

A 环饱和甾体的微生物转化作用

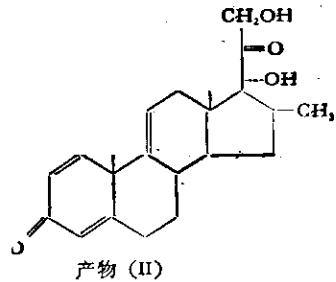
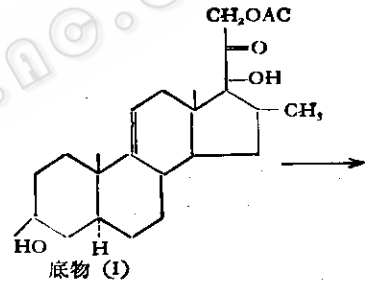
III. 倍他美松中间体 16 β -甲基-5 α - $\Delta^{9(11)}$ -孕甾烯-3 β , 17 α , 21-三羟基-20-酮-21-醋酸酯的 $\Delta^{1,4}$ 作用

徐诗伟 法幼华

(中国科学院微生物研究所,北京)

节杆菌 9-2 在一定浓度的氯化钴存在下转化 16 β -甲基-5 α - $\Delta^{9(11)}$ -孕甾烯-3 β , 17 α , 21-三羟基-20-酮-21-醋酸酯 (I) 为 16 β -甲基- $\Delta^{1,4,9(11)}$ -孕甾三烯-17 α , 21-二羟基-3, 20-二酮 (II)。转化的最适条件为氯化钴浓度 0.08%; 乙醇 2—4%; pH 7—8; 温度 28—30°C。在此条件下,产物 (II) 的收率在 60% 以上。

倍他美松 (Betamethasone) 即 16 β -甲基-9 α -氟氢化泼尼松 (16 β -Methyl-9 α -fluoroprednisolone) 是目前糖类皮质激素中作用最强的药物之一。其抗炎作用为氢化可的松 (Hydrocortisone) 的 35 倍, 比地塞美松 (Dexamethasone) 还强^[1]。一般用薯蓣皂素 (Diosgenin) 为原料生产^[2]。近年来, 已成功地采用海可吉宁 (Hecogenin) 制得^[3]。在其合成过程中的一步重要反应 $\Delta^{1,4}$ 作用可以用化学法^[3-5], 也可用两种微生物混合发酵法^[6] 完成。我们在研究由梯可吉宁 (Tigogenin) 制得的中间体制备大力补时, 曾获得一株脱氢作用很强的节杆菌 (*Arihrobacter*) 9-2 菌株^[7,8]。本文报道利用这株菌转化由海可吉宁制得的倍他美松中间体 16 β -甲基-5 α - $\Delta^{9(11)}$ -孕甾烯-3 β , 17 α , 21-三羟基-20-酮-21-醋酸酯 (I)^[3,9] 制备 16 β -甲基- $\Delta^{1,4,9(11)}$ -孕甾三烯-17 α , 21-二羟基-3, 20-二酮 (II) 的研究结果。节杆菌 9-2 的这一转化, 不仅在甾体 A 环 C_{1,2} 和 C_{4,5} 位上同时引入双键, 并使 C₃ 位羟基氧化成酮基, C₂₁ 位醋酸酯水解为羟基。这一步微生物发酵可替代化学法的多步反应。



材料和方法

(一) 菌种

节杆菌 9-2^[7]。

(二) 甾体

本文于 1982 年 3 月 9 日收到。

NMR 承中国科学院感光化学研究所分析室用 XL-100 型 100 兆赫测定; MS 承军事医学科学院中心仪器室用 MAT 711 型测定, 特此致谢。

16 β -甲基-5 α - $\Delta^4(11)$ -孕甾烯-3 β , 17 α , 21-三羟基-20-酮-21-醋酸酯 (I)、16 β -甲基- $\Delta^1,4,9(11)$ -孕甾三烯-17 α , 21-二羟基-3, 20-二酮 (II) 及 16 β -甲基- $\Delta^4,9(11)$ -孕甾二烯-17 α , 21-二羟基-3, 20-二酮 (III) 均由上海第九制药厂提供。

(三) 培养基

培养基组成及装量同前报^[7]。

(四) 培养和转化

培养方法见前报^[8]。并在已培养 22 小时的 40 ml 菌液中加 2.5% 氯化钴溶液 1.28ml 和 5% 底物 (I) 乙醇溶液 0.8 ml, 继续按培养条件进行转化。

(五) 分析方法

用等量醋酸乙酯提取转化后的发酵液, 取 50 μ l 薄层色谱, 以已知样品作对照。薄板用青岛海洋化工厂的硅胶 Gf 254 铺板, 110 $^{\circ}$ C 活化半小时。展开剂醋酸乙酯-环己烷 (1:1)。显层后, 先置于紫外检示灯观察吸收斑点, 然后用 3% 磷酸乙醇溶液显色。

发酵液中, 产物 (II) 的定量测定方法除了测定波长改用 237 nm 以外, 其他同前报^[9] ADD 的测定方法, 并按 ϵ 值为 15800^[10] 计算含量。

(六) 产物的提取和鉴定

取转化约 72 小时的发酵液用醋酸丁酯提取三次, 提取液经过滤置于蒸发器除去溶剂近干, 冷却后过滤取结晶, 用少量溶剂洗涤即得产物 (II), 以正己烷-丙酮重结晶得分析样品, 再进行熔点、比旋值、紫外光谱、红外光谱、核磁共振谱、质谱以及元素分析等理化性质的测定。

实验结果

(一) 氯化钴对节杆菌 9-2 转化 (I) 的影响

在节杆菌 9-2 的转化液中, 发现添加氯化钴与否对转化的产物有很大的影响 (表 1)。不加氯化钴转化产物主要是极性较大的未知物 (IV), 而添加一定浓度的氯化钴才累积所需的产物 (II)。其累积量与氯化钴的添加浓度有关 (图 1)。从图中可见, 随着添加浓度的增大, 产物 (II) 的累积量随之提高。但在 0.06% 以下, 所形成

表 1 氯化钴对转化产物的影响 (转化 22 h, TLC)
Table 1 Effect of cobaltous chloride on products of transformation

甾体 Rf Steroids	不加 Co ²⁺ -Co ²⁺	加 Co ²⁺ +Co ²⁺
II 0.40	-	+++
III 0.49	-	++
IV 0.19	+++	-
V 0.28	±	-

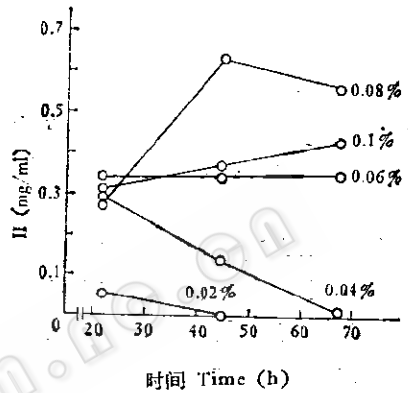


图 1 氯化钴浓度对转化的影响

Fig. 1 Effect of the concentration of cobaltous chloride on transformation

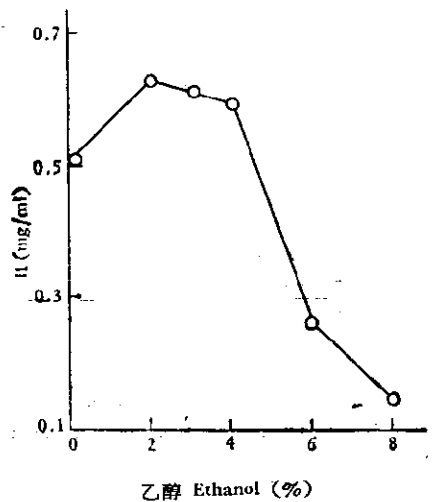


图 2 乙醇浓度对转化的影响

Fig. 2 Effect of ethanol on transformation

的 (II) 是不稳定的, 会继续被氧化, 结果主要产物仍是 (IV)。0.08% 以上, 虽然主

要产物是 (II)，但由于整个转化速率减慢，在转化 68 小时之内 (II) 的量还较低。最适的添加量应为 0.08%。在此浓度下，(II) 的累积量的提高幅度较大，转化 45 小时，每毫升可达 0.62 mg。

(二) 乙醇浓度对转化的影响

试验比较了不同浓度的乙醇对累积产物 (II) 的影响，结果表明节杆菌 9-2 可直接转化细粉末状底物 (I) 累积产物 (II)，转化率约 50%。但若将 (I) 预先用乙醇溶解后再转化，可使转化率提高到 60% 以上。但乙醇浓度不得超过发酵液体积的 4%，超过此浓度，转化反而受到严重的抑制 (图 2)。

(三) pH 对转化的影响

图 3 表明不同转化 pH 对累积产物 (II) 的影响，转化最适 pH 范围为 7—8，pH 低于 7 转化活性明显下降，pH 5 或 5 以下转化活性完全受抑制。

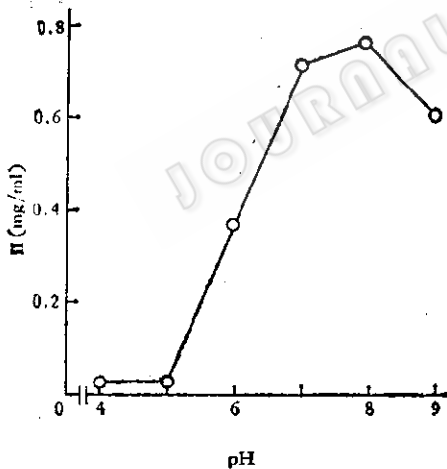
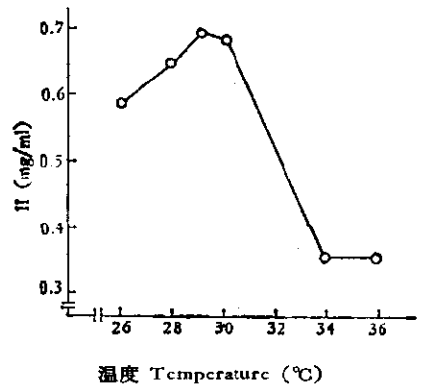


图 3 pH 对转化的影响

Fig. 3 Effect of pH on transformation

(四) 温度对转化的影响

在不同温度条件下，比较了节杆菌 9-2 转化底物 (I) 累积产物 (II) 的情况 (图 4)。这一转化反应对温度还是较敏感的。在 28—30°C 下进行转化，(II) 的转化率均



温度 Temperature (°C)

图 4 温度对转化的影响

Fig. 4 Effect of temperature on transformation

可超过 60%，而在 34°C 下转化，(II) 的累积量就减少了一半。

(五) 产物理化性质的测定

发酵液按常规法处理后得到产物 (II)，进行 TLC 分析， R_f 值与已知样品一致。熔点范围 205—213°C，收率为 60% (W/W) 以上。以正己烷-丙酮重结晶 MP 212—215°C； $[\alpha]_D^{25} + 42.8$ (C, 0.472; 1, 4-Dioxane)；UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ (nm) 238, ϵ 15500；IR ν_{\max}^{KBr} (cm^{-1}) 3450 (—OH), 1725 (2C=O), 1660 ($\Delta^{1,4}\text{C}=\text{O}$), 1620, 1605 ($\Delta^{1,4}$), 890 (C=CH 平面外弯曲)；NMR $\delta_{\text{Me}_2\text{Si}}^{\text{CDCl}_3}$ (ppm) 7.22 (1H, d, J 10 Hz, C₇-H), 6.25 (1H, d, J 10 Hz, C₇-H), 6.05 (1H, s, C₄-H), 5.55 (1H, d, J 5 Hz, C₁₁-H), 4.44 (2H, q, J 18 Hz, C₂₁-CH₂OH), 1.53 (3H, s, C₁₉-CH₃), 1.14 (3H, d, J 7 Hz, C₁₆-CH₃), 0.86 (3H, s, C₁₈-CH₃)；MS m/e M⁺ 356; 297 (M-CH₂OHCO); Anal. C₂₂H₂₆O₄ 计算值: C, 74.13; H, 7.92; 测定值: C, 74.00; H, 7.95。

讨 论

已知节杆菌 9-2 具有很强的甾体 A 环脱氢和侧链降解的能力^[3]。但在转化底物 (I) 时，仅表现出脱氢作用。根据大量有关甾体结构对微生物转化产物的影响的研究

表明,当甾体分子某一部位被取代时,将使转化反应的类型、被作用部位及其产物的比例发生很大改变。因此底物(I)分子结构上所含的 C_{17} 和 C_{20} 二羟基及 C_{16} -甲基都可能是造成甾体底物与侧链切割酶在结合上的空间位阻,而抑制了侧链的降解活性^[11]。Sih 等^[12]曾成功地用化学改造胆固醇的 AB 环的结构,防止了微生物对甾核的破坏。de Flines^[13]采用 17 α -醋酸酯或 C_{16} 位甲基取代的 RS 衍生物进行 11 β -羟基化作用,可以抑制 14 α -羟基化作用,从而提高产物的收率。此法已在工业生产氢化可的松方面使用多年。这些工作表明在微生物转化中,利用甾体结构与转化之间关系有目的地控制转化的方向,并防止产生不需要的副反应都是有可能的。

底物(I)的原料是从制麻工业的废叶汁中提取的^[14]。产物(II)是制备高效皮质激素倍他美松的重要中间体。借节杆菌 9-2 的一步微生物转化从(I)制备(II),不但为制备甾体激素药物开辟了新的途径,而

且在合成过程中替代了多步化学反应,产品收率也是较高的。

参 考 文 献

- [1] 今田幸男、新田一誠: 発酵と工業, 38 (12): 21—36, 1980.
- [2] 上海第十二制药厂: 医药工业, 4: 22—32, 1976.
- [3] 广州第八制药厂中试室: 医药工业, 8: 3—8, 1980.
- [4] Amlard, G.: US. Pat., 3, 104, 246, 1963.
- [5] Testa, E. et al.: US. Pat., 3, 076, 001, 1963.
- [6] 张丽青等: 药学学报, 16(5): 356—360, 1981.
- [7] 法幼华, 徐诗伟: 微生物学报, 20(2): 185—190, 1980.
- [8] 徐诗伟、法幼华: 微生物学报, 22(4): 361—366, 1982.
- [9] Attenburrow, J. et al.: J. Chem. Soc., 4547—4559, 1961.
- [10] Carrington, T. B. et al.: J. Chem. Soc., 4560—4572, 1961.
- [11] Nagasawa, M. et al.: Agr. Biol. Chem., 34 (5): 798—800, 1970.
- [12] Sih, C. J. et al.: J. Am. Chem. Soc., 87 (12): 2765—2766, 1965.
- [13] de Flines J.: Fermentation Advances, VI, ed by Perlman, D., Academic Press, New York and London, 1969, 385—390.
- [14] 陈延铺等: 医药工业, 8: 1—3, 1978.

THE MICROBIAL TRANSFORMATION OF RING-A SATURATED STEROIDS

III. $\Delta^{1,4}$ -DEHYDROGENATION OF BETAMETHASONE INTERMEDIATE 16 β -METHYL-5 α - $\Delta^{9(11)}$ -PREGNENE-3 β , 17 α , 21-TRIHYROXY-20-ONE-21-ACETATE

Xu Shiwei Fa Youhua

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

In the presence of Co^{2+} the transformation of 16 β -methyl-5 α - $\Delta^{9(11)}$ -pregnene-3 β , 17 α , 21-trihydroxy-20-one-21-acetate(I) to 16 β -methyl- $\Delta^{1,4,9(11)}$ -pregnatriene-17 α , 21-dihydroxy-3, 20-dione (II) was carried out by *Arthrobacter* No 9-2.

The optimal conditions for accumulation of product (II): $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.08%

(W/V); pH 7—8; range of temperature 28—30°C and 2—4% (V/V) ethanol were used to dissolve the substrate (I) as final concentration in the medium (V/V). Under such conditions the yield of product (II) after the microbial transformation was more than 60%.