

2. <sup>15</sup>N-Markiertes Benzazid. 136 mg reines Benzhydrazid werden in 5 ml Wasser gelöst und unter Eiskühlung mit 70 mg Na<sup>15</sup>NO<sub>2</sub> (3,28% <sup>15</sup>N) versetzt. Das Azid scheidet sich beim tropfenweisen Zugeben von 1,5 ml Eisessig kristallin ab. Smp. 32°. Nach der Verseifung durch einstündiges Kochen mit einer Lösung von 120 mg KOH in 10 ml Wasser wird die Stickstoffwasserstoffsäure mit verdünnter Schwefelsäure in Freiheit gesetzt und wie beschrieben aufgearbeitet.

Der *Stiftung für Wissenschaftliche Forschung an der Universität Zürich* sind wir für die Bereitstellung von Mitteln zu vielem Dank verpflichtet.

### Zusammenfassung

Bei der Diazotierung von Benzhydrazid und 2,4-Dinitrophenylhydrazin mit H<sup>15</sup>NO<sub>2</sub> entstehen ausschliesslich Azide vom Typ R-N=N=<sup>15</sup>N, während beim Phenylhydrazin noch bis zu 7% des Isotop-isomeren R-N=<sup>15</sup>N=N auftreten. Dieser Befund zeigt, dass die Nachbarschaft elektrophiler Gruppen den Angriff der salpetrigen Säure bei diesen Hydrazinen auf das äussere Stickatom lenkt, wobei das intermediäre β-Nitrosoderivat spontan in Wasser und endständig markiertes Azid zerfällt. Im Zusammenhang damit sind Nitroso-derivate des Benzhydrazids und 2,4-Dinitrophenylhydrazins in reiner Form überhaupt unbekannt.

Physikalisch-Chemisches Institut der Universität Zürich

## 158. Reaktionen mit Mikroorganismen

### 2. Mitteilung<sup>1)</sup>

### Die stereospezifische Reduktion von (±)-Δ<sup>4,9</sup>-8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5)

von W. Acklin, V. Prelog und A. P. Prieto

(13. VI. 58)

*Curvularia falcata* (TEHON) BOEDIJN, welche das Carbonyl in Stellung 8 des (±)-Δ<sup>4,9</sup>-Methyl-octalindions-(3,8) stereospezifisch reduziert<sup>1)</sup>, greift auch, wie in Vorversuchen gezeigt werden konnte, das ringhomologe (±)-Δ<sup>4,9</sup>-8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5)<sup>2)</sup> (I und II) reduktiv an. Schon die Vorversuche zeigten einen auffallenden Unterschied in den Reaktionsgeschwindigkeiten. Während das (±)-Δ<sup>4,9</sup>-Methyl-octalindion-(3,8) aus dem Reaktionsgemisch nach 24 Std. praktisch vollständig verschwindet, bleibt vom (±)-Δ<sup>4,9</sup>-8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5) noch nach mehreren Tagen ein beträchtlicher Teil unangegriffen.

Neben den Kulturen von Mikroorganismen in einem Nährmedium, in welchem sie kräftig wachsen, verwenden wir neuerdings auch Suspensionen von

<sup>1)</sup> I. Mitt., V. PRELOG & W. ACKLIN, Helv. **39**, 748 (1956).

<sup>2)</sup> P. WIELAND & K. MIESCHER, Helv. **33**, 2215 (1950); vgl. auch den experimentellen Teil.

abzentrifugiertem Mycel in einer gepufferten Zuckerlösung. Obwohl dabei, besonders bei längeren Versuchszeiten, das Wachstum nicht ganz unterbunden ist, sprechen wir in diesem Falle von «*ruhenden*» Kulturen. Die Verwendung von «*ruhenden*» statt wachsenden Kulturen bringt oft praktische Vorteile mit sich. Die Menge des eingesetzten Mikroorganismus ist leichter kontrollierbar, und die Versuche sind besser reproduzierbar. Bei den «*ruhenden*» Kulturen ist weiter die synthetische Aktivität des Mikroorganismus stark herabgesetzt und das Reaktionsmedium ist frei von lipophilen Bestandteilen. Die Reaktionsprodukte enthalten deshalb viel weniger Verunreinigungen und lassen sich leichter isolieren.

Durch Umsetzung von  $(\pm)\text{-}\Delta^{4,9}\text{-8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5)}$  mit «*ruhenden*» Kulturen von *Curvularia falcata* in präparativem Maßstab und Chromatographie des Reaktionsgemisches an Aluminiumoxyd erhält man zwei Hauptprodukte: 1. ein  $(-)\text{-}\Delta^{4,9}\text{-8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5)}$ , Smp.  $67^\circ$ ,  $[\alpha]_D = -364^\circ$  (IR.-Absorptionsspektrum, Fig. 1, Kurve 1) und 2. ein  $(+)\text{-}\Delta^{4,9}\text{-1-Hydroxy-8-methyl-hexahydro-indenon-(5)}$ , Smp.  $58\text{--}60^\circ$  bzw.  $79\text{--}81^\circ$ ,  $[\alpha]_D = +97^\circ$  (IR.-Absorptionsspektrum, Fig. 1, Kurve 2). Das letztere gibt bei der Oxydation mit Chrom(VI)-oxyd-Pyridin<sup>3)</sup> das  $(+)\text{-}\Delta^{4,9}\text{-8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5)}$  vom Smp.  $67^\circ$  und  $[\alpha]_D = +362^\circ$ . Die Ausbeute an isolierten, reinen Produkten beträgt etwa 80% d. Th. Es gelingt also, das  $(\pm)\text{-}\Delta^{4,9}\text{-8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5)}$  mit «*ruhenden*» Kulturen von *Curvularia falcata* in ausgezeichneter Ausbeute zu reduzieren, wobei a) nur das rechtsdrehende Enantiomere angegriffen wird und b) die Reduktion stereospezifisch verläuft, indem von den zwei theoretisch möglichen Diastereomeren nur das eine entsteht.

Dadurch unterscheidet sich diese Reduktion charakteristisch von der früher beschriebenen Reduktion des  $(\pm)\text{-}\Delta^4\text{-9-Methyl-octalindions-(3,8)}$ , bei der, wie wir uns nachträglich überzeugen konnten, auch die «*ruhenden*» Kulturen von *Curvularia falcata* die beiden Enantiomeren mit fast gleicher Geschwindigkeit angreifen. Der Unterschied im Verhalten gegenüber den beiden Diketonen ist jedoch nur quantitativer und nicht prinzipieller Natur. Als wir das  $(\pm)\text{-}\Delta^{4,9}\text{-8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5)}$  mit kräftig wachsenden Kulturen von *Curvularia falcata* längere Zeit behandelten, erhielten wir folgende Produkte: 1. linksdrehende  $\Delta^{4,9}\text{-8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5)}$ -Präparate mit variierendem  $[\alpha]_D -110^\circ$  bis  $-29^\circ$ , 2. ein  $(+)\text{-}\Delta^{4,9}\text{-1-Hydroxy-8-methyl-hexahydro-indenon-(5)}$ , das mit dem schon erwähnten identisch war, und 3. ein neues  $(+)\text{-}\Delta^{4,9}\text{-1-Hydroxy-8-methyl-hexahydro-indenon-(5)}$  vom Smp.  $95^\circ$   $[\alpha]_D = +32^\circ$  (IR.-Absorptionsspektrum, Fig. 1, Kurve 3), das bei der Rückoxydation mit Chrom(VI)-oxyd-Pyridin das optisch reine  $(-)$ -Diketon lieferte. Die wachsenden Kulturen von *Curvularia falcata* greifen somit auch dieses letztere, und zwar stereospezifisch an, indem auch hier von den zwei möglichen Diastereomeren nur das eine entsteht.

<sup>3)</sup> G. I. POOS, G. E. ARTH, R. E. BEYLER & L. H. SARETT, J. Amer. chem. Soc. **75**, 422 (1953).

Es schien uns möglich, dass der Unterschied zwischen den «ruhenden» und den wachsenden Kulturen auf einer Adaptation des Mikroorganismus an das zweite Enantiomere während des Wachstums beruhen könnte. Wir haben deshalb *Curvularia falcata* einige Zeit in Gegenwart von ( $\pm$ )- $\Delta^{4,9}$ -8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5) wachsen lassen. Die so vorbereiteten «ruhenden» Kulturen reduzierten nun tatsächlich auch das (-)-Enantiomere des Diketons, wenn auch bedeutend langsamer als das (+)-Enantiomere.

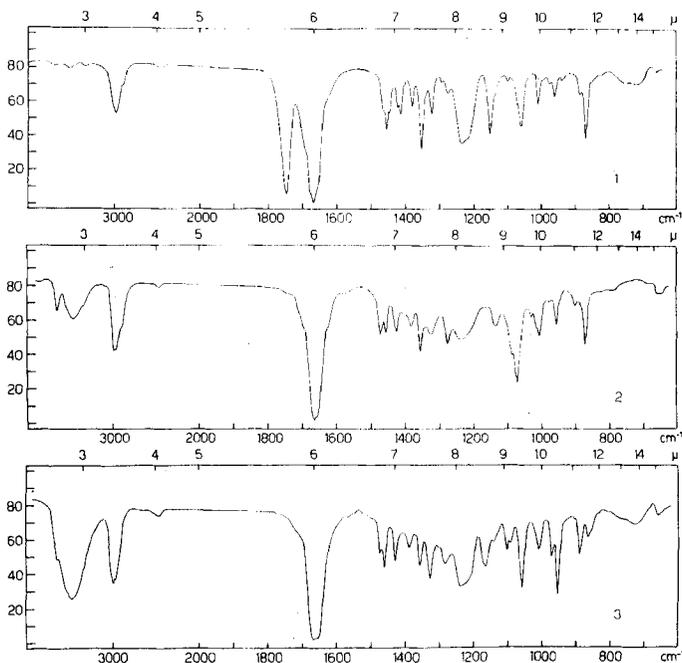


Fig. 1

Den Umsetzungsprodukten des  $\Delta^{4,9}$ -8-Methyl-hexahydro-indendions-(1,5) mit *Curvularia falcata* wurden auf Grund ihres Drehungsvermögens die durch die Formeln I–IV dargestellten absoluten Konfigurationen zugeschrieben<sup>4)</sup>. Demnach besitzt das rascher reduzierbare rechtsdrehende Enantiomere des Diketons die (8 S)<sup>5)</sup>-Konfiguration. Die diastereomeren 1-Hydroxy-Verbindungen haben beide die (1 S)<sup>5)</sup>-Konfiguration. Der sterische Verlauf der Reduktion ist demnach analog demjenigen bei  $\Delta^{4,9}$ -Methyl-octalindion-(3,8)<sup>1)</sup>. Es ist weiter interessant, dass die bevorzugten Konfigurationen denjenigen der Ringe C und D der natürlichen Steroid-Hormone entsprechen. Im Zusammenhang damit sei daran erinnert, dass man racemisches Östron mit Mikroorganismen in optische Antipoden trennen kann, indem nur das natürliche

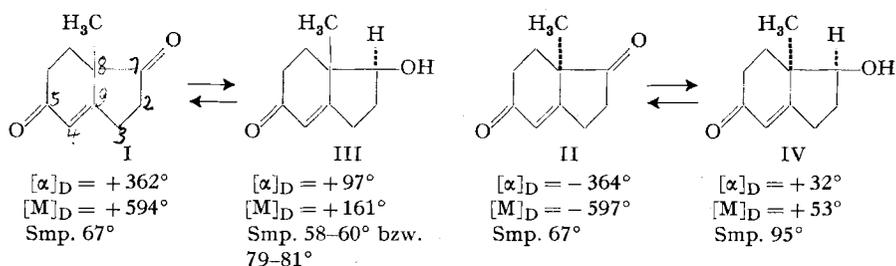
<sup>4)</sup> Über einen exakteren Konfigurationsbeweis durch asymmetrische Synthese werden wir in einer späteren Mitteilung berichten.

<sup>5)</sup> Konfigurative Bezeichnung nach R. S. CAHN, C. K. INGOLD & V. PRELOG, *Experientia* **12**, 81 (1956).

Enantiomere zum  $17\beta$ -Östradiol reduziert wird<sup>6)</sup>. Die Reduktion einer Anzahl von 17-Ketosteroiden mit gärender Hefe oder *Pseudomonas*-Kulturen ergab immer die  $17\beta$ -Hydroxy-Derivate<sup>7)</sup>.

Der Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit des  $(\pm)\Delta^{4,9}$ -8-Methyl-hexahydro-indendions-(1,5) gegenüber dem  $(\pm)\Delta^{4,9}$ -Methyl-octalindion-(3,8) ist zum Teil vielleicht dadurch bedingt, dass die Carbonyl-Gruppe, falls sie in einem 5-Ring statt in einem 6-Ring vorliegt, auch *in vitro* durch eine Hydridübertragung langsamer reduziert wird. Bei der Reduktion mit Natriumborhydrid bei 0° haben H. C. BROWN & K. ICHIKAWA<sup>8)</sup> ein Verhältnis  $k(\text{Cyclohexanon})/k(\text{Cyclopentanon}) = 23$  gefunden. Der Unterschied in der Stereoselektivität bei beiden Substraten ist dagegen wohl auf die Verschiedenheit der Wechselwirkungen der nichtgebundenen Atome im Übergangszustand der enzymatischen Reaktion zurückzuführen und wird in einem grösseren Zusammenhang später diskutiert werden.

Da inzwischen die Erfahrung gemacht wurde, dass die Reduktion des  $(\pm)\Delta^{4,9}$ -Methyl-octalindions-(3,8) mit gewissen Mikroorganismen, wie z. B. *Aspergillus niger* VAN T.<sup>9)</sup>, weniger stereospezifisch verläuft, als diejenige mit *Curvularia falcata*, wurde auch das  $(\pm)\Delta^{4,9}$ -8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5) mit «ruhenden» Kulturen von *Aspergillus niger* umgesetzt. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die Reduktion verläuft auch bei einem grossen Überschuss an Mikroorganismen sehr langsam. Als Reaktionsprodukte wurden erfasst: 1. ein schwach linksdrehendes  $\Delta^{4,9}$ -8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5) vom Smp. 66–68°,  $[\alpha]_D = -32^\circ$ , 2. ein teilweise racemisches  $\Delta^{4,9}$ -1-Hydroxy-8-methyl-hexahydro-indenon-(5) III vom Smp. 72 bis 74°,  $[\alpha]_D = +56^\circ$  und 3. ein teilweise racemisches, rechtsdrehendes  $\Delta^{4,9}$ -1-Hydroxy-hexahydro-indenon-(5) IV, Smp. 77–82°,  $[\alpha]_D = +21^\circ$ . Im Gegensatz zu *Curvularia falcata*, die optisch reine Reduktionsprodukte liefert, entstehen also unter Einwirkung von *Aspergillus niger* teilweise racemische Reduktionsprodukte.



Die Reduktion von  $(\pm)\Delta^{4,9}$ -8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5) mit «ruhenden» Kulturen von *Curvularia falcata* weist demnach eine hohe *Edukt-Selektivität* für das (8 S)-Enantiomere auf, die bei wachsenden Kulturen nicht

<sup>6)</sup> E. VISCHER, J. SCHMIDLIN & A. WETTSTEIN, *Experientia* **12**, 50 (1956).

<sup>7)</sup> Vgl. A. WETTSTEIN, *Experientia* **11**, 465 (1955).

<sup>8)</sup> *Tetrahedron* **1**, 221 (1957).

<sup>9)</sup> Vgl. die nachstehende 3. Mitt., *Helv.* **41**, 1424 (1958).

mehr so ausgeprägt ist, oder auch durch Adaptation bei «ruhenden» Kulturen verkleinert werden kann. In beiden Fällen findet man jedoch eine hohe *Produkt-Stereospezifizität*, indem nur stereoisomere  $\Delta^{4,9}$ -1-Hydroxy-8-methyl-hexahydro-indenone-(5) mit (1 *S*)-Konfiguration gebildet werden.

Die Reduktion mit *Aspergillus niger* ist sowohl durch eine geringe Edukt-Selektivität als auch durch eine kleine Produkt-Stereospezifizität charakterisiert.

Wir danken Herrn Dr. P. WIELAND, CIBA AKTIENGESellschaft, Basel, für die Überlassung eines Musters des Ausgangsmaterials für die Vorversuche. Die Hauptmenge wurde unter Mitarbeit von Herrn D. DÜTTING hergestellt, dem wir auch die Vorversuche für diese Arbeit verdanken.

Der CIBA AKTIENGESellschaft in Basel danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit. Den HH. Dr. A. WETTSTEIN und Dr. E. VISCHER von derselben Firma verdanken wir viele Einzelheiten über mikrobiologische Reaktionen.

### Experimenteller Teil<sup>10)</sup>

1. *Herstellung des Ausgangsmaterials*: ( $\pm$ )- $\Delta^{4,9}$ -8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5)<sup>2)11)</sup>. Zu 13,15 g 1-Methyl-cyclopentandion-(2,5)<sup>12)</sup>, 15 ml Pyridin, 10 ml t.-Butanol, 250 ml Toluol und 100 mg Hydrochinon, die sich in einem mit Stickstoff gespülten Rundkolben mit Rückflusskühler befanden, tropfte man langsam 10 ml Methylvinylketon und erhitze das Gemisch in Stickstoff 90 Std. unter Rückfluss (Ölbadtemperatur 115°). Während des Erhitzens führte man nach 3, 17 und 27 Std. je 5 ml Methylvinylketon zu. Da die Vorversuche zeigten, dass sich die Isolierung des kristallinen  $\delta$ -Diketons, welches bei der Kondensation entsteht, nicht lohnt, wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum, zuletzt unter Zugabe von Benzol, eingedampft und der Rückstand (25 g) mit 12,2 g p-Toluolsulfosäure und 250 mg Hydrochinon in 120 ml Eisessig 2 Std. unter Stickstoff auf 100–120° erhitzt. Die essigsäure Lösung wurde dann im Vakuum auf ein kleines Volumen eingengt, mit viel Äther versetzt und mit festem Natriumcarbonat und wenig Wasser neutralisiert. Die Ätherauszüge wurden mit Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Alle wässrigen Lösungen wurden wegen der Wasserlöslichkeit des Produktes im KUTSCHER-STEUDEL-Apparat mit Äther extrahiert. Der teilweise kristallisierende ölige Rückstand nach dem Eindampfen der vereinten ätherischen Auszüge (21,1 g) wurde mit Aktivkohle entfärbt und durch Kristallisation aus Äther-Petroläther sowie Sublimation im kalten Finger gereinigt. Nach dem Aufarbeiten der Mutterlaugen durch Chromatographie an Aluminiumoxyd konnten insgesamt 15,18 g (75% d. Th.) der reinen, farblosen Verbindung vom Smp. 71–72° und 3,53 g (17%) eines weniger reinen, bräunlichen Produktes erhalten werden. Die Verbindung war in jeder Hinsicht (Analyse, IR.-Absorptionsspektrum, Smp. und Misch-Smp.) mit einem authentischen Vergleichspräparat von WIELAND & MIESCHER<sup>2)</sup> identisch.

2. *Mikrobiologische Reaktionen*. – 2.1. Bei *Vorversuchen* mit kleinen Mengen («Screenings») konnte papierchromatographisch festgestellt werden, dass alle verwendeten Mikroorganismen: *Aspergillus niger* VAN T., *Curvularia falcata* (TEHON) BOEDIJN, *Ophiobolus herpotrichus* (FR.) SACC., *Rhizopus nigricans* EHRENB. und *Streptomyces coelicolor* (MÜLLER) WAKSMAN & HENRICI das  $\Delta^{4,9}$ -8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5) [Rf (Propylenglykol-Toluol) = 0,65 und Rf (BUSH C) = 0,83] in ein stärker polares, UV.-absorbierendes Pro-

<sup>10)</sup> Alle Smp. sind korrigiert. Das optische Drehungsvermögen wurde in 1 dm Rohr bestimmt. Die UV.-Absorptionsspektren wurden mit einem selbstregistrierenden BECKMAN-Spektrographen Modell DK 1, die IR.-Absorptionsspektren mit dem PERKIN-ELMER-Double-Beam-Spectrograph, Modell 21, aufgenommen.

<sup>11)</sup> Die Kondensation wurde unter den Bedingungen ausgeführt, die für analoge Kondensationen mit Methylvinylketon von A. FREY, Diss. ETH Zürich, Nr. 2311, 1954, ausgearbeitet worden waren. Vgl. J. PANOUSE & CH. SANNIÉ, Bull. Soc. chim. France 1956, 1433.

<sup>12)</sup> Hergestellt nach J. PANOUSE & CH. SANNIÉ, Bull. Soc. chim. France 1955, 1036.

dukt überführen [Rf (Propylenglykol-Toluol) = 0,07 und Rf (BUSH C) = 0,37]. Im Gegensatz zu  $\Delta^{4,9}$ -Methyl-octalindion-(3,8), welches von *Curvularia falcata* relativ rasch (2 Tage) vollständig reduziert wird, bleibt vom  $\Delta^{4,9}$ -8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5) auch nach längerer Umsetzung (2 Wochen) etwa die Hälfte des Ausgangsmaterials unangegriffen.

2.2 *Bereitung der «ruhenden» Kulturen von Curvularia falcata.* 450 ml der sterilen Nährlösung<sup>13)</sup>, jedoch ohne Zusatz von Calciumcarbonat, wurden mit 50 ml einer 24-std. Schüttelkultur von *Curvularia falcata* geimpft und in einem horizontal rotierenden (280 U/Min.) 2-l-Rundkolben<sup>13)</sup> bei 25° 16 Std. wachsen gelassen. Die Kultur wurde bei 0° und 17800 g zentrifugiert und das Sediment zweimal mit Wasser aufgeschwemmt und zentrifugiert. Das auf diese Weise erhaltene, feuchte Mycel wog etwa 24 g. Bei «Adaptationsversuchen» auf das Substrat wurde der gleiche Versuch unter Zugabe von 250 mg ( $\pm$ )- $\Delta^{4,9}$ -8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5) ausgeführt. Nach etwa 40 Std. erhielt man 34 g abzentrifugiertes, feuchtes Mycel.

2.3. *Bereitung der «ruhenden» Kulturen von Aspergillus niger.* Die Versuchsanordnung war die gleiche wie bei *Curvularia falcata*, die Nährlösung hatte jedoch folgende Zusammensetzung: 25 g Malzextrakt, 25 g Reinglucose, 20 g *Oxo*-Pepton, 0,5 g krist. Magnesiumsulfat und 1 ml Spurenelementlösung nach BRIAN, mit Leitungswasser auf 1 l aufgefüllt und 20 Min. bei 120° sterilisiert, pH = 4,55. Zur Schaumbekämpfung wurden 2 ml einer verd. (1:10) Antifoam-A-Emulsion (Dow CHEMICALS) zugegeben. Nach 23 Std. wurde bei 0° auf einem Nylon-Filter abgenutscht und mit eiskaltem Wasser gewaschen, wodurch man etwa 36 g feuchtes Mycel erhielt.

2.4. *Umsetzungen mit «ruhenden» Kulturen von Curvularia falcata.* 20 g abzentrifugiertes, feuchtes Mycel schlemmte man in 500 ml Phosphat-Pufferlösung pH = 7 auf, die 10 g Saccharose und 200 mg ( $\pm$ )- $\Delta^{4,9}$ -8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5) enthielt, und liess die Suspension im horizontal rotierenden 2-l-Rundkolben 30 Std. bei 25° reagieren. Das Mycel wurde darauf abgenutscht und dreimal mit je 100 ml Wasser nachgewaschen. Das Kulturfiltrat und die Waschwässer schüttelte man mit Äthylacetat gründlich aus. Nach Trocknen mit Natriumsulfat und Eindampfen im Vakuum verblieben 270 mg gelbes Öl, welche man in 1 ml Benzol an 12 g Aluminiumoxyd (neutral; Akt. II) chromatographierte.

Fraktion	Eluierungsmittel	Eluat mg	$[\alpha]_D^{14}$
1	12 ml Benzol	14	–
2–14	144 ml Benzol	80	– 328° krist. II
18–34	192 ml Benzol-Äther	86	+ 95° krist. III
42–57	180 ml Chloroform-Alkohol	12	+ 17° IV?

Ein analoger Versuch mit 34 g «adaptiertem» Mycel lieferte folgende Produkte:

Fraktion	Eluierungsmittel	Eluat mg	$[\alpha]_D^{14}$
1–2	20 ml Benzol	61	–
3–13	120 ml Benzol	64	– 242° krist. II
14–30	200 ml Benzol-Äther	72	+ 97° krist. III
56–63	300 ml Chloroform-Alkohol	26	+ 36° krist. IV

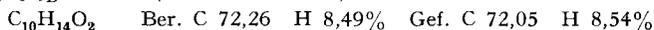
<sup>13)</sup> Unsere Apparatur ist im wesentlichen einem Modell nachgebildet, das für analoge Zwecke von Professor S. E. LURIA, University of Illinois, Urbana, Ill., verwendet wird. Der eine von uns (A.P.P.) dankt ihm für den Hinweis auf diese elegante Züchtungsmethode für Mikroorganismen.

<sup>14)</sup> In Benzol.

2.5. *Umsetzung mit wachsender Kultur von Curvularia falcata*. 10 ERLÉNMEYER-Kolben à 500 ml wurden mit je 150 ml steriler Nährlösung<sup>1)</sup> beschickt und mit je 5 ml einer 3 Tage alten Schüttelkultur von *Curvularia falcata* geimpft, welche  $\frac{1}{2}$  Std. durch Schütteln mit Glaskugeln auf der Schüttelmaschine homogenisiert worden war. Nach 2 Tagen wurden mit den so bereiteten Kulturen 4 Schüttelenten mit je 4 l Nährlösung geimpft und 36 Std. wachsen gelassen, worauf 2 der Schüttelenten mit je 500 mg und die anderen 2 mit je 1 g Edukt, in wenig Aceton gelöst, beschickt wurden. Nach 2 und  $\frac{1}{2}$  Tagen arbeitete man auf übliche Weise auf. Um Verluste zu vermeiden, verzichtete man auf das Waschen der Äthylacetat-Auszüge. Die Schüttelenten mit der höheren Konzentration des Eduktes wurden gesondert von denjenigen mit der niedrigeren Konzentration aufgearbeitet. Da sie jedoch die Produkte im gleichen Verhältnis lieferten, soll hier nur das Gesamtergebnis der chromatographischen Trennung an Aluminiumoxyd angegeben werden. Man erhielt folgende Hauptfraktionen: 1. 0,360 g optisch uneinheitliches, linksdrehendes  $\Delta^{4,9}$ -8-Methyl-hexahydro-indenon-(1,5),  $[\alpha]_D = -56^\circ$  bzw.  $-30^\circ$  (Benzol). Aus diesem liess sich durch Kristallisation racemisches Diketon gewinnen. 2. 1,07 g stark rechtsdrehende Hydroxy-ketone, hauptsächlich das (1 S, 8 S)-Diastereomere III mit wenig des (1 S, 8 R)-Diastereomeren IV. 3. 0,525 g eines optisch fast inaktiven Gemisches des (1 S, 8 R)-Diastereomeren IV mit stark negativ drehenden Diketopiperazinen.

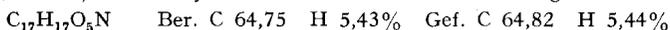
2.6. *Umsetzung mit «ruhender» Kultur von Aspergillus niger*. 500 mg Edukt wurden in 500 ml Phosphat-Pufferlösung pH = 7 und 10 g Glucose mit 95 g abgenutztem, feuchtem Mycel von *Aspergillus niger* 66 Std. auf übliche Weise umgesetzt und das Reaktionsprodukt aufgearbeitet. Man erhielt durch chromatographische Trennung an 30 g Aluminiumoxyd (neutral, Akt. II–III) 372 mg schwach linksdrehendes Edukt,  $[\alpha]_D = -32^\circ$  und 135 mg eines Hydroxy-keton-Gemisches, aus dem durch nochmalige Chromatographie an 8 g Aluminiumoxyd (neutral, Akt. II) 88 mg eines rechtsdrehenden Gemisches des (1 S, 8 S)- mit dem (1 R, 8 R)-Stereoisomeren,  $[\alpha]_D = +56^\circ$  und 33 mg eines rechtsdrehenden Gemisches des (1 S, 8 R)- mit dem (1 R, 8 S)-Stereoisomeren,  $[\alpha]_D = +21^\circ$ , erhalten wurden.

3. *Produkte der mikrobiologischen Umsetzungen*. – 3.1. (+)-(1 S, 8 S)- $\Delta^{4,9}$ -1-Hydroxy-8-methyl-hexahydro-indenon-(5) (III). 1,372 g der aus mehreren Versuchen stammenden, positiv drehenden Fraktionen der ersten chromatographischen Trennung wurden in 4 ml Benzol gelöst und nochmals an 41 g Aluminiumoxyd (neutral, Akt. II) chromatographiert. Man erhielt 1,042 g eines papierchromatographisch einheitlichen, kristallinen Produktes, Smp. 55–65°, welches in Aceton-Äther mit Aktivkohle entfärbt und mehrmals aus Äther-Petroläther umkristallisiert wurde. Der Smp. blieb dabei unscharf, 58–60°. Aus Diisopropyläther konnte eine zweite Modifikation, Smp. 79–81°, erhalten werden. Zur Analyse und Bestimmung der optischen Drehung wurde im Hochvakuum geschmolzen (Gewichtsverlust 3%).  $[\alpha]_D = +97^\circ$  ( $c = 1,415$ , Benzol).



Im UV. in Feinsprit wurde an einem nicht im Hochvakuum geschmolzenen Präparat ein  $\lambda_{\text{max}} = 241 \mu$  ( $\log \epsilon$  3,87) beobachtet. Das IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform ist in Fig. 1, Kurve 2, dargestellt. Die relative Oxydationsgeschwindigkeitskonstante mit Chrom(VI)-oxyd:  $k^* = 0,9$  (Cholestanol-(3 $\beta$ ):  $k^* = 1,0$ )<sup>15)</sup>.

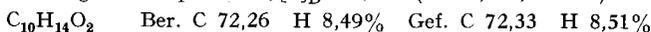
*p-Nitrobenzoyl-Derivat*. Aus 78 mg Alkohol wurden auf übliche Weise<sup>1)</sup> mit p-Nitrobenzoylchlorid und Pyridin in Benzol 123 mg eines kristallinen p-Nitrobenzoyl-Derivates erhalten, das nach Umlösen aus Aceton-Äther bei 152,5–153° schmolz,  $[\alpha]_D = +94^\circ$  ( $c = 1,138$ , Benzol). Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 80° getrocknet.



3.2. (+)-(1 S, 8 R)- $\Delta^{4,9}$ -1-Hydroxy-8-methyl-hexahydro-indenon-(5) (IV). Die scheinbar inaktiven oder schwach negativ drehenden Fraktionen von der ersten chromatographischen Trennung, die nach papierchromatographischer Untersuchung das polare Umsetzungsprodukt enthielten, erwiesen sich als ein Gemisch von stark negativ drehenden Diketo-

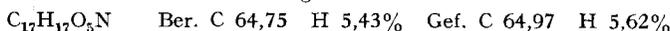
<sup>15)</sup> J. SCHREIBER & A. ESCHENMOSER, Helv. 38, 1529 (1955).

piperazinen<sup>16)</sup> mit einem positiv drehenden  $\alpha, \beta$ -ungesättigten Hydroxy-keton. Das letztere liess sich aus dem Gemisch leicht durch Umkristallisieren aus Diisopropyläther, in dem die Diketopiperazine praktisch unlöslich sind, gewinnen. Durch Umlösen aus demselben Lösungsmittel und aus Aceton-Äther und Sublimation im Hochvakuum wurde schliesslich eine Verbindung vom Smp. 94–95°,  $[\alpha]_D = +32^\circ$  ( $c = 1,821$ , Benzol) erhalten.

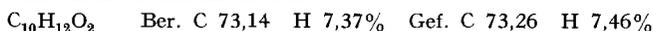


Das UV.-Absorptionsspektrum weist ein  $\lambda_{\text{max}}$  241  $\mu$  ( $\log \epsilon$  4,13) auf. IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform Fig. 1, Kurve 3. Die relative Oxydationsgeschwindigkeit mit Chrom(VI)-oxyd:  $k^* = 0,35^{16)}$ .

*p*-Nitrobenzoyl-Derivat. Mit *p*-Nitrobenzoylchlorid und Pyridin in Benzol wurden aus 35 mg Alkohol 51 mg einer kristallinen Verbindung erhalten, die nach dreimaligem Umkristallisieren aus Aceton-Äther bei 134° schmolz,  $[\alpha]_D = +122^\circ$  ( $c = 0,970$ , Benzol). Zur Analyse wurde im Hochvakuum bei 60° getrocknet.

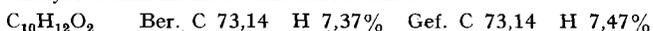


3.3. (+)-(8*S*)- $\Delta^{4,9}$ -8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5) (I). 100 mg (+)-(1*S*, 8*S*)- $\Delta^{4,9}$ -1-Hydroxy-8-methyl-hexahydro-indenon-(5) (III) wurden in 1 ml Pyridin mit einer Suspension aus 120 mg Chrom(VI)-oxyd und 1,2 ml Pyridin mit einem Vibro-Mischer 21 Std. geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde darauf mit Benzol und etwas Wasser versetzt und unter ständiger Zugabe von Benzol im Vakuum von Pyridin befreit. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgenutscht und mit Benzol und Äther gewaschen, die Filtrate mit verd. Salzsäure schwach angesäuert und mit Äther extrahiert. Nach Waschen, Trocknen und Eindampfen blieben 70 mg eines öligen Rückstandes zurück, der nach papierchromatographischer Untersuchung grösstenteils aus dem Diketon und etwas Ausgangsmaterial bestand. Durch Extrahieren aller wässriger Lösungen von der Aufarbeitung im KÜTSCHER-STEUDEL-Apparat konnten noch 21 mg eines Öles erhalten werden, welches grösstenteils das unveränderte Ausgangsmaterial enthielt. Das letztere Produkt wurde mit Chrom(VI)-oxyd-Pyridin nochmals oxydiert, wodurch noch 11 mg unreines Diketon gewonnen werden konnten. Durch Chromatographie an Aluminiumoxyd (neutral, Akt. I–II) erhielt man 65 mg rohes Diketon, aus welchen durch Umlösen aus Äther-Diisopropyläther-Petroläther 45 mg der reinen Verbindung vom Smp. 65–66°,  $[\alpha]_D = +362^\circ$  ( $c = 0,598$ , Benzol) gewonnen werden konnten. Zur Analyse wurde nochmals umkristallisiert und im Hochvakuum sublimiert.



Das IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform war mit denjenigen des Enantiomeren (vgl. Fig. 1, Kurve 1) und des Racemates praktisch identisch.

3.4. (–)-(8*R*)- $\Delta^{4,9}$ -8-Methyl-hexahydro-indendion-(1,5) (II). – a) Aus den Versuchen mit «ruhenden» Kulturen. Die stark negativ drehenden ersten Fraktionen des ersten Chromatogramms wurden aus Äther-Diisopropyläther-Petroläther umkristallisiert, wodurch eine Verbindung vom Smp. 66,5–67°,  $[\alpha]_D = -365^\circ$  ( $c = 0,338$ , Benzol), erhalten wurde. Zur Analyse wurde im Hochvakuum sublimiert.



Das UV.-Absorptionsspektrum in Feinsprit wies ein  $\lambda_{\text{max}} = 237 \mu$  ( $\log \epsilon$  3,96) auf. IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform Fig. 1, Kurve 1.

b) Durch Oxydation von (1*S*, 8*R*)-1-Hydroxy-8-methyl-hexahydro-indenon-(5). 50 mg des langsamer oxydierbaren Hydroxy-ketons IV wurden in zwei Ansätzen 30 bzw. 54 Std. mit Chrom(VI)-oxyd-Pyridin oxydiert. Die Aufarbeitung ergab 45 mg des unreinen Diketons, aus dem durch chromatographische Reinigung an Aluminiumoxyd 34 mg des rohen Diketons erhalten wurden, das schliesslich durch Umkristallisieren die reine Verbindung vom Smp. 66,5–67,5° und  $[\alpha]_D = -356^\circ$  ( $c = 1,092$ , Benzol) lieferte, die in allen ihren Eigenschaften mit der direkt erhaltenen Verbindung übereinstimmte.

<sup>16)</sup> Diketopiperazine erhält man oft als Nebenprodukte der mikrobiologischen Reaktionen. Vgl. L. ETLINGER, E. GÄUMANN, R. HÜTTER, W. KELLER-SCHIERLEIN, F. KRADOLFER, L. NEIPP, V. PRELOG, P. REUSSER & H. ZÄHNER, Monatshefte Chem. **88**, 989 (1957).

Die Analysen wurden in unserm mikroanalytischen Laboratorium (Leitung W. MANSER) ausgeführt.

### Zusammenfassung

Racemisches  $\Delta^{4,9}$ -8-Methyl-hexahydro-indendon-(1,5) wird durch «ruhende» Kulturen von *Curvularia falcata* (TEHON) BOEDIJN stereospezifisch reduziert, unter Bildung von (1 S, 8 S)- $\Delta^{4,9}$ -1-Hydroxy-8-methyl-hexahydro-indenon-(5) (III). Das (8 R)-Enantiomere des Eduktes bleibt dabei grösstenteils unangegriffen. Wachsende und «adaptierte ruhende» Kulturen desselben Mikroorganismus greifen auch dieses letztere stereospezifisch, unter Bildung von (1 S, 8 R)- $\Delta^{4,9}$ -1-Hydroxy-8-methyl-hexahydro-indenon-(5) (IV), an. «Ruhende» Kulturen von *Aspergillus niger* VAN T. verhalten sich ähnlich, liefern jedoch teilweise racemische Hydroxy-ketone.

Organisch-chemisches Laboratorium  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

## 159. Reaktionen mit Mikroorganismen

3. Mitteilung<sup>1)</sup>

### Reduktion von ( $\pm$ )- $\Delta^4$ -9-Methyl-octalindion-(3,8) mit *Aspergillus niger*

von W. Acklin, D. Dütting und V. Prelog

(1. VII. 58)

Die wachsenden und «ruhenden»<sup>1)</sup> Kulturen von *Curvularia falcata* (TEHON) BOEDIJN reduzieren die Carbonyl-Gruppe in Stellung 8 der beiden enantiomeren  $\Delta^4$ -9-Methyl-octalindione-(3,8) I und II. Diese mikrobiologische Reduktion ist wenig selektiv in bezug auf das Edukt, von welchem das (9S)-Enantiomere etwas rascher reagiert. Sie verläuft dagegen *stereospezifisch in bezug auf das Produkt*, indem von den vier theoretisch möglichen stereoisomeren  $\Delta^4$ -8-Hydroxy-9-methyl-octalonen-(3) *ausschliesslich zwei* und zwar diejenigen mit (8S)-Konfiguration entstehen<sup>1) 2)</sup>.

Bei der Fortsetzung unserer Versuche konnten wir feststellen, dass wachsende und «ruhende» Kulturen eines andern Mikroorganismus, des weitverbreiteten *Aspergillus niger* VAN T., die  $\Delta^4$ -9-Methyl-octalindione-(3,8) ebenfalls zu  $\Delta^4$ -8-Hydroxy-9-methyl-octalonen-(3) reduzieren. Der Verlauf der Reduktion ist jedoch ein anderer als bei *Curvularia falcata*. Die mikrobiologische Reduktion mit *Aspergillus niger* ist bedeutend langsamer und liefert folgende Produkte:

1. Eine optisch inaktive Verbindung  $C_{11}H_{18}O_2$  vom Smp. 77–78°, deren IR.-Absorptionsspektrum in Chloroform identisch ist mit demjenigen des früher beschriebenen (8S,9R)- $\Delta^4$ -8-Hydroxy-9-methyl-octalons-(3) (V)<sup>1)</sup>. Es

<sup>1)</sup> 2. Mitt. Helv. **41**, 1416 (1958).

<sup>2)</sup> V. PRELOG & W. ACKLIN, Helv. **39**, 748 (1956).