

107. Kyosuke Tsuda, Toshinobu Asai, Yoshihiro Sato, Tokuji Tanaka, Takemasa Matsuhisa, und Hiroko Hasegawa : Mikrobiologische Hydroxylierung der Steroide. X.¹⁾ Über 7 β ,15 β -Dihydroxypregn-4-en-3,20-dion.

(Institut für angewandte Mikrobiologie,^{*1} Universität Tokio)

In der IV. Mitteilung dieser Reihe²⁾ berichteten wir über ein Dihydroxyprogesteron, welches bei der Einwirkung von *Syncephalastrum racemosum* COHN auf Progesteron (Pregn-4-en-3,20-dion)(I) entstand. Diesem Dihydroxylierungsprodukt erteilten wir dabei eine Struktur von 7 α ,15 β -Dihydroxyprogesteron auf Grund folgender Tatsachen: Durch Einwirkung von Alkali lässt dieser Stoff sich unter Eliminierung einer Hydroxylgruppe leicht in das Monohydroxypregna-4,6-dien-3,20-dion umwandeln; letzteres liefert bei der katalytischen Hydrierung das bekannte 15 β -Hydroxyprogesteron. Damit wird die 7- und 15-Stellung für die zwei Hydroxylgruppen sowie die β -Konfiguration für die 15-Hydroxylgruppe bestätigt. Die Zuerkennung der α -Konfiguration für die 7-Hydroxylgruppe folgt aus dem Vergleich^{*2} des M_D -Werts für diesen Stoff mit dem des 15 β -Hydroxyprogesterons; der dabei gegebene ΔM_D -Wert ist -99. .

Kurz nach unserem Bericht über das 7 α ,15 β -Dihydroxyprogesteron haben McAleer *et al.*³⁾ gezeigt, dass die beiden Epimere an C-7 von 7-Hydroxyprogesteron negative ΔM_D -Werte aufweisen: d. h. Progesteron, $M_D = +534 \sim 564$; 7 β -Hydroxyprogesteron, $M_D = +521$ ($\Delta M_D = -13 \sim -43$); 7 α -Hydroxyprogesteron, $M_D = +508$ ($\Delta M_D = -26 \sim -56$). Damit ist der negative ΔM_D -Wert des von uns gewonnenen Dihydroxyprogesterons kein eindeutiger Beweis für die α -Konfiguration der 7-Hydroxylgruppe geworden. Dies veranlasste uns, dieses Problem weiter zu untersuchen.

In einer früheren Mitteilung⁴⁾ haben wir die mikrobiologische Umsetzung von Progesteron durch *Diplodia tubericola* beschrieben. Bei dieser Hydroxylierungsreaktion entstand das 7 β -Hydroxyprogesteron (II) mit einer Ausbeute von 40~50%. Wir haben diesen Versuch von neuem mit einer grösseren Menge Progesteron durchgeführt, wobei eine Verbindung vom Schmp. 231~233° neben dem oben genannten 7 β -Hydroxyprogesteron erhalten wurde. Diese Verbindung war identisch mit der vorher von uns als 7 α ,15 β -Dihydroxyprogesteron bezeichneten Verbindung. Die Feststellung der Identität basierte auf Schmp., Analysenwert, spez. Drehung, Papierchromatogramm, Infrarot-Spektrum und dem Verhalten gegenüber alkalischen Reagenzien. Wir haben dann das 7 β -Hydroxyprogesteron zur analogen Fermentation gebracht; dabei wurde auch die mit dem sogenannten 7 α ,15 β -Dihydroxyprogesteron identische Verbindung erhalten. Damit wurde bewiesen, dass die Verbindung vom Schmp. 231~233° nichts anders als das 7 β ,15 β -Dihydroxyprogesteron (III) ist.^{*3}

Daher muss die Bezeichnung von 7 α ,15 β -Dihydroxyprogesteron für die Verbindung vom Schmp. 231~233° in die von 7 β ,15 β -Dihydroxyprogesteron umgesetzt werden.

Bei der Einwirkung von gleichen Mikroben auf Pregnenolon (3 β -Hydroxypregn-5-en-20-on)(IV) ergaben sich auch 7 β -Hydroxyprogesteron und 7 β ,15 β -Dihydroxyprogesteron;

*1 Yayoi-cho, Bunkyo-ku, Tokio (津田恭介, 朝井勇宣, 佐藤良博, 田中篤治, 松久毅正, 長谷川弘子).

*2 Für die beiden Epimere an C-7 von 7-Hydroxy-5 α -cholestan-3 β -ol sowie von 7-Hydroxy-5 α -cholestan sind folgende ΔM_D -Werte gegeben worden; Cholestanol-Reihe: 7 β -OH, +120; 7 α -OH, -59. Cholestan-Reihe: 7 β -OH, +111; 7 α -OH, -48. Vgl. (L. Fieser, M. Fieser: "Steroids," 179(1959). Reinhold Publishing Corporation, New York).

*3 Es gibt bisher kein Beispiel, eine Hydroxylgruppe durch Fermentation zur Inversion zu bringen.

1) IX. Mitt.: J. Gen. Appl. Microbiol. (Tokyo), 5, 127(1959).

2) K. Tsuda, T. Asai, E. Ohki, A. Tanaka, M. Hattori: Dieses Bulletin, 6, 387(1958).

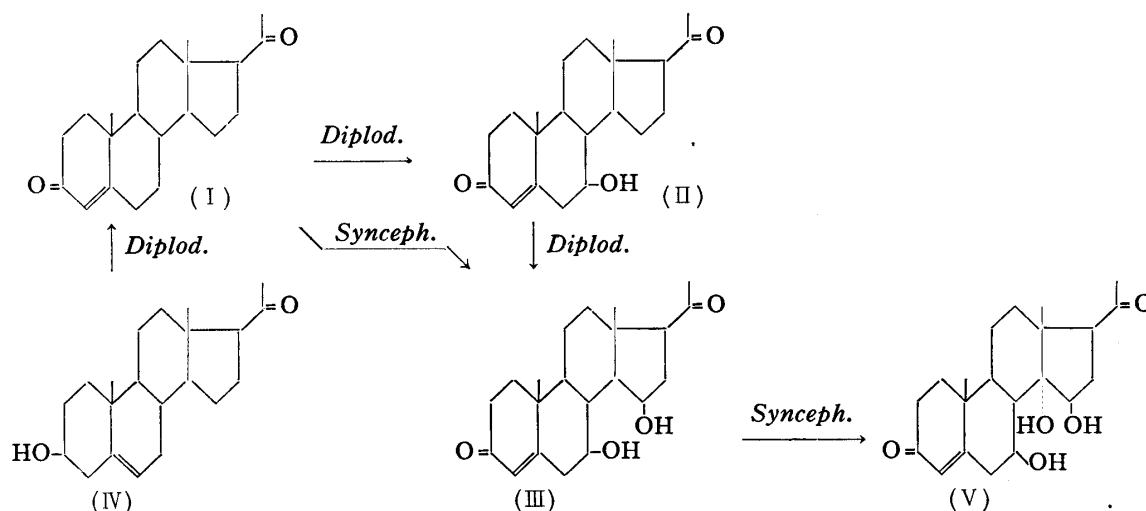
3) W. J. McAleer, M. A. Kozlowski, T. H. Stoudt, J. M. Chemerda: J. Org. Chem., 23, 958(1958).

4) K. Tsuda, T. Asai, Y. Sato, T. Tanaka, M. Kato: J. Gen. Appl. Microbiol., 5, 1(1959).

dabei wurde papierchromatographisch erkannt, dass das Pregnenolon bei dieser Fermentation zuerst in das Progesteron übergeführt wird.

Dieses $7\beta,15\beta$ -Dihydroxyprogesteron entsteht auch ferner bei der mikrobiologischen Umwandlung von Progesteron bzw. von Pregnenolon mit *Helminthosporium sativum*; darüber werden wir in einer anderen Mitteilung dieser Reihe schreiben.

Im Zusammenhang mit diesen Arbeiten muss das Strukturzeichen des $7\alpha,14\alpha,15\beta$ -Trihydroxyprogesterons,⁵⁾ welches durch Einwirkung von *Syncephalastrum racemosum* auf Progesteron sowie auf das sogenannte $7\alpha,15\beta$ -Dihydroxyprogesteron gewonnen wurde, notwendigerweise mit dem des $7\beta,15\beta,14\alpha$ -Trihydroxyprogesterons (V) vertauscht werden.



Experimentelles**

$7\beta,15\beta$ -Dihydroxyprogesteron ($7\beta,15\beta$ -Dihydroxypregn-4-en-3,20-dion) (III)—100 g Progesteron (I) oder Pregnenolon (IV) wurden zur Kultur⁴⁾ von *Diplodia tubericola* (ELL ET EV. GANB.) unter sterilen Bedingungen zugegeben und 72 Std. lang bei 27° fermentiert. Die vom Myzel abgetrennte Flüssigkeit wurde mit AcOEt extrahiert und die AcOEt-Auszüge, nach Waschen mit NaHCO_3 -Lösung und dann mit Wasser, im Vakuum eingedampft. Das hierbei erhaltene Produkt wurde an der 20-fachen Menge Silica-Gel chromatographiert, wobei die Eluierung mit Benzol-Äther-Gemischen steigenden Äthergehalts ein Monohydroxy- und ein Dihydroxyprogesteron laut der in Tabelle I angegebenen Ausbeute ergab. Dieses Monohydroxyprogesteron hat sich bereits bei unserer vorigen Untersuchung⁴⁾ als das 7β -Hydroxyprogesteron (II) erwiesen.

TABELLE I.
Ausbeute (%) der Produkte

Substrat	Zurückgehaltenes Substrat	Monohydroxyprogesteron	Dihydroxyprogesteron
Pregnenolon	nichts	12	42
Progesteron	3.5	36	7.6

Das Dihydroxyprogesteron wurde wiederum an Silica-Gel chromatographiert und dann aus MeOH umkristallisiert: Nadeln vom Schmp. 231~233°; SbCl_5 -Farbenreaktion, gelbbraun. $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_4$ —Ber.: C, 72.80; H, 8.73. Gef.: C, 72.77; H, 8.64. $[\alpha]_D^{25} + 136^\circ$ ($c=0.72$ in CHCl_3). UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}} 240.2 \text{ m}\mu$ ($\epsilon 18000$). IR (in Nujol) cm^{-1} : 3520 (OH); 3360 (OH); 1704 (20-CO); 1680 (3-CO); 1630 (4-en).

Aus 7β -Hydroxyprogesteron (II) ergab sich durch Einwirkung der gleichen Mikroben auch das Dihydroxyprogesteron vom Schmp. 231~233°. 6 g (II) ergaben dabei 350 mg Dihydroxyprogesteron. Dieses Dihydroxyprogesteron (III) erwies sich nach Schmp., Mischprobe, IR und Papierchromatographie als identisch mit dem früher von uns als $7\alpha,15\beta$ -Dihydroxyprogesteron²⁾ bezeichneten Stoff. Zum weiteren Vergleich wurden folgende Derivate hergestellt.

** Die Schmp. sind auf dem Kofler-Block bestimmt und noch nicht korrigiert.

5) K. Tsuda, T. Asai, E. Ohki, A. Tanaka, T. Matsuhisa: Dieses Bulletin, 7, 369(1959).

7 β ,15 β -Dihydroxyprogesteron-7-monoacetat : (III) wurde in üblicher Weise mit Pyridin-Ac₂O acetyliert; Schmp. 194~195°, $[\alpha]_D^{25} +123^\circ$ (c=0.80, in CHCl₃). C₂₈H₃₂O₅—Ber. : C, 71.10; H, 8.30. Gef. : C, 71.06; H, 8.29. UV : $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 237 m μ (ϵ 18000).

15 β -Hydroxypregna-4,6-dien-3,20-dion : (III) wurde mit MeOH-KHCO₃ behandelt und das erhaltene 4,6-dien aus Me₂CO umkristallisiert. Schmp. 220~223°, C₂₁H₂₈O₃—Ber. : C, 76.79; H, 8.59. Gef. : C, 76.53; H, 8.55. UV : $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 283.8 m μ (ϵ 30000).

Dem Japanischen Nationalfond zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Unterrichtsministerium) danken wir bestens für die Unterstützung dieser Arbeit. Wir danken auch den Herren Dr. K. Okazaki und R. Shirasaka (Takamine Forschungslaboratorium) für ihre freundliche Hilfe bei der Massenkultivierung. Ferner möchten wir für die Ausführung der Mikroanalysen Frl. H. Yamano-uchi und K. Hayashi (Mikro-Labor dieses Instituts) und für die Aufnahme der Infrarot-Spektren Frl. N. Kurosawa (IR-Labor dieses Instituts) ebenfalls herzlich danken.

Zusammenfassung

Das Dihydroxyprogesteron, welches von diesen Autoren durch Einwirkung von *Syncephalastrum racemosum* auf Progesteron (I) einst gewonnen wurde und damals nach dem Strukturzeichen von 7 α ,15 β -Dihydroxyprogesteron genannt wurde, ergibt sich diesmal bei der Umsetzung von (I) sowie von 7 β -Hydroxyprogesteron (II) mit *Diplodia tubericola*. Aus diesen Tatsachen sowie aus den Ergebnissen der vorherigen Mitteilungen ist ersichtlich, dass das richtige Strukturzeichen des Dihydroxyprogesterons 7 β ,15 β -Dihydroxyprogesteron (III) ist.

(Eingegangen am 6. Mai, 1960)