

Л. О. СЕВЕРИНА, И. В. ТОРГОВ

О НОВЫХ ПРОДУКТАХ ПРЕВРАЩЕНИЯ ДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ  
КИСЛОТЫ ПРИ ПОМОЩИ КУЛЬТУРЫ  
MUCOBACTERIUM MUCOSUM 1210

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 19 XI 1970)

Выделенная из почвы активная культура *Mycobacterium mocosum* 1210, трансформирующая холевую кислоту, способна осуществлять также и трансформацию дезоксихолевой кислоты. При этом из культуральной жидкости были выделены (в виде метиловых эфиров) 3, 12-дикето- $\Delta^4$ -биснорхоленовая и 9 $\alpha$ -окси-3,12-дикето- $\Delta^4$ -биснорхоленовая кислоты (<sup>1</sup>, <sup>2</sup>). Впервые было показано  $\beta$ -окисление боковой цепи и 9 $\alpha$ -гидроксилирование молекулы дезоксихолевой кислоты микробиологическим путем.

Данная работа посвящена выделению и идентификации других продуктов превращения дезоксихолевой кислоты, обнаруженных в культуральной жидкости.

Ферментацию проводили на среде следующего состава:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 г,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 г,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  1 г;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,01 г, дезоксихолевая кислота 1 г, вода дистиллированная 1000 мл, pH 7 после стерилизации в колбах Эрленмейера, помещенных на качалку (160 об/мин) при 27°.

Колбы засеивали трехсуточной культурой *Mycobacterium mocosum* 1210, предварительно выращенной на агаризованной среде с холевой кислотой.

На 9 сутки ферментации (хроматографический контроль показал отсутствие дезоксихолевой кислоты в культуральной жидкости) содержимое колб обрабатывали обычным способом. Продукт метилировал диазометаном и смесь метиловых эфиров разделяли препаративно в тонком слое окиси алюминия (III степени активности по Брокману) в эфире и в системах эфир — этилацетат (<sup>1</sup>). Основными компонентами оказались метиловый эфир 3,12-дикето- $\Delta^4$ -биснорхоленовой кислоты (т. пл. 200—202°) и метиловый эфир 9 $\alpha$ -окси-3,12-дикето- $\Delta^4$ -биснорхоленовой кислоты (т. пл. 225—228°).

При дальнейшем многократном хроматографировании в системах эфир и эфир — этилацетат (4:1; 3:1; 3:2; 1:1; 1:2 и 1:3) были выделены вещества III, IV и V. Вещество III после кристаллизации из смеси эфир — петролейный эфир имело т. пл. 175—177°. В и.-к. спектре вещества (в пасте с вазелиновым маслом) проявились следующие полосы поглощения: 3450  $\text{см}^{-1}$  (гидроксильная группа), 1740  $\text{см}^{-1}$  (сложноэфирная группировка), 1670 и 1620  $\text{см}^{-1}$  ( $\Delta^4$ -3-кетогруппировка). Молекулярный вес, определенный масс-спектрометрически (374), явно указывал на деградацию боковой цепи. Кроме того, в масс-спектре имелись дегидратационный пик с  $m/e$  356, а также пик с  $m/e$  269 ( $\text{M} - \text{H}_2\text{O}$  — боковая цепь). Присутствие в спектре пика с  $m/e$  124 подтверждало наличие  $\Delta^4$ -3-кетогруппировки.

На основании вышеизложенного можно считать, что полученное соединение обладает строением метилового эфира 12 $\alpha$ -окси-3-кето- $\Delta^4$ -биснорхоленовой кислоты.

Вещество IV после кристаллизации из эфира имело т.пл. 184—186° и

оказалось метиловым эфиром 3,12-дикето- $\Delta^4$ ,  $^{9(11)}$ -биснорхолодиеновой кислоты, полученным нами ранее нагреванием эфира II с *n*-толуолсульфокислотой в бензоле (<sup>2</sup>). Смешанная проба не дала депрессии температуры плавления.

Масс-спектры обоих веществ были идентичны: имелись пик молекулярного иона ( $m/e$  370), пики, обусловленные потерей боковой цепи ( $m/e$  283 и 88), пик трициклического фрагмента (М-кольцо D + H,  $m/e$  243) и пик, характерный для  $\Delta^9(11)$ -12-кетостероидов ( $m/e$  202) (<sup>3</sup>).

Наиболее полярное вещество V, после кристаллизации из эфира и смеси эфир — этилацетат имело т.пл. 235—238°. В масс-спектре вещества V

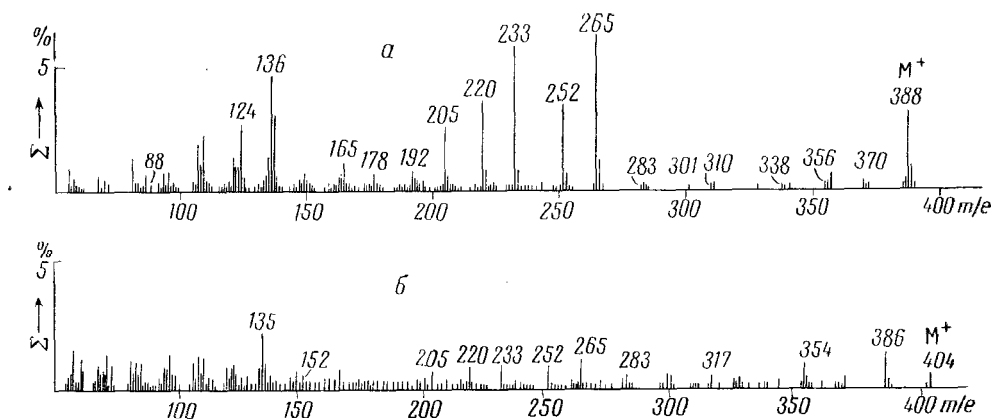
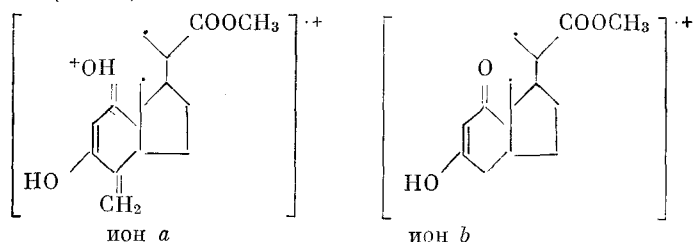


Рис. 1. Масс-спектр соединения II (a) и соединения V (б)

содержатся пик молекулярного иона с  $m/e$  404, дегидратационный пик с  $m/e$  386, а также пик, характеризующий длину боковой цепи (М — 87,  $m/e$  317).

При сравнении масс-спектров (рис. 1) эфиров II и V видно, что молекулярный вес эфира V больше молекулярного веса эфира II на 16 единиц, т.е. в эфире V содержится дополнительная гидроксильная группа (рис. 1). Кроме того, в спектрах эфиров V присутствуют пики с  $m/e$  265 (ион a) и 252 (ион b):

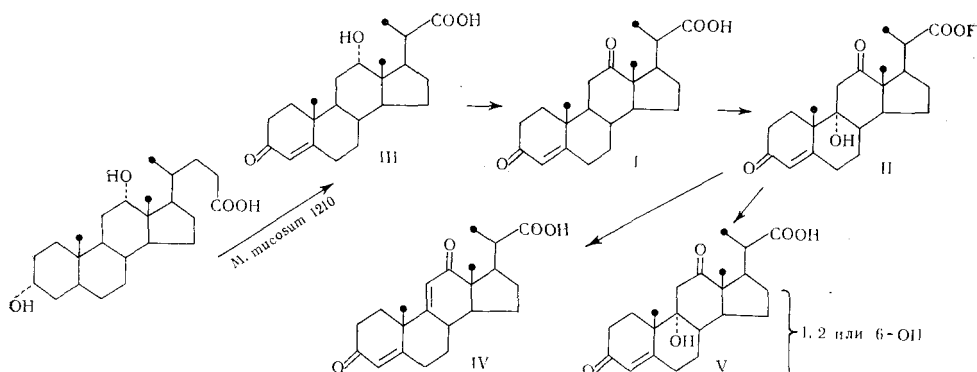


В состав этих фрагментов входят кольца C и D, и образование их связано с разрывом связей кольца B — соответственно 9, 10 и 6, 7 (ион a) и 9, 10 и 7, 8 (ион b), что указывает на присутствие гидроксильной группы в 9 положении, инициирующей подобный разрыв. Дальнейший распад этих фрагментов сопровождается потерей молекул  $\text{CH}_3\text{OH}$  или  $\text{HCOOCH}_3$  или всей боковой цепи и приводит к ионам с  $m/e$  233 и 220; 205 и 192; 178 и 165 соответственно, имеющихся в спектрах обоих соединений.

Таким образом, вторая гидроксильная группа может находиться только в кольце A или B, а именно в положении 1, 2 или 6. Поскольку вещество V образуется в очень небольшом количестве, мы не имели возможно-

сти провести дополнительные исследования для окончательного доказательства положения гидроксильной группы.

Таким образом, трансформацию дезоксиголевой кислоты при помощи культуры *Mycobacterium mageritense* 1210 можно представить следующей схемой:



Авторы выражают благодарность Ю. С. Некрасову и И. Б. Паперной (лаборатория масс-спектрометрии Института химии природных соединений АН СССР) за снятие масс-спектров и их интерпретацию.

Институт микробиологии  
Академии наук СССР  
Москва

Поступило  
16 XI 1970

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Л. О. Северина, И. В. Торгов, Г. К. Скрыбин, ДАН, 184, 963 (1969).
- <sup>2</sup> L. O. Severina, I. V. Torgov et al., Tetrahedron, 25, 5617 (1969).
- <sup>3</sup> L. Tökes, C. Djerassi, Steroids, 6, 493 (1965).