

# 5 $\alpha$ - $\Delta^{9(11)}$ -16 $\beta$ -甲基-3 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-三羟基-孕甾烯-3 $\beta$ , 21-双醋酸酯-20酮和5 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -甲基-17 $\beta$ -羟基-雄甾-3酮的微生物转化

张丽青 张恩慈\* 吴照华

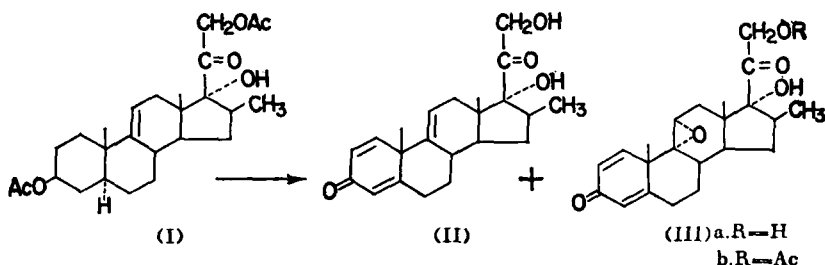
(中国科学院上海有机化学研究所)

**摘要** 用诺卡氏菌与节杆菌混合菌种转化从蕃麻皂素制得的中间体5 $\alpha$ - $\Delta^{9(11)}$ -16 $\beta$ -甲基-3 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21三羟基孕甾烯-3 $\beta$ , 21-双醋酸酯-20酮(I)得50%的16 $\beta$ -甲基- $\Delta^{1,4,9(11)}$ -孕甾三烯-20酮(II)和少量的16 $\beta$ -甲基-9, 11 $\alpha$ 环氧- $\Delta^{1,4}$ 孕甾二烯-20酮(III)。另外, 又用同样的混合菌种转化从剑麻皂素制得的中间体5 $\alpha$ , 17 $\alpha$ 甲基-17 $\beta$ 羟基-雄甾-3酮(IV)得50%17 $\alpha$ 甲基-17 $\beta$ 羟基- $\Delta^{1,4}$ -雄甾二烯-3酮(V)。如改变培养基则得3,17 $\beta$ -羟基-17 $\alpha$ -甲基-9酮基-9,10开环-1,3,5(10)雄甾三烯化合物。

蕃麻皂素(Hecogenin)和剑麻皂素(Tigogenin)存在于蕃麻和剑麻的植物叶片中, 是制麻工业的副产品。这类麻在我国两广及福建等省均有大面积种植。因此, 充分利用蕃麻皂素和剑麻皂素来合成皮质激素等甾体药物, 可以部分解决皂素资源问题。在甾体药物生产中, A环引入C<sub>1,2</sub>位双键往往是用微生物转化脱氢, 可以获得较为经济的效果。我们研究从蕃麻皂素和剑麻皂素制得的两种中间体用微生物转化法在A环上引入1,4双键获得了较好的结果。

诺卡氏菌<sup>(1)</sup>(*Nocardia* sp No. 76816)和节杆菌<sup>(2)</sup>(*Arthrobacter simplex* No.A-1)\*\*均能使甾体化合物A环上的C<sub>3</sub>醋酸酯水解氧化和脱氢。我们试验了它们的活力, 发现诺卡氏菌主要是使A环C<sub>3</sub>羟基氧化及C<sub>4,5</sub>脱氢, 节杆菌则主要使C<sub>1,2</sub>脱氢。所以, 单用一种微生物不能获得转化完全的 $\Delta^{1,4}$ 的甾体化合物。因此, 我们采用诺卡氏菌和节杆菌两种菌混合培养的方法, 获得较为单一的1,4位脱氢产物。

从蕃麻皂素制得的中间体5 $\alpha$ ,  $\Delta^{9(11)}$ -16 $\beta$ -甲基-3 $\beta$ , 17 $\alpha$  21-三羟基孕甾烯 3 $\beta$ , 21双醋酸酯-20酮(I)<sup>(3)</sup>为原料, 经两种菌混合培养, 引入 $\Delta^{1,4}$ 双键而得到16 $\beta$ -甲基- $\Delta^{1,4,9(11)}$ -孕



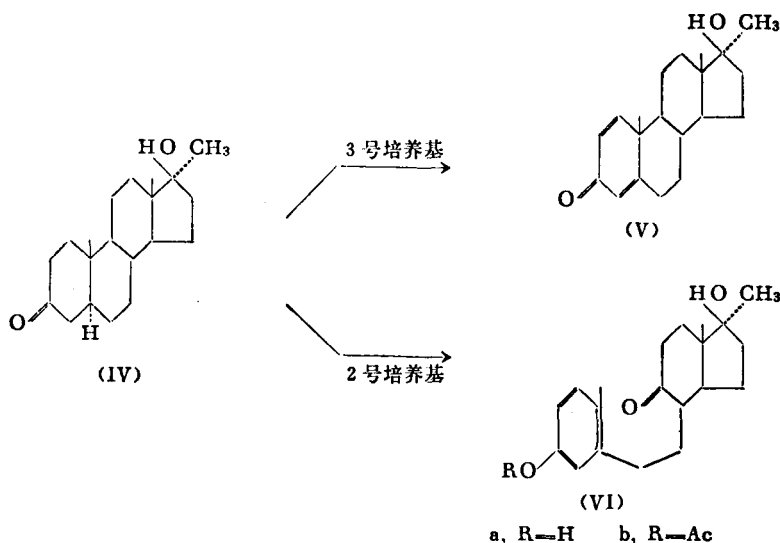
本文于1980年3月11日收到。

\* 张恩慈上海第九制药厂, 现工作单位广州市微生物研究所。

\*\* 诺卡氏菌从上海化纤二厂处理废水的生物膜中分离得到, 节杆菌是本实验室保存。

甾三烯 $17\alpha, 21$ -二羟基- $20$ 酮(II)<sup>(4)</sup>和少量的 $16\beta$ -甲基- $9, 11\alpha$ 环氧- $\Delta^{1,4}$ 孕甾二烯 $17\alpha, 21$ -二羟基- $20$ 酮(III)<sup>(5)</sup>。

此外,我们利用剑麻皂素制得的中间体 $5\alpha, 17\alpha$ -甲基- $17\beta$ -羟基雄甾- $3$ 酮(IV)为原料,经上述二种微生物脱氢可得 $17\alpha$ -甲基- $17\beta$ -羟基- $\Delta^{1,4}$ 雄甾二烯- $3$ 酮<sup>(6)</sup>( $\Delta^1$ -甲基睾丸素)(V)。如改变培养基则得 $3, 17\beta$ -二羟基- $17\alpha$ -甲基- $9$ 酮基,  $9, 10$ 开环- $1, 3, 5(10)$ 雄甾三烯化合物<sup>(6)</sup>(VI)。



## 实验方法\*\*\*及结果

### (一) $5\alpha, \Delta^9(11)$ - $16\beta$ -甲基- $3\beta, 17\alpha, 21$ -三羟基孕甾烯- $3\beta, 21$ -双醋酸酯- $20$ 酮(I)的转化

#### 1. 斜面培养

将诺卡氏菌 No. 76816 及节杆菌 No A-1 分别接种在 I 号琼脂斜面上,  $28^\circ\text{C}$  左右培养, 培养时间节杆菌 2 天, 诺卡氏菌 3~5 天。

#### 2. 培养基成分

培养基 1 号: 玉米浆 2%, 葡萄糖 3%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2%,  $\text{NaNO}_3$  0.2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $\text{MgSO}_4$  0.05%,  $\text{KCl}$  0.02%,  $\text{FeSO}_4$  0.02%, pH 6.7 (斜面加琼脂 2.5%)。

#### 3. 摇瓶试验

(1) 用 250 ml 三角瓶, 每瓶盛 1 号培养液 50 ml, 灭菌后, 接种诺卡氏菌及节杆菌斜面各 1 支, 往复式振荡机上(110 次/min)振荡培养。在  $30^\circ\text{C}$  培养 16 小时左右, 将中间体(I)用乙醇溶解(乙醇浓度为发酵液的 4%, 投料浓度为 0.2%)加入发酵液内, 并加吐温-80 0.1%, 继续振摇。每隔 24 小时取发酵液 2 ml, 用乙酸乙酯提取, 浓缩后用硅胶薄层层析, 观察转化情况, 以确定发酵终点。(2) 5 L 三角瓶中, 盛 1 号培养液 900 ml, 灭菌后, 接种已经按

\*\*\* 所有熔点均未校正, 紫外光谱用 751 型分光光度计(上海分析仪器厂)测定, 比旋用 Hilger 旋光仪测定, 红外光谱用 UR-10 型仪测定, 一般用石蜡油, 核磁共振谱用 JEOL PS-100 型 100 兆周测定, 以四甲基硅为内标,  $\sigma$  值单位为 ppm, J 值为赫。质谱用 JMS-OIU 型仪测定。

上述条件培养 24 小时的诺卡氏菌及节杆菌各一小瓶(50 ml)振荡培养,待转化完全后,将投料 2 克的发酵液 1 L 离心,清液与菌渣分别提取,清液用乙酸乙酯提取,提取液浓缩后所得粗产物加少许乙醚,析出粗结晶 0.2 g,菌渣用丙酮在索氏抽提器内提取,丙酮液浓缩后残渣成糖浆状物质,再用乙酸乙酯提取,浓缩后即析出结晶 1.03 g,与清液部分合并,共得结晶 1.23 g,用丙酮正己烷精制得纯结晶(II)0.9 g,熔点  $213\sim 16^{\circ}\text{C}^*$ ,与自合成  $9\alpha$  氟  $16\beta$  甲基可的松中间体时所得到的已知品 II<sup>(4)</sup> 测混熔不降低,  $[\alpha]_{\text{D}}^{26} + 43.9$  (C=2.39  $\text{CHCl}_3$ ); 紫外光谱  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  nm(log $\epsilon$ )238 (4.19); 红外光谱  $\text{cm}^{-1}$ ,3450 (OH 基) 1725(G=O)1610, 1640 (CH=CH), 1680 ( $\alpha, \beta$  不饱和酮) 910 (CH=CH); 质谱  $m/e, \text{M}^+$  356, 341 (M-CH<sub>3</sub>), 338 (M-H<sub>2</sub>O); 核磁共振谱(CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  0.85(3 H, S, C<sub>18</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.15(3 H, d, J=6, C<sub>16</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.45 (3 H, S, C<sub>19</sub>-CH<sub>3</sub>) 4.53(2 H, AB型, J=18, C<sub>21</sub>-CH<sub>2</sub>OH), 6.25(1 H, d, J=10, C<sub>2</sub>-H), 7.20 (1 H, d, J=10, C<sub>1</sub>-H), 6.05(1 H, S, C<sub>4</sub>-H)。

上述母液放置后又析出 500 mg 化合物(II)及(III<sub>a</sub>)的混合物,用柱层析分离(硅胶 30 g, 100~160 目)先用 200 ml 正己烷展层,然后用不同比例的正己烷-丙酮(自 95:5 至 90:10)洗脱,各用 50 ml,首先得化合物(II)200 mg,熔点  $210\sim 212^{\circ}\text{C}$ ,当己烷丙酮比例继续调整至 88:12,收集洗脱液得化合物(III<sub>a</sub>)粗结晶 100 mg,用丙酮正己烷精制一次,析出 80 mg,用醋酐及无水吡啶在室温时按常法乙酰化,所得产物用丙酮正己烷精制得化合物(III<sub>b</sub>),熔点  $197\sim 8^{\circ}\text{C}$ 。与已知化合物(II)的  $9(11)\beta$  环氧化物<sup>(7)</sup> 熔点  $220\sim 223^{\circ}\text{C}$  测混熔有降低,经下列光谱鉴定,证明化合物(III<sub>b</sub>)为  $9,11\alpha$  环氧化物。红外光谱  $\text{cm}^{-1}$  3450 (OH)1610, 1640(G=C)1660( $\alpha\beta$  不饱和酮), 1735, 1225 (21-OAc) 997( $9\alpha$ ,  $11\alpha$  环氧); 核磁共振谱(CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.91(3H, S, C<sub>18</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.15(3 H, d, J=6, C<sub>16</sub>-CH<sub>3</sub>) 1.50(3 H, S, C<sub>19</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.20(3 H, S, C<sub>21</sub>-OAc), 3.45(1 H, d, C<sub>11</sub>-H), 4.96(2 H AB型, J=18, C<sub>21</sub>-CH<sub>2</sub>OAc), 6.25(1 H, S, C<sub>4</sub>-H), 6.40(1 H, d, J=10, C<sub>2</sub>-H), 7.20 (1 H, d, J=10, C<sub>1</sub>-H); 质谱  $m/e \text{M}^+$  414, 399 (M-CH<sub>3</sub>), 396(M-H<sub>2</sub>O)。

## (二) $5\alpha, 17\alpha$ -甲基- $17\beta$ -羟基雄甾-3-酮(IV)的转化

1. 斜面培养 同上。

2. 培养基成分 2号培养基系 1号加 0.1% 酵母膏, pH 6.7。

3号培养基 酵母膏 0.5%, 蛋白胨 0.25%, 葡萄糖 2%, MgSO<sub>4</sub> 0.005%, pH 6.7。

### 3. 摇瓶试验

(1) 3号培养基,盛 900 ml 于 5 L 三角瓶中,按上述方法接种诺卡氏菌及节杆菌的培养液各 50 ml(已振荡培养 24 小时),混合培养 16 小时左右,加入化合物(IV),投料浓度 0.1% 并加吐温-80 0.1%,硫酸锰 200 mg,继续振荡培养,6 小时后加青霉素钾盐 40 单位/ml 发酵液,48 小时后,用乙酸乙酯提取,除去溶剂得粗结晶(V),用丙酮重结晶,熔点  $161\sim 163^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_{\text{D}} + 5.3^{\circ}$  (c. 1.04  $\text{CHCl}_3$ ); 紫外光谱  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$  nm 244(log $\epsilon$  4.25); 红外光谱,1610, 1630 (CH=CH), 1670 ( $\alpha, \beta$  不饱和酮) 3480 (OH)。以上光谱数据及物理常数均与已知物  $17\alpha$ -甲基- $17\beta$ -羟基- $\Delta^{1,4}$  雄甾二烯-3 酮<sup>(6)</sup> 相符合。

按上述条件于 50 L 发酵罐发酵,实装培养液体积 40 L,空气流量 0.22 L/L/min,搅拌速度 235 转/min,温度  $30^{\circ}\text{C}$ ,培养 18 小时左右,投料时调节 pH 至 6.7~7,投料 40 g,溶于 1600 ml 乙醇,加入后另加吐温-80:乙醇(1:1)36 ml,加料 6 小时后,加硫酸锰 4 g,青霉素

\* 将 II 经两步化学反应,合成  $\beta$ -米松,其物理常数与已知品相同。

80 万国际单位, 转化结束后, 菌液用乙酸乙酯提取三次, 提取液除去溶剂得结晶, 再用丙酮重结晶得 20 g 化合物(V), 熔点 162~165°C, 产率 50%。

(2) 2 号培养基, 盛于 5 L 三角瓶中, 按上述方法转化, 投料浓度 0.3%, 共 4.2 g, 同时加入硫酸锰 0.02%, 转化 42 小时, 发酵液离心, 菌渣用丙酮抽提[方法同(一), 3]除去溶剂得 1.2 g 白色结晶, 丙酮正己烷精制得化合物(IV<sub>2</sub>) 1.09g, 熔点 164~5°C, 与化合物(V)测混熔有降低,  $[\alpha]_D -9.7^\circ$  (G, 1.10 CHCl<sub>3</sub>); 紫外光谱  $\lambda_{max}^{EtOH}$  nm (log $\epsilon$ ), 280 (3.32); 红外光谱 cm<sup>-1</sup>; 3340, 3530(OH), 1710, (C=O)3030, 1610, 1510, 1470, 870, 820(芳香环); 质谱 m/e, M<sup>+</sup>316, 298(M-H<sub>2</sub>O)283(M-CH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O)265(M-CH<sub>3</sub>-2 H<sub>2</sub>O); 核磁共振(CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  1.21 (3 H, S, C<sub>17</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.23(3 H, S, C<sub>18</sub>-CH<sub>3</sub>), 2, 23 (3 H, S, C<sub>19</sub>-CH<sub>3</sub>), 2, 91(1 H, S, C<sub>17</sub>-OH)7.87 (1 H, S, C<sub>3</sub>-OH), 6.98 (1 H, d, J=10, C<sub>1</sub>-H)6.60 (1 H, d, J=10, C<sub>2</sub>-H), 6, 71 (1 H, d, J=4, C<sub>4</sub>-H)。

称取上述结晶(IV<sub>2</sub>)0.4 g 溶于 5 ml 醋酐, 5 ml 无水吡啶中, 室温放置过夜, 倒入冰水中, 析出固体, 滤过, 水洗至中性, 烘干得结晶 IV<sub>3</sub> 0.4 g, 丙酮正己烷精制, 熔点 104~6°C  $[\alpha]_D -73^\circ$  (G, 1.09, CHCl<sub>3</sub>); 紫外光谱  $\lambda_{max}^{EtOH}$  nm(log $\epsilon$ ) 267(2.72), 273(2.705); 红外光谱 cm<sup>-1</sup> 3380(OH) 1220, 1770(OAC)1710(C=O), 3030, 1610, 1590, 1510, 1470, 835(芳香环); 质谱 m/e M<sup>+</sup>358, 340(M-H<sub>2</sub>O), 325 (M-CH<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O), 299 (M-CH<sub>3</sub>COO); 核磁共振 (GDCl<sub>3</sub>) 1.9(3 H, s, C<sub>7</sub>-CH<sub>3</sub>) 1.24(3 H, s, C<sub>18</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.23 (3 H, s, C<sub>19</sub>-CH<sub>3</sub>) 2.28 (3 H, s, C<sub>3</sub>-OAC)6.85(1 H, d, J=10 C<sub>2</sub>-H), 7.17(1H, d, J=10, C<sub>1</sub>-H), 6.95(1 H, d, J=4, C<sub>4</sub>-H)。根据上述数据, 证明 IV<sub>2</sub> 的结构为 3,17  $\beta$ -二羟基-17  $\alpha$ -甲基-9.10 开环-1,3,5(10)雄甾三烯-9 酮。

## 讨 论

1964 年 Goronelli<sup>(5)</sup> 等曾报道用棒状杆菌 *Corynebacterium simplex*(ATCG 6946) 转化 5  $\alpha$ , 16 $\beta$ -甲基-17 $\alpha$ , 21-双羟基- $\Delta^9(11)$  雄甾烯-3 酮得到化合物 III<sub>1</sub>, 我们采用诺卡氏菌与节杆菌混合培养转化中间体(I)所得主产物为 II 及少量的 III<sub>1</sub>。

据文献<sup>(6)</sup> 报道诺卡氏菌能将 17 $\alpha$ -甲基-17  $\beta$ -羟基-5  $\alpha$ -雄甾-3 酮(IV) 降解成二氧化碳和水。

从试验结果看, 培养基成分对产物的生成影响很大, 两种混合菌, 在 2 号培养基中, 培养 24 小时后加入 17  $\alpha$  甲基-17  $\beta$ -羟基 5  $\alpha$ -雄甾-3 酮或 甲基睾丸素, 转化 24 小时两者都转变成化合物(VI<sub>1</sub>), 然后再进一步降解。如在 3 号培养基中培养, 同时在投料时加入锰离子则主要得(V), 如不加锰离子则产物仍会被降解成(VI<sub>1</sub>), 以至再降解成二氧化碳及水, 但如在 2 号培养基中, 即使加入锰离子并不能阻止降解只生成化合物(VI<sub>1</sub>)26%。

1970 年 Nagasawa<sup>(8)</sup> 等曾报道在节杆菌转化胆固醇时, 加入 Co<sup>++</sup>, Ni<sup>++</sup> 等金属离子, 可以抑制胆固醇的降解, 而使  $\Delta^1,4$  雄甾二烯 3,17-双酮作为产物积累下来, 我们用锰离子在化合物(IV)的转化中亦取得了相似的结果。

致谢 上海第九制药厂蔡国梅同志参加部分试验工作, 光谱分析由本所光谱分析室同志代测, 特此一并致谢。

## 参 考 文 献

1. Sih C J, et al: Enzymic dehydrogenation of steroid A ring. *Biochem Biophys Acta* 38:378, 1960  
Sih C J, et al: Steroid 1-dehydrogenase of *Nocardia restrictus*. *Ibid* 56:584, 1962
2. Kondo E: Steroid 1-dehydrogenation by a crude enzyme preparation from *Arthrobacter simplex*. *Agr*

*Biol Chem* 27:69, 1963

Kondo E: "Pseudo-crystallofermentation" of steroid: a new process for preparing prednisolone by a microorganism. *J Gen Appl microbiol* (Tokyo) 7:113, 1961

3. Henbarrow J A, et al: Compounds related to the steroid hormones: Part V. the partial synthesis of 21-acetoxy-17-hydroxy-16 $\beta$ -methyl-5 $\alpha$  pregn-9-ene-3, 20-dione. *J Chem Soc* 4547, 1961
4. Carrington T R, et al: Compounds related to the steroid hormones. Part VI. the synthesis of the 9 $\alpha$ -fluoro-16 $\beta$ -methyl derivatives of hydrocortisone and prednisolone. *J Chem Soc* 4560, 1961
5. Coronelli C, et al: An epoxidation by *Corynebacterium simplex*. *Experientia* 20:208, 1964
6. Buki K G, et al: Microbiological decomposition of 17 $\alpha$ -methyl-17 $\beta$ -hydroxy steroids with androstane nucleus. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 16:253, 1969
7. Taub D, et al: 16 $\beta$ -methyl-5 $\alpha$ - $\Delta^{9(11)}$ -pregnen-17 $\alpha$ , 21-diol-3, 20-dione-21-acetate into 16 $\beta$ -methyl- $\Delta^{1,4}$ -pregnadiene-9 $\alpha$ , 11 $\alpha$ -epoxy-17 $\alpha$ , 21-diol-3, 20-dione (II). *J Amer Chem Soc* 82:4012, 1960
8. Micitaro N M, et al: Microbial transformation of sterols Part V. Inhibitors of microbial degradation of cholesterol. *Agr Biol Chem* 34:838, 1970

## MICROBIAL TRANSFORMATION OF 16 $\beta$ -METHYL-5 $\alpha$ - $\Delta^{9(11)}$ -PREGNENE-3 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-TRIOL-20-ONE-3 $\beta$ , 21- DIACETATE AND 17 $\alpha$ -METHYL-17 $\beta$ -HYDROXY- 5 $\alpha$ -ANDROSTAN-3-ONE

Zhang Liqing, Zhang Enci, and Wu Zhaohua

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Academia Sinica)

### ABSTRACT

Incubation of 16 $\beta$ -Methyl-5 $\alpha$ - $\Delta^{9(11)}$ -pregnene-3 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-triol-20-one-3 $\beta$ , 21-diacetate (I) with a mixed culture of *Nocardia Sp.* and *Arthrobacter simplex* gave 16 $\beta$ -methyl-1,4,9(11) pregnatriene-17 $\alpha$ , 21-dihydroxy-3,20-dione (II) (50% yield) together with a small amount of 16 $\beta$ -methyl- $\Delta^{1,4}$ -pregnadiene-9 $\alpha$ , 11 $\alpha$ -epoxy-17 $\alpha$ , 21-diol-3,20-dione (III).

On the other hand, incubation of 17 $\alpha$ -methyl-17 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-3-one (IV) with the same mixed culture gave 17 $\alpha$ -methyl-17 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^{1,4}$ -androstadien-3-one (V) in 50% yield. However, when a different medium was used for the incubation, the product was 17 $\alpha$ -methyl-3,17 $\beta$ -dihydroxy-9,10-seco-1,3,5(10)-androstatrien-9-one (VI).