

Zur mikrobiologischen Hydroxylierung von 14 α -H-Cardenoliden

Fritz Wagner und Siegmund Lang

Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung, D-3301 Stöckheim

Wolfgang Kreiser*

Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Braunschweig,
Schleinitzstraße, D-3300 Braunschweig

Eingegangen am 30. Januar 1976

Mit bekannten Methoden der Steroidchemie wird **1** in die Verbindungen **2**, **5b**, **8b**, **11** und **14b** übergeführt. Diese dienen als Substrate für die mikrobiologische Hydroxylierung mit *Curvularia lunata*, *Cunninghamella blakesleeana* und *Aspergillus ochraceus*. Allgemein wird dabei lediglich ein Angriff auf die α -Seite der Steroide beobachtet, vorzugsweise in den Positionen C-11, C-17 und C-14.

The Microbial Hydroxylation of Some 14 α -H-Cardenolides

1 is chemically transformed to compounds **2**, **5b**, **8b**, **11**, and **14b** by well known methods. These are the educts for microbial hydroxylation by *Curvularia lunata*, *Cunninghamella blakesleeana*, and *Aspergillus ochraceus*. Generally α -attack on the steroids is observed only, by preference of the C-11-, C-17- and C-14-positions.

Die mikrobiologische Einführung von Hydroxylgruppen an nicht aktivierte Kohlenstoffatome des Steroidgerüsts hat insbesondere technische Anwendung in der Cortison-Reihe gefunden¹⁾.

Wie dort der 11 β -Hydroxyl-Rest, ist in der Klasse der Cardenolide und Bufadienolide die Alkohol-Funktion in 14 β -Position von essentieller Bedeutung²⁾ für die physiologische Wirkung. Ein biochemischer Prozeß, der die bequem zugänglichen 14 α -H-Butenolide^{3, 4)}, z. B. **1**, mit einem 14 β -OH-Substituenten (Xysmalogenin) versehen würde, wäre zweifellos von größtem wirtschaftlichem Interesse. Ein für solche Transformation geeigneter Mikroorganismus ist bislang nicht beschrieben worden, wiewohl zahlreiche 14 α -Hydroxylierer bekannt sind¹⁾.

Für C/D-trans-verknüpfte Substrate vom Typ **1** – mit dem voluminösen Lactonring in 17 β -Stellung – darf man nach Kieslich⁵⁾ allgemein den biochemischen Angriff von der α -Seite der Molekel erwarten. Im Widerspruch dazu steht keineswegs die Tatsache, daß bei den nicht sehr zahlreichen Untersuchungen an pflanzlichen und tierischen Herzgiften⁶⁾ nahezu ausschließlich β -Oxygenierung beobachtet wurde. Schließlich ruft die C/D-cis-Anellierung der natürlichen Vertreter eine fast kugelige Gestalt hervor, die eine Wechsel-

¹⁾ Übersicht: W. Charney und H. L. Herzog, *Microbial Transformation of Steroids*, Academic Press, New York 1967.

²⁾ W. Zürcher, E. Weiss-Berg und Ch. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **52**, 2449 (1969).

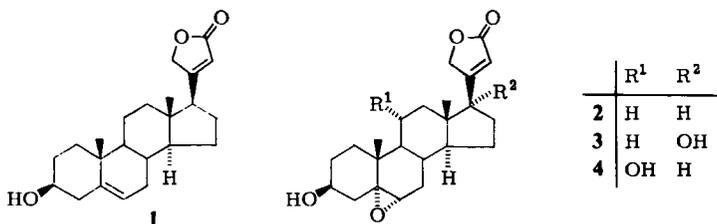
³⁾ W. Fritsch, U. Stache und H. Ruschig, *Liebigs Ann. Chem.* **699**, 195 (1966).

⁴⁾ W. Kreiser und M. Nazir, *Liebigs Ann. Chem.* **755**, 12 (1972).

⁵⁾ K. Kieslich und H. Wiegand, *Chem. Ber.* **104**, 205 (1971).

⁶⁾ Übersicht: H. Iizuka und A. Naito, *Microbial Transformations of Steroids and Alkaloids*, Univ. of Tokyo Press/Univ. Park Press State College, Pennsylvania, 1967.

wirkung mit dem Enzym nur noch auf der konvexen Oberfläche erlaubt. Durch Einsatz der 5,6 α -Epoxide normaler Androstan- und Pregnan-Abkömmlinge konnte *Kieslich*⁵⁾ kürzlich für den Pilz *Curvularia lunata* die α -Hydroxylierung vollständig unterdrücken. Wenngleich eine 14 β -Hydroxylierung von vornherein nicht zu erwarten war, hofften wir für das 5,6 α -Oxiran **2** ähnlich günstige Ergebnisse zu erzielen.



Die Überführung von **1** in **2** wurde nach einer alten Vorschrift⁷⁾ mit Monoperphthalsäure in 80proz. Ausb. vorgenommen, nachdem zuvor *m*-Chlorperbenzoesäure nur Produktgemische der konfigurationsisomeren 5,6-Oxide geliefert hatte. In Vorversuchen inkubierten wir **2** mit vier Pilzen, die vornehmlich als 11 α - und 11 β -Hydroxylierer bekannt waren, und verfolgten die Umwandlung dünnschichtchromatographisch. Mit *Rhizopus nigricans*^{8, 9)} und *Cunninghamella blakesleeana*^{10, 11)} deutet das komplexe Produktgemisch keine Vorzugsreaktion an. Dagegen ließen sich *Curvularia lunata*^{12, 13)} und *Aspergillus ochraceus*^{14, 15)} in quantitative Untersuchungen einbeziehen. Der erste dieser beiden Mikroorganismen erbrachte nach 30 h mit 26% d. Th. ein Hauptprodukt, dem nach Ausweis aller spektroskopischen Daten die Konstitution **3** zukommt. Daneben resultierten noch 12% Ausgangsmaterial **2** sowie 7% **5a** als Folge der Hydrolyse des Dreiringes. — Eine ausführliche Diskussion der ¹³C-NMR-Spektren von **3** sowie weiterer hier erwähnter Cardenolide findet sich in Lit.¹⁶⁾. — Das Ergebnis ist insoweit überraschend, als *Kieslich*⁵⁾ für denselben Pilz bei Vorliegen des 5,6 α -Oxido-Strukturmerkmals ausschließlich die bekannte 11 β -Hydroxylierung beobachten konnte. An **2** erfolgt die 17 α -Oxygenierung augenscheinlich unter dem Einfluß zweier konkurrierender Abschirmeffekte von 17 β -Butenolid- und α -Oxiran-Ring. Die zitierte Regel⁵⁾ gilt damit nicht ohne Einschränkung.

Aspergillus ochraceus dagegen vermag **2** unbeeinflusst vom Epoxidring in 32 h zum 11 α -Alkohol **4** (55%) umzuwandeln. Weiterhin ließen sich 5% Edukt **2** sowie 13% **5a** nachweisen. Allein die hohe Ausbeute für diesen Prozeß bietet bereits den deutlichen Hinweis

⁷⁾ P. N. Chakravorty und R. H. Levin, J. Amer. Chem. Soc. **64**, 2317 (1942).

⁸⁾ S. H. Eppstein, J. Amer. Chem. Soc. **75**, 408 (1953).

⁹⁾ O. K. Sebek, L. M. Reinecke und D. H. Peterson, J. Bacteriol. **83**, 1327 (1962).

¹⁰⁾ K. M. Mann, F. R. Hanson, P. W. O'Connell, H. V. Anderson, M. P. Brunner und J. N. Karnemaat, Appl. Microbiol. **3**, 14 (1955).

¹¹⁾ M. Hayano, A. Saito, D. Stone und R. I. Dorfman, Biochim. Biophys. Acta **21**, 380 (1956).

¹²⁾ G. M. Shull und D. A. Kita, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 763 (1955).

¹³⁾ F. v. Werder, K. Brückner, K.-H. Bork, H. Metz, B. Hampel und H. J. Mannhardt, Chem. Ber. **95**, 2110 (1962).

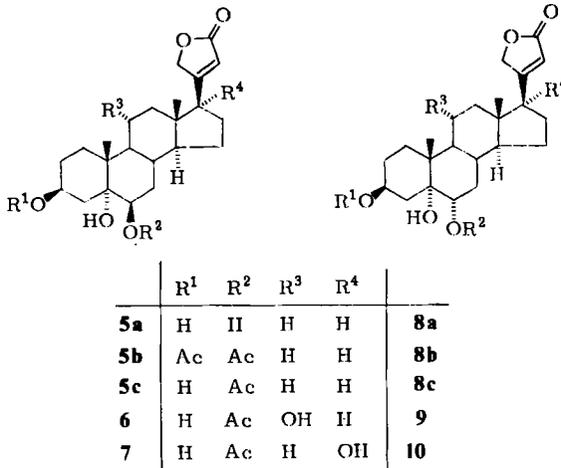
¹⁴⁾ E. L. Dulaney, E. O. Stapley und C. Hlavac, Mycologia **47**, 464 (1955).

¹⁵⁾ C. Vezina, S. N. Sehgal und K. Singh, Appl. Microbiol. **11**, 50 (1963).

¹⁶⁾ S. Lang, D. N. Lincoln und V. Wray, J. C. S. Perkin II, **1975**, 344, sowie Tetrahedron **31**, 2815 (1975).

auf einen abweichenden, von sterischen Einschränkungen offenbar weitgehend freien Enzymmechanismus.

Da bei den vorhergehenden Transformationen das Triol **5a** als Nebenprodukt auftrat, nahmen wir zur Sicherung seiner Konstitution eine gezielte Spaltung des Oxiraninges in **2** mit Perjodsäure in wäßrigem Aceton¹⁷⁾ vor. Die Konfiguration des dabei zu 95% anfallenden Produkts **5a** ist – ebenso wie die der weiteren neuen Alkohole – durch Ähnlichkeit von Lage und Aufspaltung der CH–OH-Multipletts im ¹H-NMR-Spektrum mit denen von Vergleichssubstanzen eindeutig gesichert und entspricht anerkannten Prinzipien der Steroidchemie¹⁸⁾.



Bei Inkubationsversuchen mit allen vier studierten Stämmen zeigte sich **5a** nahezu inert, womit zwanglos sein Auftreten bei den zuvor beschriebenen Ansätzen erklärt wird. Um die Polarität der Verbindung herabzusetzen, acetylierten wir die sekundären Hydroxylgruppen. Das resultierende Diacetat **5b** wurde von *Aspergillus ochraceus* und *Curvularia lunata* angenommen. Nach 96 h war bei dem ersten Pilz wiederum 11 α -Oxygenierung zu verzeichnen, unter Bildung von 26% **6**. Hauptprodukt war jedoch mit 47% **5c**, bei dem es lediglich zur Verseifung des 3-Acetatrestes gereicht hatte.

Nach der gleichen Inkubationszeit erschien das Ergebnis bei *Curvularia lunata* weniger einheitlich: 4% Edukt **5b**, 11% Esterspaltung zu **5c**, 23% 11 α -Hydroxylierung zu **6** und ferner mit 20% die 17 α -Hydroxylierung zu **7**.

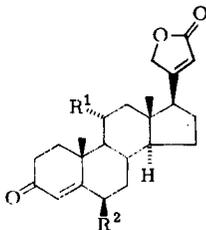
Wenn auch das durch chemische Modifikation aus **2** gewonnene Triol **5a** in seinem Fermentierungsverhalten enttäuschte, weckte es doch einiges pharmakologisches Interesse (s. später). Es stellte sich die Frage nach der Konfigurationsabhängigkeit der beobachteten Wirkung. Weiterhin bestand die Möglichkeit einer verbesserten Inoculierung für die untersuchten Kulturen durch die veränderte Geometrie der Hydroxy-Gruppen. Deshalb behandelte man **1** mit Osmiumtetroxid und Pyridin. Nach zwei Tagen resultierte das *cis*-

¹⁷⁾ A. T. Rowland und H. R. Nace, J. Amer. Chem. Soc. **82**, 2833 (1960).

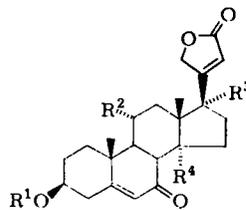
¹⁸⁾ ^{18a)} E. J. Corey und A. R. Snee, J. Amer. Chem. Soc. **78**, 6269 (1956). – ^{18b)} J. E. Bridgeman, P. C. Cherry, A. S. Clegg, J. M. Evans, E. R. H. Jones, A. Kasal, V. Kumar, G. D. Meakins, Y. Morisawa, E. E. Richards, P. D. Woodgate, J. Chem. Soc. C **1970**, 250.

Diol **8a** in 59 proz. Ausbeute; mit diesem ließen sich erneut an allen vier Stämmen keine ausreichenden Umsätze erzielen. Das abgeleitete Diacetat **8b** dagegen verhielt sich wie **5b**: Mit *Aspergillus ochraceus* konnten nach 96 h 4% Ausgangsmaterial **8b**, 34% **8c** sowie als Ergebnis des 11 α -Angriffs 9% **9** isoliert werden. In gleichfalls 9% d. Th. bildete sich **9** bei der Einwirkung von *Curvularia lunata* auf **8b**. Als weitere Produkte erschienen dabei 3% **8b**, 6% **8c** und außerdem 9% des 17-Carbinols **10**. Insgesamt darf das Verhalten beider Mikroorganismen gegenüber dem *cis*-Diol-Derivat **8b** und seinem *trans*-Isomeren **5b** als qualitativ sehr ähnlich gewertet werden, lediglich die absoluten Ausbeuten liegen beim 6 α -Acetat deutlich niedriger, das Produktverhältnis bleibt davon unberührt.

Nachdem die bisherigen Bemühungen nicht zu einer Funktionalisierung der β -Seite der Molekel geführt hatten, suchten wir unser Substrat dem überhaupt erfolgreichsten Ausgangsmaterial – Reichsteins Substanz S – anzugleichen. Dazu unterwarf man **1** einer Oppenauer-Oxidation zum bereits früher von *Ruschig*³⁾ auf anderem Wege dargestellten Keton **11**. Wir konnten **11** auf diese Art zu 37% zugänglich machen.



	R ¹	R ²
11	H	H
12	OH	H
13	OH	OH



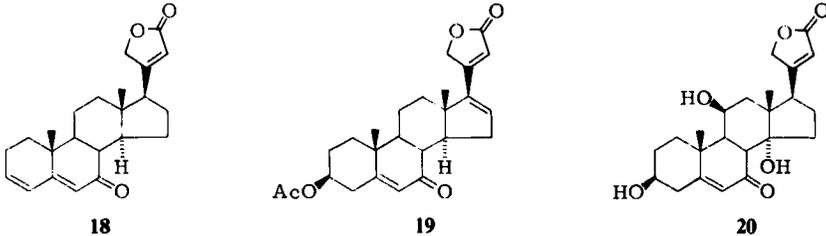
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
14a	H	H	H	H
14b	Ac	H	H	H
15	H	OH	H	H
16	H	H	OH	H
17	H	H	H	OH

Die übliche Prüfung aller vier Stämme ließ für **11** einen präparativen Ansatz nur mit *Aspergillus ochraceus* zweckmäßig erscheinen. Die Produktanalyse verdeutlichte, daß hier ein Prozeß mit zwei Folgereaktionen ablief, wobei unter dem Einfluß einer Monooxygenase zunächst der 11 α -Alkohol **12** anfiel, der im nächsten Schritt einer 6 β -Hydroxylase als Edukt diente. Dementsprechend konnte die Inkubierung zu zwei Ausbeute-Optima geführt werden: Bei 24 h Dauer ließen sich 39% **12** isolieren, neben 9% **13**; während nach 96 h die höchste Menge – absolut gesehen – an **13** mit 28% anfiel. In dieser Zeit reduzierte sich der Anteil von **12** auf 31%.

Da **11** mit der Mehrzahl der Pilze unübersichtliche Produktgemische erbrachte und bei *Aspergillus ochraceus* nur die 6 β -Hydroxylierung in den Blickpunkt rückte, beschlossen wir, **1** in das alternativ zugängliche α,β -ungesättigte Keton **14b** zu überführen und dessen Verwendbarkeit zu prüfen.

Für diesen Zweck veresterten wir **1** zum bekannten³⁾ Acetat und ließen darauf *tert*-Butylchromat einwirken. Zu 51% fiel **14b** als einziges Produkt an. Neben den spektroskopischen Daten sicherte auch das Verhalten gegenüber einer Mischung von Salzsäure/

Methanol/Äther bei Raumtemperatur die Konstitution von **14b**. Statt der erwarteten Verseifung des 3-Acetatrestes (24% **14a**), war die Wasserabspaltung zu **18** das mit 57% vorherrschende Ergebnis. Die Verlängerung des Chromophors in **18** kommt im UV-Spektrum durch ein zusätzliches Maximum bei 267 nm zum Ausdruck.



Von den vier geprüften Stämmen versagte gegenüber **14b** lediglich *Rhizopus nigricans*. Die beiden bislang vorzugsweise behandelten Pilze unterschieden sich in der Produktbildung auf gewohnte Weise: Für *Aspergillus ochraceus* tritt lediglich die 11 α -Hydroxylierung zu **15** in Erscheinung, mit der bemerkenswerten Ausbeute von 56%, während für *Curvularia lunata* das Ergebnis erneut komplexer ausfällt. Die voraussehbare 17 α -Oxygenierung überwiegt zwar mit 39% **16**, doch gewinnt man als Nebenprodukt nicht **15**, sondern erstmals einen 14 α -Alkohol **17** mit 8%.

Für **16** haben wir den Eintrittsort der Hydroxylfunktion unabhängig durch einen chemischen Beweis festgelegt. Nach Schutz des 3 β -OH durch Acetylierung nahmen wir die Wasserabspaltung aus der tertiären Alkoholgruppierung mittels Phosphoroxychlorid/Pyridin vor. Im ¹H-NMR-Spektrum des Reaktionsprodukts **19** macht sich das Signal eines weiteren Vinylprotons bei $\delta = 6.23$ bemerkbar, seiner Lage nach einem konjugierten System zuzuordnen. Diese Deutung bestätigte das UV-Spektrum von **19**, das durch ein zusätzliches langwelliges Absorptionsmaximum bei $\lambda = 270$ nm gekennzeichnet ist.

Mit *Cunninghamella blakesleeana* resultierte aus **14b** ein kompliziertes Stoffgemisch, das chromatographisch in vier Hauptzonen aufgetrennt werden konnte, deren unpolare identisch mit der polarsten von *Curvularia lunata* war und 6% **17** lieferte. Wie in allen Ansätzen mit **14b** fiel in untergeordnetem Maße auch das Verseifungsprodukt **14a** an. Ferner isolierte man 3.5% nicht ganz einheitliches Material, für das der Strukturvorschlag **20** zur Diskussion steht.

Die hier beobachtete 14 α -Hydroxylierung bei *Cunninghamella blakesleeana* steht im Einklang mit jüngst publizierter¹⁹⁾ gleichartiger Einwirkung von *Cunninghamella elegans* auf 3 β -Acetoxyandrost-5-en-17-on. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der 17 β -Lactonring als dominierendes Strukturmerkmal aller inkubierten Steroide den enzymatischen Angriff grundsätzlich auf die α -Seite der Molekel dirigiert, wobei für die untersuchten Mikroorganismen vorzugsweise Oxygenierung in 11 α - und 17 α - sowie untergeordnet in 14 α -Position gefunden wird.

Die meisten der in dieser Arbeit angeführten Substanzen wurden auf mögliche cardiotonische Effekte geprüft^{*)}. Im Langendorff-Test am isolierten Meerschweinchenherz erwiesen sich **2**, **3**, **5a** und **8a** als gering positiv inotrop wirksam, bei kurzer Wirkdauer.

¹⁹⁾ T. A. Crabb, P. J. Dawson und R. O. Williams, Tetrahedron Lett. 1975, 3623.

^{*)} Das Pharmakologische Laboratorium der Firma Hoechst AG, Frankfurt, führte die Untersuchungen durch (Leitung Prof. Dr. Lindner). Wir bedanken uns für die freundliche Unterstützung.

Experimenteller Teil

Die Schmelzpunkte wurden auf einem Kofler-Heiztischmikroskop (E. C. Reichert, Wien) bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Analysen führte I. Beetz, Kronach/Oberfranken, aus. UV-Spektren (in Methanol): DMR 22 der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen. IR-Spektren (in KBr): Perkin-Elmer-IR 521. Massenspektren: MS-9 und MS-30 der Firma AEL NMR-Spektren: Varian XL-100-12 (TMS als innerer Standard). Dünnschichtchromatographie auf Alu-Folien der Fa. Riedel de Haen sowie auf Glasplatten. Laufmittel: A) Methylchlorid/Aceton (2:1), B) dieselben (3:1), C) Essigester/Cyclohexan (4:1). Präp. DC: Kieselgel PF 254/366 der Fa. Merck, 1 mm stark auf Glasplatte, bei einer Aktivierung von 5 h und 140 °C. Für spektroskopische Messungen sei den folgenden Damen und Herren gedankt: G. Rehkopf (UV, ORD), H. Homann (IR), Dr. L. Grotjahn, Dr. H. M. Schiebel, H. Steinert (MS) sowie Dr. V. Wray und Dr. D. Lincoln (¹H-NMR; ¹³C-NMR).

Mikrobiologische Methoden

Die Stämme wurden in Schrägkulturen auf verschiedenen Agarböden herangezogen; für *Curvularia lunata* folgende Weiterbehandlung: Ein 500-ml-Erlenmeyerkolben, der 100 ml einer 25 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisierten Nährlösung²¹⁾ (100 ml Maisquellwasser, 10 g Sojamehl, 0,05 g Sojaöl, 900 ml Wasser, pH auf 6,2 eingestellt) enthielt, wurde durch Abschwemmen der Stammkultur mit 5 ml physiologischer Kochsalzlösung beimpft und 72 h bei 30 °C auf einer Rotationsschüttelmaschine mit 100 U/min geschüttelt. Diese 1. Vorkultur wurde unter sterilen Bedingungen im Volumenverhältnis 1:10 in die 2. Vorkultur (gleiches Medium und pH) weiterpropagiert. Nach 24 h Inkubation überimpfte man jeweils 10 ml der gut gewachsenen 2. Vorkultur auf die Hauptkulturen, die zusätzlich 0,05 % Tween 80 enthielten.

Nach 12–14 h Wachstumsdauer setzte man das gefriergetrocknete Substrat oder die Substratlösung zu und inkubierte anschließend weiter. Die Umwandlung der Substrate wurde durch dünn-schichtchromatographische Analyse der Chloroformextrakte von Kulturproben kontrolliert. Den pH-Wert der Kulturmedien, der sich während der gesamten Inkubation zwischen 6,2 und 7,8 bewegte, stellte man täglich zweimal mit 1 N H₃PO₄ auf 6,2–6,5 ein. Die Inkubationstemp. betrug 30 °C.

Diese ausführliche Beschreibung ist im wesentlichen übertragbar auf die Kultivierung der übrigen Mikroorganismen; nur in den Nährmedien, den pH-Werten, der Anzahl der Vorkulturen und den Wachstumszeiten bis zur Substratzugabe unterscheiden sie sich vom obigen Beispiel. Diese abweichenden Parameter der einzelnen Stämme seien nur stichwortartig genannt:

Cunninghamella blakesleeana: 1. Vorkultur: Nährmedium aus¹⁰⁾ 5 g Sojamehl, 20 g Glucose, 5 g NaCl, 5 g K₂HPO₄, 5 g Hefeextrakt sowie 1 Liter H₂O wird mit H₃PO₄ auf pH 6,4 eingestellt. Dauer 48 h. Hauptkultur: Bei gleichem Medium folgt die Substratzugabe nach 24 h. Der pH-Wert wird mit NaOH zwischen 6 und 7 gehalten.

Aspergillus ochraceus: 1. Vorkultur: 72 h in Medium²⁰⁾ aus 44 g Glucose, 150 ml Maisquellwasser, 3 g NaNO₃, 1 g KH₂PO₄, 0,5 g KCl, 0,5 g MgSO₄, 0,02 g FeSO₄ und 850 ml Wasser; pH mit NaOH auf 7 eingestellt. 2. Vorkultur: 24 h in Medium aus 20 g Sojamehl und 1 Liter Wasser, das mit H₃PO₄ auf pH 6,2 eingestellt ist. Hauptkultur: Im Medium aus 10 g Glucose, 10 g Sojamehl und 1 Liter Wasser, dessen pH zwischen 5 und 7 gehalten wird. Substratzugabe nach 12–14 h.

Rhizopus nigricans: 1. Vorkultur: 72 h in Medium²¹⁾ aus 10 g Glucose, 30 ml Maisquellwasser, 0,4 g MgSO₄ · 7H₂O, 0,4 g KH₂PO₄ und 970 ml Wasser auf pH 5,5 eingestellt. Die 2. Vorkultur läuft 24 h im gleichen Medium; ebenso wie die Hauptkultur. Substratzugabe nach 15 h. Der pH-Wert bleibt zwischen 6 und 7.

²⁰⁾ K. Kieslich, K. Petzoldt, H. Kosmol und W. Koch, Liebigs Ann. Chem. 726, 168 (1969).

²¹⁾ B. Görlich und J. Wolter, Liebigs Ann. Chem. 753, 106 (1971).

Steroidzugabe: Als der bestgeeignete Lösungsvermittler bei der Zugabe der verschiedenen Steroidsubstrate erwies sich Tween 80: 1 g des jeweiligen Steroids wurde zusammen mit 150 mg Tween 80 in 200 ml heißem Dioxan gelöst und gefriergetrocknet. Zusammen mit der Zugabe von 0.05% Tween 80 zum Medium der Hauptkultur ergab dies eine sehr gute Verteilung der hydrophoben Steroide in der wäbr. Phase des Nährmediums. — Substrate, die nur in kleineren Mengen zur Verfügung standen, wurden in Aceton oder Äthanol gelöst zugegeben.

Aufarbeitung der Submerskulturen: Nach pH-Korrektur auf 5–6 wurden die Kulturbrühen mit Chloroform extrahiert und über Hyflo Supcr Cel (Kieselgur der Fa. Serva) filtriert. Der Extrakt wurde über Natriumsulfat getrocknet und nach Vertreiben des Lösungsmittels chromatographiert.

3 β -Hydroxy-5,6 α -oxido-14 α -card-20(22)-enolid (2): Zur Lösung von 1.15 g Butenolid **1** in 30 ml absol. Dioxan fügt man 1.22 g Monoperphthalsäure²²⁾ in 70 ml Dioxan. 2½ h wird bei 80–90°C gerührt, das Lösungsmittel abgezogen, in Chloroform aufgenommen und die Lösung nacheinander mit Kaliumjodid-Thiosulfat- und Hydrogencarbonatlösungen gewaschen. Nach Trocknen und Eindampfen der organischen Phase wird der Rückstand aus Methanol umkristallisiert: 958 mg **2** (79%). Schmp. 215–218°C. — IR: 3290 (OH), 1785, 1745 (5-Ringlacton) und 1620 cm⁻¹ (C=C).

UV: λ_{\max} (lg ϵ) = 215 nm (4.11). — ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.60 (s; 3 H, CH₃-18), 1.07 (s; 3 H, CH₃-19), 2.93 (d; J = 4 Hz; 1 H, 6 β -H), 3.90 (m; 1 H, 3 α -H), 4.68 (dd; J = 18 + 3 Hz; 1 H, 21-H), 4.81 (dd; J = 18 + 3 Hz; 1 H, 21-H) und 5.84 ppm (dd; J = 3 Hz; 1 H, 22-H). — ORD-Spektrum, 0.96 mg **2** in 5 ml Chloroform/Methanol (7 : 3):

λ	590	500	420	330	256 nm
$[\Phi]$	-232	-329	-522	-928	-6380

$[\alpha]_{590}^{22} = -62.5^\circ$. — MS: m/e = 372 (47% M⁺), 354 (39% M⁺ - H₂O).

C₂₃H₃₂O₄ (372.5) Ber. C 74.16 H 8.65 Gef. C 74.25 H 8.82

3 β ,17 α -Dihydroxy-5,6 α -oxido-14 α -card-20(22)-enolid (3): Man verteilt 500 mg **2** (zuvor mit 75 mg Tween 80 gefriergetrocknet) auf 20 Schüttelkulturen, die den Pilz *Curvularia lunata* im angegebenen Medium nebst 300 mg Adsorberharz Amberlite XAD-2 pro 100-ml-Kultur enthalten. Nach 30 h Inkubation wird mit Chloroform extrahiert. Ausb. 135 mg **3** (26%). Schmp. 261–265°C (Essigester).

IR: 3480 (OH), 1780, 1730 (5-Ringlacton) und 1618 cm⁻¹ (C=C). — UV: λ_{\max} (lg ϵ) = 214 nm (4.06). — ¹H-NMR ([D₅]Pyridin/[D₆]Aceton = 4 : 1): δ = 0.62 (s; 3 H, CH₃-18), 1.07 (s; 3 H, CH₃-19), 2.88 (d; J = 4 Hz; 1 H, 6-H), 4.16 (m; 1 H, 3-H), 5.05 (dd; J = 18 Hz + 2 Hz; 1 H, 21-H), 5.21 (dd; J = 18 + 2 Hz; 1 H, 21-H) und 6.20 ppm (dd; J = 2 Hz; 1 H, 22-H). — ORD-Spektrum, 1.31 mg **3** in 3 ml Chloroform/Methanol (7 : 3):

λ	590	500	420	330	258	245 nm
$[\Phi]$	-427	-523	-946	-2051	-12896	-1005

$[\alpha]_{590}^{22} = -110^\circ$. — MS: m/e = 388 (7% M⁺), 370 (10% M⁺ - H₂O).

C₂₃H₃₂O₅ (388.5) Ber. C 71.10 H 8.30 Gef. C 71.04 H 8.44

3 β ,5 α ,6 β -Trihydroxy-14 α -card-20(22)-enolid (5a): Die Lösung von 1.2 g Epoxid **2** in 36 ml heißem Aceton wird unter Rühren mit 755 mg Perjodsäure in 12 ml Wasser versetzt und 45 min erhitzt. Dann werden weitere 20 ml Wasser zugesetzt, das Aceton i. Vak. abgedampft und die Suspension langsam abgekühlt. Man filtriert das Produkt ab und kristallisiert aus Aceton. Ausb. 1.19 g **5a** (95%). Schmp. 254–258°C.

IR: 3430 (OH), 1790, 1740 (5-Ringlacton) und 1620 cm⁻¹ (C=C). — UV: λ_{\max} (lg ϵ) = 216 nm (4.18). — ¹H-NMR ([D₅]Pyridin): δ = 0.59 (s; 3 H, CH₃-18), 1.58 (s; 3 H, CH₃-19), 3.53 (m; 1 H,

²²⁾ G. B. Payne, Org. Synth. **42**, 77 (1962).

3-H), 4.21 (m; 1 H, 6-H), 4.85 (dd; $J = 17 + 1.5$ Hz; 1 H, 21-H), 4.95 (dd; $J = 17 + 1.5$ Hz; 1 H, 21-H) und 6.01 ppm (m; 1 H, 22-H) – ORD-Spektrum, 1.09 mg **5a** in 3 ml Chloroform/Methanol (7:3):

λ	590	500	420	330	256 nm
$[\Phi]$	-64.3	-129	-216	-429	-5950

$[\alpha]_{590}^{22} = -16.5^\circ$. – MS: $m/e = 390$ (2% M^+), 372 (20% $M^+ - H_2O$), 354 (100% $M^+ - 2H_2O$).

$C_{23}H_{34}O_5$ (390.5) Ber. C 70.74 H 8.77 Gef. C 70.84 H 8.77

3 β ,6 β -Diacetoxy-5 α -hydroxy-14 α -card-20(22)-enolid (5b): Die Lösung von 872 mg Triol **5a** in 35 ml Pyridin und 35 ml Acetanhydrid wird 20 min unter Rückfluß erhitzt, am Rotationsverdampfer eingengt und mit präp. DSC aufgetrennt (Essigester/Cyclohexan 1:1, 2 \times entwickelt). Ausb. 720 mg **5b** (68%). Schmp. 233–237°C (aus Äthanol).

IR: 3450 (OH), 1780, 1750 (5-Ringlacton), 1727 (Acetat) und 1621 cm^{-1} (C=C). – UV: λ_{max} (lg ϵ) = 217 nm (4.17). – 1H -NMR ($CDCl_3/CD_3OD$ 7:3): $\delta = 0.68$ (s; 3 H, CH_3 -18), 1.19 (s; 3 H, CH_3 -19), 2.05 (s; 3 H, Ac), 2.11 (s; 3 H, Ac), 4.72 (m; 1 H, 6-H), 4.78 (dd; $J = 17 + 1$ Hz; 1 H, 21-H), 4.88 (dd; $J = 17 + 1$ Hz; 1 H, 21-H), 5.14 (m; 1 H, 3-H) und 5.86 ppm (m; 1 H, 22-H). – ORD-Spektrum, 1.19 mg **5b** in 3 ml Chloroform/Methanol (7:3):

λ	590	500	420	330	256 nm
$[\Phi]$	-359	-491	-742	-1556	-8678

$[\alpha]_{590}^{22} = -76.2^\circ$. – MS: $m/e = 474$ (1% M^+), 414 (3% $M^+ - HOAc$) und 354 (61% $M^+ - 2HOAc$).

$C_{27}H_{38}O_7$ (474.6) Ber. C 68.33 H 8.07 Gef. C 68.37 H 8.03

6 β -Acetoxy-3 β ,5 α -dihydroxy-14 α -card-20(22)-enolid (5c): Das Butenolid **5b** wird mit *Aspergillus ochraceus* umgewandelt. Dazu gibt man 100 mg **5b**, gelöst in 2.5 ml Aceton, in 5 Kolben, die den gut angewachsenen Mikroorganismus nebst Medium enthalten. Nach 96 h Kontaktzeit isoliert man wie gewöhnlich 43 mg **5c** (47%), die bei 156–159°C (Methanol) schmelzen.

IR: 3460 (OH), 1784, 1728 (5-Ringlacton), 1720 (Acetat) sowie 1622 cm^{-1} (C=C). – UV: λ_{max} (lg ϵ) = 216 nm (4.18). – 1H -NMR ($CDCl_3/CD_3OD$ 7:3): $\delta = 0.67$ (s; 3 H, CH_3 -18), 1.15 (s; 3 H, CH_3 -19), 2.08 (s; 3 H, Ac), 3.99 (m; 1 H, 3-H), 4.70 (m; 1 H, 6-H), 4.77 (dd; $J = 17 + 1.5$ Hz; 1 H, 21-H), 4.87 (dd; $J = 17 + 1.5$ Hz; 1 H, 21-H) und 5.85 ppm (m; 1 H, 22-H). – ORD-Spektrum, 1.52 mg **5c** in 3 ml Chloroform/Methanol (7:3):

λ	590	500	420	330	255	245 nm
$[\Phi]$	-247	-371	-643	-1154	-7062	-1815

$[\alpha]_{590}^{22} = -57.2^\circ$. – MS: $m/e = 433$ (0.5% $M^+ + 1$), 372 (2% $M^+ - HOAc$).

$C_{25}H_{36}O_6$ (432.6) Ber. C 69.42 H 8.39 Gef. C 69.24 H 8.58

3 β ,11 α -Dihydroxy-5 β α -oxido-14 α -card-20(22)-enolid (4): Auf 10 Erlenmeyerkolben, die mit Kulturen von *Aspergillus ochraceus* beschickt sind, werden 200 mg Butenolid **2** (zuvor mit 30 mg Tween 80 gefriergetrocknet) verteilt. Bei Abbruch nach 32 h resultieren 111 mg **4** (55%), daneben werden 9 mg Edukt **2** und 26 mg **5a** isoliert. Schmp. 261–266°C (Methanol).

IR: 3420 (OH), 1780, 1734 (5-Ringlacton) sowie 1624 cm^{-1} (C=C). – UV: λ_{max} (lg ϵ) = 214 nm (4.20). – 1H -NMR ($CDCl_3/CD_3OD$ 7:3): $\delta = 0.62$ (s; 3 H, CH_3 -18), 1.21 (s; 3 H, CH_3 -19), 2.97 (d; $J = 4$ Hz; 1 H, 6-H), 3.84 (m; 2 H, 3-H und 11-H), 4.79 (dd; $J = 18.5 + 2$ Hz; 1 H, 21-H), 4.89 (dd; $J = 18.5 + 2$ Hz; 1 H, 21-H) und 5.87 ppm (m; 1 H, 22-H). – ORD-Spektrum, 1.17 mg **4** in 3 ml Chloroform/Methanol (7:3):

λ	590	500	420	330	256	250 nm
$[\Phi]$	-209	-378	-507	-1044	-6540	-4274

$[\alpha]_{590}^{22} = -53.5^\circ$. – MS: $m/e = 388$ (21% M^+), 370 (13% $M^+ - H_2O$).

$C_{23}H_{32}O_5$ (388.5) Ber. C 71.10 H 8.30 Gef. C 71.05 H 8.26

6 β -Acetoxy-3 β ,5 α ,11 α -trihydroxy-14 α -card-20(22)-enolid (6): Aus dem für 5c beschriebenen Ansatz gingen gleichzeitig 25 mg 6 (26%) hervor. Schmp. 217–220°C (Essigester/Methanol).

IR: 3410 (OH), 1775, 1738 (5-Ringlacton), 1720 (Acetat) und 1622 cm^{-1} (C=C). – UV: λ_{max} (lg ϵ) = 216 nm (4.16). – 1H -NMR ($CDCl_3/CD_3OD$ 7:3): $\delta = 0.70$ (s; 3H, CH_3 -18), 1.28 (s; 3H, CH_3 -19), 2.08 (s; 3H, Ac), 3.94 (m; 2H, 3-H und 11-H), 4.72 (m; 1H, 6-H), 4.79 (dd; $J = 18 + 1.5$ Hz; 1H, 21-H), 4.91 (dd; $J = 18 + 1.5$ Hz; 1H, 21-H) sowie 5.89 ppm (dd; $J = 1.5$ Hz; 1H, 22-H). – ORD-Spektrum, 1.43 mg 6 in 3 ml Chloroform/Methanol (7:3):

λ	590	500	420	330	257	250 nm
$[\Phi]$	-282	-357	-563	-1267	-7508	-5350

$[\alpha]_{590}^{22} = -62.7^\circ$. – MS: $m/e = 449$ (1% $M^+ + 1$), 388 (3% $M^+ - HOAc$), 370 (12% $M^+ - HOAc - H_2O$).

$C_{25}H_{36}O_7$ (448.5) Ber. C 66.94 H 8.09 Gef. C 67.00 H 8.15

6 β -Acetoxy-3 β ,5 α ,17 α -trihydroxy-14 α -card-20(22)-enolid (7): Die Lösung von 80 mg Diacetat 5b in 2 ml Aceton gibt man zu vier 100-ml-Kulturen von *Curvularia lunata*, inkubiert 96 h und isoliert nach üblicher Aufarbeitung 2 mg Edukt 5b, 8 mg 5c, 17 mg 6 und 15 mg 7 (20%). – Schmp. 170–175°C (Methylenchlorid).

IR: 3430 (OH), 1782 (5-Ringlacton), 1735 (5-Ringlacton und Acetat), 1618 cm^{-1} (C=C). – UV: λ_{max} (lg ϵ) = 216 nm (4.11). – 1H -NMR ($CDCl_3/CD_3OD$ 7:3): $\delta = 0.69$ (s; 3H, CH_3 -18), 1.15 (s; 3H, CH_3 -19), 2.08 (s; 3H, Ac), 4.00 (m; 1H, 3-H), 4.72 (m; 1H, 6-H), 4.87 (dd; $J = 18$ Hz + 3 Hz; 1H, 21-H), 5.03 (dd; $J = 18 + 3$ Hz; 1H, 21-H) sowie 5.90 ppm (m; 1H, 22-H). – ORD-Spektrum, 1.05 mg 7 in 3 ml Chloroform/Methanol (7:3):

λ	590	500	420	330	258	245 nm
$[\Phi]$	-639	-1065	-1618	-3790	-22996	-2555

$[\alpha]_{590}^{22} = -142.5^\circ$. – MS: $m/e = 448$ (0.1% M^+), 370 (3% $M^+ - HOAc - H_2O$).

$C_{25}H_{36}O_7$ (448.5) Ber. C 66.94 H 8.09 Gef. C 64.36 H 8.06

3 β ,5 α ,6 α -Trihydroxy-14 α -card-20(22)-enolid (8a): Die Lösung von 1.5 g Butenolid 1 in 225 ml Chloroform versetzt man nacheinander mit 3 ml Pyridin und 1.55 g Osmiumtetroxid und beläßt 48 h bei Raumtemp. Das Lösungsmittel wird abgezogen und durch die gleiche Menge Methanol ersetzt. In diese Lösung leitet man 20 min Schwefelwasserstoff ein und filtriert das schwarze Osmiumsulfid ab. Nach Abdampfen der Solventien wird aus Methanol/Wasser kristallisiert. Das Rohmaterial wird mit Methylenchlorid/Aceton (1:1), bei zweimaliger Entwicklung, der präp. Schichtchromatographie unterworfen und aus Essigester erneut umkristallisiert. Ausb. 970 mg 8a (59%). Schmp. 272–279°C.

IR: 3400 (OH), 1790, 1745 (5-Ringlacton) und 1620 cm^{-1} (C=C). – UV: λ_{max} (lg ϵ) = 215 nm (3.93). – 1H -NMR ($[D_5]Pyridin$): $\delta = 0.52$ (s; 3H, CH_3 -18), 1.00 (s; 3H, CH_3 -19), 3.92 (m; 2H, 3-H und 6-H), 4.85 (dd; $J = 18 + 2$ Hz; 1H, 21-H), 4.93 (dd; $J = 18 + 2$ Hz; 1H, 21-H) sowie 6.02 ppm (m; 1H, 22-H). – ORD-Spektrum, 1.54 mg 8a in 3 ml Chloroform/Methanol (7:3):

λ	590	300	280	265 nm
$[\Phi]$	-37.9	-37.9	-910	-3360

$[\alpha]_{590}^{22} = -9.7^\circ$. – MS: $m/e = 390$ (2% M^+), 372 (10% $M^+ - H_2O$), 354 (80% $M^+ - 2H_2O$).

$C_{23}H_{34}O_5$ (390.5) Ber. C 70.74 H 8.77 Gef. C 70.70 H 8.88

3 β ,6 α -Diacetoxy-5 α -hydroxy-14 α -card-20(22)-enolid (8b): Das Triol **8a** (970 mg) wird mit 40 ml Pyridin und 40 ml Acetanhydrid 3 h bei Raumtemp. belassen. Die Aufarbeitung mittels präp. DSC (Essigester/Cyclohexan 1:1, dreimalige Entwicklung) liefert 920 mg **8b** (76%). Schmp. 258–263°C (Methanol).

IR: 3450 (OH), 1787, 1752 (5-Ringlacton), 1725 (Acetat) sowie 1623 cm⁻¹ (C=C). – UV: λ_{\max} (lg ϵ) = 216 nm (4.20). – ¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 7:3): δ = 0.67 (s; 3H, CH₃-18), 1.07 (s; 3H, CH₃-19), 2.06 und 2.11 (s; je 3H, Ac), 4.78 (dd; J = 18 + 2 Hz; 1H, 21-H), 4.88 (dd; J = 18 + 2 Hz; 1H, 21-H), 4.98 (m; 2H, 3-H und 6-H), 5.87 ppm (m; 1H, 22-H). – ORD-Spektrum, 1.04 mg **8b** in 3 ml Chloroform/Methanol (7:3):

λ	590	500	420	330	256 nm
[Φ]	-109	-177	-231	-518	-5993

[α]₅₉₀²² = -23°. – MS: m/e = 474 (1% M⁺), 354 (28% M⁺ - 2HOAc).

C₂₇H₃₈O₇ (474.6) Ber. C 68.33 H 8.07 Gef. C 68.21 H 7.97

6 α -Acetoxy-3 β ,5 α -dihydroxy-14 α -card-20(22)-enolid (8c): Zur Umwandlung von **8b** mit *Aspergillus ochraceus* verteilt man 160 mg Substrat **8b** in 4 ml Aceton auf 8 Erlenmeyer-Kolben, die jeweils 100 ml Medium mit dem gut gewachsenen Pilz enthalten. Nach 96 h Verweilzeit wird wie üblich aufgearbeitet, wobei 6 mg Edukt **8b**, 14 mg **9** (9.2%) und 50 mg **8c** (34%) isoliert werden. Schmp. 270–279°C (Essigester/Methanol).

IR: 3430 (OH), 1789, 1755 (5-Ringlacton), 1710 (Acetat) und 1630 cm⁻¹ (C=C). – UV: λ_{\max} (lg ϵ) = 218 nm (3.84). – ¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 7:3): δ = 0.65 (s; 3H, CH₃-18), 1.03 (s; 3H, CH₃-19), 2.08 (s; 3H, Ac), 3.91 (m; 1H, 3-H), 4.78 (dd; J = 17 + 2.5 Hz; 1H, 21-H), 4.88 (dd; J = 17 + 2.5 Hz; 1H, 21-H), 4.97 (m; 1H, 6-H) und 5.87 ppm (m; 1H, 22-H). – ORD-Spektrum, 1.16 mg **8c** in 3 ml Chloroform/Methanol (7:3):

λ	350	320	280	256 nm
[Φ]	-89.4	-201	-1510	-5144

MS: m/e = 432 (1.1% M⁺), 372 (10% M⁺ - HOAc), 354 (61% M⁺ - HOAc - H₂O).

C₂₅H₃₆O₆ (432.5) Ber. C 69.42 H 8.39 Gef. C 69.44 H 8.51

6 α -Acetoxy-3 β ,5 α ,11 α -trihydroxy-14 α -card-20(22)-enolid (9): Das im vorstehenden Ansatz isolierte **9** wird wie folgt charakterisiert: Schmp. 280–283°C (Essigester/Methanol). – IR: 3460 (OH), 1790, 1745 (5-Ringlacton), 1735 (Acetat), 1620 cm⁻¹ (C=C). – UV: λ_{\max} (lg ϵ) = 216 nm (4.17). – ¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 7:3): δ = 0.66 (s; 3H, CH₃-18), 1.15 (s; 3H, CH₃-19), 2.11 (s; 3H, Ac), 3.80 (m; 2H, 3-H und 11-H), 4.81 (dd; J = 18 + 2 Hz; 1H, 21-H), 4.93 (dd; J = 18 + 2 Hz; 1H, 21-H), 5.00 (m; 1H, 6-H) und 5.90 ppm (m; 1H, 22-H). – ORD-Spektrum, 1.71 mg **9** in 3 ml Chloroform/Methanol (7:3):

λ	590	400	290	258	250 nm
[Φ]	-17.3	-31.2	-866	-5327	-2771

[α]₅₉₀²² = -3.9°. – MS: m/e = 448 (0.1% M⁺), 388 (1.2% M⁺ - HOAc), 370 (12.3% M⁺ - HOAc - H₂O).

C₂₅H₃₆O₇ (448.5) Ber. C 66.94 H 8.09 Gef. C 67.50 H 8.39

6 α -Acetoxy-3 β ,5 α ,17 α -trihydroxy-14 α -card-20(22)-enolid (10): Für die Umwandlung des Diacetats **8b** mit *Curvularia lunata* überführt man 120 mg **8b** in 3 ml Aceton auf 6 Erlenmeyer-Kolben und inkubiert 72 h. Die Aufarbeitung erbringt 3 mg **8b**, 7 mg **8c**, 11 mg **9** (9.7%) sowie 10 mg **10** (9%). Schmp. 300–303°C (Essigester/Methanol).

IR: 3480 (OH), 1781 (5-Ringlacton), 1732 (5-Ringlacton und Acetat), 1620 cm⁻¹ (C=C). – UV: λ_{\max} (lg ϵ) = 212 nm (4.17). – ¹H-NMR ([D₅]Pyridin): δ = 0.67 (s; 3H, CH₃-18), 1.06 (s; 3H,

CH₃-19), 1.80 (s; 3 H, Ac), 3.65 (m; 1 H, 3-H), 4.58 (m; 1 H, 6-H), 5.01 (dd; $J = 21 + 2$ Hz; 1 H, 21-H), 5.19 (dd; $J = 21 + 2$ Hz; 1 H, 21-H) und 6.16 ppm (m; 1 H, 22-H). – ORD-Spektrum, 1.60 mg 10 in 3 ml Chloroform/Methanol (7 : 3):

λ	590	500	420	330	258	245 nm
$[\Phi]$	-184	-272	-470	-1210	-12432	0

$[\alpha]_{590}^{22} = -41.2^\circ$. – MS: $m/e = 448$ (0.4%, M⁺), 388 (4%, M⁺ – HOAc), 370 (10%, M⁺ – HOAc – H₂O).

C₂₅H₃₆O₇ (448.5) Ber. C 66.94 H 8.09 Gef. C 66.95 H 8.25

3-Oxo-14 α -carda-4,20(22)-dienolid (11): Die Lösung von 2 g 1 in 100 ml Toluol und 50 ml Cyclohexanon wird 30 min am Wasserabscheider erhitzt. Zum Schluß destilliert man noch 30 ml Lösungsmittel ab und versetzt mit 6 g Aluminiumisopropylat, bevor erneut 2 h unter Rückfluß gekocht wird. Nach Erkalten nimmt man das Gemisch mit Chloroform auf, wäscht den Extrakt mit verd. Schwefelsäure sowie Wasser und zieht die Solventien nahezu vollständig ab. Den Rest destilliert man 3 h mit Wasserdampf. Übliche Aufarbeitung und präp. DSC (Methylenchlorid/Aceton 11 : 1) führen zu 738 mg (37%) 11. Schmp. 237–240°C (Lit.³⁾ 242–244°C).

11 α -Hydroxy-3-oxo-14 α -carda-4,20(22)-dienolid (12): Jeweils 20 mg 11 verteilt man gleichzeitig mit 300 mg Adsorberharz Amberlite XAD-2 auf 15 Kulturen mit *Aspergillus ochraceus* und inkubiert 24 h unter Standardbedingungen. Nach üblicher Aufarbeitung lassen sich mit präp. DSC (Methylenchlorid/Aceton 7 : 1, dreimal entwickelt), drei Zonen gewinnen: 112 mg (37%) Edukt 11, 30 mg (9%) 13 und 124 mg (39%) 12. Schmp. 252–256°C (Methanol). – IR: 3460 (OH), 1780, 1747 (5-Ringlacton), 1655 (α,β -ungesätt. Keton) und 1621 cm⁻¹ (C=C). – UV: λ_{\max} (lg ϵ) = 222 nm (4.24). – ¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 7 : 3): $\delta = 0.74$ (s; 3 H, CH₃-18), 1.35 (s; 3 H, CH₃-19), 3.98 (m; 1 H, 11-H), 4.79 (dd; $J = 17 + 2$ Hz; 1 H, 21-H), 4.91 (dd; $J = 17 + 2$ Hz; 1 H, 21-H), 5.75 (s; 1 H, 4-H) und 5.89 ppm (m; 1 H, 22-H). – ORD-Spektrum, 1.55 mg 12 in 3 ml Chloroform/Methanol (7 : 3):

λ	590	360	340	280 nm
$[\Phi]$	+329	+1394	+1072	+5575

$[\alpha]_{590}^{22} = +89^\circ$. – MS: $m/e = 370$ (25%, M⁺), 352 (26%, M⁺ – H₂O).

C₂₃H₃₀O₄ (370.5) Ber. C 74.56 H 8.16 Gef. C 73.93 H 8.34

6 β ,11 α -Dihydroxy-3-oxo-14 α -carda-4,20(22)-dienolid (13): Unter den für 12 angegebenen Bedingungen werden 50 mg 11 96 h inkubiert. Dabei resultieren 11.5 mg (24%) Edukt 11, 16 mg (31%) 12 sowie 15 mg 13 (28%).

IR: 3450 (OH), 1781, 1745 (5-Ringlacton), 1645 (α,β -ungesätt. Keton) und 1618 cm⁻¹ (C=C). – UV: λ_{\max} (lg ϵ): 221 nm (3.99). – ¹H-NMR ([D₅]Pyridin/[D₆]Aceton 4 : 1): $\delta = 0.68$ (s; 3H, CH₃-18), 1.75 (s; 3H, CH₃-19), 4.27 (m; 1 H, 11-H), 4.53 (m; 1 H, 6-H), 4.74 (dd; $J = 17 + 2$ Hz; 1 H, 21-H), 4.90 (dd; $J = 17 + 2$ Hz; 1 H, 21-H), 5.98 (d; $J = 2$ Hz; 1H, 22-H) und 6.04 ppm (s; 1 H, 4-H). – ORD-Spektrum, 1.17 mg 13 in 3 ml Chloroform/Methanol (7 : 3):

λ	590	360	341	323	305	265 nm
$[\Phi]$	+89	+742	0	-465	-257	-4074

$[\alpha]_{590}^{22} = +23.1^\circ$. – MS: $m/e = 386$ (4%, M⁺), 368 (3.6%, M⁺ – H₂O), 353 (2.9%, M⁺ – H₂O – CH₃).

C₂₃H₃₀O₅ (386.5) Ber. C 71.48 H 7.82 Gef. C 71.91 H 7.87

3 β -Acetoxy-7-oxo-14 α -carda-5,20(22)-dienolid (14b): Die Lösung von 975 mg des Acetats von 1 in 32 ml Tetrachlorkohlenstoff, 8 ml Essigsäure und 2 ml Acetanhydrid wird auf 55–60°C erwärmt. Unter Rühren tropft man bei dieser Temperatur langsam ein Gemisch, bestehend aus

2 ml Essigsäure, 0,5 ml Acetanhydrid und 7,2 ml *tert*-Butylchromatlösung²³⁾ (entsprechend 1,33 g Cr₂O₆) hinzu und rührt 20 h bei 60–65°C weiter. Nach Abkühlen wird mit 50 ml 10proz. wäßriger Oxalsäure reaktiv hydrolysiert. Extraktion mit Chloroform und präp. DSC machen 515 mg **14b** (51%) zugänglich. Schmp. 246–251°C (Methanol).

IR: 1780, 1750 (5-Ringlacton und Acetat), 1660 (α,β -ungesätt. Keton), 1621 cm⁻¹ (C=C). – UV: λ_{\max} (lg ϵ) = 221 nm (4.33). – ¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 7:3): δ = 0.69 (s; 3H, CH₃-18), 1.25 (s; 3H, CH₃-19), 2.04 (s; 3H, Ac), 4.67 (m; 1H, 3-H), 4.76 (dd; J = 17 + 2 Hz; 1H, 21-H), 4.86 (dd; J = 17 + 2 Hz; 1H, 21-H), 5.72 (s; 1H, 6-H) und 5.87 ppm (m; 1H, 22-H). – ORD-Spektrum, 3,48 mg **14b** in 5 ml Chloroform:

λ	590	395	360	353	351	330 nm
$[\Phi]$	-462	-1054	0	+76.9	0	-4056

$[\alpha]_{590}^{22} = -112.2^\circ$. – MS: m/e = 412 (0.2%, M⁺), 352 (71%, M⁺ – HOAc).

C₂₅H₃₂O₅ (412.5) Ber. C 72.79 H 7.81 Gef. C 72.94 H 7.96

3 β -Hydroxy-7-oxo-14 α -carda-5,20(22)-dienolid (14a): In die Mischung von 12 ml Äthanol, 12 ml Äther und 1,5 ml konz. Salzsäure trägt man 55 mg **14b** ein und beläßt 48 h bei Raumtemp. Etwa 15 ml des Lösungsmittels werden abgezogen, der Rest mit Wasser versetzt und mit Chloroform extrahiert. Übliche Aufarbeitung und präp. DSC liefern 12 mg (24%) **14a** neben 27 mg (57%) **18**. Schmp. von **14a** 265–270°C (Methanol/Essigester).

IR: 3460 (OH), 1805, 1720 (5-Ringlacton), 1670 (α,β -ungesätt. Keton) sowie 1620 cm⁻¹ (C=C). – UV: λ_{\max} (lg ϵ) = 220 nm (3.94). – ¹H-NMR ([D₅]Pyridin/[D₆]Aceton 4:1): δ = 0.55 (s; 3H, CH₃-18), 1.09 (s; 3H, CH₃-19), 3.75 (m; 1H, 3-H), 4.71 (dd; J = 18 + 3 Hz; 1H, 21-H), 4.83 (dd; J = 18 + 3 Hz; 1H, 21-H), 5.78 (s; 1H, 6-H) und 5.94 ppm (m; 1H, 22-H). – ORD-Spektrum, 2,50 mg **14a** in 3 ml Chloroform/Methanol (7:3):

λ	590	395	360	352	341	325 nm
$[\Phi]$	-450.8	-998	0	+332.5	0	-4878

$[\alpha]_{590}^{22} = -123.8^\circ$. – MS: m/e = 370 (100%, M⁺), 352 (9%, M⁺ – H₂O).

C₂₃H₃₀O₄ (370.5) Ber. C 74.56 H 8.16 Gef. C 75.22 H 8.36

7-Oxo-14 α -carda-3,5,20(22)-trienolid (18): Das bei der Darstellung von **14a** anfallende **18** besitzt folgende Eigenschaften: Schmp. 236–240°C (Methanol). – IR: 1775, 1732 (5-Ringlacton), 1645 (α,β -ungesätt. Keton), 1615 cm⁻¹ (C=C). – UV: λ_{\max} (lg ϵ) = 267 (4.31) und 214 nm (4.21). – ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.70 (s; 3H, CH₃-18), 1.14 (s; 3H, CH₃-19), 4.71 (dd; J = 25 + 3 Hz; 1H, 21-H), 4.85 (dd; J = 25 + 3 Hz; 1H, 21-H), 5.64 (s; 1H, 6-H), 5.88 (m; 1H, 22-H), 6.16 ppm (s; je 1H, 3-H und 4-H). $[\alpha]_{590}^{22} = -279.5^\circ$ (c = 0.033, Chloroform/Methanol 7:3). – MS: m/e = 352 (100%, M⁺), 337 (9%, M⁺ – CH₃).

C₂₃H₂₈O₃ (352.5) Ber. C 78.37 H 8.01 Gef. C 78.40 H 8.14

3 β ,11 α -Dihydroxy-7-oxo-14 α -carda-5,20(22)-dienolid (15): Jeweils 20 mg gefriergetrocknetes Butenolid **14b** verteilt man auf fünf 100-ml-Kulturen von *Aspergillus ochraceus*, inkubiert 80 h und arbeitet wie üblich auf. Mittels präp. DSC (1. Methylenchlorid/Aceton (7:1), einmal entwickelt; 2. gleiche Laufmittel (4:1), dreimal entwickelt) lassen sich 3 Substanzen gewinnen: 25 mg Edukt **14b** (25%) als unpolarste Zone, 3,5 mg **14a** (4%) sowie 52,5 mg **15** (56%) als stark polare Zone. Schmp. 285–292°C (Methanol).

IR: 3475 (OH), 1797, 1725 (5-Ringlacton), 1660 (α,β -ungesätt. Keton) sowie 1618 cm⁻¹ (C=C). – UV: λ_{\max} (lg ϵ) = 221 nm (3.71). – ¹H-NMR ([D₅]Pyridin/[D₆]Aceton 4:1): δ = 0.65 (s; 3H, CH₃-18), 1.43 (s; 3H, CH₃-19), 3.82 (m; 1H, 3-H), 4.28 (m; 1H, 11-H), 4.74 (dd; J = 17 + 2 Hz;

²³⁾ R. V. Oppenauer und H. Oberrauch, Ann. Asoc. Quimica Argentina 37, 246 (1949).

1H, 21-H), 4.90 (dd; $J = 17 + 2$ Hz; 1H, 21-H), 5.92 (s; 1H, 6-H) und 6.00 ppm (m; 1H, 22-H). – ORD-Spektrum, 2.22 mg **15** in 5 ml Chloroform/Methanol (7 : 3):

λ	590	440	379	351	339	325 nm
$[\Phi]$	-366	-662	0	+2352	0	-6184

$[\alpha]_{590}^{22} = -94.5^\circ$. – MS: $m/e = 386$ (28%, M^+), 368 (6%, $M^+ - H_2O$).

$C_{23}H_{30}O_5$ (386.5) Ber. C 71.48 H 7.82 Gef. C 71.93 H 7.80

3 β ,17 α -Dihydroxy-7-oxo-14 α -carda-5,20(22)-dienolid (16): In fünf 100-ml-Kulturen von *Curvularia lunata* werden jeweils 20 mg Butenolid **14b** (gefriergetrocknet mit 15 mg Tween 80) eingetragen. Nach 46 h wird die Behandlung abgebrochen und in gewohnter Weise aufgearbeitet. Präp. DSC (1. Methylchlorid/Aceton (11 : 2), einmal entwickelt; 2. Essigester/Cyclohexan (4 : 1), zweimal entwickelt) erbringt 4.5 mg Substrat **14b**, 5 mg **14a** (5%), 8 mg (8%) **17** sowie 37 mg **16** (39%). Schmp. 260–265°C (Methanol).

IR: 3370 (OH), 1785, 1741 (5-Ringlacton), 1650 cm^{-1} (α,β -ungesätt. Keton), 1621 cm^{-1} (C=C). – UV: λ_{max} (lg ϵ) = 224 nm (4.29). – 1H -NMR ($CDCl_3/CD_3OD$ 7 : 3): $\delta = 0.70$ (s; 3H, CH_3 -18), 1.24 (s; 3H, CH_3 -19), 3.60 (m; 1H, 3-H), 4.90 (dd; $J = 18 + 2.5$ Hz; 1H, 21-H), 5.04 (dd; $J = 18 + 2.5$ Hz; 1H, 21-H), 5.70 (s; 1H, 6-H) sowie 5.92 ppm (m; 1H, 22-H). – ORD-Spektrum, 2.73 mg **16** in 5 ml Chloroform/Methanol (7 : 3):

λ	590	385	355	320 nm
$[\Phi]$	-622	-1549	-530	-7037

$[\alpha]_{590}^{22} = -165^\circ$. – MS: $m/e = 386$ (43%, M^+), 368 (6.2%, $M^+ - H_2O$).

$C_{23}H_{30}O_5$ (386.5) Ber. C 71.48 H 7.82 Gef. C 70.94 H 8.03

3 β ,14 α -Dihydroxy-7-oxocarda-5,20(22)-dienolid (17): Das im vorstehenden Ansatz anfallende **17** besitzt folgende Eigenschaften: Schmp. 254–260°C (Essigester). – IR: 3450 (OH), 1800, 1725 (5-Ringlacton), 1650 (α,β -ungesätt. Keton) und 1612 cm^{-1} (C=C). – UV: λ_{max} (lg ϵ) = 222 nm (4.32). – 1H -NMR ($CDCl_3/CD_3OD$ 7 : 3): $\delta = 0.80$ (s; 3H, CH_3 -18), 1.26 (s; 3H, CH_3 -19), 3.53 (m; 1H, 3-H), 4.77 (dd; $J = 16 + 2$ Hz; 1H, 21-H), 4.89 (dd; $J = 16 + 2$ Hz; 1H, 21-H), 5.75 (s; 1H, 6-H), 5.94 ppm (dd; $J = 2$ Hz; 1H, 22-H). – ORD-Spektrum, 0.99 mg **17** in 5 ml Chloroform/Methanol (7 : 3):

λ	590	400	364	351	342	260 nm
$[\Phi]$	-210	-544	0	+427	0	-1505

$[\alpha]_{590}^{22} = -54.5^\circ$. – MS: $m/e = 386$ (2%, M^+), 368 (5%, $M^+ - H_2O$).

$C_{23}H_{30}O_5$ (386.5) Ber. C 71.48 H 7.82 Gef. C 71.30 H 7.93

3 β -Acetoxy-7-oxo-14 α -carda-5,16,20(22)-trienolid (19): Die Lösung von 56 mg **16** in 10 ml Pyridin und 5 ml Acetanhydrid wird nach 5 h bei Raumtemp. in Eiswasser gegossen und wie üblich aufgearbeitet, wobei 39 mg acetyliertes **16** anfallen. Diese werden in 10 ml Pyridin erneut gelöst, die Lösung auf $-15^\circ C$ abgekühlt und langsam mit 1 ml Phosphoroxychlorid versetzt. Nach 16 h Rühren bei Raumtemp. verdünnt man mit Eiswasser und extrahiert mit Chloroform. Mittels präp. DSC fallen 21 mg **19** (54%) an. Schmp. 205–210°C.

UV: λ_{max} (lg ϵ) = 270 (4.06) und 225 nm (4.11). – 1H -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 0.97$ (s; 3H, CH_3 -18), 1.25 (s; 3H, CH_3 -19), 2.05 (s; 3H, Ac), 4.72 (m; 1H, 3-H), 4.91 (dd; $J = 16 + 1$ Hz; 1H, 21-H), 4.97 (dd; $J = 16 + 1$ Hz; 1H, 21-H), beide 21-H fallen zu einem „s“ zusammen, 5.75 (s; 1H, 6-H), 5.92 (scheinbares „s“; 1H, 22-H) und 6.24 ppm (t; 1H; 16-H). – ORD-Spektrum, 0.71 mg **19** in 3 ml Chloroform/Methanol (7 : 3):

λ	590	380	350	282	260	245 nm
$[\Phi]$	-365	-1444	-1009	-17040	-6180	-9185

$[\alpha]_{590}^{22} = -89^\circ$. – MS: $m/e = 410$ (0.3%, M^+), 350 (95%, $M^+ - HOAc$).

$C_{25}H_{30}O_5$ (410.5) Ber. C 73.14 H 7.37 Gef. C 71.75 H 7.42

3 β ,11 β ,14 α -Trihydroxy-7-oxocarda-5,20(22)-dienolid (**20**): 400 mg Butenolid **14b** werden mit 60 mg Tween 80 gefriergetrocknet und in 20 Schüttelkulturen mit *Cunninghamella blakesleeana* umgewandelt. Nach 72 h extrahiert man mit Chloroform und isoliert nach präp. DSC (Essigester/Cyclohexan 4:1, viermal entwickelt) 22 mg (6%) **17** und 14 mg **20** (3.5%). Schmp. 259–262°C (Methanol).

1H -NMR ($CDCl_3/CD_3OD$ 7:3): $\delta = 1.02$ (s; 3H, CH_3 -18), 1.45 (s; 3H, CH_3 -19), 3.64 (m; 1H, 3-H), 4.38 (m; 1H, 11-H), 4.77 (dd; $J = 15 + 2$ Hz; 1H, 21-H), 4.91 (dd; $J = 15$ Hz + 2 Hz; 1H, 21-H), 5.69 (s; 1H, 6-H) und 5.91 ppm (m; 1H, 22-H). – MS: $m/e = 402$ (4%, M^+), 384 (2.2%, $M^+ - H_2O$) und 366 (1.4%, $M^+ - 2H_2O$).

$C_{23}H_{30}O_6$ (402.5) Ber. C 68.63 H 7.51 Gef. C 68.40 H 6.73

[32/76]