

## 181. Mikrobiologische Hydroxylierung von Steroiden in der 17 $\alpha$ - und 21-Stellung<sup>1)</sup>.

Mikrobiologische Reaktionen, 4. Mitteilung<sup>2)</sup>

von Ch. Meystre, E. Vischer und A. Wettstein.

(30. VI. 54.)

Seitdem Peterson und Mitarbeiter<sup>3)</sup><sup>4)</sup> zeigen konnten, dass gewisse Pilze die Fähigkeit besitzen, Hydroxylgruppen am Kohlenstoffatom 11 des Steroidgerüstes einzuführen, hat die Methode zur mikrobiologischen Hydroxylierung in der Steroidchemie grosse und auch praktische Bedeutung erlangt. Die Mehrzahl der Mikroorganismen scheint die 11 $\alpha$ - und die 6 $\beta$ -Stellung zu bevorzugen<sup>3)</sup><sup>4)</sup>, doch wurden auch Hydroxylierungen in 7 $\beta$ -<sup>5)</sup>, 8-<sup>4)</sup>, 11 $\beta$ -<sup>3)</sup><sup>4)</sup><sup>7)</sup><sup>8)</sup><sup>9)</sup>, 14 $\alpha$ -<sup>4)</sup><sup>10)</sup> und 16 $\alpha$ -Stellung<sup>2)</sup><sup>11)</sup> beschrieben.

Bis jetzt konnte also von den wirkungsmässig ausschlaggebenden Hydroxylierungen in 11 $\beta$ -, 17 $\alpha$ - und 21-Stellung<sup>12)</sup>, wie sie offenbar bei der Biosynthese der Hormone in der Nebenniere erfolgen, nur die erstere auf mikrobiologischem Wege durchgeführt werden.

Wir haben nun Pilzstämme gefunden, die imstande sind, C<sub>21</sub>-Steroide einerseits in der 17 $\alpha$ -Stellung und anderseits in der 21-Stellung zu hydroxylieren. Nach den botanischen Befunden<sup>13)</sup> handelt es sich

<sup>1)</sup> 123. Mitt. „Über Steroide“; wird vorgetragen am 4. Juli 1954 vor der Schweiz. Gesellschaft für Endokrinologie in Zürich. 122. Mitt. siehe A. Wettstein, F. W. W. Kahnt & R. Neher, CIBA Colloquio on Endocrinol. **8**, im Druck.

<sup>2)</sup> 3. Mitt. s. Helv. **37**, 321 (1954).

<sup>3)</sup> Übersichtsreferat D. H. Peterson, Research **6**, 309 (1953).

<sup>4)</sup> H. C. Murray & D. H. Peterson, U. S. Patent 2,602,769 (1952).

<sup>5)</sup> A. Kramli & J. Horvath, Nature **162**, 619 (1948).

<sup>6)</sup> F. W. Kahnt, Ch. Meystre, R. Neher, E. Vischer & A. Wettstein, Exper. **8**, 422 (1952).

<sup>7)</sup> G. M. Shull, R. Heights, D. A. Kita, J. Heights & J. W. Davison, U. S. Patent 2,658,023 (1953).

<sup>8)</sup> D. R. Colingsworth, J. N. Karnaemaaat, F. R. Hanson, M. P. Brunner, K. M. Mann & W. J. Haines, J. Biol. Chem. **203**, 807 (1953).

<sup>9)</sup> F. R. Hanson, K. M. Mann, E. D. Nielson, H. V. Anderson, M. P. Brunner, J. N. Karnaemaaat, D. R. Colingsworth & W. J. Haines, Am. Soc. **75**, 5369 (1953).

<sup>10)</sup> P. D. Meister, S. H. Eppstein, D. H. Peterson, H. C. Murray, H. M. Leigh, A. Weintraub & L. M. Reineke, Abstr. 123<sup>rd</sup> Meet. Amer. Chem. Soc. 1953, 5C.

<sup>11)</sup> D. Perlmann, E. Titus & J. Fried, Am. Soc. **74**, 2126 (1952).

<sup>12)</sup> Vgl. R. I. Dorfman & F. Ungar, Metabolism of Steroid Hormones, Minneapolis 1953, Tab. 14, 15, 19 und 21.

<sup>13)</sup> Wir danken den Herren Prof. Gämänn und Dr. Ettlinger, Zürich, bestens für die Überlassung und Bestimmung dieser Stämme.

bei den wirksamsten in  $17\alpha$ -Stellung hydroxylierenden Stämmen um Vertreter der den Fungi imperfecti zugezählten Familie der Moniliaceae, insbesondere um Trichothecien wie *Trichothecium roseum*. Bei der aeroben Einwirkung von Schüttelkulturen dieser Pilze auf *Cortexon* (11-Desoxy-corticosteron) erhielten wir neben unverändertem Ausgangsmaterial und dem bekannten  $6\beta$ -Oxy-cortexon<sup>1)</sup> in über 20-proz. Ausbeute  $17\alpha$ -Oxy-cortexon (*Reichstein's Substanz S*). Das Gemisch liess sich mittels Chromatographie an Silicagel auftrennen. Die Reaktionsprodukte wurden im allgemeinen durch Misch-Smp., Analyse, Drehung und IR.-Spektren der freien Verbindungen und ihrer Acetate identifiziert.

Auf gleiche Weise wurde aus 11-Dehydro-corticosteron *Cortison* erhalten und aus *Corticosteron*  $17\alpha$ -Oxy-corticosteron (*Reichstein's Substanz M*), neben *Cortison*. Bei letzterem handelt es sich wahrscheinlich um ein sekundäres Reaktionsprodukt, wie es auch schon bei entsprechenden  $11\beta$ -Hydroxylierungen beobachtet worden ist.

Die Anwesenheit einer Hydroxylgruppe in  $11\alpha$ -Stellung scheint diese neue mikrobiologische Reaktion eher ungünstig zu beeinflussen. So wurden  $11\alpha$ -Oxy-cortexon und  $11\alpha$ -Oxy-progesteron durch Kulturen von *Trichothecium roseum* nur langsam umgesetzt. Die Reaktion bei der Inkubation von Progesteron verlief ziemlich uneinheitlich.

Die Stämme, die am Kohlenstoffatom 21 eine Hydroxylgruppe einführen, gehören zu den Ascomyceten und sind hauptsächlich Vertreter der Familie der *Scolecosporae*, wie *Ophiobolus herbotrichus*. Bei dreitägiger Inkubation bei  $27^\circ$  in Schüttelkulturen dieser Stämme wurde Progesteron schon in den ersten Versuchen in über 60-proz. Ausbeute in *Cortexon* übergeführt. Daneben konnten wir noch unverändertes Ausgangsmaterial isolieren. Weiter wurden auf diese Weise unter anderem 11-Dehydro-corticosteron (*Kendall's Compound A*) aus 11-Keto-progesteron und  $17\alpha$ -Oxy-cortexon (*Reichstein's Substanz S*) aus  $17\alpha$ -Oxy-progesteron gebildet. Besonders bemerkenswert ist, dass bei dieser mikrobiologischen Umsetzung keine Nebenprodukte entstehen. Offenbar werden Steroide mit einer Hydroxylgruppe in 21-Stellung dabei nicht angegriffen. So blieb *Cortexon* bei der Einwirkung solcher Schüttelkulturen völlig unverändert.

Unter Verwendung der eingangs genannten Hydroxylierungen in 11-Stellung sowie der beschriebenen neuen mikrobiologischen Reaktionen sind nun äusserst einfache Synthesen für Nebennierenrinden-Hormone möglich geworden. Ausgehend vom heute besonders leicht zugänglichen Progesteron erhält man so z. B. *Cortison* in nur

<sup>1)</sup> P. T. Herzig & M. Ehrenstein, J. Org. Chem. **16**, 1050 (1951); S. H. Eppstein, P. D. Meister, D. H. Peterson, H. C. Murray, H. M. Leigh, D. A. Lytle, L. M. Reineke & A. Weintraub, Am. Soc. **75**, 408 (1953); W. J. Haines, Recent Progress in Hormone Research **7**, 282 (1952).

vier Stufen. Dabei wird Progesteron zuerst auf mikrobiologischem Wege in  $11\alpha$ -Oxy-progesteron übergeführt, das man mit Chromsäure zum  $11$ -Keto-progesteron oxydiert. Dieses lässt sich nun wieder mikrobiologisch zuerst in der  $21$ -Stellung und dann in der  $17\alpha$ -Stellung hydroxylieren, wobei Cortison entsteht. Noch einfacher, in nur 3 mikrobiologischen Stufen, verläuft die Umwandlung von Progesteron über Cortexon und Substanz S in Hydrocortison.

Die neuen enzymatischen Umsetzungen auf mikrobiologischem Wege scheinen zum mindesten im Endeffekt denjenigen bei der Biosynthese der Hormone in der Nebennierenrinde weitgehend zu entsprechen. Offenbar sind diese Enzymsysteme der Mikroorganismen aber weniger spezifisch als diejenigen der endokrinen Drüsen der Säugetiere, was präparative Vorteile bietet. So greift die besonders in den Nebennieren und Testes enthaltene  $17\alpha$ -Hydroxylase  $11\beta$ -hydroxylierte sowie  $21$ -hydroxylierte Pregnanverbindungen kaum mehr an<sup>1)</sup>. Diese Einschränkung gilt nicht für unsere mikrobiologische  $17\alpha$ -Hydroxylierung.

### Experimenteller Teil<sup>2)</sup>.

$17\alpha$ -Oxy-cortexon und  $6\beta$ -Oxy-cortexon aus Cortexon: 2 l einer *Czapek-Dox*-Nährlösung wurden in einem Schüttelgefäß sterilisiert (pH 6,8) und mit einem Stamm *Trichothecium roseum* beimpft. Nach 48- bis 96-stündigem Schütteln bei  $27^\circ$  wurde zu der gut entwickelten Kultur unter sterilen Bedingungen eine Lösung von 500 mg Cortexon in  $15\text{ cm}^3$  Aceton zugegeben, worauf man noch weitere 60 Std. bei der gleichen Temperatur schüttelte. Dann wurde das Mycel abgetrennt und das Kulturfiltrat (pH 5,1) mehrmals mit Essigester (total 2 l) ausgeschüttelt. Die Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Den Rückstand (620 mg) chromatographierte man an 9 g Silicagel, wobei zu Beginn mit reinem Chloroform, dann mit Chloroform-Aceton-Gemischen mit steigendem Acetongehalt eluiert wurde. Die ersten Fraktionen [Chloroform und Chloroform-Aceton (95:5)] enthielten neben Ausgangsmaterial nur Verunreinigungen, während man aus den ersten mit Chloroform-Aceton (9:1) eluierten Fraktionen nach dem Eindampfen 140 mg eines Rückstandes erhielt, der zur Hauptsache  $17\alpha$ -Oxy-cortexon enthielt. Er gab mit konz. Schwefelsäure die charakteristische karminrote Färbung und kristallisierte aus Aceton-Äther in Prismen vom Smp. 202-213°. Misch-Smp. mit authentischem  $17\alpha$ -Oxy-cortexon ohne Erniedrigung. Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei  $100^\circ$  getrocknet.  $[\alpha]_D^{23} = +132^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 0,885$  in Chloroform).



*Acetat*. Zur weiteren Charakterisierung wurden 20 mg der obigen Substanz mit Acetanhydrid-Pyridin bei  $20^\circ$  umgesetzt. Das in üblicher Weise aufgearbeitete Acetat kristallisierte aus Aceton in Nadeln vom Smp. 236-241°, die mit authentischem  $17\alpha$ -Oxy-cortexon-21-acetat keine Smp.-Erniedrigung zeigten.

Die weiteren Eluate mit Chloroform-Aceton (9:1) gaben nach dem Eindampfen 190 mg eines Rückstandes, aus dem durch Kristallisation aus Aceton 47 mg Prismen erhalten wurden. Sie gaben mit konz. Schwefelsäure eine Gelbfärbung und grüne Fluores-

<sup>1)</sup> *J. E. Plager & L. T. Samuels*, Feder. Proc. **12**, 357 (1953).

<sup>2)</sup> Die Smp. sind auf dem *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert.

zenz. Zur Analyse wurden sie bei 135° im Hochvakuum getrocknet.  $[\alpha]_D^{27} = +97^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 0,598$  in Chloroform).



Diese Daten stimmen mit denjenigen des  $6\beta$ -Oxy-cortexons überein.

**Diacetat.** 20 mg der Substanz wurden in Acetanhydrid-Pyridin 20 Std. bei 20° acetyliert. Nach der Aufarbeitung wurde das Acetat aus Hexan kristallisiert. Es schmolz bei 94°, erstarrte wieder zu hexagonalen Platten, die endgültig bei 128° schmolzen. Beim Umkristallisieren aus Äther-Pentan-Gemischen erhielt man direkt die hochschmelzenden Kristalle. Vor der Analyse wurde die Substanz im Schiffchen bei 130° im Hochvakuum getrocknet.



Das Diacetat erwies sich nach Smp., Mischprobe und Infrarotspektrum als identisch mit authentischem Diacetat von  $6\beta$ -Oxy-cortexon<sup>1</sup>).

**Cortison aus 11-Dehydro-corticosteron:** Zu einer 4 Tage alten, gut entwickelten Schüttelkultur von *Trichothecium roseum* in 600 cm<sup>3</sup> Bierwürze, enthaltend 6 g Calciumcarbonat, wurde unter sterilen Bedingungen eine Lösung von 150 mg 11-Dehydro-corticosteron in 2 cm<sup>3</sup> Aceton gegeben, worauf die Kultur weiter bei 27° geschüttelt wurde. Nach 48 Std. wurde abgenutscht. Wie oben beschrieben schüttelte man das Kulturfiltrat mit insgesamt 600 cm<sup>3</sup> Essigester aus und chromatographierte den erhaltenen Extraktionsrückstand (280 mg) an 9 g Silicagel (Elution mit Chloroform und Chloroform-Aceton-Gemischen). Die einzelnen Fraktionen wurden papierchromatographisch untersucht<sup>2</sup>). Die mit Chloroform-Aceton (10:1) eluierten Fraktionen enthielten Ausgangsmaterial (aus Äther Rhomben vom Smp. 173–184°; Misch-Smp. mit 11-Dehydro-corticosteron gleich). In weiteren Chloroform-Aceton-Eluaten wurde Cortison festgestellt. Diese Fraktionen wurden vereinigt und eingedampft. Man erhielt rohes Cortison, das durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Äther und Aceton-Isopropyläther-Gemischen gereinigt wurde. Das reine Cortison schmolz bei 206–216° und zeigte mit authentischem Material keine Smp.-Depression. Auch waren die Infrarotspektren identisch.

**17 $\alpha$ -Oxy-corticosteron und Cortison aus Corticosteron:** 500 mg Corticosteron wurden wie oben beschrieben 60 Std. mit einer Kultur von *Trichothecium roseum* in 4 l Bierwürze unter Schütteln bei 27° inkubiert. Die Extraktion des Kulturfiltrates und die Chromatographie des gewonnenen Extraktionsrückstandes (1,10 g) an 20 g Silicagel geschah in bekannter Weise. Mit den Chloroform- und den ersten Chloroform-Aceton-Eluaten konnten 490 mg Verunreinigungen abgetrennt werden. Durch Elution mit Chloroform-Aceton (9:1) wurden 160 mg eines Rückstandes erhalten, der aus Äther kristallisierte und nach Smp. (180–184°) und Mischprobe, sowie gemäss dem Verhalten im Papierchromatogramm, mit Ausgangsmaterial identisch war.

Die weiteren Fraktionen [Chloroform-Aceton (8:2)] gaben nach dem Eindampfen 260 mg eines Gemisches, das durch Kristallisation nicht aufgetrennt werden konnte. Darum wurden 60 mg davon einer präparativen Papierchromatographie unterworfen<sup>3</sup>), wobei neben Ausgangsmaterial die Anwesenheit von Cortison und 17 $\alpha$ -Oxy-corticosteron, sowie von einer dritten Substanz festgestellt wurde, die in ihrer Polarität zwischen den beiden letzteren lag. Die diese Steroide enthaltenden Papierzonen wurden ausgeschnitten und mit 50-proz. Methanol extrahiert. Nach Filtration engte man im Vakuum ein und schüttelte den Rückstand mit Essigester aus. Die Extrakte wurden mit Wasser gewaschen,

<sup>1)</sup> Herrn Prof. Ehrenstein sei auch an dieser Stelle für die Überlassung einer Probe von  $6\beta$ -Oxy-cortexon-diacetat bestens gedankt.

<sup>2)</sup> R. Neher & A. Wettstein, Helv. 35, 276 (1952). System Propylenglykol-Toluol, s. R. B. Burton, A. Zaffaroni & E. H. Keutmann, J. Biol. Chem. 188, 763 (1951).

<sup>3)</sup> System C, siehe I. E. Bush, Biochem. J. 50, 370 (1952).

getrocknet und im Vakuum eingedampft. Man erhielt so Ausgangsmaterial, Cortison,  $17\alpha$ -Oxy-corticosteron und die dritte, nicht identifizierte Substanz, getrennt als Rohkristallisate.

Das erhaltene *Cortison* wurde aus wenig Aceton unter Zusatz von Äther umkristallisiert und schmolz bei  $206-216^\circ$ . Es gab im Gemisch mit authentischem Material keine Smp.-Erniedrigung und war auch im Infrarotspektrum identisch mit Cortison.

Das erhaltene  $17\alpha$ -Oxy-corticosteron wies nach Umkristallisieren aus Äther einen Smp. von  $202-210^\circ$  auf, der im Gemisch mit authentischem Material unverändert war. Der Vergleich des Infrarotspektrums der isolierten Substanz mit demjenigen von  $17\alpha$ -Oxy-corticosteron bestätigte die Identität.

Die dritte, noch nicht identifizierte Substanz wurde aus Äther umkristallisiert und schmolz dann bei  $196-214^\circ$ .

*Cortexon aus Progesteron*: 4 l Bierwürze wurden in einem Schüttelgefäß sterilisiert (pH 5,9) und mit einem Stamm von *Ophiobolus herbotrichus* beimpft. Nach dreitägigem Schütteln bei  $27^\circ$  gab man zur gut entwickelten Kultur unter sterilen Bedingungen eine Lösung von 1,0 g Progesteron in  $25 \text{ cm}^3$  Aceton zu und liess weiter bei der gleichen Temperatur schütteln. Nach 3 Tagen wurde das Mycel abgetrennt und das Kulturfiltrat (pH 6,4) erschöpfend mit insgesamt 1,5 l Essigester ausgeschüttelt. Die Extrakte wurden mit 0,1-n. Salzsäure, 2-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand (1,1 g) wurde an 30 g alkalifreiem Aluminiumoxyd nach der Durchlaufmethode chromatographiert, wobei man mit Benzol, Äther, Äther-Essigester-Gemischen und schliesslich mit Essigester eluierte. Die einzelnen Fraktionen (je  $100 \text{ cm}^3$ ) wurden eingedampft und papierchromatographisch untersucht. Die Benzolfraktionen enthielten nur Ausgangsmaterial (248 mg), während aus den mit Äther und Äther-Essigester (9:1) eluierten Lösungen 609 mg einheitliches Cortexon erhalten wurden. Es wurde aus Äther-Pentan umkristallisiert und schmolz dann bei  $140-142^\circ$ . Die Mischprobe mit authentischem Material sowie das Infrarotspektrum bestätigten die Identität unserer Substanz mit Cortexon.

*11-Dehydro-corticosteron aus 11-Keto-progesteron*: 150  $\text{cm}^3$  Bierwürze wurden sterilisiert, mit *Ophiobolus herbotrichus* beimpft und in einem *Erlenmeyer*-Kolben von  $500 \text{ cm}^3$  Fassungsvermögen bei  $27^\circ$  mechanisch geschüttelt. Nach 5 Tagen hatte sich die Kultur gut entwickelt. Man gab unter sterilen Bedingungen eine Lösung von 30 mg 11-Keto-progesteron in  $1,5 \text{ cm}^3$  Aceton zu und schüttelte weitere 4 Tage bei der gleichen Temperatur. Dann filtrierte man und extrahierte das Kulturfiltrat wie beschrieben mit Essigester. Der Extraktionsrückstand (45 mg) bestand gemäss der papierchromatographischen Untersuchung überwiegend aus 11-Dehydro-corticosteron. Er wurde mittels eines präparativen Papierchromatogramms<sup>1)</sup> aufgetrennt. Die Elution, die wie früher beschrieben durchgeführt wurde, gab 16 mg eines einheitlichen Kristallisates. Durch Umkristallisieren aus einem Aceton-Isopropyläther-Gemisch wurde das 11-Dehydro-corticosteron rein erhalten. Es zeigte einen Smp. von  $170-176^\circ$ , der im Gemisch mit authentischem Material unverändert blieb. Das IR.-Spektrum bestätigte die Identität.

*17 $\alpha$ -Oxy-cortexon aus 17 $\alpha$ -Oxy-progesteron*: Zu  $50 \text{ cm}^3$  einer Kultur von *Ophiobolus herbotrichus* gab man unter sterilen Bedingungen eine Lösung von 10 mg  $17\alpha$ -Oxy-progesteron in  $0,5 \text{ cm}^3$  Aceton. Nach dreitägigem Schütteln bei  $27^\circ$  wurde das Mycel abgetrennt und das Kulturfiltrat mit Essigester extrahiert. Die papierchromatographische Prüfung des Extraktionsrückstandes zeigte die Anwesenheit von  $17\alpha$ -Oxy-cortexon neben wenig Ausgangsmaterial.

Die Analysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium unter der Leitung von Herrn Dr. *H. Gysel* durchgeführt. Die IR.-Spektren verdanken wir Herrn Dr. *E. Ganz*.

<sup>1)</sup> System B1, siehe *I. E. Bush*, Biochem. J. **50**, 370 (1952).

## SUMMARY.

Some fungi, especially strains of the genus *Trichothecium* were found to be able of introducing a hydroxy group into the  $17\alpha$ -position of the steroid molecule. By means of this microbiological process, cortexone was converted into  $17\alpha$ -hydroxy-cortexone (*Reichstein's* substance S), 11-dehydro-corticosterone into cortisone, and finally corticosterone into  $17\alpha$ -hydroxy-corticosterone (hydrocortisone) and cortisone.

By the action of other fungi, especially strains of the genus *Ophiobolus* (*Scolecosporae*), steroids are hydroxylated in the 21-position. In this way cortexone could be obtained from progesterone in good yield and without formation of byproducts. 11-Keto-progesterone was converted into 11-dehydro-corticosterone and  $17\alpha$ -hydroxy-progesterone into  $17\alpha$ -hydroxy-cortexone.

Applying several microbiological hydroxylations, cortisone can now be obtained from progesterone in four and hydrocortisone in only three steps.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel,  
Pharmazeutische Abteilung.

---

## 182. Zur Kenntnis der Triterpene.

179. Mitteilung<sup>1)</sup>.

### Über die gegenseitigen Beziehungen bei Elemadienolsäure, Tirucalladienol und Euphorbadienol

von D. Arigoni, H. Wyler und O. Jeger.

(30. VI. 54.)

Vor fünf Jahren berichteten *D. W. Haines & F. L. Warren*<sup>2)</sup> über die Isolierung eines neuen tetracyclischen, sekundären Alkohols  $C_{30}H_{50}O$  aus dem Harz von *Euphorbium tirucalli*. Die als Tirucalladienol bezeichnete Verbindung lieferte bei der katalytischen Hydrierung das Dihydro-Derivat Tirucallenol (Smp. 150–151°,  $[\alpha]_D + 3^\circ$ , gemessen in Benzol), dessen Acetat bei 147–149° schmilzt und eine spez. Drehung von – 11,6° (in Benzol) aufweist. Die Konstanten der beiden Präparate sind praktisch identisch mit den Werten, welche vor zwölf Jahren

---

<sup>1)</sup> 178. Mitt., Soc. 1954, im Druck.

<sup>2)</sup> Soc. 1949, 2554.