

地塞美松中间体的 C₁₄脱氢和 11 α -羟基化

徐诗伟 徐清* 曹桂芳 法幼华

(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

关键词 节杆菌 绿僵菌 微生物混合转化 16 α -甲基-11 α ,17 α ,21-三羟基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮
中图分类号 Q815 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0763-03

地塞美松(Dexamethasone)为高效肾上腺皮质激素药物,临床上广泛使用。开拓用梯可吉宁(Tigogenin)为起始原料生产从化学结构和合成技术上讲较为合理,而且适合于资源综合利用^[1]。在合成过程中,除了A环需引入C₁₄和C_{4,5}两个双键(含C₃-羟基氧化)外,还需用微生物法在C₁₁位引入羟基。国外常采用化学法脱氢,然后再用霉菌11 α -羟基化^[2,3]。本文报道用两类微生物菌种,节杆菌(*Arthrobacter* sp.)AX86和绿僵菌(*Metarhizium* sp.)M88,混合转化一步完成脱氢和羟基化反应,自16 α -甲基-3 β ,17 α ,21-三羟基-5 α -孕甾-20-酮-21-醋酸酯制备地塞美松重要前体16 α -甲基-11 α ,17 α ,21-三羟基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮的研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌种

节杆菌 AX86 和绿僵菌 M88 由筛选得到,分别在牛肉汁和土豆汁琼脂斜面上保存,液体培养基组成见前报^[4,5]。

1.2 甾体化合物

16 α -甲基-3 β ,17 α ,21-三羟基-5 α -孕甾-20-酮-21-醋酸酯(底物),16 α -甲基-17 α ,21-二羟基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮($\Delta^{1,4}$ 中间体)和16 α -甲基-11 α ,17 α ,21-三羟基孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮(产物)由天津药业公司和上海华联制药有限公司提供。

1.3 培养与菌丝体的收获

1.3.1 绿僵菌培养:含40 mL培养基中接种斜面生长的孢子悬液,28 $^{\circ}$ C,200 r/min培养24 h,以10%(V/V)种量移入新鲜培养基,经培养后,离心收集菌丝体备用,通常每毫升菌液可获得湿菌体重75 mg(含水量约80%)。

1.3.2 节杆菌培养:含40 mL培养基中接种斜面生长2 d的节杆菌,28 $^{\circ}$ C,200 r/min培养24 h,以5%种量移入新鲜培养基,继续培养20 h。

1.4 转化及产物提取

取上述已生长好的节杆菌加入等体积培养的绿僵菌菌

丝体,然后再加入适量氯化钴(CoCl₂·6H₂O)溶液和0.2%(W/V)底物,30 $^{\circ}$ C,200 r/min转化至底物消失。终止反应后,用醋酸乙酯提取3次,合并提取液减压浓缩,残余物用溶剂洗涤即得产物,经溶剂重结晶后进行各项物理性质测定。

1.5 分析方法

取转化液用2倍醋酸乙酯(V/V)萃取,有机相进行TLC和HPLC分析,色谱条件和检测方法同前报道^[5]。

2 结果与讨论

2.1 投料方式对混合转化的影响

在甾体化合物转化中,常用能与水混溶溶剂如乙醇溶解底物投料或投加底物悬浮液(即将底物磨细,在含表面活性剂吐温的水中超声振荡处理)来改善底物的疏水性,促进转化有利于合成方向^[4-7]。我们在用不同潜溶剂进行底物投料试验时,观察到本转化底物在乙醇中溶解度较小,而易溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)。用2%~4%(v/v)DMF溶解底物比直接投加底物悬浮液,产物转化率提高约40%,且底物转化完全,若溶剂浓度超过4%,将对微生物产生明显抑制作用,致使转化率迅速降低,达到7%时,几乎不形成产物。

2.2 菌丝体添加时间的影响

当底物DMF溶液加到节杆菌培养液后,在不同时间内添加绿僵菌菌丝体观察对产物的影响。发现与投料同时到投料后28 h内加入菌丝体对产物累积无明显影响,均可获得较高转化率。

2.3 菌丝体浓度的影响

在试验12.5~75 mg/mL范围内菌丝体浓度,表明产物转化率随着菌丝体浓度增加相应提高,而采用与节杆菌培养液等体积所收获菌丝体量进行混合转化是较适宜的。

2.4 氯化钴对混合转化的影响

以前的研究^[8,9]已表明Co²⁺是节杆菌C₁₄脱氢的有效甾核降解酶(9 α -羟化酶)的抑制剂。在混合转化中,添加氯化钴 \geq 0.04%同样能得到稳定的产物,转化率在60%以上;

而在较低浓度 0.02% 时,底物可完全转化,但产物形成甚微 (<6%),若不加 Co^{2+} 转化 24 h 后产物基本稳定在 16%~18% 之间(图 1)。经色谱跟踪发现,仅在不加 Co^{2+} 情况下,混合转化过程中出现底物的 11 α -羟化物,其可进一步转化为产物。由此推测在无 Co^{2+} 时混合转化同时存在底物先 11 α -羟基化后 C_{14} 脱氢形成产物的转化途径。若底物先 C_{14} 脱氢则易受甾核降解酶作用很难累积产物,只有当添加足够量的该酶抑制剂时,产物才大量累积。可见, Co^{2+} 加入不仅对混合转化产物的积累起决定性作用,而且改变了混合转化的途径。

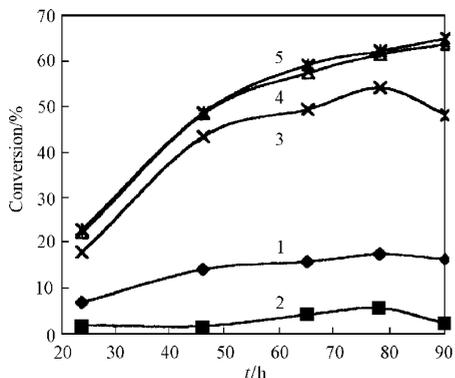


图 1 不同氯化钴浓度的产物累积时间过程

1. 0% 2. 0.02% 3. 0.03% 4. 0.04% 5. 0.06%

2.5 混合转化途径

图 2 展示在添加 0.04% 氯化钴条件下,用节杆菌单独转化以及与绿僵菌混合转化的时间进程。由图看出,节杆菌单独进行脱氢时,经 90 h 后 $\Delta^1,4$ 中间体最高转化率为 42%,尚有部分底物存在,而在混合转化过程中, $\Delta^1,4$ 中间体始终处于较低水平,转化 46 h 后底物转化完全,产物大幅度增长。可见由于混合转化降低 $\Delta^1,4$ 中间体浓度,不仅解除了它对节杆菌脱氢酶活性的反馈抑制,同时解除了对绿僵菌 11 α -羟化酶的抑制作用,起到分批投料作用,既加快了 $\Delta^1,4$ 作用速率,又有利于引入 11 α -羟基。其转化途径可认为按图 3 所示。

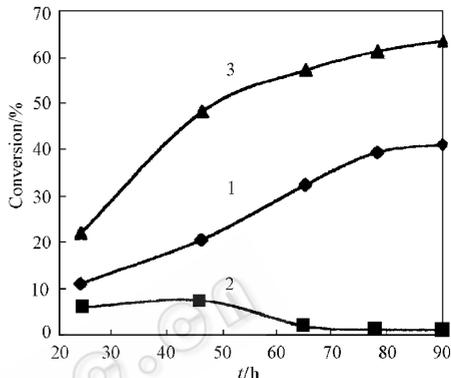


图 2 $\Delta^1,4$ 中间体和产物的形成过程

1. 节杆菌 AX86 转化形成 $\Delta^1,4$ 中间体
2, 3 分别为混合转化所形成的 $\Delta^1,4$ 中间体和产物

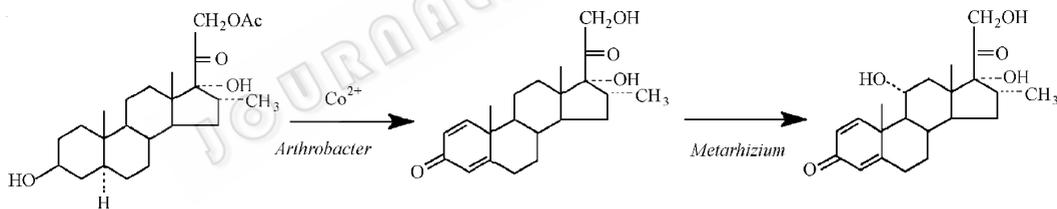


图 3 混合转化途径

2.6 产物的提取

在上述适宜条件下,进行 3L 试验,底物总投加量 3.20 g,混合转化 70 h 后,经提取得产物 1.98 g, mp220.3~221.4 $^{\circ}C$, 收率 67.2%。经乙醇重结晶得分析样品 mp221.6~222.4 $^{\circ}C$ [α] $_D^{25} + 53.4^{\circ}(C, 0.49, EtOH)$; UV λ_{max}^{EtOH} (nm) 247 (ϵ 17300); IR ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}) 3480 (OH), 1710 (C=O), 1655 (C=C), 1615, 1605, 890 (1,4C=C); MS m/e M^+ 374; 1H NMR $\delta_{Me_4Si}^{CDCl_3}$ (ppm) 0.78 (3H, s, $C_{18}-CH_3$), 0.86 (3H, d, 17Hz, 16- CH_3), 1.33 (3H, s, $C_{19}-CH_3$), 1.85 (s, 11 α -OH), 3.98

(1H, td, 11 β -H), 4.42 (2H, AB, J18Hz, $C_{21}-CH_2OH$), 6.08 (1H, s, C_4-H), 6.09 (1H, dd, J10, 2Hz, C_2H), 7.92 (1H, d, J10Hz, C_1-H); ^{13}C NMR $\delta_{Me_4Si}^{CDCl_3}$ (ppm) 12.1 (C_{20}), 188.4 (C_3 , s), 172.0 (C_5 , s), 162.0 (C_1 , d), 124.4 (C_2 , d), 124.1 (C_4 , d), 91.2 (C_{17} , s), 68.2 (C_{21} , t), 67.8 (C_{11} , d), 61.2 (C_9 , d), 18.9 (16 α - CH_3 , q), 16.4 (C_{19} , q), 15.1 (C_{18} , q), 33.1-51.2 为甾核其他各碳; Anal. $C_{22}H_{30}O_5$ 计算值(%): C, 70.57; H, 8.07; 测定值(%): C, 70.38; H, 7.97。证实混合转化产物为 16 α -甲基-11 α , 17 α , 21-三羟基孕甾-14-烯-3, 20-二酮。

参 考 文 献

[1] 马如鸿, 费得青, 游晓燕等. 中国医药工业杂志, 1989, 20(1): 1~5
 [2] Oliveto E P, Rausser R, Weber L et al. J Am Chem Soc, 1958, 80(16): 4431
 [3] Petzoldt K, Kieslich K, Weber A et al. Ger Offen, 1981, 2940285
 [4] 徐诗伟, 徐清, 法幼华. 生物工程学报, 2000, 16(4): 482~484

- [5] 徐诗伟, 徐清, 法幼华. 生物工程学报, 2000, 16(5): 651~653
- [6] 张丽青, 王敬一. 药学学报, 1986, 21(9): 974~979
- [7] 沈裕康. 工业微生物, 1987, 17(1): 26~33
- [8] 法幼华, 徐诗伟. 微生物学报, 1980, 20(2): 185~190
- [9] 徐诗伟, 法幼华. 微生物学报, 1982, 22(4): 361~366; 1984, 24(1): 46~49; 1990, 30(1): 80~82

Preparation of 16 α -Methyl-11 α ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregndiene-3,20-dione by Mixed Microbial Conversion of C₁₄ Dehydrogenation and 11 α -Hydroxylation

XU Shi-Wei XU Qing CAO Gui-Fang FA You-Hua

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080)

Abstract The optimal conditions of the conversion of 16 α -methyl-3 β ,17 α ,21-trihydroxy-5 α -pregnane-20-one-21-acetate to 16 α -methyl-11 α ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregndiene-3,20-dione by the mixed cultures of *Arthrobacter sp*86 and *Metarhizium sp* 88 were studied. 2%~4%(V/V)N,N-dimethylformamide in the medium was used to dissolve the substrate. It could increase the conversion ability. Adding the mycelium of *Metarhizium* into the dehydrogenation reaction mixture during 0~28 hours had no influence on the conversion rate. The optimal concentration of mycelium was around 75 mg/mL wet weight. 0.04%~0.06% CoCl₂·6H₂O inhibited the degradation of steroid nucleus so that the product was greatly accumulated. Under such condition the yield of mixed microbial conversion was 67%.

Key words *Arthrobacter*, *Metarhizium*, mixed microbial conversion, 16 α -methyl-11 α ,17 α ,21-trihydroxy-1,4-pregndiene-3,20-dione