

180. Herstellung weiterer 1-Dehydro-steroiden auf mikrobiologischem Wege¹⁾.

Mikrobiologische Reaktionen, 7. Mitteilung²⁾

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

(27. VIII. 55.)

In zwei Mitteilungen haben wir bereits über die mikrobiologische Herstellung von 1-Dehydro-steroiden aus Δ^4 -3-Keto-steroiden mittels Arten der Gattungen *Fusarium*, *Clonectria*, *Ophiobolus* und *Alternaria* berichtet²⁾³⁾ und eine Reihe von neuen 1-Dehydro-Verbindungen beschrieben⁴⁾. Solche Substanzen besitzen biologische Wirkungen⁵⁾, die sich in charakteristischer Weise von denjenigen der entsprechenden, in 1,2-Stellung gesättigten Δ^4 -3-Keto-steroiden unterscheiden. Soeben beschreiben nun auch *Nobile* und Mitarb.⁶⁾ die Gewinnung von sechs 1-Dehydro-steroiden, von denen vier bereits von uns auf mikrobiologischem Wege erhalten worden waren, durch Einwirkung einer Kultur von *Corynebacterium simplex*.

Dies veranlasst uns, die Herstellung bekannter sowie neuer $\Delta^{1,4}$ -3-Keto-diene unter der Einwirkung von Pilzstämmen der Gattung *Didymella* auf Δ^4 -3-Keto-steroiden zu veröffentlichen. Die Umsetzungen mit diesen Mikroorganismen verliefen praktisch vollständig, wobei nur in seltenen Fällen geringe Mengen von Nebenprodukten beobachtet wurden. Dadurch liess sich die Aufarbeitung der Extrakte wesentlich vereinfachen. Besonders im Falle der Nebennierenrinden-Hormone wurden sehr hohe Ausbeuten erzielt.

Progesteron, Cortexon (11-Desoxy-corticosteron), Corticosteron, 17α -Oxy-cortexon (*Reichstein's* Substanz S) und Cortison wurden durch 1–3 tägige Inkubation, beispielsweise mit *Didymella lycopersici* *Kleb.*, in die entsprechenden 1-Dehydro-Verbindungen über-

¹⁾ 133. Mitt.: „Über Steroide“, Auszug eines Vortrages vom 16. IX. 55 anlässlich der 128. Tagung der Amer. Chem. Gesellschaft, Minneapolis, Minn. 132. Mitt. siehe *J. Schmidlin, G. Anner, J.-R. Billeter & A. Wettstein*, *Experientia* **11**, 365 (1955).

²⁾ 6. Mitt. siehe *Helv.* **38**, 835 (1955).

³⁾ *E. Vischer & A. Wettstein*, *Experientia* **9**, 371 (1953).

⁴⁾ Das 1-Dehydro- 17α -oxy-cortexon, das wir versehentlich als bekannt angegeben hatten²⁾, war tatsächlich noch neu, worauf uns Herr Dr. *Rosenkranz* freundlicherweise aufmerksam macht. *G. Rosenkranz, J. Pataki, St. Kaufmann, J. Berlin & C. Djerassi*, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 4081 (1950), beschrieben nämlich nur das entsprechende 21-Monoacetat, dessen Eigenschaften mit denjenigen unseres Acetates übereinstimmen. Fussnoten 5 und 6 auf Seite 835 unserer genannten Arbeit sind demnach zu streichen.

⁵⁾ *J. J. Bunin, M. M. Pechet & A. J. Bollet*, *J. Amer. med. Ass.* **157**, 311 (1955).

⁶⁾ *A. Nobile, W. Charney, P. L. Perlman, H. L. Herzog, C. C. Payne, M. E. Tully, M. A. Jevnik & E. B. Hershberg*, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 4184 (1955).

dehydro-17 α -methyl-corticosteron (Va) beziehungsweise das 1;6-Bisdehydro-cortexon (VIa). Unter unseren Versuchsbedingungen wurde die 21-Acetoxy-gruppe völlig hydrolytisch gespalten.

Die physikalischen Daten der neuen Verbindungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Ihre Konstitution wurde wiederum wie folgt bewiesen:

1. Bei der Papierchromatographie in verschiedenen Systemen zeigten sie höhere Polarität als die entsprechenden, in 1,2-Stellung gesättigten Substanzen.

Tabelle 1.

	Smp.	$[\alpha]_D$	UV _{max}
1-Dehydro-17 α -methyl-testosteron (I) . . .	163-164 ^o	0 ^o (CHCl ₃)	245 m μ
1-Dehydro-anhydro-oxy-progesteron (II)	228-233 ^o	- 17 ^o (CHCl ₃)	244 m μ
1;11-Bisdehydro-progesteron (III) . . .	166-168 ^o	+ 112 ^o (Aceton)	245 m μ
1;11-Bisdehydro-17 α -methyl-corticosteron (Va)	183-186 ^o	+ 120 ^o (C ₂ H ₅ OH)	240 m μ
21-Acetat Vb	198-201 ^o	+ 135 ^o (CHCl ₃)	240 m μ
21-O-Acetyl-1;6-bisdehydro-cortexon . .	158-162 ^o	+ 123 ^o (C ₂ H ₅ OH)	223, 256 u. 300 m μ

Tabelle 2

	M _D	Mol. Drehungsbeitrag der 1,2-Doppelbindung
1-Dehydro-17 α -oxy-corticosteron	+ 356 (Dioxan)	- 213
17 α -Oxy-corticosteron (Hydrocortison)	+ 569 (Dioxan)	
1-Dehydro-17 α -methyl-testosteron (I)	0 (CHCl ₃)	- 230
17 α -Methyl-testosteron	+ 230 (CHCl ₃)	
1-Dehydro-anhydro-oxy-progesteron (II)	- 57 (CHCl ₃)	- 170
Anhydro-oxy-progesteron	+ 113 (CHCl ₃)	
1;11-Bisdehydro-progesteron (III)	+ 348 (Aceton)	- 221
11-Dehydro-progesteron	+ 569 (Aceton)	
1;11-Bisdehydro-17 α -methyl-corticosteron (Va)	+ 428 (C ₂ H ₅ OH)	- 110(!)
11-Dehydro-17 α -methyl-corticosteron	+ 538 (C ₂ H ₅ OH)	
21-O-Acetyl-1;6-bisdehydro-cortexon (VIb)	+ 453 (C ₂ H ₅ OH)	- 138
21-O-Acetyl-6-dehydro-cortexon	+ 591 (C ₂ H ₅ OH)	

2. Natronlauge-UV-Fluoreszenz-Test¹⁾ negativ.

3. IR.-Banden bei 5,98–6,04 μ , 6,13–6,18 μ und 6,21–6,25 μ^2).

4. UV.-Absorptionsmaxima bei 243–245 m μ^3) (1;11-Bisdehydro-17 α -methyl-corticosteron und 1-Dehydro-9 α -fluor-17 α -oxy-corticosteron

¹⁾ I. E. Bush, Rec. Progr. Hormone Research **9**, 321 (1954).

²⁾ R. N. Jones & K. Dobriner, Vitamins and Hormones **7**, 293 (1949); R. N. Jones & F. Herling, J. org. Chemistry **19**, 1252 (1954).

³⁾ C. Djerassi & E. Ryan, J. Amer. chem. Soc. **71**, 1000 (1949).

bei 240 m μ und 21-O-Acetyl-1;6-bisdehydro-cortexon bei 223, 256 und 300 m μ).

5. Der molekulare Drehungsbeitrag der 1,2-Doppelbindung betrug rund -220 , in Übereinstimmung mit unseren früheren Befunden¹⁾. Das 1-Dehydro-anhydro-oxy-progesteron, das 21-O-Acetyl-1;6-bisdehydro-cortexon, sowie insbesondere das 1;11-Bisdehydro-17 α -methyl-corticosteron wiesen einen kleineren Wert auf, wie er auch für das 1-Dehydro-cortison gefunden worden war.

Über die biologischen Wirkungen der neuen 1-Dehydro-steroiden wird an anderer Stelle berichtet werden.

Experimenteller Teil²⁾.

1-Dehydro-cortison: 21 Nährlösung, enthaltend auf 1 l Leitungswasser 2 g Natriumnitrat, 1 g prim. Kaliumorthophosphat, 0,5 g Magnesiumsulfat-heptahydrat, 0,5 g Kaliumchlorid, 50 g Glucose und 1 g Difco-Hefeextrakt, wurden auf pH 5 eingestellt, in einem Schüttelgefäß sterilisiert (pH 5,1) und mit einer Kultur von *Didymella lycopersici* *Kleb.* beimpft. Nach 24stündigem Schütteln bei 27° hatte sich die Kultur gut entwickelt, und man gab dann unter sterilen Bedingungen eine Lösung von 2 g Cortison in 40 cm³ Methanol zu, worauf weiter geschüttelt wurde. Nach 2½ Tagen trennte man das Mycel ab und wusch es mit Wasser und Essigester. Die vereinigten Filtrate wurden mit Essigester ausgezogen und die Extrakte gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der so erhaltene, kristalline Extraktionsrückstand enthielt gemäss der papierchromatographischen Untersuchung nur 1-Dehydro-cortison und kein Cortison. Es wurde aus Aceton umkristallisiert, wobei man sofort reines 1-Dehydro-cortison vom Smp. 226–232° u. Z. erhielt. Die Mischprobe, das papierchromatographische Verhalten und das IR-Spektrum bewiesen die Identität mit 1-Dehydro-cortison³⁾.

21-Trimethylacetat: Zu einer Lösung von 1 g 1-Dehydro-cortison in 20 cm³ Chloroform und 6 cm³ Pyridin gab man bei -10° langsam eine Lösung von 1 cm³ Trimethylacetylchlorid in 9 cm³ Chloroform. Nach vierstündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde das Gemisch auf Eis gegossen und mit Chloroform ausgezogen. Die vereinigten Extrakte wusch man mit 2-n. H₂SO₄, gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser, trocknete sie und dampfte sie ein. Der Rückstand wurde aus Aceton kristallisiert, wobei das 21-O-Trimethylacetyl-1-dehydro-cortison in Nadeln vom Smp. 274–278° anfiel. $[\alpha]_D^{23} = +169 \pm 3^\circ$ ($c = 0,815$ in Chloroform).

C₂₆H₃₄O₆ (442,58) Ber. C 70,56 H 7,74% Gef. C 70,79 H 7,88%

UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\max} = 240$ m μ ($\epsilon = 15600$).

IR.-Spektrum in Nujol: Banden u. a. bei 2,89 μ , 5,78 μ , 5,83 μ , 6,00 μ , 6,16 μ , 6,22 μ , 7,12 μ , 7,80 μ , 8,05 μ , 8,68 μ , 9,59 μ , 10,88 μ , 11,17 μ und 12,18 μ .

1-Dehydro-17 α -oxy-corticosteron: 1 g 17 α -Oxy-corticosteron wurde wie oben beschrieben mit 2 l einer Kultur von *Didymella lycopersici* *Kleb.* inkubiert und aufgearbeitet. Der Extraktionsrückstand lieferte durch Kristallisation aus Aceton das 1-Dehydro-17 α -oxy-corticosteron in Nadeln vom Smp. 234–236° (Zers.). $[\alpha]_D^{23} = +98 \pm 3^\circ$ ($c = 0,975$ in Dioxan).

C₂₁H₂₈O₅ (360,44) Ber. C 69,97 H 7,83% Gef. C 70,21 H 7,97%

¹⁾ *E. Vischer, Ch. Meystre & A. Wettstein, Helv. 38, 835 (1955).*

²⁾ Die Smp. sind auf dem *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert. Alle IR.-Spektren wurden mit einem Double-beam-Instrument von *Perkin-Elmer* (Modell 21) bestimmt. Wir danken Herrn Dr. *E. Ganz* bestens für die Aufnahme dieser Spektren.

³⁾ *H. L. Herzog* und Mitarb., *Science 121, 176 (1955)*; *E. Vischer, Ch. Meystre & A. Wettstein, Helv. 38, 835 (1955).*

UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\max} = 243 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 15300$).

IR.-Spektrum in Nujol: Banden u. a. bei $2,89 \mu$, $2,96 \mu$, $5,82 \mu$, $6,03 \mu$, $6,18 \mu$, $6,25 \mu$, $7,60 \mu$, $8,24 \mu$, $8,65 \mu$, $8,82 \mu$, $9,01 \mu$, $9,17 \mu$, $9,54 \mu$, $9,64 \mu$, $11,27 \mu$ und $12,27 \mu$.

21-Trimethylacetat¹⁾: Darstellung wie oben. Schmilzt, aus Essigester kristallisiert, bei $233-236^\circ$. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +103^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1,208$ in Chloroform).

$\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_6$ (444,55) Ber. C 70,24 H 8,16% Gef. C 70,11 H 8,04%

UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\max} = 244 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 14700$).

IR.-Spektrum in Nujol: Banden u. a. bei $2,82 \mu$, $2,97 \mu$, $5,74 \mu$, $5,79 \mu$, $6,01 \mu$, $6,16 \mu$, $6,23 \mu$, $7,12 \mu$, $7,79 \mu$, $8,10 \mu$, $8,56 \mu$, $8,65 \mu$, $8,74 \mu$, $8,98 \mu$, $9,63 \mu$, $10,00 \mu$, $11,21 \mu$ und $11,68 \mu$.

1-Dehydro-17 α -methyl-testosteron (I): Analoge Herstellung durch Einwirkung eines Stammes der Gattung *Didymella* auf 17 α -Methyl-testosteron. Umkristallisation aus Aceton-Äther, Smp. $163-164^\circ$. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = \pm 0^\circ$ ($c = 1,150$ in Chloroform).

$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$ (300,42) Ber. C 79,95 H 9,39% Gef. C 80,04 H 9,37%

UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\max} = 245 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 15600$).

IR.-Spektrum in Methylenchlorid: Banden u. a. bei $2,74 \mu$, $5,98 \mu$, $6,14 \mu$, $6,21 \mu$, $7,29 \mu$, $7,52 \mu$, $8,86 \mu$, $9,23 \mu$, $10,68 \mu$, $10,83 \mu$, $11,28 \mu$ und $12,23 \mu$.

1-Dehydro-anhydro-oxy-progesteron (II): Gewonnen in analoger Weise aus Anhydro-oxy-progesteron. Nach Umkristallisation aus Aceton-Äther, Smp. $228-233^\circ$ (unter Sublimation). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -18,5^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,054$ in Chloroform).

$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_2$ (310,41) Ber. C 81,25 H 8,44% Gef. C 81,30 H 8,62%

UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\max} = 244 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 15500$).

IR.-Spektrum in Nujol: Banden u. a. bei $2,97 \mu$, $3,05 \mu$, $4,75 \mu$, $5,98 \mu$, $6,17 \mu$, $6,22 \mu$, $7,08 \mu$, $7,64 \mu$, $8,06 \mu$, $8,91 \mu$, $9,06 \mu$, $9,39 \mu$, $10,05 \mu$, $10,63 \mu$, $11,22 \mu$ und $12,19 \mu$.

1;11-Bisdehydro-progesteron (III): Analoge Herstellung aus 11-Dehydro-progesteron. Umkristallisation aus Äther-Petroläther. Smp. $166-168^\circ$, Misch-Smp. mit Ausgangsmaterial $147-155^\circ$. $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +112^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,459$ in Aceton).

$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_2$ (310,42) Ber. C 81,25 H 8,44% Gef. C 81,00 H 8,70%

UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\max} = 245 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 17750$).

IR.-Spektrum in Methylenchlorid: Banden u. a. bei $5,85 \mu$, $5,99 \mu$, $6,14 \mu$, $6,21 \mu$, $7,29 \mu$, $7,37 \mu$, $8,35 \mu$, $9,06 \mu$, $10,64 \mu$, $11,27 \mu$ und $12,22 \mu$.

1-Dehydro-9 α -fluor-17 α -oxy-corticosteron (IVa): Hergestellt aus 21-O-Acetyl-9 α -fluor-17 α -oxy-corticosteron. Umkristallisation aus Aceton, Smp. $263-266^\circ$ (Zers.). $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +108^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,611$ in Äthanol).

$\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_5\text{F}$ (378,43) Ber. C 66,63 H 7,19% Gef. C 66,76 H 7,27%

UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\max} = 240 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 15800$).

IR.-Spektrum in Nujol: Banden u. a. bei $2,84 \mu$ und $2,91 \mu$ (Inflexionen), $2,97 \mu$, $5,81 \mu$, $6,01 \mu$, $6,17 \mu$, $6,23 \mu$, $7,65 \mu$, $8,81 \mu$, $9,41 \mu$, $9,73 \mu$, $10,90 \mu$ und $11,27 \mu$.

21-Monoacetat IVb: Durch 16stündige Einwirkung von Acetanhydrid in Pyridin auf IVa. Smp. $244-246^\circ$ (Zers.). $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +108^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,735$ in Dioxan).

$\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{O}_6\text{F}$ (420,46) Ber. C 65,70 H 6,95% Gef. C 65,58 H 7,03%

UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\max} = 240 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 16250$).

IR.-Spektrum in Nujol: Banden u. a. bei $2,90 \mu$, $2,99 \mu$, $5,75 \mu$, $5,82 \mu$, $5,99 \mu$, $6,15 \mu$, $6,23 \mu$, $8,05 \mu$, $8,86 \mu$, $9,62 \mu$ und $11,23 \mu$.

1;11-Bisdehydro-17 α -methyl-corticosteron (Va): Analog hergestellt durch Einwirkung von *Didymella lycopersici* *Kleb.* auf 21-O-Acetyl-11-dehydro-17 α -methyl-

¹⁾ Bearbeitet von Dr. W. Voser.

corticosteron. Durch Kristallisation des Extraktionsrückstandes erhielt man Va in Nadeln vom Smp. 183–186° (Zers.). Misch-Smp. mit Ausgangsmaterial 137–145°. $[\alpha]_D^{24} = +120^\circ \pm 3^\circ$ (c = 0,948 in abs. Äthanol).

$C_{22}H_{28}O_4$ (356,44) Ber. C 74,13 H 7,92% Gef. C 73,86 H 7,76%

UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\max} = 240 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 14600$).

IR.-Spektrum in Methylenechlorid: Banden u. a. bei 2,85 μ , 5,84 μ , 5,98 μ , 6,13 μ , 6,21 μ , 7,18 μ , 7,29 μ , 7,64 μ , 8,56 μ , 9,05 μ , 9,25 μ , 9,55 μ , 9,96 μ , 10,54 μ und 12,23 μ .

21-Acetat Vb: Durch 18stündige Einwirkung von Acetanhydrid in Pyridin auf Va. Aus Aceton-Petroläther und wässrigem Methanol Prismen vom Smp. 198–201°; $[\alpha]_D^{24} = +135^\circ \pm 3^\circ$ (c = 1,024 in Chloroform).

$C_{24}H_{30}O_5$ (398,48) Ber. C 72,33 H 7,59% Gef. C 72,16 H 7,46%

UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\max} = 240 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 14800$).

IR.-Spektrum in Methylenechlorid: Banden u. a. bei 5,70 μ , 5,82 μ , 5,98 μ , 6,13 μ , 6,21 μ , 7,29 μ , 8,30 μ , 9,12 μ , 9,56 μ , 9,79 μ und 12,23 μ .

1;6-Bisdehydro-cortexon (VIa): Analog hergestellt durch Inkubation von 21-O-Acetyl-6-dehydro-cortexon. Umkristallisation aus Hexan. Das in Nadeln kristallisierende Rohprodukt wurde direkt in sein 21-Acetat übergeführt.

21-Acetat VIb: Durch 18stündige Einwirkung von Acetanhydrid in Pyridin auf VIa, dann chromatographische Reinigung an Aluminiumoxyd, wobei VIb mit Benzol eluiert wurde. Kristallisation aus Aceton-Isopropyläther-Gemischen ergab Prismen vom Smp. 158–162°; $[\alpha]_D^{25} = +123^\circ \pm 3^\circ$ (c = 0,561 in Äthanol).

$C_{23}H_{28}O_4$ (368,45) Ber. C 74,97 H 7,66% Gef. C 74,64 H 7,85%

UV.-Absorptionsspektrum in Äthanol: $\lambda_{\max} = 223 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 11600$), 256 $\text{m}\mu$ ($\epsilon = 9900$) und 300 $\text{m}\mu$ ($\epsilon = 12800$).

IR.-Spektrum in Methylenechlorid: Banden u. a. bei 5,71 μ , 5,78 μ , 6,04 μ , 6,13 μ , 6,21 μ , 7,30 μ , 8,41 μ , 9,42 μ , 9,94 μ , 10,36 μ , 11,02 μ und 11,27 μ .

Die Analysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium unter der Leitung von Dr. H. Gysel durchgeführt. Die papierchromatographischen Untersuchungen verdanken wir Dr. R. Neher und Herrn E. von Arx.

Prof. E. Gäumann und Dr. L. Ettlinger sind wir für die Überlassung einer Anzahl Pilzstämmen zu Dank verpflichtet.

SUMMARY.

Certain fungi of the genus *Didymella* were detected which are particularly suitable for the enzymatic introduction of an 1,2-double bond into Δ^4 -3-keto-steroids. In this way a number of new 1-dehydrosteroids have been prepared.

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