacetat extrahiert und aliquote Teile im System Formamid/Benzol auf Papierstreifen chromatographiert. Nach 4 $\frac{1}{2}$ Tagen liess sich kein Ausgangsmaterial mehr feststellen, hingegen drei UV.-absorbierende Umwandlungsprodukte, welche sich im obigen Chromatographier-System stärker polar verhalten als das Ausgangsteroid. Nach 5 Tagen wurden die Kulturen abgenutscht, das Mycel gründlich mit Äthylacetat gewaschen, das Kulturfiltrat, welches ein pH von 9 aufwies, mit 50-proz. wäss. Essigsäure auf pH 6 gebracht, mit Natriumchlorid gesättigt und dreimal mit 4 l Äthylacetat ausgeschüttelt. Die mit 10-proz. Natriumchlorid-Lösung gewaschenen und mit Natriumsulfat getrockneten Äthylacetatauszüge ergaben nach Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum 2,85 g rohen Steroid-Extrakt. Dieser wurde an einer Säule von 120 g Silicagel, entaktiviert mit 2% Wasser, aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen papierchromatographisch untersucht (System Formamid/Benzol).

Fr. 1–4	2,4 l CH ₂ Cl ₂	} 438 mg	öliges, nichtsteroidisches Material
Fr. 5–10	3 l CH ₂ Cl ₂ -Aceton 99:1		
Fr. 11–13	1,8 l CH ₂ Cl ₂ -Aceton 98:2	57 mg	$\Delta^1,4$ -3-Ketosteroid, schwächer polar als Ib
Fr. 14–20	3,1 l CH ₂ Cl ₂ -Aceton 96:4	} 809 mg	II, Rf 0,65
Fr. 21	0,6 l CH ₂ Cl ₂ -Aceton 94:6		
Fr. 22	0,5 l CH ₂ Cl ₂ -Aceton 94:6	70 mg	Gemisch v. II und IIIa
Fr. 23/24	1 l CH ₂ Cl ₂ -Aceton 94:6	175 mg	IIIa, Rf 0,42
Fr. 25–33	5,6 l CH ₂ Cl ₂ -Aceton 9:1	923 mg	Gemisch von IIIa, IVa und Va (Rf 0,42, 0,20 und 0,20)

¹⁸⁾ Die Smp. wurden in einem Flüssigkeitsbad bestimmt und sind korrigiert. Die IR.-Spektren wurden mit einem PERKIN-ELMER double-beam-Instrument, Mod. 21 oder 201, aufgenommen.

¹⁹⁾ K. HEUSLER, P. WIELAND & A. WETTSTEIN, *Helv. 44*, 1374 (1961).

Fr. 22 sowie Fr. 25–33 wurden aus 450 Blättern ungewaschenem WHATMAN Nr. 1 Papier unter Verwendung des Systems Formamid/Benzol im Chromatoblock²⁰⁾ präparativ aufgetrennt und die beiden UV-absorbierenden Hauptzonen mit Rf 0,42 und 0,20 eluiert. Die Elution erfolgte durch Behandlung der Zonenstreifen mit Methanol-Wasser (1:4) und mehrmalige Extraktion der entstehenden Pulpa mit Aceton. Die Extrakte wurden im Vakuum von Aceton und Methanol befreit und die verbleibende wäss. Suspension erschöpfend mit Methylenchlorid extrahiert. Nach Verdampfen des Lösungsmittels erhielt man auf diese Weise aus der Zone mit Rf 0,42: 4,2 g Roh-Eluat an IIIa, aus der Zone mit Rf 0,20: 3,9 g Roh-Eluat an IVa und Va.

Die 4,2 g rohes 13-Iso-3,17-dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (IIIa) wurden an der 10fachen Gewichtsmenge Silicagel gereinigt: Mit Methylenchlorid-Aceton (85:15) wurden 275 mg z. T. spontan kristallisierendes IIIa eluiert, während sich die öligen Beimengungen in den Vorfractionen mit Methylenchlorid und in der Nachfraktion mit Methylenchlorid-Aceton (4:1) und (1:1) befanden. Die analoge Reinigung des Roh-Eluates aus der Zone mit Rf 0,20 ergab 268 mg teilweise kristallisierendes Gemisch der Substanzen IVa und Va.

(18 \rightarrow 11)-Lacton der 3,17-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-18-säure (II). Fraktionen 14–21, aus Aceton-Äther umkristallisiert, gaben 644 mg farblose Kristalle vom Smp. 320–322° (Zers.). UV.-Spektrum in Äthanol: λ_{max} 240 m μ ($\epsilon = 15400$). IR.-Spektrum in Nujol: Banden u. a. bei 5,66 μ (γ -Lacton); 5,74 μ (Fünfringketon); 6,01, 6,14 und 6,21 μ ($\Delta^{1,4}$ -3-Keton).

$C_{19}H_{20}O_4$ (312,35) Ber. C 73,06 H 6,45% Gef. C 72,94 H 6,59%

13-Iso-3,17-dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (IIIa). Fraktionen 23/24 sowie die 275 mg vorgereinigtes Eluat von IIIa aus der papierchromatographischen Auftrennung (s. oben) wurden aus Aceton-Äther umkristallisiert. Man erhielt 340 mg IIIa mit dem Smp. 248–251°. UV.-Spektrum in Äthanol: λ_{max} 244 m μ ($\epsilon = 15300$). IR.-Spektrum in Nujol: Banden u. a. bei 2,92 μ (OH); 5,78 μ (Fünfringketon); 6,02, 6,15 und 6,25 μ ($\Delta^{1,4}$ -3-Keton).

$C_{18}H_{22}O_3$ (286,36) Ber. C 75,49 H 7,74% Gef. C 75,50 H 7,74%

3,17-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (IVa) und (18 \rightarrow 11)-Lacton der 3-Oxo-11 β ,17 β -dihydroxy- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-18-säure (Va): 268 mg vorgereinigtes Gemisch von IVa und Va (s. oben) aus dem Papierchromatogramm-Roh-Eluat wurden aus Aceton-Äther kristallisiert. Die ersten Kristallisate enthielten insgesamt 63 mg (18 \rightarrow 11)-Lacton der 3-Oxo-11 β ,17 β -dihydroxy- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-18-säure (Va), Smp. 310–314°. UV.-Spektrum in Äthanol: λ_{max} 242 m μ ($\epsilon = 16000$). IR.-Spektrum in Nujol: Banden u. a. bei 2,88 μ (OH); 5,64 μ (γ -Lacton); 5,99, 6,15 und 6,24 μ ($\Delta^{1,4}$ -3-Keton).

$C_{19}H_{22}O_4$ (314,37) Ber. C 72,59 H 7,05% Gef. C 72,28 H 6,98%

Aus den Mutterlaugen liessen sich durch wiederholte Kristallisation aus Aceton-Äther 95 mg 3,17-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien IVa, Smp. 199–202°, isolieren. UV.-Spektrum in Äthanol: λ_{max} 243 m μ ($\epsilon = 14800$). IR.-Spektrum in Nujol: Banden u. a. bei 2,96 μ (OH); 5,75 μ (Fünfringketon); 6,02, 6,19 und 6,25 μ ($\Delta^{1,4}$ -3-Keton).

$C_{18}H_{22}O_3$ (286,36) Ber. C 75,49 H 7,74% Gef. C 75,55 H 7,74%

Die zwei Substanzen IVa und Va sind, ausser im System Propylenglykol/Toluol, im Papierchromatogramm Rf-mässig praktisch nicht zu unterscheiden:

	Temp.	Rf IVa	Rf Va
Propylenglykol/Toluol	22°	0,11	0,20
Formamid/Benzol	22°	0,20	0,20
Formamid/Benzol-Chloroform 1:1	22°	0,51	0,51
Toluol-Äthylacetat-Methanol-Wasser 9:1:5:5	38°	0,68	0,64
Benzol-Methanol-Wasser 10:5:5	38°	0,78	0,78
Petroläther-Toluol-Methanol-Wasser 5:5:7:3	38°	0,23	0,23
(Benzin-Ligroin)-Benzol-Methanol-Wasser 3:7:5:5	38°	0,47	0,47
Reaktion mit Blautetrazoliumchlorid		negativ	negativ
Fluoreszenz mit Natronlauge		negativ	negativ
Reaktion mit alkal. <i>m</i> -Dinitrobenzol		purpur-	negativ
		violett	

²⁰⁾ E. VON ARX & R. NEHER, Helv. 39, 1664 (1956).

Decarboxylierung des (18 → 11)-Lactons der 3,17-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-18-säure (II) zu den Hydroxydiketonen IIIa und IVa: 9,5 mg Ketolacton II, gelöst in 4 ml abs. Methanol, wurden mit 3 ml einer 0,21M Natriummethylat-Lösung in Methanol unter Ausschluss von Luftsauerstoff 3 Std. auf 45° erwärmt. Zur Aufarbeitung wurde die mit Aceton-Trockeneis gekühlte Reaktionslösung in einem einzigen Guss mit 6,3 ml 0,1N Salzsäure versetzt, mit 30 ml Wasser verdünnt und die annähernd neutral reagierende Lösung mehrmals mit Methylenchlorid ausgezogen. Nach Trocknung mit Natriumsulfat und Verdampfen des Lösungsmittels i. Vak. erhielt man 7,9 mg eines amorphen Rückstandes, welcher im Papierchromatogramm (System Formamid/Benzol) die Anwesenheit der zwei isomeren Hydroxydiketone IIIa und IVa neben wenig übrig gebliebenem II aufwies.

Isomerisierung der zwei Decarboxylierungsprodukte IIIa und IVa: Je 8,5 mg 13-*Iso*-3,17-dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (IIIa) bzw. 3,17-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (IVa) wurden in 3 ml abs. Methanol gelöst und mit 3 ml 0,21M Natriummethylat in Methanol unter Ausschluss von Luftsauerstoff je 10 und 60 Min. bei 45° gehalten. Die Isomerisierungsgemische wurden analog zum oben beschriebenen Decarboxylierungsversuch aufgearbeitet und papierchromatographisch testiert. Sowohl ausgehend von IIIa als auch IVa erhielt man ein ca. 1:1-Gemisch der beiden Isomeren, und zwar änderte sich in beiden Fällen die Zusammensetzung nach 10 Min. nicht mehr.

Reduktion des Ketolactons II mit Natriumborhydrid: 35 mg Ketolacton II in 28 ml Methanol wurden bei Raumtemperatur mit einer Lösung von 6 mg Natriumborhydrid in 0,1 ml dest. Wasser und 0,2 ml Methanol versetzt und dann 3 Std. bei 0° belassen. Man dampfte die wasserklare Reaktionslösung ohne äussere Erwärmung im Vakuum auf ca. 3 ml ein, wobei sich ein Teil des Materials ausschied, verdünnte dann mit 20 ml Eiswasser und Eis und extrahierte mehrmals mit Methylenchlorid. Die organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand, 35 mg, gab beim Umkristallisieren aus Aceton 27,5 mg (18 → 11)-Lacton der 3-Oxo-11 β ,17 β -dihydroxy- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-18-säure (Va), Smp. 310–312,5°, welches mit dem mikrobiell erhaltenen Produkt (s. oben) ohne Depression schmolz und auch nach IR.-Spektrum und Papierchromatogramm mit jenem identisch war.

3,17-Dioxo-11 β -acetoxy- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (IVb): 25 mg 3,17-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (IVa) wurden mit 0,25 ml Essigsäureanhydrid und 2,25 ml abs. Pyridin 48 Std. bei Raumtemperatur stehengelassen. Hierauf entfernte man Pyridin und überschüssiges Anhydrid im Hochvakuum, nahm den öligen Rückstand in 15 ml Methylenchlorid auf, wusch die Lösung mit eiskalter 1N Salzsäure, eiskalter 2-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser neutral, trocknete sie mit Natriumsulfat und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wurde aus Aceton-Petroläther (Sdp. 50–70°) umkristallisiert. Das erhaltene 3,17-Dioxo-11 β -acetoxy- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (IVb) schmilzt bei 209–211°. IR.-Spektrum in Nujol: Banden u. a. bei 5,78 μ (17-Keton, Acetat-CO); 6,02, 6,18 und 6,25 μ ($\Delta^{1,4}$ -3-Keton); 8,12 μ (Acetat C–O–C). $C_{20}H_{24}O_4$ (328,39) Ber. C 73,14 H 7,37% Gef. C 72,96 H 7,13%

Rf-Werte im Papierchromatogramm		Rf
Petroläther-Benzol-Methanol-Wasser 17:33:40:10	38°	0,29
Formamid/Cyclohexan-Benzol 1:1	22°	0,41
Formamid/Benzol	22°	0,79
Reaktion mit alkal. <i>m</i> -Dinitrobenzol		purpurviolett

13-Iso-3,17-dioxo-11 β -acetoxy- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (IIIb): 17,4 mg 13-*Iso*-3,17-dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (IIIa) wurden mit 0,25 ml Essigsäureanhydrid und 0,5 ml abs. Pyridin 26 Std. bei 70° acetyliert. Das dabei entstehende 11 β -Acetat (IIIb) wurde analog zum isomeren Acetat IVb aufgearbeitet und fiel als hochviskoses farbloses Öl an. Es enthielt nach Papierchromatogramm noch wenig unverestertes Ausgangsmaterial. Das 13-*Iso*-3,17-dioxo-11 β -acetoxy- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (IIIb) liess sich, auch nach chromatographischer Abtrennung des anhaftenden Ausgangssteroids, nicht zur Kristallisation bringen. Es verhielt sich im Papierchromatogramm Rf-mässig in allen für IVb angegebenen Systemen gleich wie dieses.

13-Iso-3,11,17-trioxo- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (VI): Zu dem aus 84 mg Chrom(VI)-oxid und 0,4 ml abs. Pyridin gebildeten, in Pyridin schwer löslichen Komplex gab man die Lösung von 120 mg 13-*Iso*-3,17-dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (IIIa) in 5,8 ml abs. Pyridin und

liess 17 Std. bei Raumtemperatur schütteln. Man verdünnte dann mit 65 ml Methylenchlorid und 35 ml 5-proz. Natriumsulfit-Lösung und säuerte mit verd. Salzsäure auf pH 4 an. Die wäss. Phase wurde abgetrennt und noch zweimal mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden mit Wasser neutralgewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand, ein Gemisch der 11-Oxo-Verbindung mit wenig Ausgangsmaterial, wurde an 60 Bogen WHATMAN-Papier Nr. 1 im System Formamid/Benzol präparativ papierchromatographisch aufgetrennt. Die UV.-absorbierende Zone des schwächer polaren 11-Oxosteroids wurde unter Verwendung von Tetrahydrofuran-Wasser-Gemisch 1:4 und 1:1 und von reinem Tetrahydrofuran eluiert. Die Eluate wurden im Wasserstrahlvakuum eingedampft bis frei von Tetrahydrofuran. Aus der wässrigen Suspension liess sich das 13-*Iso*-3,11,17-trioxo- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (VI) mit Methylenchlorid extrahieren. Nach Umkristallisation aus Aceton-Äther Smp. 245–247°. IR.-Spektrum in Methylenchlorid: Banden u. a. bei 5,75 μ (17-Keton); 5,85 μ (11-Keton); 6,02, 6,15 und 6,23 μ ($\Delta^{1,4}$ -3-Keton).

$C_{18}H_{20}O_3$ (284,34) Ber. C 76,03 H 7,09% Gef. C 75,95 H 7,26%

3,11,17-Trioxo- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (VII): 120 mg 3,17-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (IVa) in 1,5 ml abs. Pyridin wurden mit dem Komplex aus 84 mg Chrom(VI)-oxid in 0,4 ml abs. Pyridin 15 Std. bei Raumtemperatur oxydiert und analog dem 13-*Iso*-triketon VI aufgearbeitet. Das 3,11,17-Trioxo- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (VII) schmolz nach Umkristallisation aus Aceton-Äther bei 162,5–163,5°. IR.-Spektrum in Methylenchlorid: Banden u. a. bei 5,71 μ (17-Keton); 5,82 μ (11-Keton); 5,99, 6,13 und 6,21 μ ($\Delta^{1,4}$ -3-Keton).

$C_{18}H_{20}O_3$ (284,34) Ber. C 76,03 H 7,09% Gef. C 76,03 H 7,08%

(18 \rightarrow 11)-Lacton der 3-Oxo-11 β -hydroxy-17 β -acetoxy- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-18-säure (Vb): 40 mg (18 \rightarrow 11)-Lacton der 3-Oxo-11 β ,17 β -dihydroxy- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-18-säure (Va) wurden in 1,9 ml abs. Pyridin gelöst und mit 0,5 ml Essigsäureanhydrid 16 Std. bei Raumtemperatur belassen. Die Reaktionslösung wurde im Ölpumpenvakuum zur Trockne eingedampft, der verbleibende Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen und mit eiskalter 2N Salzsäure, eiskalter 2-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser neutral gewaschen. Die mit Natriumsulfat getrocknete Methylenchlorid-Lösung wurde im Wasserstrahlvakuum zur Trockne eingedampft und das erhaltene (18 \rightarrow 11)-Lacton der 3-Oxo-11 β -hydroxy-17 β -acetoxy- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-18-säure aus Aceton-Äther-Gemisch umkristallisiert, Smp. 187–189°. UV.-Spektrum in Äthanol: λ_{max} 241 m μ (ϵ = 17000). IR.-Spektrum in Methylenchlorid: Banden u. a. bei 5,63 μ [(18 \rightarrow 11)-Lacton]; 5,77 μ (Acetat-CO); 6,01, 6,16 und 6,23 μ ($\Delta^{1,4}$ -3-Keton) und 8,15 μ (Acetat-C–O–C).

$C_{21}H_{24}O_5$ (356,40) Ber. C 70,76 H 6,79% Gef. C 70,66 H 7,02%

Oxydation des (18 \rightarrow 11)-Lactons der 3-Oxo-11 β ,17 β -dihydroxy- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-18-säure (Va) zum Ketolacton II: 9 mg (18 \rightarrow 11)-Lacton der 3-Oxo-11 β ,17 β -dihydroxy- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-18-säure in 2 ml abs. Pyridin wurden mit dem Komplex aus 10 mg Chrom(VI)-oxid und 0,2 ml abs. Pyridin 20 Std. bei 23° stehengelassen. Hierauf versetzte man das Reaktionsgemisch mit 20 ml Eiswasser-Eis-Mischung und schüttelte dreimal mit dem gleichen Volumen Methylenchlorid aus. Die mit eiskalter 2N Salzsäure, eiskalter 2-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser neutralgewaschenen Auszüge wurden mit Natriumsulfat getrocknet und im Wasserstrahlvakuum eingedampft. Der bräunlich gefärbte, harzige Rückstand wurde in Methylenchlorid-Aceton-(4:1) aufgenommen und durch eine Säule von 400 mg entaktiviertem Silicagel (enth. 15 Gew.-% H₂O) filtriert. Die ersten 30 ml Filtrat ergaben beim Eindampfen im Vakuum 9 mg rohes, nunmehr farbloses Oxydationsprodukt. Das erhaltene (18 \rightarrow 11)-Lacton der 3,17-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-18-säure (II) schmolz nach zweimaligem Umkristallisieren aus Aceton-Äther bei 315–320° und gab mit dem auf mikrobiellem Wege isolierten Ketolacton II keine Smp.-Depression. Die zwei Substanzen verhielten sich auch nach IR.-Spektrum und Papierchromatogramm identisch.

(18 \rightarrow 11)-Lacton der 3,20-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-18-säure (VIII): Zu 20 Std. alten Kulturen von *Arthrobacter simplex*, ATCC 6946, welche in fünfzig 500-ml-ERLENMEYER-Kolben à 100 ml Nährlösung gezüchtet worden waren, gab man unter sterilen Bedingungen und unter gleichmässiger Verteilung die Lösung von 1,75 g (18 \rightarrow 11)-Lacton der 3,20-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -pregnen-18-säure (Ib) in 75 ml Aceton und liess die Kulturen 19 Std. bei 26–27° schütteln. 1 l Nährlösung enthält 1 g Difco-Hefeextrakt, 4,4 g Kaliumdihydrogenphosphat und

8,8 g Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat und war auf pH 7,1 eingestellt. Zur Aufarbeitung vereinigte man alle 50 Kulturlösungen in einem Scheidetrichter, sättigte sie mit Natriumchlorid und schüttelte sie mehrmals mit Äthylacetat aus. Die Auszüge wurden mit Natriumsulfat getrocknet und durch 20 g entaktiviertes Silicagel (mit 15 Gew.-% H_2O) filtriert. Das im Vakuum eingedampfte Filtrat, 1,50 g, gab nach dem Umkristallisieren aus Aceton-Äther 1,31 g (18 \rightarrow 11)-Lacton der 3,20-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-18-säure, Smp. 194–195°. UV.-Spektrum in Äthanol: λ_{max} 241 m μ ($\epsilon = 18000$). IR.-Spektrum in Methylenchlorid: Banden u. a. bei 5,66 μ (γ -Lacton); 5,82 μ (20-Keton); 5,99, 6,13 und 6,21 μ ($\Delta^{1,4}$ -3-Keton).

$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_4$ (340,40) Ber. C 74,09 H 7,11% Gef. C 73,94 H 7,04%

Inkubation des (18 \rightarrow 11)-Lactons der 3,20-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-18-säure (VIII) mit Kulturen von F. solani: 30 mg Lacton VIII wurden mit 100 ml einer 2 Tage alten Kultur von F. solani unter den bei der Inkubation von Ib beschriebenen Nährlösungs- und Schüttelbedingungen (s. S. 2794) 4 $\frac{1}{2}$ Tage inkubiert und die Kultur am Schluss analog mit Äthylacetat extrahiert. Die papierchromatographische Untersuchung des Extrakts unter Verwendung der Systeme Formamid/Benzol sowie Propylenglykol/Toluol (dieses knapp zweimal «bis unten»), in welchem letzterem System insbesondere das Hydroxydiketon IVa und das 17-Hydroxylacton Va aufgetrennt werden, ergab, dass ein Gemisch der Verbindungen II, IIIa, IVa und Va vorlag, der gleichen Abbauprodukte also, wie sie auch bei der Inkubation des Lactons der 3,20-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -pregnen-18-säure (Ib) isoliert werden konnten.

Die Mikroanalysen, UV.- und IR.-Spektren wurden in unseren Speziallaboratorien unter der Leitung der Herren Dres. W. PADOWETZ, H. HÜRZELER und R. F. ZÜRCHER durchgeführt bzw. aufgenommen.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Inkubation des (18 \rightarrow 11)-Lactons der 3,20-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -pregnen-18-säure (Ib) mit Kulturen von *Fusarium solani* (MART.) APP. et WR. werden als Umwandlungsprodukte das (18 \rightarrow 11)-Lacton der 3,17-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-18-säure (II), 3,17-Dioxo-11 β -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -18-norandrostadien (IVa) und die entsprechende 13-iso-Verbindung (IIIa) sowie das (18 \rightarrow 11)-Lacton der 3-Oxo-11 β ,17 β -dihydroxy- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-18-säure (Va) gebildet. Die beiden 18-Norsteroiden IIIa und IVa lassen sich auch durch rein chemische Decarboxylierung aus dem Ketolacton II herstellen und werden unter dem Einfluss von Basen ineinander übergeführt. Die Konfigurationszuordnung am Kohlenstoffatom 13 der zwei 18-Norsteroiden erfolgte auf Grund ihrer verschiedenen Acetylierungsgeschwindigkeiten sowie ihrer Rotationsdispersion.

Forschungslaboratorien
der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung