

УДК 547.92,547.6.66

## КОНВЕРСИЯ СОЕВОГО ФИТОСТЕРИНА В АНДРОСТА-4,9(11)-ДИЕН-3,17-ДИОН

© 2020 г. Т. С. Савинова<sup>1,\*</sup>, Д. В. Довбня<sup>2</sup>, С. М. Хомутов<sup>2</sup>,  
А. В. Казанцев<sup>1</sup>, Л. Д. Ху<sup>3</sup>, Н. В. Лукашев<sup>1</sup>, М. В. Донова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пушино, Московская область, 142290 Россия

<sup>3</sup>Институт химии Вьетнамской академии наук и технологии, Ханой, А18, Вьетнам

\*e-mail: [tatiana\\_savinova@rambler.ru](mailto:tatiana_savinova@rambler.ru)

Поступила в редакцию 08.11.2019 г.

После доработки 10.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

Разработан метод получения андроста-9(11)-диен-3,17-диона ( $\Delta^9(11)$ -АД), представляющий собой комбинацию микробного окисления боковой цепи фитостерина с одновременным  $9\alpha$ -гидроксилированием и последующей химической региоселективной дегидратацией образованного  $9\alpha$ -гидрокси-3,17-дикето-интермедината без его выделения и очистки. В процессе культивирования штамма *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D дикого типа фитостерин трансформировался в  $9\alpha$ -гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион (9-ОН-АД). Продукт экстрагировали из культуральной жидкости органическим растворителем и дегидратировали в экстракте минеральной кислотой. Образованный  $\Delta^9(11)$ -АД очищали с использованием метода селективной кристаллизации. Минорные продукты выделены и идентифицированы. Показана способность штамма трансформировать стеринны с образованием метилового эфира  $9\alpha$ -гидроксипрегн-4-ен-3-он-20-карбоновой кислоты. Предлагаемый подход позволил упростить технологическую схему получения целевого соединения и не только исключить потери 9-ОН-АД, но и минимизировать количество отходов.

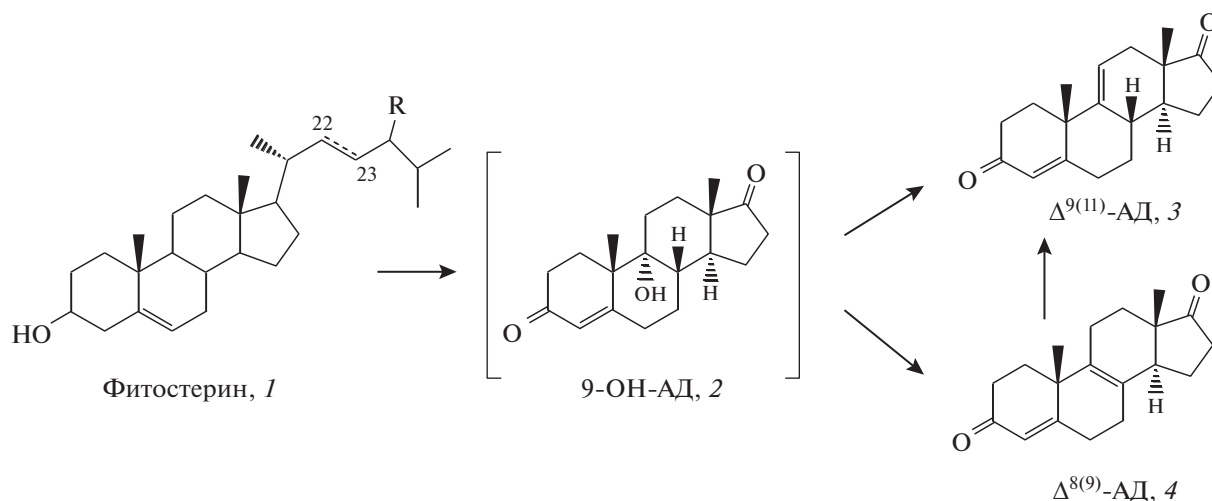
**Ключевые слова:** фитостерин, биоконверсия, *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D,  $9\alpha$ -гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион, андроста-4,9(11)-диен-3,17-дион, дегидратация, метиловый эфир прегна-4,9(11)-диен-3-он-20-карбоновой кислоты

**DOI:** 10.31857/S0555109920030125

Фитостерины – растительные стеринны – производятся в промышленности из масличного растительного сырья (соя, рапс и др.) при очистке растительных масел или отходов целлюлозно-бумажной промышленности [1]. В настоящее время фитостерины являются дешевым и доступным исходным материалом для производства различных терапевтических стероидов [2]. Обычно коммерчески доступный фитостерин представляет собой смесь нескольких стериннов, в основном  $\beta$ -ситостерина, стигмастерина, кампестерина и брассикастерина, содержащих в молекулярной структуре  $3\beta$ -гидроксильную группу и 5,6-двойную связь (рис.1). Схемы получения терапевтических стероидов включают микробиологическую конверсию фитостериннов в ключевые интермединаты, такие как андрост-4-ен-3,17-дион (АД), его 1-дегидро-аналог (АДД) и  $9\alpha$ -гидроксилированное производное (9-ОН-АД) [3–5].

Известно несколько подходов к получению 9-ОН-АД из фитостериннов. Один из них включает микробиологическое окисление фитостериннов до АД, его выделение, кристаллизацию и последующее гидроксилирование в положение  $9\alpha$  [6–9]. Способностью к  $9\alpha$ -гидроксилированию АД обладают бактерии и грибы, относящиеся к родам *Corynebacterium*, *Corinespora*, *Mycobacterium*, *No-cardia*, *Rhodococcus*, *Cunninghamella* и *Neurospora* [10, 11]. Другим подходом к получению 9-ОН-АД является двухстадийная биоконверсия, включающая микробное окисление фитостериннов до АД и последующее его гидроксилирование в положение  $9\alpha$  без извлечения АД из ферментационной среды и кристаллизации с последовательным использованием штаммов *Mycobacterium neoaurum* и *Rhodococcus erythropolis* [12].

Экономически наиболее целесообразным в синтезе 9-ОН-АД из фитостериннов является подход, основанный на использовании штаммов акти-



**Рис. 1.** Синтез  $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) из стероидов через образование 9-ОН-АД (2): R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> –  $\beta$ -ситостерин; R = CH<sub>3</sub> – кампестерин; R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> и  $\Delta^{22(23)}$  – стигмастерин, R = CH<sub>3</sub> и  $\Delta^{22(23)}$  – брассикастерин.

нобактерий, способных в одностадийной биоконверсии накапливать 9-ОН-АД в качестве основного продукта. Ранее сообщалось, что некоторые штаммы микобактерий, полученные методом мутагенеза, конвертировали  $\beta$ -ситостерин в 9-ОН-АД [13, 14]. Однако не меньший интерес представляют природные штаммы, обладающие способностью к селективному образованию и накоплению 9-ОН-АД в процессе катаболической модификации фитостеринов. Одним из таких штаммов является сапротрофный быстро растущий выделенный из почвы непатогенный штамм *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D, способный отщеплять боковую цепь при С17 и вводить гидроксильную группу в положение С9 стерина с образованием 9-ОН-АД в качестве основного продукта [15–17]. Было проведено полное геномное профилирование штамма *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D и найдено, что штамм обладает множеством генов, кодирующих ферменты катаболизма стероидов, в том числе окислительной деструкции боковой цепи, разрушения стероидного ядра и транспорта стероидов [18]. Полная последовательность генома, необходимая для осуществления генетических манипуляций с целью создания новых стерин-трансформирующих биокатализаторов, была депонирована в GenBank под регистрационным номером CP009914 [19]. Таким образом, штамм *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D является перспективным объектом для создания на его основе новых промышленных штаммов.

Мультистадийные синтезы субстанций стероидных лекарственных средств из 9-ОН-АД часто включают комбинацию химических и биотехнологических стадий. При этом, как правило, на первом этапе проводят региоселективную дегид-

ратацию 9 $\alpha$ -гидроксильной группы с образованием андроста-4,9(11)-диен-3,17-диона ( $\Delta^{9(11)}$ -АД). 9,11-Двойная связь обеспечивает большую стабильность стероидной молекулы по сравнению с 9 $\alpha$ -гидроксильной группой в условиях дальнейшей структурной модификации 17-кетогруппы, которая необходима при построении прегнановой цепи. Такой подход помогает предотвратить возможные перегруппировки с участием третичной гидроксильной группы при С9 и, в частности, модификацию кольца А молекулы стероида [20]. Так, получение  $\Delta^{9(11)}$ -АД из 9-ОН-АД было проведено на первой стадии в синтезах  $\Delta^{9(11)}$ -прекурсоров 11 $\beta$ -гидроксилированных кортикостероидов (например, гидрокортизона и преднизолон [21–23]), а также других ключевых интермедиатов коммерчески важных кортикостероидов, молекулярная структура которых содержит атом галогена в положении С9 $\alpha$ , например, дексаметазона, триамцинолона, бетаметазона и др. [24–27]. В синтезе андрогенного средства флюоксиместерона из 11 $\alpha$ -ОН-АД [28] последний также сначала превращали в  $\Delta^{9(11)}$ -АД.

Следует отметить, что эффективность технологии микробного производства ключевых стероидных интермедиатов зависит не только от активности штамма, селективности процесса и ряда других факторов, но и, в не меньшей степени, от эффективности методов выделения и очистки целевого продукта.

Цель работы – создание эффективной комбинированной схемы получения  $\Delta^{9(11)}$ -АД из соевого фитостерина, включающей биоконверсию фитостерина в 9-ОН-АД культурой *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D и региоселективную дегидратацию

9 $\alpha$ -гидроксильной группы молекулы 9-ОН-АД в органическом экстракте ферментационной жидкости без выделения и очистки его кристаллов.

### МЕТОДИКА

**Использованные реактивы.** Соевый фитостерин (“Jiangsu Spring Fruit Biological Products Co.”, Китай) в соответствии с сертификатом производителя содержал: трансформируемые стеринны – 95.5%, в том числе (%):  $\beta$ -ситостерин – 42.4; кампестерин – 23.5; стигмастерин – 26.1; брассикастерин – 3.5.

9-ОН-АД (CAS No. 560-62-3, C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>, М.м. 302.41) 99.3%-ного содержания (ВЭЖХ, <sup>1</sup>H-ЯМР) и 9 $\alpha$ -гидроксипрегн-4-ен-3-он-20-карбоновая кислота (синоним 9 $\alpha$ -гидрокси-3-кето-23,24-биснорхол-4-ен-22-овая кислота, **9-ОН-БНК**) 95%-ного содержания были получены в лаборатории микробиологической трансформации органических соединений ИБФМ РАН (Россия). АД (CAS No. 63-05-8, C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>, М.м. 286.41), АДД (CAS No. 897-06-3, C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>, М.м. 284.39) и  $\Delta^{9(11)}$ -АД (CAS 1035-69-4, C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>, М.м. 284.39) производства “Steraloids Inc.” (США) были использованы в качестве аналитических стандартов.

Агар, дрожжевой экстракт (тип Д) и органические растворители для ВЭЖХ (LC-MS или Supergradient grade) – “Panreac” (Испания), очищенная вода для ВЭЖХ “MilliQ ultrapure water” (“Merck Millipore KGaA”, Германия). Реагенты для стадии дегидратации были производства “Sigma-Aldrich Co.” (США). Органические растворители для экстракции стероидов, компоненты питательных сред и другие материалы – “Экос-1” (Россия). Для мониторинга процесса дегидратации и препаративной ТСХ были использованы пластинки Silica gel 60 F<sub>254</sub>, (“Merck KGaA”, Германия).

**Микроорганизм и условия его культивирования.** Быстро растущий непатогенный штамм *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D (по современной классификации *Mycolicibacterium* sp.) был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ ИБФМ РАН). Культуру поддерживали на скошенном агаре, посевную культуру выращивали в качалочных колбах емкостью 750 мл на питательной среде с глицерином и дрожжевым экстрактом, как было описано ранее [14].

**Биоконверсия фитостерина.** Биотрансформацию фитостерина проводили аэробно на орбитальной качалке при 220 об./мин и температуре 30 $^{\circ}$ С в качалочных колбах на 750 мл со 100 мл конвексионной среды следующего состава (г/л дистиллированной воды): КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 0.8; К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> · 3Н<sub>2</sub>О – 4.2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 3.0; глицерин – 5.0; карбамид – 0.13; MgSO<sub>4</sub> · 7Н<sub>2</sub>О – 0.2; FeSO<sub>4</sub> ·

· 7Н<sub>2</sub>О – 0.01; ZnSO<sub>4</sub> · 7Н<sub>2</sub>О – 0.002; твин-80 – 1.0; фитостерин – 5.0 (в расчете на сумму трансформируемых стериннов); рН 7.2.

По окончании стерилизации среды в автоклаве фитостерин гомогенизировали с помощью ультразвука (42 кГц, 100 Вт) в течение 2 мин. Биоконверсию начинали с внесения посевной культуры (10% по об.). Пробы культуральной жидкости (**КЖ**) отбирали каждые 12 ч, содержание 9-ОН-АД и фитостерина контролировали с помощью ВЭЖХ. Для препаративной дегидратации 9-ОН-АД биотрансформацию проводили в 10 колбах и останавливали после 60 ч инкубации, когда глубина конверсии фитостерина достигала ~80%, а селективность образования 9-ОН-АД ~55% (в расчете на конвертированный фитостерин).

**Получение экстракта.** После завершения биоконверсии из КЖ (~980 мл, рН 6.5–6.7), содержащей клетки микобактерий и остаточный субстрат, экстрагировали 9-ОН-АД толуолом трижды по 0.5 л. Экстракт, содержащий 9-ОН-АД, промывали дважды по 100 мл 5%-ного водного раствора NaHCO<sub>3</sub> для удаления 9-ОН-БНК и дистиллированной водой до рН 7.0. Затем экстракт, содержащий 1.59 г 9-ОН-АД по данным ВЭЖХ анализа, концентрировали в вакууме до объема ~300 мл и далее использовали в реакции дегидратации без выделения кристаллического продукта.

**Дегидратация.** Толуольный экстракт (~300 мл), содержащий 1.59 г (5.258 ммоль) 9-ОН-АД, помещали в колбу с насадкой Дина Старка и добавляли 0.57 мл 85%-ной Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub> из расчета ~1.6 моль на 1 моль 9-ОН-АД. Реакционную массу нагревали до кипения. Отгоняемую воду собирали в насадке. Реакция завершилась через 5 мин после начала кипения. Окончание реакции контролировали методом ТСХ. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли 5%-ный водный раствор NaCl в количестве, равном 1/2 об. реакционной массы. Органическую фазу отделяли, а водный слой экстрагировали толуолом. Объединенную органическую фазу промывали 5%-ным водным раствором NaCl до нейтральной реакции и водой, а затем сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель упаривали в вакууме досуха. Содержание  $\Delta^{9(11)}$ -АД и остаточного количества 9-ОН-АД в сухом остатке после упаривания (2.11 г) определяли с помощью ВЭЖХ анализа. Согласно ВЭЖХ анализу содержание  $\Delta^{9(11)}$ -АД составляло 1.477 г (селективность 98.8%), при этом сухой остаток не содержал 9-ОН-АД.

**Очистка  $\Delta^{9(11)}$ -АД.** Сухой остаток, полученный после упаривания растворителя (2.11 г) и содержащий  $\Delta^{9(11)}$ -АД (70% основного вещества согласно ВЭЖХ или 1.477 г в 100% исчислении) растворяли в 80 мл ацетона, раствор осветляли акти-

вированным углем (10% от веса стероида), уголь отфильтровывали, промывали на фильтре ацетоном. Затем к фильтрату (84 мл) медленно добавляли 56 мл дистиллированной воды в объемном соотношении 3 : 2 (раствор–вода). Суспензию перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Осадок, содержащий стеринны и побочные продукты, отфильтровывали и промывали на фильтре 60%-ным водным (об./об.) ацетоном. Фильтрат упаривали в вакууме для удаления ацетона. Суспензию охлаждали до 8–10°C, осадок  $\Delta^{9(11)}$ -АД отделяли фильтрацией и промывали дистиллированной водой. После сушки получали 1.457 г целевого продукта  $\Delta^{9(11)}$ -АД в виде почти белого кристаллического порошка с температурой плавления ( $T_{пл}$ ) 203.5–206.5°C ( $T_{пл}$  201–204.5°C [29]) и выходом 97.46%, при расчете на 9-ОН-АД.

Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): выбранные сигналы,  $\delta$ , м.д.: 5,75 (д,  $J = 1.8$  Гц, 1H, 4-СН); 5,55 (м, 1H, 11-СН); 1,35 (с, 3H, 19-СН<sub>3</sub>); 0,87 (с, 3H, 18-СН<sub>3</sub>).

Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  (100,6 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ , м.д.: 221,0 (17-С(О)); 199,0 (3-С(О)); 168,9 (5-С); 145,1 (9-С); 124,2 (4-СН); 118,1 (11-СН); 48,0; 45,8; 41,1 36,8; 36,2; 34,2; 33,8; 33,4; 32,6; 31,1; 26,2; 22,6; 13,9 (19-СН<sub>3</sub>).

Содержание основного вещества ( $\Delta^{9(11)}$ -АД) и примеси  $\Delta^{8(9)}$ -изомера в продукте определяли с помощью ВЭЖХ анализа. Продукт содержал 97,38%  $\Delta^{9(11)}$ -АД, 0,86%  $\Delta^{8(9)}$ -АД и 0,69% АД.

**Разделение смеси стериннов и побочных продуктов.** Влажный осадок, полученный после фильтрации раствора  $\Delta^{9(11)}$ -АД в 60%-ном водном ацетоне и содержащий стеринны и побочные продукты, сушили до постоянного веса. К сухому остатку (0,65 г) добавляли 10 мл метанола, суспензию кипятили в течение 10 мин при перемешивании, затем через холодильник медленно добавляли 3 мл воды и кипятили еще в течение 10 мин. Реакционную массу медленно охлаждали до комнатной температуры, выдерживали 30 мин без перемешивания, осадок отфильтровывали и промывали на фильтре водным метанолом в соотношении вода–метанол 10 : 3 (об./об.). Получили 0,49 г фитостерина (содержание трансформируемых стериннов 93,7% суммарно).

Метанольно-водный маточный раствор, содержащий побочные продукты, упаривали в вакууме. Остаток сушили до постоянного веса. Для разделения смеси использовали препаративную ТСХ. Для этого 151 мг сухого остатка растворяли в минимальном количестве смеси дихлорметана и метанола 1 : 1 (об./об.), наносили раствор на пластинку для ТСХ полосой на линии старта и хроматографировали восходящим методом в системе

бензол–ацетон 9 : 1 (об./об.). В УФ-свете определяли зоны, соответствующие индивидуальным соединениям. Положение зоны, соответствующей фитостерину, определяли, проявляя контрольную пластинку 1%-ным раствором ванилина в 10%-ном растворе  $\text{HClO}_4$ . Для элюирования индивидуальных соединений использовали смесь дихлорметана и ацетона в соотношении 95 : 5 (об./об.). Элюаты упаривали досуха. При этом получали три мажорных продукта: метиловый эфир прегна-4,9(11)-диен-3-он-20-карбоновой кислоты (МЭ  $\Delta^{9(11)}$ -БНК) – 117 мг,  $R_f = 0.625$ ; смесь стериннов – 17 мг,  $R_f = 0.5$ ; и  $\Delta^{9(11)}$ -АД – 15 мг,  $R_f = 0.41$ . Кроме того, тестостерон (ТС) и  $\Delta^{9(11)}$ -тестостерон ( $\Delta^{9(11)}$ -ТС) были идентифицированы как минорные продукты с помощью ЯМР и ВЭЖХ анализа.

МЭ  $\Delta^{9(11)}$ -БНК кристаллизовали в диэтиловом эфире. После фильтрации и сушки до постоянного веса получили 71 мг аналитически чистого образца в виде почти белого кристаллического порошка с  $T_{пл}$  196–198°C ( $T_{пл}$  194–200°C [30]). Масс-спектр: MALDI-TOF:  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  357. Вычислено для  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_3$  (%): С 77,49, Н 9,05. Найдено (%): С 76,98%, Н 8,96.

Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ): выбранные сигналы,  $\delta$ , м.д.: 5,73 (1H, д,  $J$  1,4 Гц, Н-4), 5,45 (1H, м, Н-11), 3,64 (3H, с,  $\text{OCH}_3$ ), 1,32 (3H, с, Н-19), 1,18 (3H, д,  $J$  6,8 Гц, Н-21), 0,66 (3H, с, Н-18).

Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  (100,6 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ , м.д.: 199,2 (С-3), 177,1 (С-22), 169,8 (С-5), 144,6 (С-9), 123,9 (С-4), 118,7 (С-11), 52,8, 52,3, 51,3, 42,4, 41,5, 40,8, 37,3, 34,2, 33,7, 32,8, 32,1, 27,4, 26,1, 25,2, 16,7 (С-21), 11,6 (С-18).

**Тонкослойная хроматография (ТСХ).** Реакцию дегидратации контролировали с помощью ТСХ на пластинках Silica gel 60 F<sub>254</sub> в системе дихлорметан – ацетон (10 : 1, об./об.). Пластинку просматривали в УФ свете (254 нм), затем опрыскивали 1%-ным раствором ванилина в 10%-ном водном растворе  $\text{HClO}_4$  и проявляли при температуре 100–120°C.

**Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).** Анализ продуктов биотрансформации проводили на приборе Infinity 1260 (“Agilent”, США), снабженном предколонкой Symmetry C<sub>18</sub>, 5 мкм, 3,9 мм × 20 мм и колонкой Symmetry C<sub>18</sub>, 5 мкм, 4,6 мм × 250 мм (“Waters”, США), в следующих условиях: мобильная фаза (об./об.): ацетонитрил – 52, деионизированная вода – 48, уксусная кислота – 0,01; скорость потока 1 мл/мин; температура колонки 50°C. Стероиды детектировали при длине волны 240 нм, для количественного определения использовали метод внешнего стандарта. Содержание минорных

сигналов продуктов биотрансформации, для которых отсутствовали стандартные соединения – 9 $\alpha$ -гидрокситестостерон (9-ОН-ТС) и 9 $\alpha$ ,21-дигидрокси-20-метилпрегн-4-ен-3-он (синоним 9 $\alpha$ ,22-дигидрокси-23,24-биснорхол-4-ен-3-он (9,22-ОН-БНХ) и др. вычисляли полуколичественно с использованием в качестве внешнего стандарта АД (99% АД, “Bayer HealthCare Pharmaceuticals”, Германия), имеющего 3-кето-4-ен-хромфорную группу, как в большинстве известных продуктов окисления стероидов. Значение времени удерживания  $R_t$  для 9-ОН-АД составляло 4.27 мин.

Анализ фитостерина осуществляли методом ВЭЖХ в тех же условиях, но с использованием мобильной фазы (об./об.): ацетонитрил – 50, изопропанол – 45, деионизированная вода – 5. Детекцию проводили при длине волны 200 нм. Для количественного определения калибровку сигнала фитостерина строили на основе профиля субстрата биоконверсии без выделения индивидуальных пиков.

Для анализа пробы КЖ разводили 50%-ным водным раствором ацетонитрила 1 : 50 (для анализа продуктов) или 1 : 20 смесью ацетонитрил – 50, изопропанол – 45 (об./об.) и отделяли осадок.

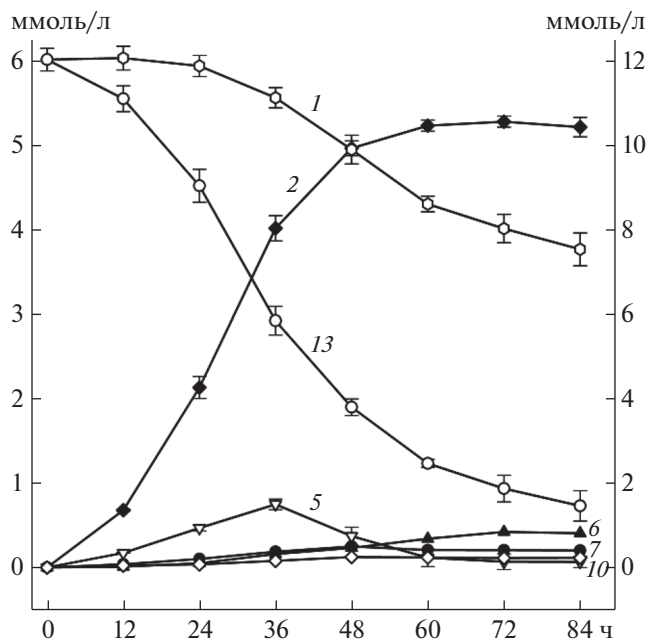
Анализ продуктов дегидратации проводили на том же оборудовании с использованием мобильной фазы (об./об.): ацетонитрил – 40, деионизированная вода – 60, уксусная кислота – 0.01. Стероиды детектировали при длине волны 250 нм. Элюировали со скоростью потока 1 мл/мин при температуре 50°C.

Значения  $R_t$  составляли (мин): 9-ОН-АД – 6.62;  $\Delta^{8(9)}$ -АД – 16.55;  $\Delta^{9(11)}$ -АД – 17.27; АД – 18.4.

**ЯМР-спектроскопия.** Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и ЯМР  $^{13}\text{C}$  регистрировали на спектрометре “Bruker Avance 400” (“Bruker”, США) с рабочими частотами 400 МГц для ЯМР  $^1\text{H}$  и 100.6 МГц для ЯМР  $^{13}\text{C}$  (с полной развязкой протонов). Химические сдвиги измеряли в м.д. относительно сигналов растворителя в качестве внутреннего стандарта ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta^1\text{H}$ : 7.26 м.д.,  $^{13}\text{C}$ : 77.1 м.д.) и относительно тетраметилсилана (ТМС), константы спин-спинового взаимодействия ( $J$ ) приведены в Гц.

**Масс-спектрометрия высокого разрешения.** Спектры высокого разрешения регистрировали на Bruker micrOTOF II с электрораспылительной ионизацией, на положительных ионах (4500 V) со шприцевым вводом вещества. Для регистрации спектров использовали фракции ВЭЖХ, собранные из нескольких вводов образцов.

Масс-спектры MALDI-TOF регистрировались на приборе Bruker Daltonics UltraFlex (“Bruker”, США).



**Рис. 2.** Профиль биоконверсии фитостерина (5 г/л) растущей культурой *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D. 1 – фитостерин, 13 – суммарное содержание всех 3-кето- $\Delta^4$ -стероидов и фитостерина (ось справа); 2 – 9-ОН-АД, 5 – 9-ОН-БНХ, 6 – 9-ОН-ТС, 7 – 9-ОН-БНХ, 10 – МЭ 9-ОН-БНХ (ось слева). Указаны величины стандартных ошибок, рассчитанные на основании данных трех независимых экспериментов биотрансформации.

Элементный анализ проведен с использованием прибора Elementar Vario MICRO cube (“Elementar Analysensysteme GmbH”, Германия).

Температуры плавления выделенных соединений были определены на приборе Melting Point M-565 (“Büchi Labor Technik AG”, Швейцария).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

В работе использовали сапротрофный штамм *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D дикого типа для получения  $\Delta^{9(11)}$ -АД из соевого фитостерина комбинированным химико-биотехнологическим методом.

Схема синтеза  $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) из фитостерина (1) через 9-ОН-АД (2) изображена на рис. 1.

На первом этапе была проведена биотрансформация фитостерина (1) с нагрузкой 5 г/л в водной среде с образованием 9-ОН-АД (2) в качестве основного продукта. Накопление продукта происходило быстро в период от 12 до 48 ч, а затем биоконверсия значительно замедлялась (рис. 2).

После 36-часовой инкубации накопление 9-ОН-АД (2) происходило с меньшей скоростью,

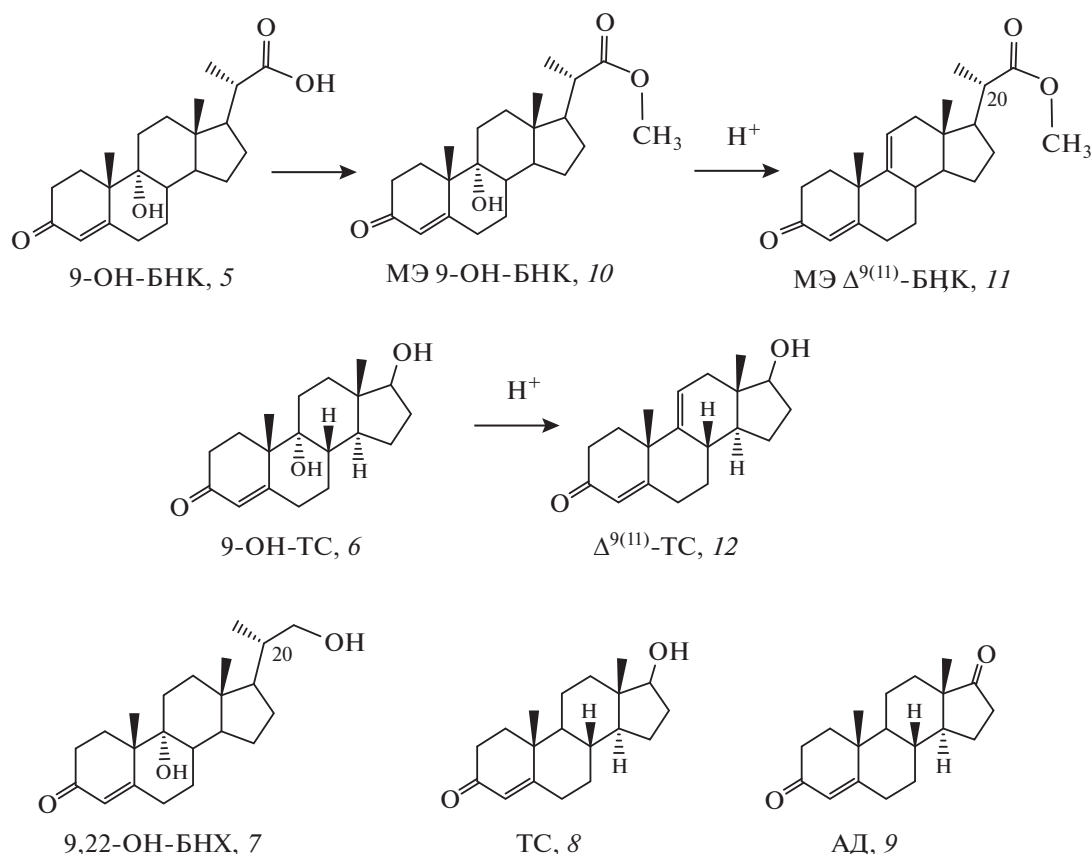


Рис. 3. Основные побочные продукты биоконверсии фитостерина в 9-ОН-АД (5–10) и реакции дегидратации (11 и 12).

а после 72 ч – прекращалось. При инкубации до 144 ч глубина конверсии фитостерина достигала 99–100%. Однако при этом селективность накопления 9-ОН-АД (2) снижалась. Вероятно, последнее является результатом частичной деструкции стероидного скелета продукта, которая имела место одновременно с образованием 9-ОН-АД (2) и происходила вследствие активности стероид-1-дегидрогеназы (**St1DH**) [31]. Для препаративного получения  $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) после 60 ч прерывали культивирование в фазе замедления роста, когда глубина превращения фитостерина (1) достигала ~80%. При этом большая часть желаемого продукта 9-ОН-АД (2) была растворена (или солюбилизирована) в жидкой фазе (~97% от общего количества).

Таким образом, селективность процесса оценивалась как  $54 \pm 0.5$  мол. % в расчете на конвертированный фитостерин, а молярный выход 9-ОН-АД составил 43.4%, при расчете на сумму трансформируемых стероидов, содержащихся в исходном субстрате. Структуры побочных продуктов биоконверсии, накапливающихся при биотрансформации в заметных количествах, показаны на

рис. 3. Это – 9-ОН-БНК (5, 5.6–7.7%), 9-ОН-ТС (6, 2.7–3.5%) и 9,22-ОН-БНХ (7, 6.0–6.2%).

Следует отметить, что способность микобактерий накапливать С22-спирты и соответствующие С-22 кислоты была подтверждена ранее в ряде работ по изучению трансформации стероидов штаммами рода *Mycobacterium* [32].

Стероиды экстрагировали из КЖ толуолом. Выбирая растворитель для экстракции, руководствовались требованиями последующего процесса дегидратации. Использовали толуол, образующий азеотропную смесь с водой (20.2% воды,  $T_{\text{кип}} - 85^\circ\text{C}$ ). Стадию дегидратации проводили без выделения 9-ОН-АД (2) из упаренного в вакууме толуольного экстракта с использованием 85%-ной  $\text{H}_3\text{PO}_4$  в качестве дегидратирующего агента.

Ранее [29] было показано, что проведение реакции в среде апротонного органического растворителя с 85%-ной  $\text{H}_3\text{PO}_4$  при температуре кипения приводит к регионаправленной дегидратации. При этом оптимальным растворителем является толуол, продолжительность процесса в котором минимальна и не превышала 30 мин, се-

лективность образования при этом  $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) достигала 98–99%, а содержание побочного андроста-4,8(9)-диен-3,17-диона ( $\Delta^{8(9)}$ -АД, 4) в продукте составляла менее 1%. Следует отметить, что изомерные  $\Delta^{9(11)}$ - и  $\Delta^{8(9)}$ -олефины имеют одинаковое значение  $R_f$  на ТСХ и не могут быть разделены кристаллизацией. Количество примеси  $\Delta^{8(9)}$ -изомера (4) может быть детектировано спектроскопически ( $^1\text{H}$ -ЯМР,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР) [33, 34] или хроматографическими методами – ВЭЖХ [33, 34], ГЖХ [35].

Возможность количественной изомеризации нежелательной примеси побочного продукта  $\Delta^{8(9)}$ -АД (4) в  $\Delta^{9(11)}$ -АД (3), позволяющей повысить выход целевого соединения, была показана ранее [29]. Было обнаружено, что проведение реакции изомеризации 8,9-двойной связи в 9,11-двойную связь возможно в среде ароматического углеводорода под действием каталитического количества сильной кислоты, при этом процесс полностью завершался за 48 ч. Следует отметить, что согласно нашим наблюдениям пролонгация процесса дегидратации в толуоле с  $\text{H}_3\text{PO}_4$  с 30 мин до 48 ч с целью проведения процесса изомеризации примеси  $\Delta^{8(9)}$ -АД (4) в  $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) уменьшала содержание примеси  $\Delta^{8(9)}$ -олефина с 1.0% практически до 0%. Однако при этом происходило осмоление реакционной массы, и содержание целевого продукта 3 снижалось до 90%.

В связи с этим в работе проводили интенсификацию процесса дегидратации в среде толуола с использованием метода азеотропной отгонки для удаления воды во время реакции. В качестве дегидратирующего агента использовали 85%-ную  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Реакция дегидратации проходила со 100% конверсией 9-ОН-АД (2) в течение 5 мин кипячения реакционной массы и селективностью до 99%. На основании полученных результатов было сделано заключение, что реакция с азеотропным удалением воды протекает значительно быстрее, не оказывая при этом влияния на выход и качество  $\Delta^{9(11)}$ -АД (3).

В общем случае, обработка органическим растворителем ферментационной суспензии позволяла извлекать все стероидные соединения, включая стерины и продукты неполного окисления боковой цепи. Экстракция стероидов толуолом обеспечивала полное извлечение как основного и побочных стероидных продуктов, так и нетрансформированного субстрата. В то же время в этих условиях 9-ОН-БНК (5) частично в виде соли оставалась в водной фазе. Промывка толуольного экстракта 5%-ным водным раствором гидрокарбоната натрия обеспечивала полный возврат 9-ОН-БНК (5) в водную фазу, из которой после подкисления до pH 2.5–3.0 она далее была экс-

трагирована. Подобный подход для эффективного отделения побочной 9-гидрокси-С20-кислоты (5) был предложен ранее в работе [36].

Для отделения стеринов от 3,17-дикетоандростанов обычно используют хорошо известные способы. Это колоночная хроматография, селективная кристаллизация, использование адсорбционных материалов, селективно сорбирующих С19 стероиды. Метод селективного разделения стеринов и С19-стероидов из их смесей путем кристаллизации из 60–70% водного ацетона был описан ранее для биотехнологического процесса получения АД (9) из стеринов [37]. Однако метод селективной кристаллизации ранее не использовался для разделения смеси, содержащей  $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) и стерины. Сухой остаток после упаривания растворителя, полученный, как описано в разделе Методы (см. Дегидратация), содержащий  $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) и различные примеси, включая нетрансформированные стерины, кристаллизовали из водного ацетона в условиях, описанных ранее [37]. Нетрансформированные стерины и примеси осаждали из раствора продукта в ацетоне, медленно добавляя воду до тех пор, пока концентрация ацетона в водной среде не достигала 60%. Образованный осадок отфильтровывали. Таким образом, в водно-ацетоновом фильтрате отсутствовали стерины, а в осадке содержалось незначительное количество С19-стероидов. Для отделения фитостерина (1) из осадка использовали метод кондиционирования стеринов, разработанный ранее [7], без применения щелочи. Следует отметить, что нетрансформированный фитостерин может быть использован повторно.

Очевидно, что побочные соединения, образовавшиеся на стадии биоконверсии и имеющие в своей структуре 9 $\alpha$ -гидроксильную группу, будут подвергаться дегидратации с образованием 9(11)-двойной связи. Разделение стеринов и побочных продуктов, содержащих 9(11)-двойную связь, проводили методом препаративной ТСХ стеринсодержащего осадка после отделения водно-ацетонового раствора  $\Delta^{9(11)}$ -АД (3). Одним из продуктов дегидратации, выделенных из осадка, был метиловый эфир 3-кето-23,24-биснорхола-4,9(11)-диен-22-овой кислоты (МЭ  $\Delta^{9(11)}$ -БНК, 11), образованный из метилового эфира 9-ОН-БНК (МЭ 9-ОН-БНК, 10). Брутто-формулу МЭ 9-ОН-БНК подтверждали методом масс-спектрометрии высокого разрешения:  $m/z = 397.23493$  (рассчитано для  $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{Na}^+$ );  $m/z = 397.23535$  (получено для  $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{Na}^+$ , отклонение м.д. 1.055).

Образование соединения 10 как минорного продукта биотрансформации фитостерина штаммом *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D было обнаружено впервые. Его образование в процессе

трансформации стерина в 9-ОН-АД (2) штаммом *Mycobacterium roseum* было установлено ранее [38]. Об образовании 9-гидроксилированных продуктов неполного расщепления боковой цепи, включая соединение 10, в процессе микробиологической конверсии  $\beta$ -ситостерина культурой рода *Mycobacterium*, было сообщено Амбрус с соавт. [39].

Известно, что ферментативное *O*-метилирование гидроксильных и карбоксильных групп молекул органических соединений, приводящее к увеличению их гидрофобности, происходит в различных живых организмах, включая бактерии, грибы, растения и млекопитающих, с целью регулирования различных функциональных процессов их жизнеобеспечения. Ферментативное *O*-метилирование карбоксильной группы продуктов деградации боковой цепи стерина характерно также для представителей рода *Mycobacterium*. Ферментативное *O*-метилирование катализируется *O*-метилтрансферазами [ЕС 2.1.1.6.х] и включает перенос метильной группы *S*-аденозил-L-метионина (AdoMet) на гидроксильную группу молекулы акцептора с образованием его метилового эфира и *S*-аденозил-L-гомоцистеина в качестве продуктов [40]. Таким образом, образование метилового эфира 10, характерное для стерин-трансформирующих штаммов микобактерий, происходит, по-видимому, так же под действием *O*-метилтрансферазы, использующей в качестве донора метильной группы *S*-аденозил-L-метионин [41, 42].

В выделенной смеси стерина по данным  $^1\text{H}$ -ЯМР спектра отсутствовали сигналы, соответствующие протонам при 22(23)-двойной связи боковой цепи. Это свидетельствовало о том, что, по-видимому, стерин с  $\Delta^{22(23)}$ -связью (стигмастерин и брассикастерин) конвертировались в первую очередь. Кроме того, с помощью ВЭЖХ анализа были идентифицированы тестостерон (ТС, 8) и  $\Delta^{9(11)}$ -тестостерон ( $\Delta^{9(11)}$ -ТС, 12).

Таким образом, наличие метилового эфира прегна-4,9(11)-диен-3-он-20-карбоновой кислоты (11) как мажорной примеси среди побочных продуктов дегидратации свидетельствовало о способности штамма *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D не только трансформировать стерин с образованием 9 $\alpha$ -гидроксипрегн-4-ен-3-он-20-карбоновой кислоты (5), но и метилировать гидроксильную группу кислотного фрагмента с образованием метилового эфира (10).

Аналогичный результат трансформации стерина был ранее описан в работе [43]. Авторы сообщили, что мутантный штамм *M. fortuitum* NRRL В-8119, у которого была блокирована способность деградировать систему стероидных колец, эффективно конвертировал  $\beta$ -ситостерин в

9-ОН-АД (2) с образованием небольших количеств 9-ОН-ТС (6); 9,22-ОН-БНХ (7), 9-ОН-БНК (10) и соответствующего метилового эфира 11.

Соединения 10 и 11 могут представлять интерес для изучения их биологической активности. Кроме того, соединение 11 может быть использовано как исходный субстрат для перехода, например, к 11-гидроксилированным, 9-галоидированным и другим 9,11-замещенным производным, а соединение 10 – в синтезе дезоксихоловой кислоты [44] и новых производных брассиностероидов [45].

Известные методы получения  $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) предусматривают использование в реакции дегидратации кристаллического 9-ОН-АД (2). В работе показана возможность объединения двух стадий синтеза  $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) из фитостерина (1): стадии микробиологической трансформации фитостерина с образованием 9-ОН-АД (2) и химической стадии дегидратации 9-ОН-АД (2), которая может быть проведена без выделения промежуточного соединения 9-ОН-АД (2) из экстракта культуральной среды.

Такой подход позволяет исключить потери 9-ОН-АД при его выделении в кристаллическом виде. Показано, что реакцию дегидратации в среде органического растворителя можно проводить с минимальным количеством дегидратирующего агента (1.6 моль на 1 моль 9-ОН-АД) и интенсифицировать процесс, удаляя воду путем азеотропной отгонки без ущерба для селективности превращения. При этом достигается высокая региоселективность реакции дегидратации. продемонстрирована возможность очистки  $\Delta^{9(11)}$ -АД от остаточного стерина и продуктов неполной деградации его боковой цепи путем селективной кристаллизации из водного ацетона. Кроме того, впервые выявлена способность природного штамма *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D трансформировать стерин с образованием метилового эфира 9 $\alpha$ -гидроксипрегн-4-ен-3-он-20-карбоновой кислоты (10). Таким образом, штамм *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D может быть использован для получения новых штаммов, способных к накоплению соединений 5 и 10 в качестве основных продуктов катаболизма стерина.

Разработанный метод получения  $\Delta^{9(11)}$ -АД комбинацией микробиологического окисления фитостерина и химической дегидратации без выделения кристаллического 9-ОН-АД может быть также использован в биотехнологических процессах с применением других штаммов микобактерий, трансформирующих фитостерин в 9-ОН-АД. Метод позволяет упростить технологическую схему получения  $\Delta^{9(11)}$ -АД и не только исключить потери 9-ОН-АД, но и минимизировать количе-



ство производственных отходов, что позволит усовершенствовать процесс без потери его эффективности.

Работа выполнена при частичной поддержке грантом Российского научного фонда (№ 14-24-00169).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Савинова Т.С., Лукашев Н.В., Хомутов С.М., Довбня Д.В., Донова М.В. // *Масла и жиры*. 2014. Т. 3. № 155. С. 14–15.  
<http://www.oilbranch.com/publ/view/424.html>
2. Al Jasem Y., Khan M., Taha A., Thiemann T. // *Med. J. Chem.* 2014. V. 3. № 2. P. 796–830
3. Szentirmai A. // *J. Ind. Microbiol.* 1990. V. 6. № 2. P. 101–115.
4. Войшвилло Н.Е., Андрюшина В.А., Савинова Т.С., Стыценко Т.С. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2004. Т. 40. № 5. С. 536–543.
5. Wang F.-Q., Yao K. and Wei D.-Z. From Soybean Phytosterols to Steroid Hormones. In *Soybean and Health.* / Ed. H. El-Shemy. InTechOpen, 2011. P. 231–252.
6. Datcheva V.K., Voishvillo N.E., Kamernitskii A.V., Vlahov R.J., Reshetova I.G. // *Steroids*. 1989. V. 54. № 3. P. 271–286.
7. Савинова Т.С., Диеп Н.Т., Войшвилло Н.Е., Андрюшина В.А., Карпова Н.Е., Белецкая И.П., Нуу Л.Д. // *Хим.-фарм. журн.* 2012. Т. 46. № 3. С. 40–43.
8. Donova M.V., Egorova O.V. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 94. P. 1423–1447.
9. Zhang X., Zhu M., Han R., Zhao Y., Chen K., Qian K., Shao M., Yang T., Xu M., Xu J., Rao Z. // *Molecules*. 2019. V. 24. Article 2534.
10. Van der Geize R., Hessels G.I., Dijkhuizen L. // *Microbiology*. 2002. V. 148. P. 3285–3292.
11. Donova M.V. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2007. V. 43. № 1. P. 5–18.
12. Андрюшина В.А., Родина Н.В., Стыценко Т.С., Нуу Л.Д., Дружинина А.В., Ядерец В.В., Войшвилло Н.Е. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2011. Т. 47. № 3. С. 297–301.
13. Seidel L., Hörhold C. // *J. Basic Microbiol.* 1992. V. 32. № 1. P. 49–55.
14. Donova M.V., Gulevskaya S.A., Dovbnya D.V., Puntus I.F. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. V. 67. P. 671–678.
15. Donova M.V., Dovbnya D.V., Koshcheyenko K.A. Proceedings of the Eighth International Symposium on Cyclodextrins., March 31–April 12, 1996, Budapest, Hungary. / Ed. J. Szejtli, L. Sente 1997. P. 527–530.
16. Donova M.V., Dovbnya D.V., Sukhodolskaya G.V., Khomutov S.M., Nikolayeva V.M., Kwon I., Han K. // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2005. V. 80. № 1. P. 55–60.
17. Bragin E.Y., Shtratnikova V.Y., Schelkunov M.I., Dovbnya D.V., and Donova M.V. // *BMC Biotechnology*. 2019. V. 19. № 1. P. 1–16.
18. Bragin E.Y., Shtratnikova V.Y., Dovbnya D.V., Schelkunov M.I., Pekov Y.A., Malakho S.G., Egorova O.V., Ivashina T.V., Sokolov S.L., Ashapkin V.V., Donova M.V. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2013. V. 138. P. 41–53.
19. Shtratnikova V.Y., Schelkunov M.I., Dovbnya D.V., Pekov Y.A., Bragin E.Y., Ashapkin V.V., Donova M.V. // *Genome Announc.* 2015. V. 3. № 1. e01447-14.
20. Chinn L., Dodson R. // *J. Org. Chem.* 1959. V. 24. № 6. P. 879–879.
21. VanRheenen V., Shephard K.P. // *J. Org. Chem.* 1979. V. 44. № 9. P. 1582–1584.
22. Reid J.G., Debiak-Krook T. // *Tetrahedron Lett.* 1990. V. 31. № 26. P. 3669–3672.
23. Huy L.D., Diep N.T., Chang-Hee L., Hung N.D. // *Vietnam J. Chem.* 2014. V. 52. № 2.
24. Turuta A.M., Kamernitsky A.V., Fadeeva T.M., Huy L.D. // *Mendeleev Commun.* 1992. V. 2. № 2. P. 47–48.
25. Huy L.D., Diep N.T., Nhung L.T.K. // *Pharm. Chem. J.* 2014. V. 48. № 3. P. 220–223.
26. Патент РФ. 2014. № 2532902
27. Wang W., Ge F., Ma C., Li J., Ren Y., Li W., Fu J. // *3 Biotech.* 2017. V. 7. P. 19.
28. Патент КНР. 2011. № 102040639
29. Савинова Т.С., Казанцев А.В., Нуу Л.Д., Лукашев Н.В. // *Хим.-фарм. журн.* 2017. Т. 51. № 7. С. 50–53.
30. Патент Венгрии. 1990. № 200203
31. Sukhodolskaya G.V., Nikolayeva V.M., Khomutov S.M., Donova M.V. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 74. P. 867–873.
32. Galán B., Uhía I., García-Fernández E., Martínez I., Bahillo E., de la Fuente J.L., Barredo J.L., Fernández-Cabezón L., García J.L. // *Microb. Biotechnol.* 2017. V. 10. P. 138–50.
33. Европейский патент. 1988. № 0253415.
34. Европейский патент. 1988. № 0294911.
35. Патент США. 1978. № 4102907.
36. Патент США. 1977. № 4029549.
37. Патент РФ. 1999. № 2126837.
38. Патент Германии. 1988. № 3739017.
39. Патент США. 1992. № 5112815.
40. Ibrahim R.K., Bruneau A., Bantignies B. // *Plant Mol. Biol.* 1998. V. 36. P. 1–10.
41. Li X., Chen X., Wang Y., Yao P., Zhang R., Feng J., Wu Q., Zhu D., Ma Y. // *Steroids*. 2018. V. 132. P. 40–45
42. Roje S. // *Phytochemistry*. 2006. V. 67. № 15. P. 1686–1698.
43. Wovcha M.G., Antosz F.J., Knight J.C., Kominek L.A., Pyke T.R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1978. V. 531. P. 308–321.
44. Европейский патент. 2019. № 3464315.
45. Antonchick A.P., Schneider B., Zhabskii V.N., Khripach V.A. // *Steroids*. 2004. V. 69. № 10. P. 617–628.

## Conversion of Soybean Phytosterol into Androsta-4,9(11)-Diene-3,17-Dione

T. S. Savinova<sup>a,\*</sup>, D. V. Dovbnya<sup>b</sup>, S. M. Khomutov<sup>b</sup>, A. V. Kazantsev<sup>a</sup>, L. D. Huy<sup>c</sup>,  
N. V. Lukashev<sup>a</sup>, and M. V. Donova<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Lomonosov Moscow State University, Chemical Department, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino,  
Moscow Region, 142290 Russia

<sup>c</sup>Vietnamese Academy of Science and Technology, Institute of Chemistry, Hanoi, A18, Vietnam

\*e-mail: tatiana\_savinova@rambler.ru

In this work, we propose a method for producing androsta-9(11)-diene-3,17-dione ( $\Delta^{9(11)}$ -AD), which is an environmentally attractive combination of microbial oxidation of the side chain of phytosterol with simultaneous  $9\alpha$ -hydroxylation and subsequent chemical regioselective dehydration of  $9\alpha$ -hydroxy-3,17-diketo-intermediate without isolation and purification. Phytosterol was converted into  $9\alpha$ -hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione (9-OH-AD) using the strain *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1817D wild type. The product was extracted from the culture medium with an organic solvent, and dehydrated in the extract with mineral acid. The resulting  $\Delta^{9(11)}$ -AD was purified using the selective crystallization method. Minor products were isolated and identified. The ability of the strain to transform sterols with the formation of  $9\alpha$ -hydroxy-pregn-4-en-3-one-20-carboxylic acid methyl ester is shown. Our approach allows us to simplify the flow chart for obtaining the target compound and not only eliminate the loss of 9-OH-AD, but also minimize the amount of production waste.

**Keywords:** phytosterol, bioconversion, *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1817D,  $9\alpha$ -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione, androsta-4,9 (11)-diene-3,17-dione, dehydration, pregn-4,9 (11)-diene-3-one-20-carboxylic acid methyl ester