

STOFFWECHSEL VON STEROIDPHARMAKA

VII. METABOLITEN VON 4-CHLOR-17 α -METHYL-17 β -HYDROXY-1,4-ANDROSTADIEN-3-ON* DURCH MIKROBIELLE HYDROXYLIERUNG

K. SCHUBERT, J. SCHLEGEL, H. GROH, G. ROSE und C. HÖRHOOLD
Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Zentral-Institut für
Mikrobiologie und Experimentelle Therapie, Jena, Abteilung für Steroidforschung, DDR

(Received 18 February 1970)

SUMMARY

The anabolic steroid Oral Turinabol (4-chloro-17 α -methyl-17 β -hydroxy-1,4-androstadien-3-one) was hydroxylated microbiologically. With *Absidia glauca* and *Cunninghamella echinulata* the 6 β - and 7 β - and with *Aspergillus flavus* the 15 α - and 15 β -hydroxyderivatives were obtained. In this way it is possible to prepare metabolites of Oral Turinabol which are needed for studies in metabolism and biological activity.

BEI Stoffwechseluntersuchungen des anabol wirksamen Steroids Oral-Turinabol (OT) wurden als Hauptmetaboliten hydroxylierte Derivate festgestellt [1]. Der bevorzugte Stoffwechselweg dieses Pharmakons verläuft somit nicht über Hydrierungs-, sondern über Hydroxylierungsreaktionen. Da ausgewählte Mikroorganismen Steroide an den gleichen C-Atomen hydroxylieren wie der Säugetierorganismus, wurden auf mikrobiellem Wege hydroxylierte Metaboliten von OT präparativ hergestellt. Damit sollten Voraussetzungen geschaffen werden, OT-Metaboliten beim Menschen zu identifizieren, den weiteren Stoffwechsel dieser Metaboliten zu untersuchen sowie deren mögliche Partialwirkungen bzw. toxische Eigenschaften zu prüfen.

MATERIAL UND METHODEN

Fermentation

(1) Kulturen von *Absidia glauca* bzw. *Cunninghamella echinulata* wurden 4 Tage bei 25–28° auf Malzagarrröhrchen bebrütet und dann in 100 ml Malzwasser enthaltende 500 ml Rundkolben abgeschwemmt. Unter Schütteln wurde weitere 3 Tage bei 25–28° kultiviert und zu jedem Kolben 5 mg Oral-Turinabol, gelöst in 0,5 ml Aceton, gegeben. Nach 3–4 tägiger Fermentation bei 25–28° wurde der Inhalt der Kolben vereinigt und extrahiert.

(2) *Aspergillus flavus* wurde von Malzagarrröhrchen, die 4 Tage bei 25–28° bebrütet wurden, auf 100 ml Malzwasser enthaltende 500 ml-Rundkolben überimpft und 2 Tage auf einem Schütteltisch bei 25–28° kultiviert. Dann erfolgte die Zugabe von 10 mg Oral-Turinabol in 1 ml Aceton. Die Kulturen wurden weitere 3–4 Tage bei 25–28° geschüttelt und dann aufgearbeitet.

Aufarbeitung, Isolierung und Identifizierung

Die Extraktion der vereinigten Ansätze erfolgte mit Chloroform. Bei Asper-

*Oral-Turinabol[®], VEB Jenapharm, Jena.

gillus flavus wurde zuvor vom Mycel abgetrennt und das Filtrat extrahiert. Die auf ein kleineres Volumen gebrachten Extrakte wurden mit 1 n Natronlauge und Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Trennung der Umwandlungsprodukte erfolgte dünn-schichtchromatographisch. Die Papierchromatographie wurde zur Charakterisierung der Umwandlungsprodukte herangezogen. Von den durch mehrfache Kristallisation gereinigten Substanzen wurden Schmelzpunkt, Molgewicht und UV-Absorptions-Maximum bestimmt sowie die IR- und NMR-Spektren aufgenommen. In einem Falle wurde der Circular-dichroismus gemessen. Durch Oxidation mit Chromsäure und Acetylierung mit Acetanhydrid/Pyridin wurden Derivate der Hydroxylierungsprodukte hergestellt.

Für die Dünnschichtchromatographie fand Kieselgel D (VEB Chemiewerk Greiz-Dörlau) Verwendung. Leuchtstoff N 40 grün (3%) (VEB Leuchtstoffwerk Bad Liebenstein), wurde zum Sichtbarmachen der UV-positiven Steroide zugesetzt. Als Laufmittel dienten die Systeme Äthylacetat und Chloroform/Äthylacetat 1:1. Die Laufstrecken betragen jeweils 14 cm. Die Papierchromatographie wurde mit Schleicher-Schüll-Papier 2043 bm in den BUSH-Systemen B-1* und B-7† durchgeführt. Zur Lokalisierung der Substanzen wurde Phosphorwolframsäure (PWS) in 10% iger alkoholischer Lösung verwendet. Nach dem Besprühen wurden die Papierstreifen auf 90°C und die Dünnschichtchromatogramme auf 120–130° erhitzt. Die Drehwerte wurden mit einem lichtelektrischen Polarimeter (Zeiss-Opton, Oberkochen) unter Anwendung einer Mikromethode gemessen. (Chloroform; $c = 1$). Zur Registrierung der UV-Spektren (Äthanol) diente ein Unicam Sp 700 und der IR-Spektren (KBr-Presslinge $1 \times 1 \times 4$ mm, 20–30 μg Substanz) ein UR-10 Spektralphotometer (VEB Carl Zeiss, Jena). Die NMR-Spektren (CDCl_3) wurden mit einem Varian HA-100 Spektrometer aufgenommen und der Circular-dichroismus (Äthanol) mit einem Roussel-Jouan Dichrograph gemessen. Die Molgewichte wurden massenspektrometrisch nach den Methoden mit negativer [2] und positiver Ionenbildung ermittelt.

Ergebnisse

Bei der Umwandlung von OT (I) mit *Aspergillus flavus* wurden bei fast vollständigem Umsatz des Substrats zwei Hauptprodukte (IV und V) in Ausbeuten von je 40% gebildet.

Mit *Cunninghamella echinulata* und *Absidia glauca* wurde eine größere Anzahl Metaboliten erhalten. Auf dem Dünnschichtchromatogramm konnten fünf UV-positive Substanzen lokalisiert werden, die polarer als OT waren und in Mengen von 5–20% vorlagen. Ein Metabolit II hatte den gleichen R_s -Wert wie ein beim Menschen aus Urin isoliertes Stoffwechselprodukt [1]. Zwei Umwandlungsprodukte zeigten ein ähnliches chromatographisches Verhalten wie die von *Aspergillus flavus* gebildeten Metaboliten (IV und V). Ein weiteres Umwandlungsprodukt (III) war etwas polarer als II. In Tabelle 1 sind die R_s -Werte zusammengefaßt.

Mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie wurden die Metaboliten II und III aus den *Absidia*- und *Cunninghamella*-, die Metaboliten IV und V aus den *Aspergillus* Ansätzen isoliert. Nach mehrfacher Kristallisation bis zur Schmelzpunkt Konstanz wurden die physikalischen Konstanten der Metaboliten

* (Ligroin (100–120°)–Benzol–Methanol–Wasser, 5:5:7:3, v/v/v/v).

† (Benzol–Methanol–Wasser, 2:1:1, v/v/v).

Tabelle 1. Dünnschicht- und papierchromatographisches Verhalten der mikrobiellen Hydroxylierungsprodukte von Oral-Turinabol (OT)

Substanz	Dünnschichtchromatographie*		Papierchromatographie†	
	Rs	PWS-Spray‡	Rs	PWS-Spray‡
I (Oral-Turinabol)	1	Gelb	1	Gelb
II	0,75	Rot-Orange	0,82	Rot-Orange
III	0,61	Gelb	0,75	Gelb
IV	0,40	Orange	0,55	Orange
V	0,51	Orange	0,7	Orange

*Kieselgel D (VEB Chemiewerk Greiz-Dörlau).

†Schleicher & Schüll 2043 bm System B-5.

‡PWS-Phosphorwolframsäure, 15%ig in Äthanol.

bestimmt. Bei III wurde dies erst nach einer weiteren Reinigung an Aluminiumoxid (7% H₂O) mit einem Benzol-Methanol Gradienten von 0–2% Methanol erreicht.

Die Acetylierung von II, III, IV und V bei Zimmertemperatur verlief mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Während sich II, III und IV leicht acetylieren ließen, waren bei V nur 50% umgesetzt. Durch Oxidation der Metaboliten wurden die entsprechenden Ketone erhalten, die bei IV und V identisch waren. Die Messung des Circular dichroismus ergab bei diesem Keton die Werte λ [nm] = 370 (–0,16), 360 (–0,4), 340 (–0,5), 330 (–0,35), 300 (+1,4), 247 (+8) und 220 (–10).

DISKUSSION

Beim Vergleich der UV-Maxima der Metaboliten II–V mit dem UV-Maximum von OT ist ersichtlich, daß außer in II, wo die Schulter bei 267 nm nicht mehr vorhanden ist und das Hauptmaximum geringfügig verschoben ist, der OT Chromophor unverändert vorliegt. Ebenso beweisen die entsprechenden IR-Banden, daß Ring A im Verlaufe der mikrobiellen Umsetzung nicht angegriffen wurde. Das IR-Spektrum von II ist mit dem von 6 β -Hydroxy-Oral-Turinabol identisch, das im Verlaufe von Stoffwechsel-Untersuchungen beim Menschen aus Urin als Hauptmetabolit isoliert und identifiziert worden war [1]. Auch die anderen physikalischen Konstanten stimmten überein.

Bei III konnte es sich nach dem chromatographischen Verhalten um das 6 α -Isomere von II handeln. II und III ergaben jedoch verschiedene Ketone. Auch die Massenspektrometrie ergab keinen Anhaltspunkt für ein 6-Hydroxyderivat. Ein entsprechendes Ring A Fragment fehlte. Da ebenfalls ein Bruchstück mit den Ringen CD und einer Hydroxygruppe fehlte, wurde angenommen, daß III am C-7-Atom substituiert ist. Der Beweis konnte durch das NMR-Spektrum erbracht werden. Das Multiplett der CHOH-Gruppierung lag bei 3,5 ppm, war aber durch Überlagerung mit dem Multiplett des 6 α -H-Atoms nicht aufgelöst. Dafür zeigte das entsprechende III-Acetat bei 4,63 ppm das CHOAc-Signal als gut aufgelöstes Sextett. Dieses muß der CHOAc-Gruppierung in 7-Stellung mit axialem H (α) zugeordnet werden. Die Kopplungskonstanten $J_{6\beta,7\alpha} = 10,6$ Hz, $J_{8\beta,7\alpha} = 10,6$ Hz und $J_{6\alpha,7\alpha} = 5,3$ Hz zeigen die für diese Verbindung zu

Tabelle 2. Physikalische Konstanten mikrobieller Hydroxylierungsprodukte von Oral-Turinabol

	I (OT)*	II	IV	V	III
MG	334,9	350,9	350,9	350,9	350,9
Fp.	149–151° Ac/HXn.	274–277° Chl/HXn.	119–122° Chl/HXn	212–215° Chl/HXn.	220–222° Ac/Chxn.
$[\alpha]_D^{22}$	+56°	-33°	+59,2°	+2,1°	+16,7°
UV: λ_{max} [nm]	246; 267 sh	248	246; 270 sh	246; 270 sh	246; 273 sh
IR: ν_{max} [cm^{-1}]	1590, 1636, 1666	1580, 1630, 1668	1585, 1630, 1660	1585, 1630, 1660	1592, 1640, 1666
Cl- $\Delta^{1,4,3}$ -Keto	3605	3540, 3450	3460	3460	3440
O—H					
NMR: δ [ppm],					
Multiplicität					
CH ₃ -17	1,15; s	1,22; s	1,32; s	1,20; s	1,18; s
CH ₃ -18	0,91; s	0,99; s	0,94; s	1,17; s	0,94; s
CH ₃ -19	1,28; s	1,53; s	1,32; s	1,35; s	1,34; s
H-1	7,08; d _{J=10} Hz)	7,10; d _{J=10} Hz)	7,10; d _{J=10} Hz)	7,11; d _{J=10} Hz)	7,10; d _{J=10} Hz)
H-2	632; d	6,36; d	6,39; d	6,37; d	6,36; d
CHOH	—	5,53; t _{J=3.1} Hz)	4,14; m	4,23; m	3,50; m überlagert

* Die Pharmazie 18 (1963) 323.

erwartenden zwei axial-axial-Kopplungen mit den Protonen in 6β und 8β -Stellung sowie eine axial-äquatorial-Kopplung mit dem 6α -Proton.

Das Multiplett des 6α -Protons, das durch die Nachbarschaft des 4-Chloratoms in I bei 3,25 ppm als Sextett klar zu erkennen ist, wird in III durch die 7β -O Ac-Gruppe nach 3,61 ppm verschoben und zu einem Quartett vereinfacht, ($J_{6\alpha,6\beta} = 12,8$ Hz, $J_{6\alpha,7\alpha} = 5,3$ Hz) wodurch ebenfalls die 7β -Substitution bewiesen wird.

Die Singulets der Protonen der C-17-, C-18- und C-19-Methylgruppen zeigten gegenüber der nicht hydroxylierten Ausgangssubstanz OT nur eine geringe Verschiebung (Tabelle 2).

Bei den Metaboliten IV und V handelt es sich um Epimere, da die Massenspektrogramme eine ähnliche Fragmentierung zeigten und nach Chromsäure-Oxidation identische Ketone erhalten wurden. Das Auftreten einer IR-Ketonbande bei 1740 cm^{-1} erbrachte den Beweis für das Vorliegen eines 5-Ringketons. Die Hydroxygruppe in IV und V mußte sich demnach am C-15- oder C-16-Atom befinden. Das gleiche Ergebnis lieferten die NMR-Spektren von IV und V sowie von den identischen Ketonen. Die Signale der Protonen der C-17- und C-18-Methylgruppe zeigten gegenüber OT die für eine 15α - bzw. 15β -Hydroxygruppe zu erwartenden Verschiebungen [3].

Durch Messung des Circular dichroismus des Ketons aus IV bzw. V konnte eine Hydroxylierung in 16-Stellung ausgeschlossen werden. Ein 16-Keton mit trans-Verknüpfung der Ringe C/D müßte einen entgegengesetzten Cotton Effekt bei 300 nm zeigen.

Die Zuordnung, in welchem der beiden durch *Aspergillus flavus* erhaltenen Metaboliten die 15α - und 15β -Hydroxyverbindung vorliegt, erfolgte außerdem durch Vergleich der Acetylierbarkeit und Vergleich der molaren Drehwerte mit OT.

Hervorzuheben ist, daß *Aspergillus flavus* aus bestimmten Substraten Epimere in gleichhohen Ausbeuten bildet. Offenbar ist dies von der "Topographie" des Substrats abhängig, denn nach Einsatz von 4-Chlor- 17α -Methyltestosteron wurden beispielsweise keine Epimere erhalten. Beziehungen zwischen Struktur und mikrobieller Hydroxylierung von Testosteron und androgen/anabol wirksamen Pharmaka sind Gegenstand einer weiteren vergleichenden Untersuchung.

ANERKENNUNG

Herrn Dr. Snatzke, Bonn, sind wir für die Messung und Auswertung des Circular dichroismus zu Dank verbunden. Herrn Dr. G. Kaufmann danken wir für die Interpretation von NMR-Spektren und Frau H. Hicke für die gewissenhafte Mitarbeit.

LITERATUR

1. K. Schubert und K. Wehrberger: *Endokrinologie* **55** (1970) 257.
2. M. v. Ardenne, K. Steinfeldt, R. Tümmler und K. Schreiber: *Experimentia* **19** (1963) 178.
3. L. L. Smith: *Steroids* **4** (1964) 395.

ZUSAMMENFASSUNG

Das anabol wirksame Steroid Oral-Turinabol (4-Chlor- 17α -methyl- 17β -hydroxy-1,4-androstadien-3-on) wurde auf mikrobiellem Weg hydroxyliert. Mit *Absidia glauca* und *Cunninghamella echinulata* sowie *Aspergillus flavus* wurden die 6β -, 7β -, 15α - und 15β -Hydroxyderivate hergestellt. Damit besteht die Möglichkeit, Metaboliten des Oral-Turinabols für Stoffwechseluntersuchungen und für die Testung präparativ herzustellen.