

ALFRED SCHUBERT, GERHARD LANGBEIN und RUDOLF SIEBERT
MIKROBIELLE HYDROXYLIERUNG VON STEROIDEN
IN 12- UND 15-STELLUNG

Aus den Wissenschaftlichen Laboratorien des VEB Jenapharm, Jena
(Eingegangen am 6. Juni 1957)

Durch mikrobielle Umsetzung von Steroiden mit *Calonectria decora* wird die 12- und/oder 15-Stellung hydroxyliert. Die Konstitutionsaufklärung der erhaltenen Reaktionsprodukte wird beschrieben.

Aus den zahlreichen Veröffentlichungen der vergangenen Jahre über mikrobielle Umsetzungen von Steroiden¹⁾ geht hervor, daß Schimmelpilze einer bestimmten Art gewöhnlich stets die gleiche Stellung am Steroidmolekül stereospezifisch verändern. Allerdings kennt man auch Beispiele, daß Stämme verschiedener Herkunft, aber der gleichen Art mit gleichem Einsatzmaterial unterschiedliche Reaktionsprodukte erzeugen. Beispielsweise hydroxyliert einerseits *Rhizopus nigricans* Ehrenberg²⁾ allgemein Δ^4 -3-Ketosteroide in 11 α -Stellung, andererseits wandelt *Fusarium solani* Progesteron sowohl in $\Delta^{1,4}$ -Androstadien-dion-(3.17)³⁾ als auch in 15 β -Hydroxyprogesteron^{4,4a)} um.

Von der Art *Calonectria decora* (Hypocreales) ist bekannt, daß sie in geeigneten Steroiden die Δ^1 -Doppelbindung einführt. Wir haben jedoch einen Stamm dieser Art gefunden, der die 12 β - und 15 β -Stellung im Progesteron hydroxyliert. Eine mikrobielle Substitution der 12-Stellung ist noch nicht beschrieben worden.

Bei der Einwirkung von *Calonectria decora* auf Progesteron (I) entsteht mit einer Ausbeute von über 80% ein Dihydroxyprogesteron (II). Die Konstitution dieser Verbindung (II) wird durch die Elementaranalyse, die UV- und IR-Spektren, die molaren Rotationsdifferenzen, Farbreaktionen sowie durch die Darstellung einiger Derivate und die Synthese des 11 α ,15 β -Dihydroxyprogesterons (VI) auf mikrobiellem Wege gesichert.

Die Substanz II kristallisiert aus Aceton in feinen Nadeln oder derben Prismen. Auffallend ist die starke Abhängigkeit des Drehwertes vom Lösungsmittel. Die

1) A. WETTSTEIN, *Experientia* [Basel] **11**, 465 [1955]; S. H. EPPSTEIN, P. D. MEISTER, H. C. MURRAY und D. H. PETERSON, *Vitamins and Hormones* Vol. XIV, S. 360 ff. Academic Press Inc., Publishers, New York 1956; E. VISCHER und A. WETTSTEIN, *Angew. Chem.* **69**, 456 [1957].

2) D. H. PETERSON und Mitarbb., *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 5933 [1952]; F. W. KAHNT, CH. MEYSTRE, R. NEHER, E. VISCHER und A. WETTSTEIN, *Experientia* [Basel] **8**, 422 [1952]; A. ERCOLI, P. DE RUGGIERI und D. D. MORTE, *Gazz. chim. ital.* **85**, 628 [1955]; E. TUMOVA, O. SIBLIKOVÁ-ZBUDOVSKÁ und O. HANČ, *Českoslov. Farmac.* **4**, 65 [1955].

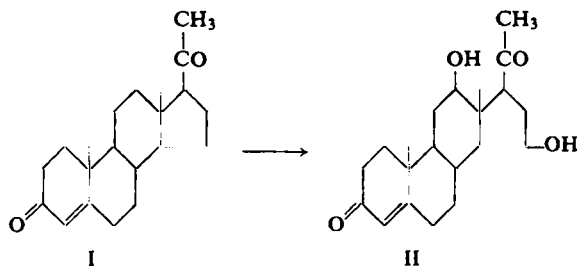
3) E. VISCHER und A. WETTSTEIN, *Experientia* [Basel] **9**, 371 [1953].

4) B. KLÜGER, R. SIEBERT und A. SCHUBERT, *Naturwissenschaften* **44**, 40 [1957].

4a) Die Zuordnung der 15-Hydroxygruppe erfolgte in dieser Arbeit in Anlehnung an die Bezeichnung von J. FRIED und Mitarbb., *Recent Progr. Hormone Res.* **11**, 149 [1955].

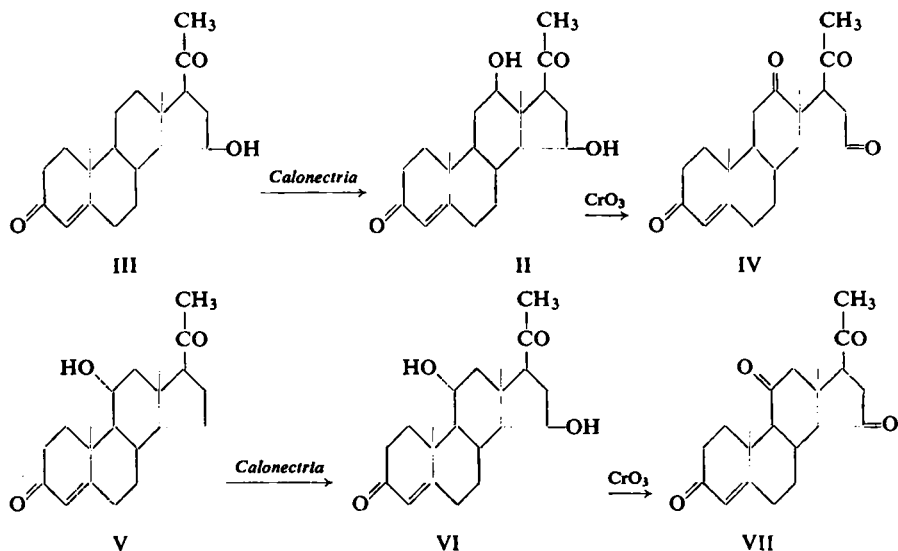
CH. MEYSTRE, E. VISCHER und A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* **38**, 381 [1955], beweisen, daß der 15 α -Hydroxy-Gruppierung von FRIED die 15 β -Stellung zugeordnet werden muß. Wir verwenden deshalb die Nomenklatur nach WETTSTEIN.

spezifische Drehung beträgt $[\alpha]_D^{25}$: $+139 \pm 3^\circ$ in Chloroform und $+186 \pm 3^\circ$ in Methanol. Nach den Ergebnissen der Elementaranalyse liegt ein Dihydroxy-progesteron der Summenformel $C_{21}H_{30}O_4$ vor.



Das UV-Spektrum in Äthanol hat bei $241 m\mu$ ein hohes Absorptionsmaximum ($\log \epsilon = 4.23$), das für α, β -ungesättigte Ketone charakteristisch ist. Demnach ist die im Ausgangsmaterial I vorhandene Δ^4 -3-Keto-Gruppierung erhalten geblieben.

Im IR-Spektrum von II, das in Methylenchloridlösung aufgenommen wurde, sind Banden bei 3605, 1690 (Schulter), 1672, 1622, 1363, 1040 und $870 cm^{-1}$ vorhanden. Die Δ^4 -3-Ketobande bei $1672 cm^{-1}$ ist in ihrer Intensität wesentlich stärker als die Schulter bei $1690 cm^{-1}$. Beachtenswert ist die Tatsache, daß diese Schulter, die der 20-Ketogruppe zugeordnet wird, ihr Absorptionsmaximum bei $1690 cm^{-1}$ besitzt, während das Absorptionsmaximum bei $1710 cm^{-1}$ erwartet wird. Diese Rotverschiebung um $20 cm^{-1}$ deutet darauf hin, daß eine Wechselwirkung einer Hydroxylgruppe mit der 20-Ketogruppe stattfindet. Ähnliche Rotverschiebungen werden beobachtet zwischen Keto- und Hydroxylgruppen bei Hydroxyanthrachinonderivaten⁵⁾



⁵⁾ Methoden der organ. Chemie (Houben-Weyl), 4. Aufl., S. 859, Thieme-Verlag, Stuttgart 1955.

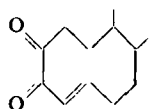
mit Nahstellung der funktionellen Gruppen. Auf Grund des negativen Ausfalls der PORTER-SILBER-Reaktion⁶⁾ scheidet die Substitution in 16- und 17-Stellung in II aus.

Das Dihydroxy-progesteron II wird durch Einwirkung von Chromsäureanhydrid in Eisessig bei Zimmertemperatur in die Substanz IV übergeführt, deren IR-Spektrum keine Hydroxylbanden besitzt. Außerdem bildet IV keine Alkalisalze und enthält demnach keine Carboxylgruppe.

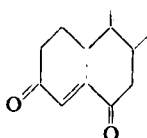
Im IR-Spektrum werden Carbonylbanden festgestellt bei 1748 cm^{-1} (stark), 1717 cm^{-1} (sehr stark) und 1682 cm^{-1} (stark). Dabei fällt besonders auf, daß die im Ausgangsmaterial II bei 1690 cm^{-1} vorhandene Schulter nach 1717 cm^{-1} verschoben ist und gleichzeitig die Carbonylbande der Δ^4 -3-Ketogruppe bei 1682 cm^{-1} an Intensität übertrifft.

Wir schließen aus dem Intensitätsverhältnis der Banden bei 1682 cm^{-1} und bei 1717 cm^{-1} , daß die sehr starke Absorption bei 1717 cm^{-1} durch mindestens 2 Carbonylgruppen hervorgerufen wird. Die Bande bei 1748 cm^{-1} ist nach Lage und Intensität typisch für ein 5-Ring-Keton⁷⁾. Damit wird die Existenz einer vierten Carbonylgruppe in IV bewiesen. Die Verbrennungswerte bestätigen die Summenformel eines Pregnentetraons $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_4$. Das UV-Spektrum dieses Pregnentetraons besitzt ein Absorptionsmaximum bei $238\text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4.20$). Demnach ist durch die Oxydation das Δ^4 -3-Ketosystem des Ausgangsmaterials II erhalten geblieben.

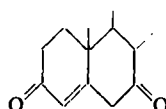
Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, daß in alkalischer Methanollösung keine Veränderung in der Lage und Höhe des Absorptionsmaximums des Pregnentetraons IV eintritt. Aus der Literatur^{8,9,10)} ist bekannt, daß die Systeme VIII–XI charakteristische UV-Absorptionsmaxima sowohl in Alkohol als auch in alkalischem Alkohol besitzen, die von IV verschieden sind.



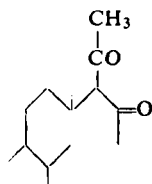
VIII



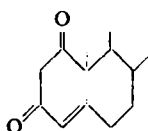
IX



X



XI



XII

⁶⁾ C. C. PORTER und R. H. SILBER, *J. biol. Chemistry* **185**, 201 [1950]; R. H. SILBER und C. C. PORTER, ebenda **210**, 923 [1954].

⁷⁾ R. H. JONES, D. HUMPHRIES und K. DOBRINER, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 956 [1950].

⁸⁾ C. W. GREENHALGH, H. B. HENBEST und E. R. H. JONES, *J. chem. Soc. [London]* **1952**, 2375.

⁹⁾ E. T. STILLER und O. ROSENHEIM, *J. chem. Soc. [London]* **1938**, 383.

¹⁰⁾ G. BERNSTEIN, H. HELLER und ST. M. STOLAR, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 5327 [1955].

Die nicht bekannte Gruppierung XII schließen wir aus Analogiegründen aus, weil dieses 1,3-Diketon in alkalischem Alkohol ebenfalls ein starkes UV-Absorptionsmaximum zwischen 280 und 320m μ haben müßte. Damit können die Carbonylgruppen unseres Pregnentetraons IV nicht an den C-Atomen 1, 2, 6, 7 und 16 stehen. Die Substitution der 15-Stellung ist durch den Ausschluß der 16-Stellung bereits indirekt bewiesen.

Zur Aufklärung der sterischen Anordnung der 15-ständigen Hydroxylgruppe und zur Festlegung der Stellung der zweiten Hydroxylgruppe der Substanz II, die entweder an C-11 oder an C-12 stehen muß, werden mikrobielle Reaktionen herangezogen.

15 β -Hydroxy-progesteron (III)⁴⁾ wird bei Einwirkung von *Calonectria decora* in fast quantitativer Ausbeute in das Dihydroxy-progesteron II umgewandelt. Bis jetzt ist in der Literatur in der Steroidreihe noch kein Fall bekannt, daß durch mikrobielle Umsetzung eine Inversion von Hydroxylgruppen stattfindet. Wir ordnen deshalb der 15-ständigen Hydroxylgruppe in II die β -Stellung zu.

Die Festlegung der zweiten Hydroxylgruppe des Dihydroxy-progesterons (II) wird experimentell indirekt dadurch bewiesen, daß in dieser Substanz die 11-Stellung nicht substituiert ist. Bei der durch *Calonectria decora* bewirkten Umwandlung des 11 α -Hydroxy-progesterons (V) wird nach den Ergebnissen der Elementaranalyse nur eine Hydroxylgruppe zusätzlich in das Molekül eingeführt. Es wird ein Dihydroxy-progesteron (VI) isoliert, dessen physikalische Konstanten sich von denen des Dihydroxy-progesterons II wesentlich unterscheiden.

Daten der dargestellten Steroide

	Schmp.	$[\alpha]_D$	IR-Banden in cm ⁻¹ (in Methylenchlorid) *)
12 β ,15 β -Dihydroxy-progesteron (II)	218°	+186° (CH ₃ OH)	3605, 1690, 1672, 1622, 1363, 1040, 870
11 α ,15 β -Dihydroxy-progesteron (VI)	182°	+180° (CH ₃ OH)	3600, 1710, 1670, 1620, 1360, 1060
Pregnen-tetraon-(3.12.15.20) (IV)	208–212°	+249° (CHCl ₃)	1748, 1712, 1676, 1622, 1362, 1168, 1110
Pregnen-tetraon-(3.11.15.20) (VII)	217–225°	+325° (CHCl ₃)	1750, 1715, 1682, 1625, 1210

Die Verbindung VI wird durch Einwirken von Chromsäureanhydrid in Eisessig bei Zimmertemperatur in ein Pregnentetraon (VII) umgewandelt, dessen UV-Spektrum in neutraler und alkalischer Alkohollösung mit dem von IV identisch ist.

Im IR-Spektrum stimmen beide Pregnentetraon-Verbindungen im Bereich der Ketobanden überein. Sie unterscheiden sich jedoch wesentlich im Fingerprintbereich. Substanz VII schmilzt um ca. 10° höher und hat eine um 76° höhere spezifische Drehung. Beide Pregnentetraon-Verbindungen (IV und VII), von denen VII in 11-Stellung substituiert ist, sind keinesfalls identisch. Verbindung VII ist Δ^4 -Pregnen-tetraon-(3.11.15.20). Das bedeutet, daß die vierte Carbonylgruppe im Pregnentetraon IV in 12-Stellung steht.

*) Sämtliche IR-Spektren wurden mit dem Zeiß-UR 10-Gerät aufgenommen.

Die sterische Zuordnung der 12(ξ)-Hydroxylgruppe von II wird unter Anwendung der Methode der molaren Rotationsdifferenzen gelöst.

M. SORKIN und T. REICHSTEIN¹¹⁾ haben die molaren Rotationsdifferenzen der in 12-Stellung epimeren 3 α ,12 β -Dihydroxy- Δ^4 -cholesterolsäure-methylester und 3 α ,12 α -Dihydroxy- Δ^4 -cholesterolsäure-methylester bestimmt. Die 12 α -Hydroxyverbindung hat $[M]_D$: +362° in Methanol und die 12 β -Hydroxyverbindung hat $[M]_D$: +182° in Methanol. Die molare Rotationsdifferenz $\Delta[M]_D$ für den Übergang der 12 α -Hydroxy- nach der 12 β -Hydroxygruppe beträgt -180°. Für den Übergang der Methylengruppe am C-Atom 12 des Sterinskeletts in die 12 α -Hydroxy-Gruppierung wird aus bekannten Verbindungen ein molarer Drehungsbeitrag von +76° in Aceton berechnet.

Für die Verbindung II wird unter Berücksichtigung des Drehungsbeitrages der 15 β -Hydroxylgruppe für die 12(ξ)-Hydroxylgruppe ein molarer Drehungsbeitrag von -90° in Methanol festgestellt. Die Hydroxylgruppe am C-Atom 12 der Verbindung II kann infolgedessen nicht die α -Stellung einnehmen. Der Unterschied zwischen dem berechneten molaren Drehungsbeitrag der 12 α -Hydroxylgruppe von +76° in Aceton und dem gemessenen Wert für die 12(ξ)-Hydroxylgruppe der Verbindung II von -90° in Methanol beträgt 166°. Dieser Wert stimmt in der Richtung und in der Größenordnung gut überein mit den von SORKIN und REICHSTEIN gemessenen Werten.

Die von uns auf mikrobiellem Wege dargestellte Verbindung II ist Δ^4 -12 β ,15 β -Dihydroxy-pregnen-dion-(3.20).

Wir danken Herrn Dr. K. HELLER und Frä. U. WAGNER für die Aufnahme der IR-Spektren, Frä. CH. DAMKER und Frä. A. WENDA für die Messung der UV-Spektren sowie für die Durchführung der präparativen Arbeiten.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1. *Fermentation*: Die mikrobiellen Umsetzungen werden in einer Rührapparatur von 6 l Inhalt, in der 4 l Nährlösung enthalten sind, durchgeführt. Die Belüftung geschieht durch eine G2-Fritte, die am Ende des hohlen Rührers angebracht ist. Belüftet wird mit 100 l Luft/Stde. bei 200 Umdrehungen des Rührers in der Minute.

Das Impfmateriel des Pilzes *Calonectria decora* wird in einem 500-ccm-Schüttelkolben auf 200 ccm der üblichen Czapek-Dox-Nährlösung, der 0.5 % Maisquellwasser zugegeben wurde, angezogen. Nach 3 bis 4 Tagen wird es unter sterilen Bedingungen in die oben beschriebene Rührapparatur auf 4 l Nährlösung übergeführt. Nach weiterem 48stdg. Wachstum werden 2 g des Ausgangsmaterials, mit 2 g Tween 80 in 50 ccm Aceton gelöst, zugegeben. Es ist zweckmäßig, die Hydroxylierung papierchromatographisch zu kontrollieren. Normalerweise ist das zugegebene Steroid nach 48stdg. Fermentation vollkommen umgesetzt.

Das Mycel wird von der Nährlösung durch Zentrifugieren getrennt, getrocknet, fein pulverisiert und mit Methylenchlorid erschöpfend extrahiert. Das Kulturfiltrat wird 4 mal mit 1.5 l Methylenchlorid extrahiert, sämtliche Extrakte werden vereinigt, getrocknet und eingeeengt.

2. *12 β ,15 β -Dihydroxy-progesteron (II)*: Aus 2 g Progesteron (I) werden nach der oben beschriebenen Methode 3 g Rohextrakt erhalten, der teilweise kristallisiert. Nach Zugabe von 5 ccm Aceton kristallisieren 1.7 g II vom Schmp. 214–216° aus. Nach Umkristallisieren aus Aceton erhält man Prismen vom Schmp. 218°.

¹¹⁾ Helv. chim. Acta 29, 1218 [1946].

Substanz II wird ebenfalls erhalten, wenn 2.0g 15 β -Hydroxy-progesteron (III) in gleicher Weise umgesetzt werden.

Zur Analyse wird 2 Stdn. bei 78° i. Vak. getrocknet. $[\alpha]_D^{25}$: +139 \pm 3° (in CHCl₃), +186 \pm 3° (in Methanol).

UV-Spektrum in Äthanol: λ_{\max} = 241 m μ (log ϵ = 4.23).

IR-Spektrum: siehe Tab.

C₂₁H₃₀O₄ (346.5) Ber. C 72.80 H 8.73 Gef. C 72.56 H 8.80

Aus den Mutterlaugen können durch Chromatographie an Silicagel und Elution mit Chloroform-Aceton-Gemisch noch 120mg II erhalten werden.

3. 11 α ,15 β -Dihydroxy-progesteron (VI): Der nach der biologischen Umsetzung aus 2g 11 α -Hydroxy-progesteron (V) erhaltene und eingeengte Extrakt kristallisiert nicht spontan. Er wird mehrmals in Chloroform gelöst, wieder eingedampft und zuletzt in 400ccm Chloroform aufgenommen. Die Lösung wird auf eine Säule gebracht, die mit 450g gut getrocknetem Silicagel beschickt ist.

Die Elution geschieht mit Chloroform-Aceton-Gemisch, bei dem der Acetongehalt ständig gesteigert wird. Jedes Eluat umfaßt 400ccm, das jeweils in mehreren Kölbchen aufgefangen wird.

Man erhält folgende Fraktionen bei:

5 % Aceton	95 % Chloroform	Öl
10 % Aceton	90 % Chloroform	Antischaummittel
15 % Aceton	85 % Chloroform	Tween 80
usw. bis		
60 % Aceton	40 % Chloroform	Kristalle

Die zusammengehörigen Fraktionen werden vereinigt und aus Essigester umkristallisiert. Man erhält vorzüglich gewachsene, stark lichtbrechende Prismen, deren Kantenlänge bis zu 4 mm beträgt. Schmp. 182—183°. Zur Analyse wird 2 Stdn. i. Vak. getrocknet. $[\alpha]_D^{25}$: +180 \pm 3° (in Methanol).

UV-Spektrum in Äthanol: λ_{\max} = 243 m μ (log ϵ = 4.21).

IR-Spektrum: siehe Tab.

C₂₁H₃₀O₄ (346.5) Ber. C 72.80 H 8.73 Gef. C 72.51 H 8.90

4. 14-Pregnen-tetraon-(3.12.15.20) (IV): 1g 12 β ,15 β -Dihydroxy-progesteron (II) wird in 15ccm 90-proz. Essigsäure gelöst, auf +10° abgekühlt und bei dieser Temperatur mit 4 Äquivv. CrO₃ in 10ccm Essigsäure versetzt. Nach 6stdg. Rühren bei 10° wird unter Turbinieren mit NaHCO₃-Lösung die Essigsäure weitgehend abgestumpft, so daß die Lösung noch schwach sauer ($p_H \approx 6$) reagiert. Man extrahiert mehrmals mit Essigester oder Chloroform, wäscht die vereinigten organischen Phasen mit Wasser, trocknet über Na₂SO₄ und engt i. Vak. ein. Der teilweise kristalline Rückstand beträgt 0.78 g. Er wird in Isopropylalkohol aufgenommen und zur Kristallisation bei -10° stehengelassen. Man erhält 0.65g vom Schmp. 204—211°. Aus der Mutterlauge werden weitere 0.05g vom Schmp. 198—202° isoliert. Nach nochmaliger Umkristallisation beider Kristallfraktionen aus Isopropylalkohol schmilzt die Substanz bei 208—212°. Zur Analyse wird 2 Stdn. bei 78° i. Vak. getrocknet. $[\alpha]_D^{25}$: +249 \pm 3° (in Chloroform).

UV-Spektrum in Äthanol: λ_{\max} = 238 m μ (log ϵ = 4.20).

IR-Spektrum: siehe Tab.

C₂₁H₂₆O₄ (342.4) Ber. C 73.66 H 7.65 Gef. C 73.69 H 7.73

5. *14-Pregnen-tetraon-(3.11.15.20) (VII)*: 305 mg *11 α ,15 β -Dihydroxy-progesteron (VI)* werden in 3.05 ccm 80-proz. Essigsäure gelöst, auf +15° abgekühlt, mit 1.22 ccm Chromsäurelösung versetzt und 4 Stdn. bei dieser Temperatur oxydiert. Nach der unter IV beschriebenen Aufarbeitung werden aus Isopropylalkohol farblose Kristalle vom Schmp. 217–225° erhalten. Die Ausbeute beträgt 160 mg. Zur Analyse wird 2 Stdn. i. Vak. getrocknet. $[\alpha]_D^{25}$: +325 \pm 3° (in Chloroform).

UV-Spektrum in Äthanol: λ_{\max} = 238 m μ ($\log \epsilon$ = 4.18).

IR-Spektrum: siehe Tab.

C₂₁H₂₆O₄ (342.4) Ber. C 73.66 H 7.65 Gef. C 73.42 H 7.70

WOLFGANG PFLEIDERER

Pteridine, I

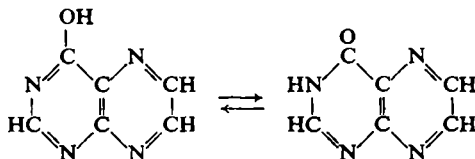
ÜBER 2,4-DIOXO-TETRAHYDROPTERIDINE *)

Aus dem Institut für Organische Chemie und Organisch-Chemische Technologie der Technischen Hochschule Stuttgart

(Eingegangen am 3. Juli 1957)

Es wird gezeigt, daß das Lumazin in wäßrigem Medium als 2,4-Dioxo-tetrahydropteridin zu formulieren ist. Die Ionisation der H-Atome erfolgt in erster Stufe vom N-1- und in zweiter vom N-3-Atom.

Die Atomanordnung im Pteridinmolekül hat zur Folge, daß sich in den Mono- und Polyhydroxyderivaten die Hydroxygruppen stets in α -Stellung zu einem Ringstickstoffatom befinden. Die Hydroxypteridine stellen demzufolge cyclische Säureamide dar, deren Struktur naturgemäß das Problem der Lactam-Lactim-Tautomerie der Carbonsäureamide aufwirft.



Da die Monohydroxypteridine¹⁻⁵⁾ schon eingehend untersucht worden sind, haben wir unsere Untersuchungen am Lumazin, dem 2,4-Dihydroxy-pteridin (I), begonnen, mit dem Ziel, die Struktur des Neutalmoleküls in wäßrigem Medium sowie die Reihenfolge der Ionisation der H-Atome zu bestimmen. Die Darstellung sämtlicher

*) Wir verwenden die international eingeführte amerikanische Bezifferung des Pteridin-systems.

1) A. ALBERT, D. J. BROWN und G. CHEESEMAN, J. chem. Soc. [London] **1951**, 474.

2) A. ALBERT, D. J. BROWN und G. CHEESEMAN, J. chem. Soc. [London] **1952**, 1620.

3) A. ALBERT, D. J. BROWN und G. CHEESEMAN, J. chem. Soc. [London] **1952**, 4219.

4) A. ALBERT, D. J. BROWN und H. C. S. WOOD, J. chem. Soc. [London] **1956**, 2066.

5) D. J. BROWN und S. F. MASON, J. chem. Soc. [London] **1956**, 3443.