

270. Reaktionen mit Mikroorganismen

12. Mitteilung¹⁾

Die Stereospezifität der Reduktion der Doppelbindung in (\pm)- Δ^4 -9-Methyl-octalindion-(3,8) mit *Curvularia falcata*

von W. Acklin, V. Prelog und B. Serdarević

Herrn Prof. TH. POSTERNAK zum 60. Geburtstag gewidmet

(2. IX. 63)

In der 1. Mitteilung dieser Reihe²⁾ wurde erwähnt, dass bei der mikrobiologischen Reduktion von (\pm)- Δ^4 -9-Methyl-octalindion-(3,8) mit wachsenden Kulturen von *Curvularia falcata* (TEHON) BOEDIJN neben zwei diastereomeren Δ^4 -8-Hydroxy-9-methyl-octal-3-onen ein gesättigtes Hydroxyketon als Nebenprodukt entsteht, dessen Konstitution und Konfiguration damals wegen Materialmangels nicht aufgeklärt werden konnte. Bei der Wiederholung der erwähnten mikrobiologischen Reaktion mit grösseren Mengen des Ausgangsmaterials erhielten wir genügend gesättigtes Hydroxyketon, um dies nachholen zu können.

Ein Vergleich der IR.-Absorptionsspektren zeigte, dass die Verbindung mit keinem der bisher beschriebenen isomeren Hydroxydekalone mit Sauerstoff-Funktionen am C-1 und C-6³⁾⁴⁾ identisch ist. Die Oxydation mit Chrom(VI)-oxid lieferte ein gesättigtes Diketon, welches durch Vergleich mit einem authentischen Präparat als (9S)-9-Methyl-*cis*-dekalindion-(1,6) (III) identifiziert wurde. Die Reduktion des Carbonyls im gesättigten Hydroxyketon nach WOLFF-KISHNER führte zu einem Methyldekalol, das durch Oxydation mit Chrom(VI)-oxid das linksdrehende (10S)-10-Methyl-*cis*-dekalon-(2) (V) ergab. Die Konstitution und Konfiguration des letzteren folgt aus der Identität seines IR.-Absorptionsspektrums mit demjenigen des bekannten, enantiomeren, rechtsdrehenden (10R)-10-Methyl-*cis*-dekalons-(2)³⁾⁴⁾.

Es sitzt demnach die Hydroxyl-Gruppe in dem als Zwischenprodukt erhaltenen (10S)-10-Methyl-*cis*-dekalol am C-2, und im gesättigten Hydroxyketon am C-6. Es handelt sich offenbar um Verbindungen mit (2S)- bzw. (6S)-Konfiguration, da das IR.-Absorptionsspektrum des (10S)-10-Methyl-*cis*-dekalols-(2) (IV) verschieden ist von demjenigen der diastereomeren Verbindung mit *trans*-Stellung des Hydroxyls am C-2 und des Methyls am C-10, welches früher von D. ZÄCH³⁾ erhalten worden ist.

Für das gesättigte Hydroxyketon folgt aus allen diesen Tatsachen eindeutig die Konstitution eines (6S,9S)-6-Hydroxy-*cis*-dekalons-(1) (II). In Übereinstimmung damit ist es verschieden von den drei bekannten isomeren *cis*-Dekalin-Derivaten³⁾⁴⁾: (6S,9R)-6-Hydroxy-9-methyl-*cis*-dekalon-(1) sowie (1S,9S)- und (1S,9R)-1-Hydroxy-9-methyl-*cis*-dekalon-(6).

¹⁾ 11. Mitteilung: V. PRELOG & H. E. SMITH, *Helv.* **42**, 2624 (1959).

²⁾ V. PRELOG & W. ACKLIN, *Helv.* **39**, 748 (1956).

³⁾ D. ZÄCH, Diss. ETH, Zürich, Prom. Nr. 2911 (1959).

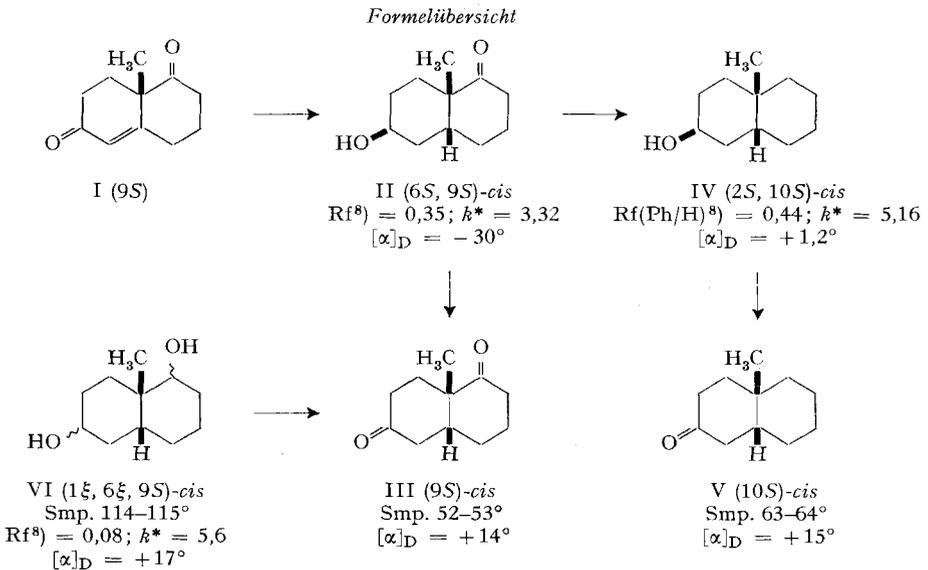
⁴⁾ W. ACKLIN, V. PRELOG & D. ZÄCH, *Helv.* **41**, 1428 (1958).

⁵⁾ V. PRELOG & D. ZÄCH, *Helv.* **42**, 1862 (1959).

Neben dem gesättigten Hydroxyketon II wurden bei der Wiederholung der mikrobiologischen Reduktion des (\pm)- Δ^4 -9-Methyl-octalindions-(3, 8) mit *Curvularia falcata* aus dem Reaktionsgemisch in kleinen Mengen zwei neue gesättigte Diole Smp. 114–115° und 154–156° isoliert und durch ihre IR.-Absorptionsspektren und spezifischen Drehungen charakterisiert. Das Diol mit dem niedrigeren Smp. lieferte bei der Oxydation mit Chrom(VI)-oxid das (9S)-*cis*-Dekalindion-(1,6) (III). Es handelt sich demnach um eine Verbindung, welche vom gleichen (9S)- Δ^4 -9-Methyl-octalindion-(3,8) (I) stammt wie das Hydroxyketon II. Das zweite isolierte Dekalindiol konnte wegen Materialmangels nicht näher untersucht werden.

Die Doppelbindung im (9S)- Δ^4 -9-Methyl-octalindion-(3,8) wird ebenso wie die Carbonyl-Gruppe am C-8 von *Curvularia falcata* rascher reduziert als diejenige in dem Enantiomeren.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass die Doppelbindung in α,β -ungesättigten Ketonen der Steroid-Reihe in einer analogen Lage wie diejenige im (9S)- Δ^4 -9-Methyl-octalindion-(3,8) durch Mikroorganismen relativ selten reduziert wird. Es entstehen dabei gesättigte Verbindungen sowohl mit *cis*-⁶⁾ als auch mit *trans*-Verknüpfung⁷⁾ der Ringe A und B.



⁶⁾ L. MAMOLI, R. KOCH & H. TESCHEN, *Z. physiol. Chem.* 261, 287 (1939); D. PERLMAN, E. TITUS & J. FRIED, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 2126 (1952); M. SHIRASAKA & M. TSURUTA, *Arch. Biochem. Biophys.* 85, 277 (1959); K. SCHUBERT, J. SCHLEGEL & C. HÖRHOOLD, *Z. Naturforsch.* 17b, 84 (1962), 18b, 284 (1963).

⁷⁾ E. VISCHER & A. WETTSTEIN, *Experientia* 16, 355 (1960).

⁸⁾ Wo nicht anders angegeben, wurden die Rf-Werte im System Propylenglykol/Toluol erhalten. Ph/H bedeutet System Phenylcellosolve/Heptan [R. B. BURTON, A. ZAFFARONI & E. H. KEUTMANN, *J. biol. Chemistry* 188, 763 (1951)]. Die $[\alpha]_D$ -Werte gelten für benzolische Lösung mit Ausnahme des Wertes für Verbindung VI, welcher in Feinsprit gemessen wurde. Die relativen Oxydationsgeschwindigkeiten mit Chrom(VI)-oxid k^* sind auf k^* Cholestanol-(3 β) = 1 bezogen.

Aus zellfreien Extrakten von *Curvularia falcata* lässt sich durch Fällung mit Ammoniumsulfat ein rohes, von anderen Keton-Reduktasen aus diesem Mikroorganismus verschiedenes Enzym abtrennen, welches für die Reduktion der Doppelbindung verantwortlich ist. Eine eingehendere Untersuchung dieser in unserem Laboratorium von Dr. A. PRIETO gefundenen Oxydoreduktase ist vorgesehen.

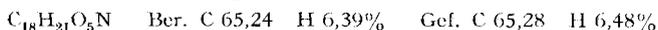
Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil⁹⁾

1. Die mikrobiologische Reduktion von 20 g (\pm)-*A*⁴-9-Methyl-octalindion-(3,8) mit einer wachsenden Kultur von *Curvularia falcata* und die Auftrennung des Rohextraktes durch wiederholte Chromatographie an Aluminiumoxid und Cellulosepulver sowie anschließende Kristallisation oder Destillation erfolgte auf die übliche Weise (vgl. 1.–11. Mitt. dieser Reihe). Von den im Rohextrakt papierchromatographisch nachgewiesenen 6 Produkten mit den Rf(BUSH-C)-Werten 0,89, 0,77, 0,58, 0,54, 0,44 und 0,38 konnten die folgenden Mengen an einheitlichem Material gewonnen werden:

- a) 413 mg partiell racemisches Edukt, $[\alpha]_D = -58^\circ$ (Benzol), Rf 0,89.
- b) 1,441 g gesättigtes Hydroxyketon II, Rf 0,77.
- c) 3,700 g öliges (+)-(8S, 9S)-*A*⁴-8-Hydroxy-9-methyl-octalon-(3), welches nach Reinigung über das *p*-Nitrobenzoyl-Derivat die früher mitgeteilten Daten aufwies²⁾, Rf 0,58.
- d) 4,955 g kristallines (-)-(8S, 9R)-*A*⁴-8-Hydroxy-9-methyl-octalon-(3) mit den früher mitgeteilten Daten²⁾, Rf 0,54.
- e) 260 mg des neuen kristallinen Dekalindiols VI Smp. 114–115°, Rf 0,44.
- f) 10 mg eines neuen kristallinen Dekalindiols Smp. 154–156°, Rf 0,38.

2. Die neuen Verbindungen. – 2.1. (-)-(6S, 9S)-6-Hydroxy-9-methyl-cis-dekalon-(I) (II). Die 1,441 g der öligen Verbindung Rf(BUSH C) = 0,77 wurden in das *p*-Nitrobenzoyl-Derivat übergeführt, das nach viermaliger Umkristallisation aus Äther-Petroläther 2,310 g gelbliches kristallines Produkt gab. Smp. 106–107°; $[\alpha]_D = -24^\circ$ ($c = 1,21$, Benzol).



1,0 g davon wurde mit 1N methanolischer Kalilauge verseift. Das dabei entstandene gelbe ölige Produkt (0,542 g) chromatographierte man in Petroläther-Benzol (2:1) an Aluminiumoxid (Akt. III, neutral), wobei mit 1250 ml Petroläther-Benzol(2:1) 0,501 g farbloses Öl mit $[\alpha]_D = -30^\circ$ ($c = 1,02$, Benzol), Rf (P/T) = 0,35 eluiert wurde. IR.-Absorptionsspektrum⁹⁾, R. D. ($c = 0,104$, CHCl₃): negativer COTTON-Effekt. $[M]_{318} = -960^\circ$ und $[M]_{275} = +1140^\circ$; $k^* = 3,32$.

2.11. Acetyl-Derivat des Hydroxyketons II. 66 mg gesättigtes Hydroxyketon II wurden mit 132 mg Acetanhydrid und 100 mg Pyridin einige Zeit geschüttelt und dann mit der dreifachen Menge Eis versetzt, worauf sofort ein weisser Niederschlag ausfiel. Dieser wurde abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen, bis der Geruch von Pyridin verschwunden war. Nach einer Umkristallisation aus Äther-Petroläther wurden 85 mg Acetylderivat, Smp. 72–74°, $[\alpha]_D = -40^\circ$ ($c = 1,01$, Benzol) erhalten. R. D. ($c = 0,105$, CHCl₃): negativer COTTON-Effekt $[M]_{320} = -1800^\circ$.

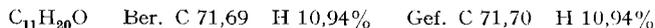
⁹⁾ Alle Smp. sind korrigiert. Die IR.-Absorptionsspektren wurden mit einem PERKIN-ELMER Double-Beam Spectrophotometer, Modell 21 aufgenommen und sind in der Promotionsarbeit B. SERDAREVIĆ [ETH, Zürich, Prom. Nr. 3145, (1961)] wiedergegeben. Die $[\alpha]_D$ -Werte wurden im 1-dm-Rohr bestimmt. Die Aufnahme der Rotationsdispersionskurven, welche wir Herrn Dr. Th. BÜRER verdanken, erfolgte mit der Apparatur nach Th. BÜRER, M. KOHLER & Hs. H. GÜNTARD, Helv. 41, 2216 (1958). Für die Aluminiumoxid-Chromatogramme wurde «Aluminiumoxid WOELM, alkalifrei (annähernd neutral)» verwendet. Die relativen Oxydationsgeschwindigkeitskonstanten k^* verdanken wir Herrn Dr. J. SCHREIBER [vgl. J. SCHREIBER & A. ESCHENMOSER, Helv. 38, 1529 (1955)]. Für die Papierchromatographie wurden die Systeme nach I. E. BUSH [Biochem. J. 50, 370 (1952)] und A. ZAFFARONI⁸⁾ verwendet. Die Sichtbarmachung der Flecke erfolgte durch Photokopie im UV. und durch Sprühen mit einer 7-proz. methanolischen Phosphormolybdänsäure-Lösung und Erhitzen auf 90°.

2.12. (+)-(9S)-9-Methyl-cis-dekalindion-(1,6) (III). 100 mg Hydroxyketon II wurden mit Chrom(VI)-oxid in Aceton oxydiert. Nach üblichem Aufarbeiten verblieben 97 mg öliges Produkt, welches nach Chromatographie an 6 g Aluminiumoxid (Akt. IV, neutral) kristallisierte. Nach Sublimation bei 45°/0,02 Torr Smp. 52 bis 54° und $[\alpha]_D = +14^\circ$ ($c = 0,98$, Benzol). IR.-Absorptionsspektrum identisch mit dem von authentischem 9-Methyl-cis-dekalindion-(1,6)³⁾ 4). R. D. ($c = 0,1073$, CHCl_3): negativer Corron-Effekt. $[\text{M}]_{316} = -2000^\circ$ und $[\text{M}]_{275} = +2650^\circ$.

2.13. (+)-(2S, 10S)-10-Methyl-cis-dekalol-(2) (IV). 70 mg Hydroxyketon II wurden mit 135 mg Hydrazinhydrat und 66 mg Kaliumhydroxid in 1,5 ml Diäthylenglykol 1 Std. unter zeitweiligem Umschütteln auf 110° unter Rückfluss erhitzt. Man erhöhte darauf die Temperatur im Laufe von 3 Std. auf 210°, wobei die leichtflüchtigen Anteile abdestilliert wurden. Nun kühlte man rasch ab und neutralisierte Destillat und Rückstand nach Zugabe von 30 ml Wasser mit ca. 6 ml 2N Salzsäure. Extraktion mit Pentan, Waschen der Auszüge mit 0,1N Salzsäure, Kaliumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser, Trocknen mit Natriumsulfat und Chromatographieren des Rückstandes an Aluminiumoxid (Akt. III) ergab 65 mg Öl $[\alpha]_D = +1,2^\circ$ ($c = 0,96$, Benzol), Rf (Ph/H) = 0,44, IR.-Absorptionsspektrum⁹⁾.

2.14. (+)-(10S)-10-Methyl-cis-dekalon-(2) (V). 35 mg (10S)-10-Methyl-cis-dekalol-(2) (IV) wurden mit Chrom(VI)-oxid in Aceton oxydiert und das Reaktionsgemisch wie üblich aufgearbeitet. Man erhielt 32 mg (10S)-10-Methyl-cis-dekalon-(2) (V); nach Sublimation bei 40°/0,02 Torr Smp. 63–64° und $[\alpha]_D = +15^\circ$ ($c = 1,05$, Benzol). IR.-Absorptionsspektrum in KBr°), identisch mit demjenigen von authentischem (-)-(10R)-10-Methyl-cis-dekalon-(2)³⁾ 4). R. D. ($c = 0,0926$, CHCl_3): negativer Corron-Effekt. $[\text{M}]_{313} = -540^\circ$ und $[\text{M}]_{268} = +982^\circ$.

2.2. (+)-(1ξ, 6ξ, 9S)-9-Methyl-cis-dekalindiol-(1,6) (VI). Die Verbindung mit Rf(Bush C) = 0,44 wurde dreimal aus Benzol-Äther umkristallisiert und im Hochvakuum sublimiert. Smp. 114–115°, $[\alpha]_D = +17^\circ$ ($c = 0,92$, Feinsprit), Rf (P/T) = 0,08. $k^* \approx 5,6$. IR.-Absorptionsspektrum⁹⁾.



2.21. (+)-(9S)-9-Methyl-cis-dekalindion-(1,6) (III). 70 mg Dihydroxydekalin VI wurden mit Chrom(VI)-oxid in Aceton oxydiert und wie üblich aufgearbeitet. Die 62 mg kristallines Rohprodukt ergaben nach zweimaligem Umlösen aus Äther-Petroläther und Sublimation im Hochvakuum 53 mg reines Diketon III, Smp. 52–53° und $[\alpha]_D = +14^\circ$ ($c = 1,05$, Benzol). IR.-Absorptionsspektrum in KBr identisch mit demjenigen von authentischem 9-Methyl-cis-dekalindion-(1,6)³⁾ 4), vgl. 2.12.

2.3. Die Verbindung mit Rf(Bush C) = 0,38 kristallisiert aus Aceton-Benzol, Smp. 154–156°, $[\alpha]_D = +26^\circ$ ($c = 1,08$, Feinsprit), Rf (P/T) = 0,07. Dem IR.-Absorptionsspektrum⁹⁾ zufolge dürfte es sich um ein Dekalindiol handeln. Die kleine zur Verfügung stehende Menge erlaubte keine weitere Untersuchung.

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

SUMMARY

The constitution and configuration II has been determined for a saturated hydroxy ketone obtained earlier²⁾ as a byproduct of the reduction of (\pm)- Δ^4 -9-methyl-octalin-3,8-dione by the microorganism *Curvularia falcata*.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich