

制备 16 α -甲基孕甾 1, 4, 9 (11)-三烯 的微生物学方法

陈家任 吴衍庸 李惠泉

(中国科学院成都生物研究所, 成都)

17 α , 21-二羟基-16 α -甲基孕甾-4, 9 (11)-二烯-3, 20-二酮-21-醋酸酯 (I) 与节杆菌 *A₄₉₋₁* 培养物中, 出现较大量结晶物, 经分离和鉴定, 确认为 17 α , 21-二羟基-16 α -甲基孕甾-1, 4, 9 (11)-三烯-3, 20-二酮 (III)。结晶母液中还残存少量 17 α , 21-二羟基-16 α -甲基孕甾-4, 9 (11)-二烯-3, 20-二酮 (IV) 和化合物 (I) 和 (I) 的简单脱氢类似物 (II), 提出了合成 (III) 的可能途径。

17 α , 21-二羟基-16 α -甲基孕甾-1, 4, 9 (11)-三烯-3, 20-二酮 (III) 是制备 9 α -氟 (或 9 α -氯)-16 α -甲基泼尼松和氢化可的松及其醋酸酯的一个重要中间体, 并有利尿的生理活性^[1]。Robinson^[2]首先用 (III)-21-醋酸酯为底物, 经水解制备 (III)。Ranssur^[3]以 16 α (或 β -) 甲基醋酸氢化泼尼松为起始物, 经 C₁₁-羟基脱水作用, 制备了一系列 1, 4, 9 (11)-三烯-16 α -甲基孕甾和 (III)-21-醋酸酯, (III)-21-醋酸酯再经水解反应制备 (III)。Merck^[4]以不同底物制备了 (III)-醋酸。Phillips 等^[5]、Calzada 等^[6]和 Bristol Myers 公司^[7]分别从不同底物利用化学方法制备了 16 α -甲基 (III) 的类似物。四川生物研究所^[8]用倍他米松中间体“格氏物”生物制备了 16 β -甲基-1, 4, 9 (11)-三烯。张丽青^[9]等以 5 α -9 (11) 烯-16 β -甲基-3 β , 17 β , 21-三羟基-3 β , 21-双醋酸酯生物制备了 16 β -甲基-1, 4, 9 (11)-三烯。然而, 至今尚未见 *A. simplex* 能同时发生 C₁ 脱氢和醋酸酯水解制备 16 α -甲基孕甾 1, 4, 9 (11)-三烯的报道, 本文简要报道对 (III) 的确证及其制备。

材料与方 法

(一) 菌种

简单节杆菌 (*Arthrobacter simplex*) *A₄₉₋₁₀*

(二) 甾体化合物

化合物 (I) 和 (II) 来自天津制药厂。化合物 (III) 和 (IV) 分别用 (II) 和 (I) 经碱水解制得。一般试剂是分析纯。

(三) 培养基

1. 斜面培养基组成 (%): 酵母膏 0.5, 蛋白胨 0.5, 葡萄糖 1, 琼脂 2, 自来水配制, 用氢氧化钠溶液调至 pH 7.2, 15 磅灭菌 25 分钟。

2. 发酵培养基组成 (%): 蛋白胨 0.4, 葡萄糖 0.6, 玉米浆 0.6, 磷酸二氢钾 0.07, 磷酸氢二钾 0.05, 用氢氧化钠溶液调 pH 7.2—7.4, 500 ml 三角瓶装 100 ml, 15 磅灭菌 30 分钟。

(四) 微生物的培养

取在酵母膏葡萄糖琼脂斜面上生长良好的培养物接种三角瓶, 28 $^{\circ}$ C 通气振荡培养 18 小时作种液, 以 10% (V/V) 种量接入含有相同组分培养液中, 在相同条件下培养 22—24 小时。

(五) 转化

在已培养好的菌液内, 按 3 g/l 发酵液投入经约十万分之三的吐温分散的底物 (I), 在同样条件下继续氧化 80 小时左右。

本文于 1982 年 1 月 11 日收到。

(六) 分析方法

熔点测定用 VEB Analytik Dresden PHMK 和宝工业 FERMACOB 自动热分析仪测定;用 SP 500 型,乙醇作溶剂测定紫外吸收;用岛津 (Shimadzu) IR-27G (KBr) 测定红外吸收;利用 60 Hc BH-02 高分辨核磁共振波谱仪测定核磁氢谱,四甲基硅烷作内标,氘代甲醇作溶剂。薄层层离用西德 Merck Kiesegel Gf 254 铺板,厚度 0.25 mm,用苯:丙酮 (9:1) 溶剂系统展开,荧光下定位,或用硫酸香格兰素溶液显色。样品经薄层展开后,用岛津 TLC 扫描仪 CS-910 扫描,进行定量分析,参比波长 420 nm,测定波长 240 nm。

结果与讨论

(一) 产物确证

发酵液用乙酸乙酯提取,无水硫酸钠脱水,减压浓缩。用过滤,或离心收集结晶物,然后用丙酮或乙酸乙酯提取,浓缩得化合物 (III) 粗品,理论收率 90% 左右。分析样品经氯仿丙酮纯制,乙醇重结晶。M. P. 228—229.8°C, UV_{max} 240.5 (95% 乙醇, $\epsilon = 1.4 \times 10^4$), IR (KBr) 2.96 μ (OH), 5.85 μ (20C = 0), 6.05 μ , 6.15 μ , 6.25 μ ($\Delta^{143}C = 0$), 8.86 μ , 9.45 μ (OH), 11.19 μ (对位 C=C)。Mnr δ_{TMS}^{OD} ppm 0.72 (单峰, 3H, 18-CH₃), 0.87 (双峰, J = 7Hz, 3H, 16-CH₃), 1.43 (单峰, 3H, 19-CH₃), 4.16, 4.52 (AB, J = 20Hz, 2H, 21-CH₂), 5.54 (宽单峰, H, 9(11)C=C), 5.97 (宽单峰, H, 4, 5 C=C), 6.17 (AB, J_{hg} = 10 Hz, H), 7.35 (AB, J_{gf} = 2Hz, H) [C₁, C₂ C=C]。元素分析: C₂₂H₂₈O₄, 理论值 C 74.16% H 7.87%, O 17.97%, 实验值 C 73.98%, H 7.90%, O 18.12%。薄层层离 R_f 0.25。重结晶物溶于吡啶,加入醋酐,放置过夜,冲冰水,过滤并经氯仿甲醇纯制,乙醇重结晶, M. P. 213.2—214.4°C, 与已知化合物 (II) 混合,熔点不下降。薄层层离, R_f 0.42。综上分析,节杆菌 A₆₉₋₂ 主要

产物为 17 α , 21-二羟基-16 α -甲基孕甾-1, 4, 9 (11)-三烯-3, 20-二酮 (III)。

结晶母液浓缩,按上述条件薄层展开,除出现痕迹化合物 (I) 外,还出现一个红色斑点, R_f 0.40, 与已知化合物 (II) 一致。另出现一个浅黄色斑点, R_f 0.33, 与已知化合物 (I) 的碱水解物 (IV) 相同。

(二) 节杆菌 A₆₉₋₂ 对化合物 (IV) 的转化

化合物 (I) 溶于氯仿甲醇混合溶剂,加入碳酸氢钾搅拌反应,浓缩,冲水,过滤得化合物 (IV)。在上述相似条件下培养的菌液内,按 8g/l 发酵液投加经吐温分散的化合物 (IV) (图 1),继续氧化 64—72 小时,发酵液显现大量结晶物 (图 2),投加底物同时加入 2% (V/V) 或 4% (V/V) 乙醇,会改变结晶物形态,结晶物也长得更大一点,呈浅黄色柱状结晶 (图 3)。过滤,离心或静置倾去上层发酵液等方法,均可得

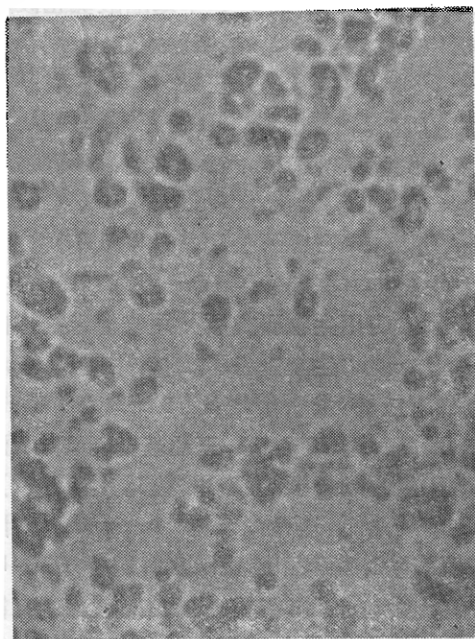


图 1 底物经吐温分散,超声波处理后的微粒
Fig. 1 Substrate dispersed by tween and treated by ultrasonic oscillation

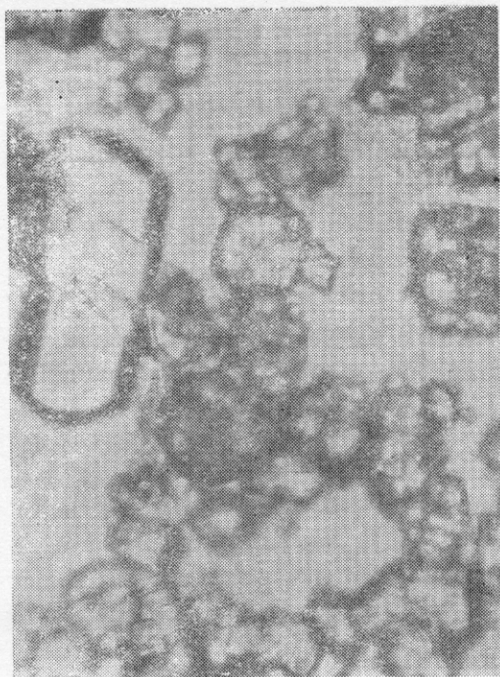


图 2 产物结晶

Fig. 2 Product crystal

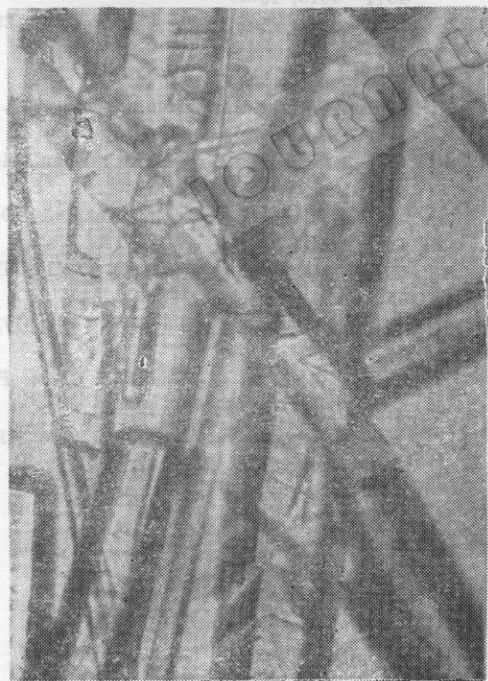


图 3 产物结晶 (呈浅黄色柱状结晶)

Fig. 3 Product crystal (light yellow pillar crystal)

到化合物 (III) 粗品, 转化率达 90% 以上。

(三) 节杆菌 *A₆₉₋₂* 对化合物 (I) 的转化

以化合物 (I) 为基质, 在不同转化时间取样分析, 发现转化过程中出现两个主要产物 (IV) 和 (III) 以及少量的产物 (II)。由此可以证明, 此菌除了含有 C_1 位导入双键的脱氢酶外, 还有 C_{21} -醋酸酯水解酶, 意味着化合物 (I) 转化生成 (III) 有两个不同的生物合成途径, 即 (I) \rightarrow (II) \rightarrow (III) 和 (I) \rightarrow (IV) \rightarrow (III)。从图 4 可以看出, 底物经 C_1 脱氢作用形成 (II), 与此同时, 一部分 (II) 又被继续水解, 除去 C_{21} 醋酸酯而变成 (III), 因此在转化过程, (II) 的量增加很少。添加 (0.5g/l) 甲萘二酮, 可明显提高 (II) 的量。从图还可以看到, 底物亦可先经水解作用, 除去 C_{21} -醋酸酯后, 生成的 (IV) 再经脱氢酶作用生成化合物 (III)。转化前期, (III) 的量积累很慢, 随着转化时间延长, (IV) 的量迅速增加, (III) 的量随之迅速增加, 推测 (IV) 很可能是 C_1 -脱氢酶活性的最适诱导物或作用底物。说明 (I) 转化生成 (III) 虽然可经 (II) 中间代谢, 但经 (IV) 中间物转化生成 (III) 可能是节杆菌 *A₆₉₋₂* 合成 (III) 的主要途径 (图 5)。以 (IV) 作底物制备 (III)

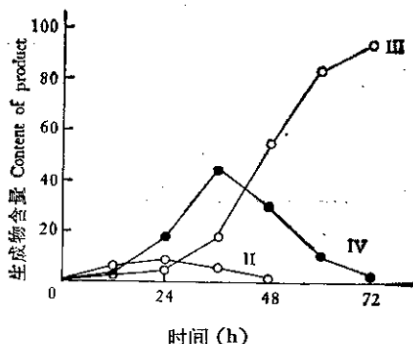


图 4 转化 (I) 时产物消长情况

Fig. 4 Growth and decline of different products from substrate (I) transformed by *Arthrobacter simplex* *A₆₉₋₂*

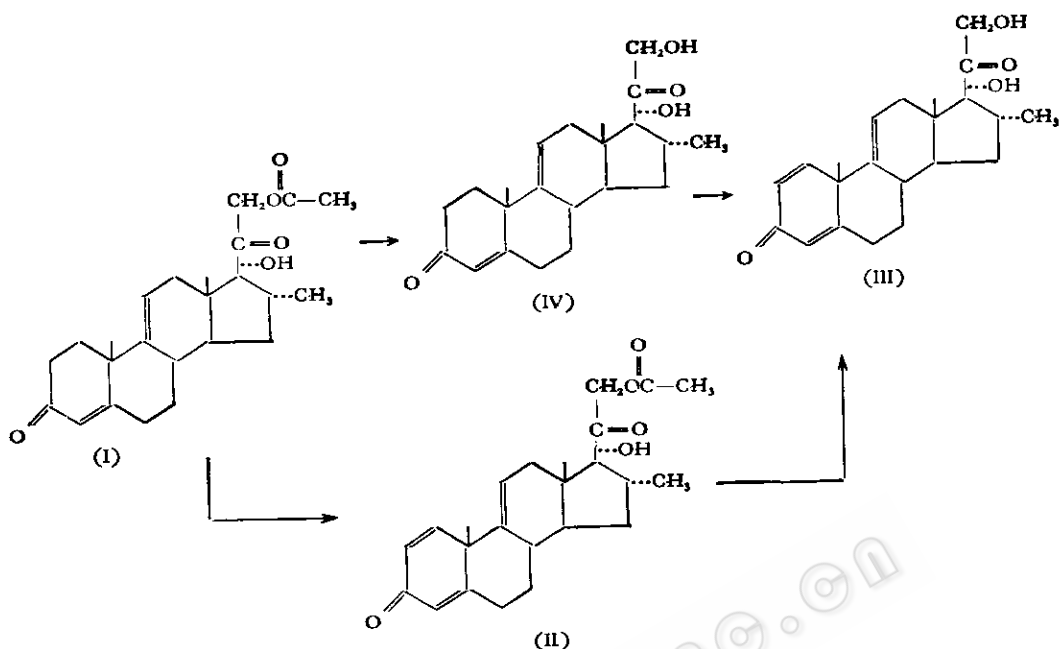


图5 推测转化 (I) 底物的可能途径

Fig. 5 Proposed possible transformation pathway of substrate (I)

的转化试验提供了进一步的证据。这不仅提高了底物浓度,也缩短了反应时间,是直接制备 (III) 更为合适的途径。

Maxon^[10] 进行黄体酮羟化过程,观察到“共结晶”现象。制备 (III) 过程与此不同,基质以固体微粒投入,产物以特定的较大的晶体析出,这与 Kondo^[11] 生物制备 Δ^{1-2} 脱氢类似物所观察到的“假结晶发酵”十分相似。这不仅利于产物回收,而且可减少底物对产物的抑制作用,减少溶剂的毒害,可能进一步提高底物投加量。

参 考 文 献

[1] Rausser, B. C. et al.: US. Pat., 3, 284,477.

- [2] Robinson, C. H.: *J. Am. Chem. Soc.*, 82: 4611—4615, 1960.
- [3] Rausser, B. C. et al.: US. Pat., 3, 284, 477.
- [4] Merck & Co.: Fr., 143, 301.
- [5] Phillips et al.: Ger. offen, 2, 232, 827, C. A. P7893q.
- [6] Calzada Baclia, Jose Maria.: Span., 445, 981, C. A. 88, 62533.
- [7] Bristol, Myers, Co.: Japan Kokai 148,062, C. A. P24627y.
- [8] 四川生物研究所: 微生物学报, 17 (1): 41—45, 1977.
- [9] 张丽青等: 有机化学, 1981 年第 3 期 pp171—174.
- [10] Daxon W. D. et al.: *Ind Eng. Chem. Process Des. Dev.*, 5: 285, 1960.
- [11] Kondo, E. and E. Masuo. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 7(2): 113—117, 1961.

MICROBIOLOGICAL PREPARATION OF 16 α -METHYL-1, 4, 9(11)-PREGNATRIENE

Chen Jiaren Wu Yanyoung Li Huequn

(Chengdu Biological Institute, Academia Sinica, Chengdu)

A large number of crystals were existed in the culture of *A. simplex* with 17 α , 21-dihydroxyl-16 α -methyl-pregna-4,9 (11)-diene-3, 20-dione-21-acetate (I). The crystals have been isolated and identified as 17 α , 21-dihydroxyl-16 α -methyl-pregna-1,4,9(11)-triene-3, 20-dione (III). Three minor compounds also were obtained as fo-

llowing structures respectively: 17 α , 21-dihydroxyl-16 α -methyl-pregna-4,9(11)-diene-3, 20-dione (IV), compound (I) and its simple dehydrogenated analogue (II). A possible pathway of synthesizing (III) which has been synthesized with different substrates was suggested.