

Ungesättigte Lactone mit steroidanalogem Grundgerüst, VIII¹⁾

Zur mikrobiologischen Hydroxylierung eines Pseudosteroid-butenolids

Wolfgang Kreiser*

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

Siegmond Lang

Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung mbH Braunschweig-Stöckheim,
Mascheroder Weg 1, D-3301 Braunschweig-Stöckheim

Eingegangen am 30. Januar 1976

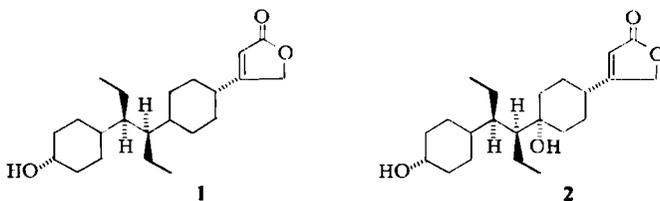
Bei der Inkubation des racemischen Butenolids **1** mit *Curvularia lunata* wird eine Selektion derart beobachtet, daß das (–)-*R,R*-Enantiomere zu **2**, **3** und **4** oxygeniert, während das zugehörige (+)-*S,S*-Enantiomere völlig abgebaut wird. Die Konstitutionsaufklärung von **2–4** erfolgt mit spektroskopischen Methoden.

Unsaturated Lactones with Steroidal-Type Backbone, VIII¹⁾

The Microbial Hydroxylation of a Pseudosteroid Butenolide

The incubation of the racemic butenolide **1** with *Curvularia lunata* is accompanied by an asymmetric selection. Whereas (–)-*R,R*-**1** is oxygenated to **2**, **3**, **4**, the corresponding (+)-*S,S*-enantiomer is degraded. The structures of **2–4** are elucidated by spectroscopy.

Im Rahmen unserer Bemühungen, die Giftigkeit natürlicher Cardenolide herabzusetzen – bei Erhalt der positiv inotropen Wirkung –, haben wir den starren Steroid-Tetracyclus durch das konformativ bewegliche Perhydrostilben-Grundgerüst ersetzt. Unter der Voraussetzung, daß in dieser Klasse eine vergleichbare Raumerfüllung und ähnlicher Abstand der funktionellen Gruppen zu finden sei, wurden in der Vergangenheit zahlreiche Lactone des Typs **1** synthetisiert und geprüft¹⁾. Von diesen ist das sogenannte *threo*-Pseudosteroid-cardenolid **1** der angegebenen Konfiguration am längsten bekannt²⁾ und gründlich untersucht³⁾.



¹⁾ VII. Mitteil.: W. Kreiser und G. Neef, Liebigs Ann. Chem. 1974, 1279.

²⁾ H. H. Inhoffen, W. Kreiser und R. Panenka, Liebigs Ann. Chem. 749, 117 (1971).

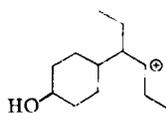
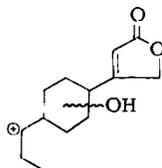
³⁾ H. H. Inhoffen, W. Kreiser und M. Nazir, Liebigs Ann. Chem. 755, 1 (1972).

Ursprünglich war für **1** eine cardiotonische Wirkung erwartet worden, deren Ausbleiben mit dem Fehlen eines Hydroxyls, das dem 14 β -OH natürlicher Herzgifte entsprach, gedeutet wurde. Die Einführung solcher Alkoholfunktion in das vollständige Molekül – wie etwa zu **2** – erschien mit chemischen Methoden ebenso problematisch wie der gezielte schrittweise Aufbau.

Die in vorstehender Mitteilung⁴⁾ beschriebene 14 α -Oxygenierung von Steroid-butenoliden durch die Pilze *Curvularia lunata* und *Cunninghamella blakesleeana* gab uns Hoffnung, **2** mit dem mikrobiologischen Verfahren zugänglich zu machen und so die Deutung des physiologischen Verhaltens von **1** zu prüfen. Weiterhin dürfte man sich im Falle der Umwandlung von **1** durch die Mikroorganismen einigen Aufschluß zur Strukturspezifität biochemischer Reaktionen erhoffen. Unter diesem Aspekt war gerade **1** als Substrat ausgewählt worden, weil es als *threo*-Racemat bequem zugänglich war⁵⁾; die Lage der Substituenten an den Cyclohexanringen ließ sich als äquatorial bestimmen³⁾; das entsprechende Diastereomere der *erythro*-Reihe war gleichfalls bekannt; schließlich hatte Neef⁵⁾ auch beide Enantiomere der *threo*-Verbindung **1** rein darstellen können, deren absolute Konfiguration sich durch Korrelation mit (+)-2,3-Diäthylbernsteinsäure bzw. mit (–)-Hexöstrol⁶⁾ ableiten ließ.

Qualitative Vorversuche an **1** mit den beiden ausgewählten Pilzen zeigten, daß *Curvularia lunata* ein Haupt- und zwei Nebenprodukte bildete; obgleich auch *Cunninghamella blakesleeana* bevorzugt das gleiche Hauptprodukt lieferte, fehlten hier die beiden polareren Nebenprodukte.

In einer ersten quantitativen Versuchsreihe inkubierten wir das linksdrehende Enantiomere von **1** der *R,R*-Konfiguration mit *Curvularia lunata*. Nach 48 h Reaktionszeit ließen sich durch präparative DSC drei kristalline Hydroxylierungsprodukte isolieren. Die aus der unpolarsten Zone stammende bei 169–173°C schmelzende Hauptmenge wies nach Umkristallisieren aus Äther den Drehwert $[\alpha]_{589}^{22} = +9.7^\circ$ auf. Nach Auskunft des Massenspektrums handelte es sich um ein Monohydroxyl-Derivat von **1**. Als wesentliche Fragmente erschienen dabei *m/e* = 183 (5%) und 223 (27%), die durch Bruch der zentralen Hexankette erklärt werden konnten.

A *m/e* = 183B *m/e* = 223

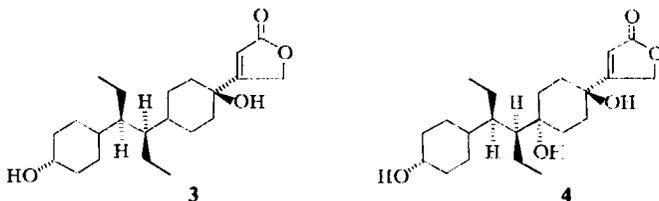
Damit war das neu eingetretene Hydroxyl bereits in der Molekülhälfte von **1** zu lokalisieren, die auch den Heterocyclus enthielt. Ganz entsprechend kann das restliche Fragmentierungsverhalten gedeutet werden. Zusätzliche Aufklärung verschaffte das ¹H-Kernresonanzspektrum des Produkts, in dem kein zusätzliches Proton geminal zur neuen Alkoholfunktion gefunden wird. Diese muß danach tertiär angeordnet sein. Der genaue Ort – und damit der Konstitutionsvorschlag **3** – konnte durch das Fehlen des Signals

⁴⁾ F. Wagner, S. Lang und W. Kreiser, Chem. Ber. **109**, 3304 (1976), vorstehend.

⁵⁾ Dissertation G. Neef, Techn. Univ. Braunschweig 1973.

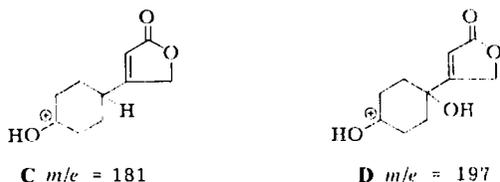
⁶⁾ W. Kreiser und G. Neef, Tetrahedron Lett. **1971**, 2985.

für den Wasserstoff geminal zum Butenolidring eindeutig bestimmt werden. Dieses Multiplett bei $\delta = 2.35$ ppm war früher bereits zur Frage der Anordnung des Lactonringes am Cyclohexansystem herangezogen worden³⁾. Eine leichte Tieffeldverschiebung der Protonen im Heterocyclus – unter dem Einfluß des nahen OH – sowie das ¹³C-NMR-Spektrum bestätigen die Struktur **3** für das unpolare Hauptprodukt.



Als Test für die Konfigurationsabhängigkeit der beobachteten mikrobiologischen Umsetzungen wurde in einer zweiten Versuchsreihe das rechtsdrehende *S,S*-Enantiomere von **1** unter exakt den gleichen Bedingungen mit *Curvularia lunata* inkubiert. Hierbei ließ sich kein mit **3** in der Polarität vergleichbares Umwandlungsprodukt identifizieren; lediglich im Bereich niedriger *R_f*-Werte tauchten neben einer Vielzahl weiterer Substanzflecken auch die für das andere Enantiomere aufgefundenen Nebenprodukte (**2** und **4**) auf. Die geringe Gesamtintensität aller Flecken ließ den Schluß zu, daß der Mikroorganismus dieses Enantiomere langsam zum Veratmen benutzte. Damit konnte man aber auch das bequemer zugängliche racemische *threo*-**1** einsetzen, um größere Mengen optisch aktives **3** für die physiologische Untersuchung bereitzustellen. Aus einem dritten Ansatz mit racemischem **1** isolierte man unter Standardbedingungen 40% racemisches **1** zurück, neben 38% optisch aktivem **3**, sowie die beiden polaren Stoffe der ersten Versuchsreihe in 17 bzw. 10proz. Ausbeute. Die gleichfalls optisch aktiven Verbindungen vom Schmp. 62–65 und 92–98°C fielen dabei in zur Konstitutionsaufklärung ausreichenden Mengen an.

Im Massenspektrum erwies sich die polarste Substanz als Triol, die weniger polare als Diol, wobei in beiden Fällen die Basispeaks C und D wiederum den Ort des Angriffs eindeutig in der rechten Molekülhälfte von **1** festlegen.



Die weitere Strukturermittlung folgt dem für **3** angegebenen Verfahren. Für das Diol **2** kehrt das Signal bei $\delta = 2.35$ ppm wieder und die Lactonringprotonen nehmen die vorherige Lage ein; da auch hier der neue Alkohol tertiär angeordnet ist, bleibt in Kombination mit dem Fragment C nur die vorgeschlagene Konstitution.

Für das Triol **4** ist unter Berücksichtigung des ¹H-NMR-Spektrums und des Fragments D keine alternative Formulierung denkbar. Im übrigen zeigen die am Schluß des experimentellen Teils tabellierten ¹³C-Kernresonanzspektren der Verbindungen **1**–**4** gesetzmäßige

Signal-Verschiebungen, wie sie vollkommen im Einklang mit den abgeleiteten Strukturen stehen. Insbesondere bestätigen die Off-Resonance-Spektren von 2–4 mit Singulett bei $\delta = 74.69$ für 2, bei 70.23 für 3 und 70.43, 74.70 ppm für 4 das Vorliegen tertiärer OH-Gruppen.

Über die relative Konfiguration der neu eingeführten Hydroxylreste läßt sich zur Zeit keine Aussage machen, doch dürfte die angegebene Stereochemie wahrscheinlich sein. Alle drei Verbindungen zeigten im Langendorff-Test beim Meerschweinchen keinen digitalisartigen Effekt.

Experimenteller Teil

Bezüglich allgemeiner Angaben gelten die in Lit.⁴⁾ gemachten Hinweise. Für die mikrobiologischen Umsetzungen von 1 ist folgender Ansatz repräsentativ:

Die Lösung von 1.48 g *racem.* Butenolid 1 in 18.5 ml Äthanol wird auf 37 Kolben mit gut angewachsenen Kulturen von *Curvularia lunata* verteilt. Nach Zugabe von jeweils 300 mg Adsorbierharz Amberlite XAD-2 inkubiert man 48 h, extrahiert die vereinigten Kulturbrühen mit zweimal 12 Liter Chloroform und isoliert mittels präp. DSC vier Zonen (1. Methylenchlorid/Aceton (12 : 1), einmal entwickelt, 2. Essigester/Cyclohexan (4 : 1), einmal entwickelt). Ausb. 582 mg *racem.* 1; 180 mg 3 (38%)*; 80 mg 2 (17%) sowie 47 mg 4 (10%).

4-{4-[(1*R*,2*R*)-1-Äthyl-2-(4-hydroxycyclohexyl)butyl]-4-hydroxycyclohexyl}-2,5-dihydro-2-furanon (2): Schmp. 62–65°C. – IR: 3430 (OH), 1778, 1735 (5-Ringlacton) und 1625 cm^{-1} (C=C). – UV: λ_{max} (lg ϵ) = 210 nm (4.23). – ¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 7 : 3): δ = 1.00 (t; *J* = 8 Hz, 6H für Methyl), 2.35 (m; 1H geminal zum Lacton), 3.50 (m; 1H geminal zu OH), 4.87 (d; Methylen im Lacton), 5.85 ppm (t; Vinyl-H). – ORD-Spektrum, 20.12 mg 2 in 5 ml Chloroform/Methanol (7 : 3):

λ	350	320	300	270	255 nm
$[\Phi]$	-560	-687	-777	-859	-940

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -153.6^\circ$. – MS: *m/e* = 365 (0.1%, M⁺ + 1), 183 (1%, A), 182 (10%, A – 1), 181 (100%, C), 163 (4%, C – H₂O).

C₂₂H₃₆O₄ (364.5) Ber. C 72.49 H 9.96 Gef. C 72.40 H 9.97

4-{4-[(1*R*,2*R*)-1-Äthyl-2-(4-hydroxycyclohexyl)butyl]-1-hydroxycyclohexyl}-2,5-dihydro-2-furanon (3): Schmp. 169–173°C (Äther). – IR: 3400 (OH), 1780, 1730 (5-Ringlacton) sowie 1622 cm^{-1} (C=C). – UV: λ_{max} (lg ϵ) = 210 nm (4.24). – ¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 7 : 3): δ = 0.90 (t; *J* = 6 Hz, 6H für Methyl), 3.47 (m; 1H geminal zu OH), 4.95 (d; Methylen im Lacton), 5.90 ppm (t; Vinyl-H). – ORD-Spektrum, 7.83 mg 3 in 5 ml Chloroform:

λ	589	500	350	300	350 nm
$[\Phi]$	+35.3	+41.8	+79	+139	+257

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +9.7^\circ$. – MS: *m/e* = 364 (0.7%, M⁺), 346 (13%, M⁺ – H₂O), 265 (4%, M⁺ – C₆H₁₁O), 247 (7%, M⁺ – C₆H₁₁O – H₂O), 225 (15%), 224 (20%), 223 (27%, B), 205 (17%, B – H₂O), 183 (5%, A), 182 (10%, A – 1) und 165 (20%, A – H₂O).

C₂₂H₃₆O₄ (364.5) Ber. C 72.49 H 9.96 Gef. C 72.65 H 9.84

4-{4-[(1*R*,2*R*)-1-Äthyl-2-(4-hydroxycyclohexyl)butyl]-1,4-dihydroxycyclohexyl}-2,5-dihydro-2-furanon (4): Schmp. 92–98°C. – IR: 3430 (OH), 1781, 1743 (5-Ringlacton) und 1625 cm^{-1} (C=C). – UV: λ_{max} (lg ϵ) = 210 nm (4.14). – ¹H-NMR (CDCl₃/CD₃OD 7 : 3): δ = 1.0 (t; *J* = 8 Hz, 6H

* Die Ausbeuten sind auf den Umsatz eines Enantiomeren im Substrat bezogen (450 mg).

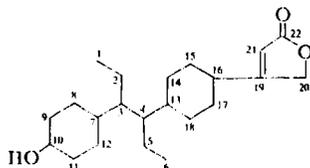
für Methyl), 3.52 (m; 1 H geminal zu OH), 4.97 (d; Methylen im Lacton) sowie 5.96 ppm (t; Vinyl-H).
 – ORD-Spektrum, 14.4 mg 4 in 5 ml Chloroform:

λ	350	320	300	270	255 nm
$[\Phi]$	-234	-342	-357	-519	-621

$[\alpha]_{350}^{25} = -61.5^\circ$. – MS: $m/e = 381$ (0.2%, $M^+ + 1$), 344 (1%, $M^+ - 2H_2O$), 197 (100%, D), 179 (92%, D - H_2O) und 161 (5%, D - $2H_2O$), kein 183.

$C_{22}H_{36}O_5$ (380.5) Ber. C 69.44 H 9.54 Gef. C 69.53 H 9.40

Tab. ^{13}C -NMR-Spektren^{a)} von 1–4 in $CDCl_3/CD_3OD$ (7 : 3). Die Messungen erfolgten bei 37°C mit Tetramethylsilan als innerem Standard in Fourier-Transform-Arbeitsweise



C-Atom	Verbindung			
	1	2	3	4
1	14.3	14.4 ^d	14.3 ^c	14.4 ^d
2	21.5	19.2 ^c	21.2 ^d	19.2 ^c
3	45.8 ^c	45.0	45.3 ^b	44.9
4	45.3 ^c	52.2	45.8 ^b	52.2
5	21.2	22.1 ^c	21.5 ^d	22.2 ^c
6	14.3	16.7 ^d	14.4 ^c	16.7 ^d
7	40.1 ^b	41.0	39.9	41.0
8	27.6 ^a	27.1 ^a	27.7 ^a	27.2 ^a
9	35.9	35.9	35.9	35.9
10	71.0	71.1	71.1	71.1
11	35.9	35.9	35.9	35.9
12	30.1 ^a	30.3 ^a	30.0 ^a	30.2 ^a
13	39.8 ^b	74.7	39.9	74.7
14	28.9 ^d	33.8 ^b	24.0 ^c	29.1 ^b
15	32.2	26.9	37.5	32.4
16	38.6	38.0	70.7	70.4
17	32.2	26.9	37.5	32.4
18	31.3 ^d	34.1 ^b	26.1 ^c	29.2 ^b
19	175.9	175.9	175.7	175.8
20	72.8	72.7	71.8	71.8
21	113.7	113.8	113.3	113.4
22	176.9	176.7	180.3	180.3

^{a)} Die Messung und Zuordnung verdanken wir Herrn Dr. V. Wray, Institut für Molekularbiologische Forschung, Braunschweig-Stöckheim.

a–j: Diese Zuordnungen können innerhalb der einzelnen Spalten vertauscht werden.