

- [3] R. W. GRIFFIN, JR., Chem. Rev. 63, 45 (1963).
- [4] W. HÜCKEL, «Reduktion von Kohlenwasserstoffen durch Metalle in flüssigem Ammoniak» in Fortschr. chem. Forsch. 6 (2), 197–250 (1966).
- [5] A. J. BIRCH, J. chem. Soc. 1944, 435.
- [6] K. BURRI & W. JENNY, Helv. 50, 1978 (1967).
- [7] T. SATO, S. AKABORI, M. KAINOSH & K. HATA, Bull. chem. Soc. Japan 39, 856 (1966).
- [8] F. H. HERBSTEIN, J. chem. Soc. 1959, 2292.
- [9] B. A. SHOULDER, R. M. GIPSON, R. J. JANDACEK, S. H. SIMONSEN & W. SHIVE, J. Amer. chem. Soc. 90, 2992 (1968); L. J. DURHAM & J. STUDEBAKER, Chem. Commun. 1965, 456.

## 164. Mikrobiologische Umwandlung von bicyclischen Monoterpenen durch *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM.

### 1. Teil: Reduktion von Campherchinon und Isofenchonchinon<sup>1)</sup>

17. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen [1]

von B. Pfrunder und Ch. Tamm

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

(26. VI. 69)

**Summary.** (–)-Camphorquinone (**1a**) was transformed to a mixture consisting of 3-endo-hydroxy-camphor (**2a**) (40%), 3-exo-hydroxy-camphor (**3a**) (30%) and 2-endo-hydroxy-epi-camphor (**4a**) (30%) by an aqueous suspension of the mycelium of *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM. The composition of the reduction products was determined by the NMR. spectra. Incubation of the enantiomeric (+)-camphorquinone (**1b**) under the same condition yielded 3-exo-hydroxy-camphor (**3b**) as single product. Since both substrates form their products immediately and in the same ratio the possibility of a posterior isomerization of **3a** yielding the ketols **2a** and **4a** can be ruled out. For comparison the course of the chemical reduction of camphorquinone (**1**) to the ketols (Zn in acetic acid, hydrogenation with RANEY-Ni as catalyst, NaBH<sub>4</sub>) was investigated. Camphor was not transformed by *Absidia orchidis*. (–)-Isofenchonequinone (**6a**) yielded upon incubation with an aqueous suspension of the mycelium of *Absidia orchidis* exclusively 2-endo-hydroxy-epi-isofenchone (**7a**). The enantiomer diketone **6b** gave the same result, i.e. the ketol **7b** as the only transformation product. Also with isofenchonequinone the chemical reduction to the ketols by Zn in acetic acid, hydrogenation with RANEY-Ni as catalyst and NaBH<sub>4</sub> was studied.

**1. Einleitung.** – Die Umwandlung von Steroiden mit Hilfe von Mikroorganismen ist in den vergangenen Jahren eingehend untersucht worden [2]. Einige dieser Reaktionen haben sogar technische Bedeutung erlangt. Demgegenüber finden sich in der Literatur nur sehr wenige Berichte über das Verhalten von Vertretern der anderen Klassen von isoprenoiden Verbindungen gegenüber mikrobiellen Enzymsystemen. In der Monoterpenreihe stammt die erste derartige Untersuchung von NEUBERG [3]. Er inkubierte (+)-Campherchinon mit Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und isolierte ein Gemisch von  $\alpha$ -Ketolen, das er aber nicht weiter analysierte. 10 Jahre später berichtete eine indische Arbeitsgruppe [4] über die Umwandlung von  $\alpha$ -Pinen durch *Aspergillus niger*. Es bildeten sich *cis*-Verbenol als Hauptprodukt, sowie Verbenon

<sup>1)</sup> Über einen Teil dieser Ergebnisse wurde am 151st National Meeting der American Chemical Society, Pittsburgh, Pa., USA, 22.–31. März 1966, im Rahmen des «Symposium on Novel Microbiological Transformations of Medicinal Interest» vorgetragen.

und *trans*-Sobrerol als Nebenprodukte. Es hat somit vorwiegend Hydroxylierung in Allylstellung, Dehydrierung der eingeführten HO-Gruppe und Umlagerung des C-Gerüsts stattgefunden. Die von CHAPMAN *et al.* [5] beobachtete Bildung von 1,2- und 2,3-Fencholid nach Inkubation von (+)-Fenchon mit einer *Corynebacterium*-Species dürfte auf eine BAAYER-VILLIGER-Oxydation zurückzuführen sein. Schliesslich untersuchten GUNSAKUS *et al.* [6] die enzymatische Umwandlung von (+)-Campher mit Hilfe von verschiedenen Bakterienstämmen. Neben Hydroxylierungen traten Spaltungen von C-C-Bindungen und Abbau des Ringsystems ein. Die amerikanischen Autoren haben auch begonnen, die Enzyme anzureichern und zu isolieren [7].

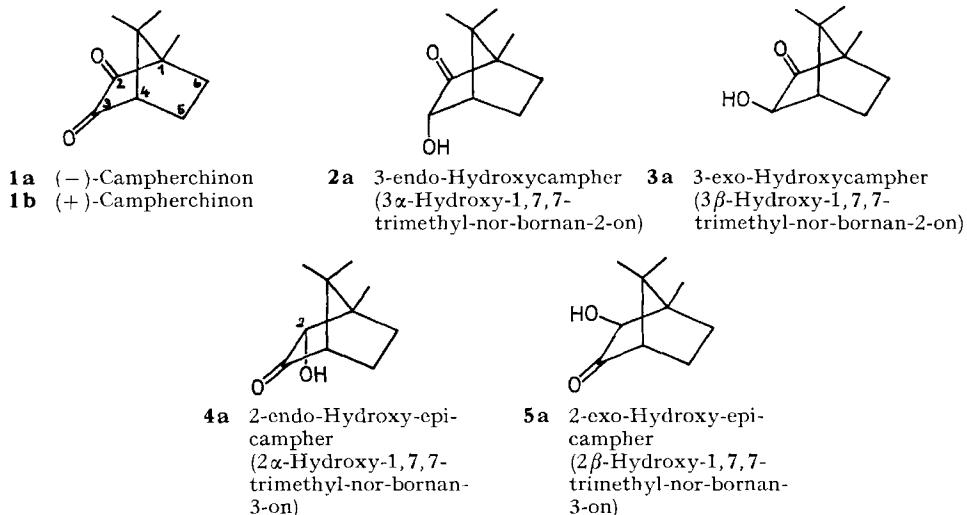
Im folgenden berichten wir über die mikrobiologische Umwandlung von einigen strukturell nahe verwandten bicyclischen Monoterpenen durch *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM. *A. orchidis* wurde aus drei Gründen ausgewählt. Einmal ist das Verhalten der biogenetisch eng verwandten Steroide gegenüber den Enzymen dieses Organismus eingehend untersucht worden [8]. Es war deshalb erwünscht, ihre Substratspezifität näher abzuklären. Andererseits ist es möglich, bereits mit Hilfe von wässrigen MycelSuspensionen von *A. orchidis* rasche und gut reproduzierbare Umsetzungen zu erzielen, was die experimentelle Technik vereinfacht. Schliesslich hatten Vorversuche mit zahlreichen anderen Mikroorganismen wesentlich schlechtere Umwandlungen ergeben. Als Substrate wählten wir zunächst die  $\alpha$ -Diketone Campherchinon und das isomere Isofenchonchinon, wobei jeweils beide Enantiomeren berücksichtigt wurden. Von beiden Verbindungen ist die absolute Konfiguration bekannt [9]. Bei der Inkubation trat im wesentlichen selektive und stereospezifische Reduktion der 1,2-Diketo-Gruppierung zum  $\alpha$ -Ketol ein. Es schien uns deshalb interessant, das Verhalten der beiden Diketone gegenüber verschiedenen chemischen Reduktionsmitteln zu untersuchen und mit der mikrobiellen Reduktion zu vergleichen.

Alle mikrobiologischen Versuche führten wir, in Anlehnung an die Methodik von NOZAKI<sup>2)</sup>, mit wässrigen MycelSuspensionen von *A. orchidis* in Schüttelkulturen unter aeroben Bedingungen bei 25–28° durch, wobei eine Aktivierung der Enzyme durch geeignete Vorinkubation mit dem jeweiligen Substrat vorgenommen wurde.

**2. Campherchinon.** – 2.1. *Mikrobiologische Reduktion von (–)- und (+)-Campherchinon.* (–)-Campherchinon (**1a**), das durch  $\text{SeO}_2$ -Oxydation des natürlichen (+)-Camphers leicht erhältlich ist [10], ergab nach 7 Std. Inkubation bei 28° ein kristallines Rohprodukt vom Smp. 197–206°. In den Dünnschichtchromatogrammen war auch in verschiedenen Fliessmitteln nur ein einziger Fleck sichtbar, der langsamer als das Edukt lief. Die Analysenwerte stimmten auf die Formel  $C_{10}H_{16}O_2$ . Im IR-Spektrum in  $\text{CCl}_4$  waren Hydroxylbanden bei  $3600\text{ cm}^{-1}$  und  $3480\text{ cm}^{-1}$  sichtbar. Eine Carbonyl-streckschwingung absorbierte bei  $1745\text{ cm}^{-1}$ . Diese Daten liessen das Vorliegen eines  $\alpha$ -Ketols vermuten. Damit übereinstimmend liess sich das Reaktionsprodukt mit  $\text{CrO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$  in Aceton [11] zu Campherchinon (**1a**) zurückoxydieren. Die NMR-Spektren des Alkohols und seines Acetyl-derivates zeigten aber, dass das Kristallisat aus drei der vier theoretisch möglichen isomeren  $\alpha$ -Ketolen zusammengesetzt ist. Eine präparative Trennung der freien Ketole oder des Acetylierungsgemisches konnte weder durch Gas-Chromatographie noch durch Chromatographie an der Kieselgelsäule

<sup>2)</sup> Wir danken Herrn Dr. Y. NOZAKI, SHIONOGI & Co., LTD., Osaka, Japan, für die Überlassung einer Kultur von *Absidia orchidis* und die Angaben über experimentelle Einzelheiten.

erzielt werden. Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der mikrobiellen Umwandlungsprodukte liess sich jedoch aus den NMR.-Spektren ableiten.



In  $\text{CDCl}_3$  erschienen bei 4,22 ppm ein Dublett ( $J = 5,4$  Hz), das dem 3-exo-Proton in **2a** zuzuordnen ist, ferner ein Singulett bei 3,75 ppm, das vom 3-endo-Proton von **3a** herrührt und ein weiteres Singulett bei 3,87 ppm, für welches das 2-exo-Proton von **4a** verantwortlich ist. Diese Zuordnungen werden weiter unten begründet. Die mikrobiologische Reduktion von (-)-Camphorquinon (**1a**) hat somit die drei Ketole **2a**, **3a** und **4a** ergeben, und zwar – auf Grund der Integration der Signale – im Verhältnis von 4:3:3 (vgl. Tab. 1).

Tabelle 1. *Mikrobiologische und chemische Reduktion von Camphorquinon (1)*

Edukt und Reduktionsmittel	Prozentuale Produktverteilung			
	3-endo-Hydroxy-camphor ( <b>2</b> )	3-exo-Hydroxy-camphor ( <b>3</b> )	2-endo-Hydroxy-epi-camphor ( <b>4</b> )	2-exo-Hydroxy-epi-camphor ( <b>5</b> )
1. (-)-Camphorquinon ( <b>1a</b> )				
<i>Absidia orchidis</i>	40	30	30	0
Zn-Eisessig	40	0	60	0
$\text{H}_2\text{-Ni}$ in Äthanol	0	100	0	0
$\text{NaBH}_4$ in Methanol	0	75	0	25
2. (+)-Camphorquinon ( <b>1b</b> )				
<i>Absidia orchidis</i>	0	100	0	0

Inkubation des enantiomeren (+)-Camphorquinons (**1b**)<sup>3</sup> unter den gleichen Bedingungen lieferte ein Produkt vom Smp. 208–210°:  $[\alpha]_D^{23} = -117^\circ \pm 3^\circ$  (Benzol), das

<sup>3)</sup> Herrn Dr. R. PRAIRIE, University of Illinois, Urbana, Ill. USA., danken wir für die Überlassung eines Präparates von (+)-Camphorquinon und der beiden enantiomeren 1,7,7-Trimethyl-nor-bornan-2,5-dione.

sich überraschenderweise als einheitlich erwies. Im IR.-Spektrum waren HO-Schwingungen bei  $3575\text{ cm}^{-1}$  (scharf) und  $3430\text{ cm}^{-1}$  (breit) sichtbar. Das Absorptionsmaximum der Carbonylgruppe lag bei  $1753\text{ cm}^{-1}$ . Das NMR.-Spektrum in  $\text{CDCl}_3$  zeigte ein Singulett bei  $3,75\text{ ppm}$ , das dem Methinproton an C-3 des 3-exo-Hydroxy-camphers (**3b**) entspricht. Der Betrag der optischen Drehung stimmt gut mit dem von 3-exo-Hydroxy-campher (**3a**) überein, der durch katalytische Hydrierung von Campherchinon (**1a**) erhalten wird [12] und für den wir  $[\alpha]_D^{23} = +118^\circ \pm 3^\circ$  (Benzol) fanden. Das unterschiedliche Verhalten der beiden optischen Antipoden bei der mikrobiellen Reduktion könnte darauf beruhen, dass die Umsetzung von Campherchinon in zwei Schritten erfolgt, nämlich zuerst Reduktion zum Ketol **3**, dann Isomerisierung von **3** zu den Ketolen **2** und **4**<sup>4)</sup>. Die Bildung von **3a** würde rascher als diejenige des Enantiomeren **3b** erfolgen. Um dies abzuklären, verglichen wir die Bildungsgeschwindigkeiten der  $\alpha$ -Ketole aus (+)- bzw. (-)-Campherchinon und das Produkteverhältnis in verschiedenen Zeitpunkten, indem in Parallelversuchen nach einer Inkubationszeit von 1, 3 und 7 Std. eine möglichst genaue Produktanalyse vorgenommen wurde. Sie zeigte eindeutig, dass sich bei der Reduktion von (+)-Campherchinon (**1b**) sehr rasch und ausschliesslich Ketol **3b** bildet, indem das Reaktionsgemisch nach 1 Std. ca. 28%, nach 3 Std. bereits 91% und nach 7 Std. 100% Produkt enthielt. Beim (-)-Campherchinon (**1a**) hingegen waren sofort und in gleichem Mengenverhältnis alle drei isomeren Ketole **2a**, **3a** und **4a** nachweisbar, wobei nach 1 Std. 20%, nach 3 Std. 80% und nach 7 Std. 100% des Substrats reduziert war. (+)-Campherchinon (**1b**) wird etwas rascher und selektiver als sein optischer Antipode reduziert.

Um abzuklären, ob die Unterschiede in der Reduktion der beiden Enantiomeren auf die Wirkung von verschiedenen Enzymsystemen zurückzuführen sind, haben wir vor der eigentlichen Umsetzung das reduzierende Enzymsystem von *A. orchidis* durch Vorinkubation mit den jeweiligen enantiomeren Diketonen aktiviert. Dabei wurde keine Änderung im Reduktionsverlauf festgestellt. Man kann deshalb annehmen, dass für die Reduktion der beiden enantiomeren Campherchinone dasselbe Enzym verantwortlich ist, an das sich die (+)-Form **1b** so fixieren kann, dass selektive und stereospezifische Reaktion eintritt, während dies beim enantiomeren Substrat offenbar nicht der Fall ist<sup>5)</sup>.

**2.2. Chemische Reduktion von (-)-Campherchinon (**1a**).** Nachdem bei der mikrobiologischen Reduktion von (-)-Campherchinon nur drei  $\alpha$ -Ketole entstanden waren, war es unerlässlich, alle vier theoretisch möglichen  $\alpha$ -Ketole auf einem unabhängigen Wege herzustellen, um so in den NMR.-Spektren die Signale der Methinprotonen eindeutig zuordnen zu können. Ausserdem schien es uns, wie eingangs erwähnt, interessant, die mikrobielle Reduktion mit der chemischen und zwar unter Bedingungen, d.h. mit verschiedenen Typen von Reduktionsmitteln zu vergleichen. Die Ergebnisse sind in Tab. I zusammengestellt. RASSAT & COULOMBEAU [13] hatten bereits die endo-

<sup>4)</sup> Es ist bekannt, dass sich die endo-Ketole **2** und **4** in Gegenwart von Base leichter als die Ketole mit exo-ständiger HO-Gruppe isomerisieren. In einer Lösung von 6-proz. KOH in Methanol sind bei  $22^\circ$  nach 24 Std. 67% endo-Ketole **2** und **4** enthalten. Unter analogen Bedingungen verändert sich das exo-Ketol **3** nicht [13].

<sup>5)</sup> Im Anschluss an die Versuche mit Campherchinon (**1**) inkubierten wir auch die beiden Enantiomeren des  $\gamma$ -Diketons 1,7,7-Trimethyl-nor-bornan-2,5-dion<sup>3)</sup> mit MycelSuspensionen von *A. orchidis*. Selbst nach 24 Std. war keinerlei Umsetzung zu beobachten.

Ketole näher untersucht. Hingegen fanden wir in der Literatur keine näheren Angaben über die exo-Ketole. In diesem Zusammenhang interessierte uns auch die Geschwindigkeit der Isomerisierung der exo-Ketole zu den thermodynamisch viel stabileren endo-Ketolen.

Bei der metallischen Reduktion (Zn in Eisessig) von Campherchinon (**1**) erhielten wir, wie RASSAT & COULOMBEAU [13], die endo-Ketole **4** und **2** im Verhältnis 3:2. Im NMR.-Spektrum des Gemisches in  $\text{CDCl}_3$  erschienen die folgenden zwei charakteristischen Signale für die Methinprotonen:

1. Ein Dublett bei 4,22 ppm ( $J = 5,4$  Hz) des exo-ständigen C-3-Protons, das durch das C-4-Proton aufgespalten wird. Der Torsionswinkel zwischen den H-Atomen an C-3 und C-4 beträgt nach KARPLUS [14] ca.  $40^\circ$ . Eine theoretisch mögliche weitreichende Kopplung über  $4\sigma$ -Bindungen mit W-Konformation [14] zwischen den Protonen an C-3 und C-5 war nicht zu beobachten.

2. Ein verbreitertes Singulett bei 3,87 ppm ( $J \simeq 0,8$  Hz) des exo-ständigen Protons an C-2. Es sind zwei weitreichende Kopplungen möglich, nämlich mit den Protonen an C-2 und C-6. Die Kopplungen dürften rund ein Hz betragen, was die Verbreiterung des Signales erklärt.

Aus der Integration der Signale bei 4,22 ppm und 3,87 ppm ergab sich die prozentuale Verteilung der beiden Isomeren.

Bei der katalytischen Hydrierung von (–)-Campherchinon mit RANEY-Ni in Äthanol erhielten wir ausschliesslich 3-exo-Hydroxy-campher (**3**). Er wurde durch das Acetyl-Derivat charakterisiert und seine Konstitution durch optische Rotationsdispersion und Circulardichroismus gesichert<sup>6)</sup>. Die Weiterreduktion zum Diol konnte durch Verwendung von nur schwach aktivem RANEY-Ni verhindert werden. Das NMR.-Spektrum von **3** in  $\text{CDCl}_3$  zeigte nur ein einziges Signal eines Methinprotons bei 3,75 ppm.

Bei der Reduktion von Campherchinon (**1**) mit  $\text{NaBH}_4$  in Methanol bei  $-65^\circ$  entstanden neben wenig endo-*cis*-Diol (5%), dessen Konfiguration auf Grund der von ANET [15] veröffentlichten Spektren für 2,3-Bornandiole bestimmt wurde, ausschliesslich die exo-Ketole **3** und **5**. Im NMR.-Spektrum in Deuterochloroform erschienen die Signale der Methinprotonen bei 3,75 und 3,55 ppm. Das Singulett bei 3,75 ppm ist dem endo-ständigen C-3-Proton zuzuordnen. Die Kopplung mit dem C-4-Proton ist nur sehr schwach, da der Torsionswinkel zwischen den Protonen an C-3 und C-4  $79^\circ$  beträgt [15], was einer Kopplungskonstante von 0,5 Hz entsprechen würde [14]. Das Singulett bei 3,55 ppm entspricht dem endo-ständigen Methinproton an C-2, das mit keinem anderen Proton koppeln kann.

Aus der Integration der Signale bei 3,75 ppm und 3,55 ppm folgt, dass das Reduktionsgemisch aus 75% 3-exo-Hydroxy-campher (**3**) und 25% 2-exo-Hydroxy-*epi*-campher (**5**) besteht. Behandlung dieses Isomerengemisches mit 6-proz. KOH in Methanol bei  $22^\circ$  ergab nach 48 Std. ein Gemisch, das aus 39% endo-Ketol **2**, 9% endo-Ketol **4**, 48% exo-Ketol **3** und 4% exo-Ketol **5** bestand. Nach 48 Std. ist das Gemisch der beiden exo-Isomeren erst etwa zur Hälfte in die endo-Isomeren übergegangen, ob-

<sup>6)</sup> Wir danken Herrn Prof. A. RASSAT, CENTRE DES ÉTUDES NUCLÉAIRES, Grenoble, bestens für die Aufnahme und Interpretation der ORD.- und CD.-Kurven.

wohl das thermodynamische Gleichgewicht ganz auf der Seite der endo-Isomeren liegt [13].

3-exo-Hydroxy-campher (**3**) liess sich unter analogen Bedingungen nicht isomeren. Aus diesen Versuchen folgt, dass die exo-Ketole **5** und **7** thermodynamisch stabiler sind als die endo-Ketole **2** und **4**.

Was die Signale der Methinprotonen in den NMR.-Spektren der vier isomeren Ketole betrifft, so lassen sich jetzt für Messungen in  $\text{CDCl}_3$  eindeutig die folgenden Zuordnungen treffen<sup>7)</sup>:

3-exo-H in <b>2</b>	3-endo-H in <b>3</b>	2-exo-H in <b>4</b>	2-endo-H in <b>5</b>
4,22 ppm <i>d</i> (5,4)	3,75 s	3,87 s <sup>8)</sup>	3,55 s

Überblickt man die Ergebnisse der Reduktionsversuche, so wird deutlich, dass die sterisch weniger gehinderte 3-Oxo-Gruppe bevorzugt reduziert wird, wobei – mit Ausnahme der metallischen Reduktion – hauptsächlich eine exo-ständige HO-Gruppe entsteht, d. h. der Angriff des Reduktionsmittels erfolgt lediglich von der offeneren endo-Seite her. Am selektivsten verläuft die katalytische Hydrierung. Eine 2-endo-HO-Gruppe wird lediglich durch die Reduktion mit Zn erzeugt.

**3. Isofenchonchinon.** – 3.1. *Mikrobiologische Reduktion von (–)- und (+)-Isofenchonchinon.* Nach 8-stündiger Inkubation von (–)-Isofenchonchinon (**6a**), das durch  $\text{SeO}_2$ -Oxydation von (–)-Isofenchon erhältlich ist [16], mit einer wässrigen Mycel-suspension von *A. orchidis* bei 28°, zeigte das Rohprodukt im Dünnschichtchromatogramm einen einzigen langsamer laufenden Fleck. Nach Chromatographie an Kieselgel wurde das entsprechende Umsetzungsprodukt in reinen Nadeln vom Smp. 61,5–62° und  $[\alpha]_D^{23} = 98^\circ \pm 3^\circ$  (Chloroform) erhalten. Das NMR.-Spektrum in  $\text{CDCl}_3$  zeigte bei 3,55 ppm ein Tripplett, das dem Methinproton an C-2 zuzuordnen ist. Die Aufspaltung dieses Signals kommt durch die weitreichenden Kopplungen zwischen den Protonen C-2 und C-4 und C-2 und C-6 (exo) zustande ( $J = 1,5$  Hz).

Diese Daten liessen das Vorliegen von 2-endo-Hydroxy-*epi*-isofenchon (**7a**) vermuten. Ein direkter Vergleich mit einem durch metallische Reduktion erhaltenen Präparat bestätigte die Identität.  $\text{CrO}_3$ -Oxydation lieferte Isofenchonchinon zurück. Auch die Acetylivate waren identisch.

Das unterschiedliche Verhalten der beiden enantiomeren Campherchinone bei der mikrobiologischen Reduktion veranlasste uns auch hier, das Verhalten des optischen Antipoden zu untersuchen. Nach Inkubation von (+)-Isofenchonchinon (**6b**) erhielten wir nur ein einziges Produkt, nämlich **7b**, d. h. das Enantiomere von **7a**.

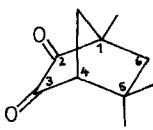
Demnach bieten die beiden enantiomeren Substrate dem Enzymsystem von *A. orchidis* gleiche Fixierungsmöglichkeiten.

3.2. *Chemische Reduktion von (–)-Isofenchonchinon.* Ebenso wie RASSAT & COULOMBEAU [13] erhielten wir bei der Reduktion von (–)-Isofenchonchinon (**6a**) mit Zn-Eisessig ein Gemisch der beiden endo-Ketole **7a** und **9a** im Verhältnis von 2:1. Ther-

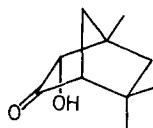
<sup>7)</sup> Es bedeuten: *s* = Singulett; *d* = Dublett; Zahl in Klammer ist die Kopplungskonstante *J* in Hz.

<sup>8)</sup> Verbreitertes Singulett mit  $J \simeq 0,8$  Hz.

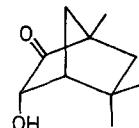
modynamisch ist **7** viel stabiler als **9**. Nach 10-stündiger Behandlung des Reaktionsgemisches mit 6-proz. methanolischer KOH liess sich reines **7** isolieren, das zur Identifi-



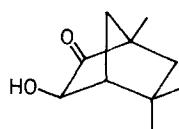
**6a**  $(-)$ -Isofenchonchinon  
**6b**  $(+)$ -Isofenchonchinon



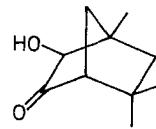
**7a** 2-endo-Hydroxy-epi-isofenchon  
( $2\alpha$ -Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-3-on)



**8a** 2-exo-Hydroxy-epi-isofenchon  
( $2\beta$ -Hydroxy-1,5,5-trimethyl-norbornan-3-on)



**9a** 3-endo-Hydroxy-isofenchon  
( $3\alpha$ -Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on)



**10** 3-exo-Hydroxy-isofenchon  
( $3\beta$ -Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on)

fizierung des mikrobiologischen Reduktionsprodukts diente. Im NMR.-Spektrum erscheint das Methinproton von C-2 des Ketols **7** als Triplet, da es zwei weitreichende Kopplungen eingeht, nämlich mit den Protonen an C-4 und C-6 ( $J = 1,5$  Hz). Das Methinproton an C-3 des Ketols **9** verursacht ein Dublett, da es durch das Proton an C-4 aufgespalten wird. Die Kopplungskonstante von 5,4 Hz entspricht gut dem am Modell gemessenen Torsionswinkel von rund 40°.

Nach Behandlung von  $(-)$ -Isofenchonchinon (**6a**) mit  $\text{NaBH}_4$  in Methanol bei  $-65^\circ$  erhielten wir ein Gemisch von 85% Ketol **7a** und 15% Ketol **8a**. In den Dünn-schichtchromatogrammen war allerdings auch mit verschiedenen Fliessmittelgemischen nur ein einziger Fleck sichtbar. Das Reaktionsgemisch war weder durch Gas-chromatographie noch durch Chromatographie an Kieselgel in die zwei Komponenten zu zerlegen. Der Nachweis von zwei isomeren Verbindungen im Reaktionsgemisch konnte aber eindeutig durch die NMR.-Spektren erbracht werden. Es waren zwei Signale von Methinprotonen sichtbar, nämlich ein Triplet bei 3,55 ppm, das dem Proton an C-2 von **7a** zugeordnet werden kann, und ein Singulett bei 3,79 ppm. Dieses Singulett wird sicher vom Proton eines Isomeren mit exo-ständiger HO-Gruppe hervorgerufen, wobei diese sowohl an C-2 wie auch an C-3 haften kann. Eine weitreichende Kopplung wäre in beiden Fällen möglich, wurde aber im 60-MHz-Spektrum nicht beobachtet. Eine sichtbare Kopplung zwischen dem endo-ständigen Proton an C-3 und dem Proton an C-4 ist kaum zu erwarten, da der Torsionswinkel zwischen diesen Protonen rund  $80^\circ$  beträgt, was einer Kopplungskonstante von weniger als 0,5 Hz entspricht. Aus räumlichen Gründen, d.h. wegen der Anwesenheit der geminalen 5-Methylgruppen ist ein Angriff des  $\text{NaBH}_4$ -Komplexes von «unten», der zu einer exo-ständigen Hydroxylgruppe führen würde, sehr unwahrscheinlich. An C-2 ist ein Angriff von unten eher möglich, da die Methylgruppe an C-1 ein viel kleineres Hindernis

darstellt. Aus diesen Gründen dürfte dem zweiten Reduktionsprodukt am ehesten die Konstitution des 2-exo-Hydroxy-*epi*-isofenchons (**8a**) zukommen.

Bei der katalytischen Hydrierung von (–)-Isofenchonchinon (**6a**) mit RANEY-Ni in Äthanol erhielten wir neben wenig Diol (weniger als 5%) drei isomere  $\alpha$ -Ketole. Das Diol konnte durch Chromatographie an Kieselgel vom Ketogemisch glatt abgetrennt werden. Die Konfiguration der beiden Hydroxylgruppen konnte wegen der geringen Menge nicht abgeklärt werden. Nach dem NMR.-Spektrum enthielt das Gemisch der Monohydroxy-Verbindungen 30% **7a** (Triplet bei 3,55 ppm), 10% **9a** (Dublett bei 4,15 ppm) und 60% **8a** (Singulett bei 3,79 ppm). Die Ergebnisse der Reduktionsversuche sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2. *Mikrobiologische und chemische Reduktion von Isofenchonchinon (6)*

Edukt und Reduktionsmittel	Prozentuale Produktverteilung			
	2-endo-Hydroxy- <i>epi</i> -isofenchon ( <b>7</b> )	2-exo-Hydroxy- <i>epi</i> -isofenchon ( <b>8</b> )	3-endo-Hydroxy-isofenchon ( <b>9</b> )	3-exo-Hydroxy-isofenchon ( <b>10</b> )
1. (–)-Isofenchonchinon ( <b>6a</b> )				
<i>A. orchidis</i>	100	0	0	0
Zn-Eisessig	65	0	35	0
H <sub>2</sub> -Ni in Äthanol	30	60	10	0
NaBH <sub>4</sub> in Methanol	85	15	0	0
2. (+)-Isofenchonchinon ( <b>6b</b> )				
<i>A. orchidis</i>	100	0	0	0

Es ist bemerkenswert, dass bei allen Reduktionsversuchen aus Isofenchonchinon nur ein einziger Alkohol mit exo-ständiger Hydroxylgruppe entstanden ist, wobei es sich höchstwahrscheinlich um das 2-exo-Hydroxy-*epi*-isofenchon (**8**) handelt. Die Bildung von 3-exo-Hydroxy-isofenchon (**10**) wurde nicht beobachtet.

Die Bildung eines exo-Alkohols setzt einen Angriff des Reduktionsmittels von der endo-Seite her voraus. Diese ist aber nur für die Reduktion der Carbonylfunktion an C-2 sterisch nicht gehindert. Ein Angriff an C-3 wird durch die geminalen Methylgruppen an C-5 stark erschwert. Demgegenüber ist die exo-Seite für einen Angriff vom Reduktionsreagens frei. Infolgedessen werden die beiden endo-Alkohole gebildet.

Wir danken dem «SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG» für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit (Projekte Nr. 2535 und 3976).

### Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert; Fehlertoleranz ca.  $\pm 2^\circ$ . Substanzproben zur Messung der spez. Drehungen und Spektren wurden 20 Min. bei 35°/15 Torr und zur Elementaranalyse 1 Std. bei 25°/0,02 Torr getrocknet. Die Elementaranalysen verdanken wir dem mikroanalytischen Laboratorium unseres Instituts (E. THOMMEN). Die IR.-Spektren wurden entweder mit einem PERKIN-ELMER-IR.-Gitterspektrometer, Modell 125, oder mit einem BECKMAN-Spektrophotometer, Modell IR8, die NMR.-Spektren mit einem VARIAN-Spektrometer, Modell A-60, im Spektrallaboratorium des Instituts (K. AEGERTER) aufgenommen. Zur Säulenchroinatographie nach DUNCAN [17] dienten Kieselgel (Korngrösse 0,05–0,20 mm). Für die Dünnschichtchromatographie (DC.) [18] wurde Kieselgel G als Adsorbens verwendet. Als Fliessmittel dienten meistens Äther-Petroläther-Gemische. Die Flecke wurden durch

Besprühen mit  $H_2SO_4$  in Äthanol und anschliessendem Erwärmen auf  $110^\circ$  oder durch  $J_2$ -Dämpfe sichtbar gemacht.

**2. Kultur der Mikroorganismen.** Proben einer Schrägagarkultur von *Absidia orchidis* (VUILL.)

HAGEM (Herkunft: Dr. Y. NOZAKI, SHIONOGI & Co., LTD., Osaka, Japan) wurden direkt als Impfmaterial für die Nährösung verwendet. Nährösung: 3,5% Glucose, 3,0% Bacto-Pepton, 0,5% Maislauge. Zum Versuch wurden 1000-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 200 ml Nährösung benutzt. Die Gefäße wurden 40 Min. im Dampftautoklaven bei  $120^\circ$  sterilisiert und dann beimpft. Die ERLENMEYER-Kolben wurden auf einer rotierenden Schüttelmaschine (170 Umdrehungen/Min.) 48 Std. bei  $27^\circ$  inkubiert. Nach Zugabe des Substrats (50–90 mg pro ERLENMEYER-Kolben) wurde während 72–120 Std. weitergeschüttelt. Bei der Umsetzung in Myceluspension wurde das Mycel zuerst mit dem umzusetzenden Substrat aktiviert (25 mg Substrat in 0,5 ml Aceton pro ERLENMEYER-Kolben). Nach weiterem Schütteln während 12 Std. wurde das Mycel durch Filtration auf einem Gazestoff gesammelt, leicht ausgepresst, mit dest. Wasser gewaschen und wiederum auf die ERLENMEYER-Kolben mit je 200 ml dest. Wasser verteilt. Zu dieser Myceluspension wurde das Substrat, gelöst in wenig Methanol oder Aceton, zugegeben.

**3. Campherchinon (1) aus Campher.** (Abgeänderte Vorschrift von EVANS *et al.* [10].) Eine Lösung von 16 g (+)-Campher und 20 g  $ScO_2$  in 16 ml Essigsäureanhydrid wurde 4 Std. unter Rückfluss gekocht. Die abgekühlte Lösung wurde abfiltriert, der Rückstand mit Eisessig nachgewaschen und das Filtrat mit KOH neutralisiert. Dabei fiel Campherchinon in kleinen, unreinen Kristallen aus, die mit Wasserdampf destilliert wurden. Beim Abkühlen des Destillates kristallisierte die Hauptmenge des Produkts in langen, gelben Nadeln aus. Der im Wasser verbleibende Rest wurde mit Methylenechlorid ausgeschüttelt, die Auszüge mit  $Na_2SO_4$  getrocknet und unter Verwendung einer VIGREUX-Kolonne eingedampft. Es resultierte 11,5 g reines krist. Campherchinon (1). Für mikrobiologische Umsetzungen wurden die Kristalle nochmals an der 200-fachen Menge Kieselgel chromatographiert. Als Elutionsmittel diente Petroläther-Äther-(3:7). Das so erhaltene Produkt kristallisierte aus Pentan in Nadeln vom Smp.  $198\text{--}199^\circ$  und erwies sich auch im Gaschromatogramm als einheitlich.  $[\alpha]_D^{23} = -122^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 1,825$  in Benzol).

Campherchinon wurde auch über den Isonitrosocampher auf zwei in der Literatur beschriebenen Wegen hergestellt [19]. Die Ausbeuten lagen aber in beiden Fällen unter 30%.

**4. Mikrobiologische Reduktion von (–)- und (+)-Campherchinon**

**4.1. Umsetzung von (–)-Campherchinon (1a) mit *A. orchidis*.** Eine Lösung von 1,5 g (–)-Campherchinon vom Smp.  $198\text{--}199^\circ$  in 15 ml Aceton wurde auf 15 1-Liter-ERLENMEYER-Kolben verteilt, in welchen das aktivierte Pilzmycel in je 200 ml Wasser suspendiert war. Die Kolben wurden 7 Std. bei  $27^\circ$  auf der rotierenden Maschine geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Mycels und Nachwaschen mit Methylenchlorid-Methanol-(9:1) wurde die wässrige Lösung viermal mit Methylenchlorid-Methanol-(9:1) extrahiert. Nach Trocknen über  $Na_2SO_4$  und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonne wurden 1,48 g Rohprodukt erhalten, das im Dünnschichtchromatogramm (Fließmittel: Äther-Petroläther-(4:1)) neben 2 schwachen, langsamer laufenden Flecken (Rf-Werte 0,3) einen starken Fleck des  $\alpha$ -Ketol-Gemisches zeigte. Das Rohprodukt wurde an 170 g Kieselgel chromatographiert. (Elutionsmittel: Äther-Petroläther-(3:1).) Nach Umkristallisation aus Pentan-Methylenechlorid-(9:1) resultierte 1,28 g Ketolgemisch **2a + 3a + 4a** vom Smp. 197 bis  $206^\circ$ .



**4.2.  $CrO_3$ -Oxydation des Ketolgemisches **2a + 3a + 4a**.** Eine Lösung von 200 mg Ketolgemisch in 30 ml Aceton wurde unter Rühren bei  $0^\circ$  bis  $+2^\circ$  innerhalb 5 Min. mit 0,9 ml einer Lösung von 3,32 g  $CrO_3$  + 2,87 g  $H_2SO_4$  in 50 ml  $H_2O$  [11] versetzt und weitergeführt. Nach Versetzen mit Eis, Extraktion mit Methylenchlorid, Waschen mit 2N  $H_2SO_4$ , 1N  $NaHCO_3$  und Wasser, und Trocknen mit  $Na_2SO_4$  wurden 174 mg gelbes Rohprodukt erhalten, das an 5 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:2) gereinigt wurde. Nach Umkristallisation aus Pentan resultierten 153 mg gelbe Kristalle vom Smp.  $198\text{--}199^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{23} = -108^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 1,021$  in Benzol). Nach Misch-Smp., IR.-Spektrum und DC. mit (–)-Campherchinon (1a) identisch.

**4.3. Acetylierung des Ketolgemisches **2a + 3a + 4a**.** 80 mg Ketolgemisch wurden mit 1,5 ml abs. Pyridin und 1,35 ml Acetanhydrid 36 Std. bei  $38^\circ$  stehengelassen, dann mit Eis versetzt, mit HCl kongosauer gestellt und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Der Extrakt wurde mit Wasser gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Es resultierten

82 mg öliges Rohprodukt, das an 5 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:2) als Lösungsmittel gereinigt wurde. Es resultierten 64 mg Öl, das sich sowohl auf Dünnschichtplatten als auch bei gas-chromatographischen Untersuchungen einheitlich verhielt. Signale im NMR.-Spektrum: 5,22 ppm Dublett; 4,9 ppm breites Singulett; 4,8 ppm scharfes Singulett; 2,2–2,0 ppm (3 CH<sub>3</sub>CO); 1,1–0,9 ppm neun Protonen (3 CH<sub>3</sub>). Das Acetat-Gemisch konnte weder gas-chromatographisch noch säulenchromatographisch aufgetrennt werden.

4.4. *Umsetzung von (+)-Campherchinon (1b) mit A. orchidis.* Eine Lösung von 600 mg (+)-Campherchinon vom Smp. 198–199° in 6 ml Aceton wurde auf 6 1-Liter-ERLENMEYER-Kolben gleichmäßig verteilt, in welchen das Pilzmycel in je 200 ml Wasser verteilt war. Hierauf wurde wie bei 4.1. beschrieben verfahren. Es resultierten 586 mg Rohprodukt, das nach Reinigen an 80 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:1) als Elutionsgemisch 540 mg 3-exo-Hydroxy-campher **3b** in farblosen Kristallen vom Smp. 208–210° ergab.  $[\alpha]_D^{25} = -117^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 6,421$  in Benzol). IR.-Spektrum in CCl<sub>4</sub>: Banden bei 3575 cm<sup>-1</sup> (OH frei), 3430 cm<sup>-1</sup> (OH assoz.) und 1755 cm<sup>-1</sup> (C=O-Streckschwingung).

4.5. *Vergleich der Bildungsgeschwindigkeit der Ketole aus (+)- bzw. (-)-Campherchinon.* Mit einer vereinigten Sporensuspension von zwei Schrägagarkulturen wurden total 8 1-Liter-ERLENMEYER-Kolben mit je 200 ml steriler Nährlösung angeimpft und 48 Std. bei 27° auf der rotierenden Schüttelmaschine belassen. Nach 12-stündiger Aktivierung mit je 25 mg **1a** bzw. **1b** wurde das Mycel gewaschen, im Turmix zerkleinert, gleichmäßig auf drei ERLENMEYER-Kolben verteilt und mit je 60 mg **1a** bzw. **1b** inkubiert. Nach 1, 3 und 7 Std. wurde, wie bei 4.1. beschrieben, aufgearbeitet, das Rohprodukt an 12 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:1) als Elutionsmittel in eine Ketol- und Campherchinon-Fraktion zerlegt und die Ketol-Fraktion mit Hilfe des NMR.-Spektrums analysiert. Resultate vgl. Theoret. Teil.

4.6. *Reduktion von (+)- und (-)-Campherchinon nach vorheriger Aktivierung des Enzymsystems von A. orchidis durch den entsprechenden optischen Antipoden.* Je 3 1-Liter-ERLENMEYER-Kolben, die Mycel von 48-stündigem Wachstum enthielten, wurden mit je 35 mg **1a** bzw. **1b** aktiviert. Nach 12 Std. wurde das Mycel 3mal mit dest. Wasser ausgewaschen und wiederum auf die ERLENMEYER-Kolben mit 200 ml dest. Wasser verteilt. Diese aktivierte Mycelsuspension wurde dann als Substrat (pro ERLENMEYER-Kolben) mit 60 mg des optischen Antipoden (**1a** bzw. **1b**) versetzt und während 7 Std. geschüttelt. Die zwei Ansätze wurden nach 4.1. aufgearbeitet und das Rohprodukt mit Hilfe des NMR.-Spektrums analysiert.

##### 5. Chemische Reduktion von (-)-Campherchinon (**1a**)

5.1. *Mit Zn in Eisessig (vgl. [9b], [19a]).* Eine Lösung von 400 mg Campherchinon vom Smp. 198–199° in 20 ml Eisessig wurde nach Zugabe von 3 ml Wasser auf 0° gekühlt und unter Rühren mit 200 mg Zn-Staub versetzt. Die anfänglich gelbe Lösung entfärbte sich im Laufe von 1,5 Std. Nach Filtrieren wurde mit KOH neutralisiert und mit Methylenchlorid extrahiert. Nach 3-maligem Waschen mit Wasser wurde mit wenig Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Der Eindampfrückstand ergab aus Pentan-Methylenchlorid-(9:1) 362 mg farblose Kristalle vom Smp. 195–197°. Im Dünnschichtchromatogramm (Fließmittel: Äther-Petroläther-(4:1) und Methylenchlorid-Methanol-(98:2)) war das Produkt einheitlich. Auch gas-chromatographisch liess sich keine Trennung erzielen trotz Verwendung von verschiedenen Säulen (Carbowax, Silicon, Marlophen). Nach den NMR.-Spektren liegt ein Gemisch von 40% 3-endo-Hydroxy-campher (**2a**) und 60% 2-endo-Hydroxy-epi-campher (**4a**) vor.

5.2. *Katalytisch mit RANEY-Ni (vgl. [12a]).* Eine Lösung von 350 mg (-)-Campherchinon in 25 ml abs. Äthanol wurde zu 200 mg vorhydriertem RANEY-Nickel gegeben und bei Normaldruck hydriert. Nach 1 Std. war die anfänglich gelbe Lösung farblos und die für die Reduktion einer Ketogruppe benötigte Menge Wasserstoff verbraucht. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurden zur Bildung eines azotropen Gemisches 100 ml Methylenchlorid zugegeben und das Lösungsmittel über eine VIGREUX-Kolonne abdestilliert. Aus Pentan-Methylenchlorid-(9:1) wurden 287 mg 3-exo-Hydroxy-campher (**3a**) in reinen, farblosen Kristallen vom Smp. 208–210° erhalten;  $[\alpha]_D^{25} = +118^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 1,324$  in Benzol). RUPE *et al.* [12a] fanden den Smp. 209–211°;  $[\alpha]_D = +115,6^\circ$  (10-proz. Äthanol).

5.3. *Mit NaBH<sub>4</sub>.* Eine Lösung von 105 mg (-)-Campherchinon vom Smp. 198–199° in 25 ml Methanol wurde auf –65° abgekühlt und mit einer Lösung von 10 mg NaBH<sub>4</sub> (1,5-fache Menge für

die Reduktion einer Ketogruppe) in 1,5 ml Methanol versetzt. Nach Reduktion und damit nach Entfärbung der anfänglich gelben Lösung (nach 5–6 Min.) wurde sofort mit 2N  $H_2SO_4$  kongosauer gestellt und mit Methylenechlorid ausgeschüttelt. Waschen mit 2N  $Na_2CO_3$ , Wasser und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonne ergab 93 mg Rohprodukt. Nach Chromatographie an 12 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:1) als Elutionsmittel resultierten aus Pentan-Methylenechlorid-(9:1) 86 mg farblose Kristalle vom Smp. 203–207°. Nach dem NMR.-Spektrum liegt ein Gemisch von 75% 3-exo-Hydroxy-campher (**3a**) und 25% 2-exo-Hydroxy-epi-campher (**5a**) vor. – Zur Isomerisierung wurde eine Lösung von 40 mg des Ketogemisches in 25 ml 6-proz. methanolischer KOH und 2,5 ml Wasser 48 Std. bei 23° gerührt. Nach Extraktion mit Methylenchlorid und Waschen der Auszüge mit Wasser wurden die Extrakte über  $Na_2SO_4$  getrocknet. Es resultierten 36 mg Isomergemisch, nach dem NMR.-Spektrum bestehend aus 39% 3-endo-Hydroxy-campher (**2a**), 48% 3-exo-Hydroxy-campher (**3a**), 9% 2-endo-Hydroxy-epi-campher (**4a**) und 4% 2-exo-Hydroxy-epi-campher (**5a**).

5.4. *3-exo-Acetoxy-campher aus 3-exo-Hydroxy-campher (3a)*. Eine Lösung von 85 mg **3a** in 1,5 ml abs. Pyridin wurde mit 1,35 ml Acetanhydrid versetzt und bei 36° stehengelassen. Nach 36 Std. wurde mit Eis versetzt und mit HCl kongosauer gestellt. Nach 4-maligem Ausschütteln mit Methylenchlorid, 3-maligem Waschen mit Wasser, Trocknen über  $Na_2SO_4$  und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonne resultierten 82 mg öliges Rohprodukt, das an 5 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:2) als Elutionsmittel, gereinigt wurde. Es wurden 66 mg Öl, das nach längerem Stehen bei –8° Kristalle vom Smp. 42–43° bildete, erhalten.  $[\alpha]_D^{23} = +109^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 6,542$  in Chloroform).

6. (–)-*Isofenchon aus (+)-Fenchon*. Die Herstellung erfolgte nach Lit.-Angaben, wobei Modifikationen vorgenommen wurden. Eine Lösung von 200 g (+)-Fenchon (Präparat der FLUKA AG., Buchs SG) reiner als 98% in 800 g Äthanol wurde mit 160 g Hydroxylaminhydrochlorid in 160 ml Wasser, dann mit 200 ml 50-proz. KOH versetzt. Der Niederschlag von KCl wurde abgenutscht und das Filtrat 5 Std. unter Rückfluss erhitzt. Beim Stehen über Nacht kristallisierten 167 g (+)-Fenchoxim [20] in langen Nadeln vom Smp. 166–167° (sublimiert ab 130°) aus. Durch nochmaliges Kochen der verbliebenen Lösung unter Rückfluss während 14 Std. wurden weitere 45 g krist. (+)-Fenchoxim erhalten. (Ausbeute: 98% der Theorie.) Eine Lösung von 167 g (+)-Fenchoxim in 1,2 l abs. Äthanol wurden mit 55 g RANEY-Nickel bei 55° und 180 Atm. 24 Std. hydriert. Nach Filtrieren des Katalysators und Abdampfen über eine VIGREUX-Kolonne wurde der Rückstand (155 g) im Vakuum (15 Torr) fraktioniert destilliert. 1. Fraktion, Sdp. 32–36°: 5,5 g (verworfen); 2. Fraktion, Sdp. 76–78°: 105,0 g (70% d. Th.) Fenchylamin [21]. Nach HÜCKEL *et al.* [22] liegt ein Gemisch von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Fenchylamin vor. Destillationsrückstand: 38,0 g (verworfen). – Zu einer Lösung von 88 g Eisessig und 50 g  $NaNO_2$  in 330 ml Wasser wurden im Laufe von 30 Min. 105 g (0,7 Mol) Fenchylamin (Sdp. 76–78°/15 Torr) zugetropft. Es wurde mit Wasserdampf abgeblasen, das Destillat in 4N KOH 1 Std. unter starkem Rühren auf 65° erwärmt und nochmals mit Wasserdampf destilliert. Die abgeschiedene ölige Phase wurde bei 15 Torr destilliert: 1. Fraktion, Sdp. 47–60°: 38,0 g; im IR.-Spektrum starke Vinylidenbande bei 1660  $cm^{-1}$ ; 2. Fraktion, Sdp. 60–80°: 2,5 g; im IR.-Spektrum starke Vinylidenbande bei 1660  $cm^{-1}$ ; 3. Fraktion, Sdp. 85–94°: 13,2 g; im IR.-Spektrum schwache Vinylidenbande bei 1660  $cm^{-1}$ ; 4. Fraktion, Sdp. 94–98°: 3,5 g; verworfen; 5. Fraktion, Sdp. 98–108°: 16,5 g; verworfen; Rückstand: 8,1 g; verworfen.

Für die weiteren Reaktionen wurde das  $\alpha$ -Fenchon [23] der Fraktionen 1 und 2 verwendet.

Bei der Herstellung von  $\alpha$ -Fenchon über das Fenchylchlorid nach Ruzicka & Liebl [24] war die Ausbeute an  $\alpha$ -Fenchon viel schlechter.

Eine Lösung von 40,5 g  $\alpha$ -Fenchon in 180 g Eisessig wurde mit 20 g 50-proz. Schwefelsäure 18 Std. bei 50° gerührt. Hierauf wurde die rotbraune Lösung mit Wasserdampf destilliert und das abgeschiedene Öl in 20-proz. methanolischer KOH am Rückfluss hydrolysiert. Das durch Wasserdampfdestillation abgeschiedene farblose Öl wurde im Vakuum fraktioniert destilliert. Die Fraktion vom Sdp. 88–90° enthielt Isofenchylalkohol, der mit ca. 20% Fenchylalkohol verunreinigt war. Durch Kristallisation aus Pentan wurde 8,1 g reiner Isofenchylalkohol [23] vom Smp. 61–62°  $[\alpha]_D^{23} = -25^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 2,813$  in Äthanol) erhalten. Die Mutterlaugenrückstände (9,2 g) wurden in Portionen von ca. 3 g an 250 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:1) als Elutionsmittel gereinigt und lieferten weitere 5,1 g reinen Isofenchylalkohol. Die Rf-Werte der beiden Alkohole im Dünnschichtchromatogramm (Fließmittel: Äther-Petroläther-(4:1)) betragen für Fenchylalkohol 0,8, für Isofenchylalkohol 0,7.

In eine Lösung von 2,34 g (–)-Isofenchylalkohol vom Smp. 61–62° in 180 ml Aceton wurde unter Rühren 8 ml einer Lösung von 3,32 g  $\text{CrO}_3$ , 2,87 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in 50 ml Wasser nach [11] bei 0° zugetropft. Nach 15 Min. wurde mit Eis und Wasser versetzt, mit total 400 ml Methylenchlorid extrahiert, der Extrakt mit Wasser gewaschen, mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Erhalten wurden 2,29 g Rohprodukt, das an 220 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(7:3) gereinigt wurde. Es resultierten 2,12 g reines (–)-Isofenchon [23],  $[\alpha]_D^{23} = -10^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 7,20$  in Chloroform). – Größere Mengen unreinen Isofenchons werden mit Vorteil wie folgt gereinigt (vgl. [25]): Eine Lösung von 10 g Gemisch in 50 ml Äthanol wurde mit 10 g Semicarbazidhydrochlorid und 10 g Natriumacetat in 50 ml Wasser versetzt und 4 Std. gerührt. Es resultierten 5,9 g krist. Isofenchonsemicarbazon vom Smp. 218–221°. Nach Erwärmen mit 50 ml 30-proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  während 3 Min. auf 60° erhielt man 3,82 g Isofenchon von 99% Reinheit (gas-chromatographisch).

7. (–)-Isofenchonchoninon (**6a**) aus (–)-Isofenchon (vgl. [16]). Eine Lösung von 4,61 g Isofenchon in 100 ml Eisessig wurde mit 4 g  $\text{SeO}_2$  unter Rückfluss gekocht. Nach 48 Std. wurde abfiltriert, das Filtrat mit wässrigem KOH auf pH 4,7 gestellt, mit Methylenchlorid ausgeschüttelt und der Extrakt über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Präparative Gas-Chromatographie («BECKER-Gaschromatograph»; Säule: Silicon SE 30, 3 m; Temp. 125°) des Rohprodukts ergab neben mindestens 3 nicht identifizierten Substanzen 2,34 g (–)-Isofenchonchoninon vom Smp. 69–70°  $[\alpha]_D^{23} = -5^\circ \pm 1^\circ$  ( $c = 6,80$  in Chloroform).

#### 8. Mikrobiologische Reduktion von Isofenchonchoninon

8.1. Umsetzung von (–)-Isofenchonchoninon (**6a**) mit *A. orchidis*. Eine Lösung von 450 mg (–)-Isofenchonchoninon vom Smp. 69–70° in 5 ml Aceton wurde auf 5 1-Liter-ERLENMEYER-Kolben verteilt, in welchen das Pilzmycel in je 200 ml Wasser suspendiert war. Die Kolben wurden 8 Std. auf der rotierenden Maschine bei 27° geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Mycels und Nachwaschen mit Methylenchlorid-Methanol-(9:1), wurde die wässrige Lösung 4-mal mit Methylenchlorid-Methanol-(9:1) extrahiert. Nach Trocknen des Extraktes über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonne wurden 443 mg Rohprodukt erhalten, das im Dünnschichtchromatogramm (Fliessmittel: Äther-Petroläther-(4:1)) neben 3 sehr schwachen, langsam laufenden Flecken einen starken Fleck zeigte. Das Rohprodukt wurde an 50 g Kieselgel chromatographiert. Zum Eluieren diente ein Gemisch von Petroläther-Äther-(1:3). Das dem Hauptfleck entsprechende Produkt erschien zwischen 260 und 300 ml durchflossenem Elutionsgemisch. Umkristallisation aus Pentan-Methylenchlorid-(9:1), ergab 408 mg reines 2-endo-Hydroxy-epi-isofenchon (**7a**) [13] vom Smp. 61,5–62°;  $[\alpha]_D^{23} = +98^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 0,851$  in Chloroform);  $[\alpha]_D^{23} = +57^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 0,913$  in Äthanol).



8.2. Umsetzung von (+)-Isofenchonchoninon (**6b**) mit *A. orchidis*. Eine Lösung von 240 mg (+)-Isofenchonchoninon vom Smp. 69–70° in 3 ml Aceton wurde auf 3 1-Liter-ERLENMEYER-Kolben verteilt, in welchen das Pilzmycel in je 200 ml Wasser suspendiert war. Umsetzung und Extraktion erfolgt wie bei 8.1. beschrieben. Nach Umkristallisation des an Kieselgel gereinigten Rohproduktes aus Pentan-Methylenchlorid-(9:1) resultierten 198 mg reines krist. 2-endo-Hydroxy-epi-isofenchon (**7b**) vom Smp. 61,5–62°;  $[\alpha]_D^{23} = -100^\circ \pm 3^\circ$  ( $c = 1,012$  in Chloroform). IR.-Spektrum identisch mit dem Spektrum von **7a**.

8.3.  $\text{CrO}_3$ -Oxydation von 2-endo-Hydroxy-epi-isofenchon (**7b**). Eine Lösung von 150 mg **7b** in 25 ml Aceton wurde unter Rühren bei 0° bis +2° langsam mit 0,6 ml einer Lösung von 3,32 g  $\text{CrO}_3$ , 2,87 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in 50 ml Wasser (vgl. [11]) versetzt und 15 Min. weitergerührt. Nach Versetzen mit Eis, Ausschütteln mit Methylenchlorid, Waschen mit 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1N  $\text{NaHCO}_3$  und Wasser und Abdampfen resultierten 122 mg gelbes Rohprodukt, das an 5 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:2) gereinigt wurde. Umkristallisieren aus Pentan ergab 98 mg gelbe Kristalle, die nach IR.-Spektrum, Smp., Misch-Smp. und Dünnschichtchromatogramm mit **6a** identisch waren.

8.4. 2-endo-Acetoxy-epi-isofenchon. 65 mg **7b** wurden mit 1,5 ml abs. Pyridin und 1,35 ml Acetanhydrid 36 Std. bei 36° stehengelassen. Hierauf wurde mit Eis versetzt und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Nach 3-maligem Waschen mit dest. Wasser, Trocknen mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonne resultierten 67 mg Rohprodukt, das an 6 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:2) als Elutionsmittel, gereinigt wurde. Es wurde ein farbloses Öl erhalten; Signale im NMR.-Spektrum in  $\text{CDCl}_3$ : 4,9 ppm (Triplet; Methin-Proton); 2,1 ppm (Singulett;  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 1,17 ppm ( $\text{CH}_3$ ); 1,10 ppm ( $\text{CH}_3$ ); 0,98 ppm ( $\text{CH}_3$ ).

9. *Chemische Reduktion von (–)-Isofenchonchinon (6a)*

9.1. *Mit Zn in Eisessig* (vgl. [13] [26]). Eine Lösung von 150 mg (–)-Isofenchonchinon vom Smp. 69–70° in 10 ml Eisessig wurde nach der Zugabe von 1,5 ml Wasser auf 0° gekühlt und unter Rühren mit 100 mg Zn-Staub versetzt. Die anfänglich gelbe Lösung entfärbte sich im Laufe von 50 Min. Es wurde abfiltriert, mit KOH neutralisiert und mit Methylchlorid ausgeschüttelt. Nach 3-maligem Waschen mit Wasser wurde über wenig  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Im Dünnschichtchromatogramm (Fließmittel: Äther-Petroläther-(4:1)) war das Rohprodukt einheitlich. Auch gas-chromatographisch liessen sich die Isomeren trotz Versuchen mit verschiedenen Säulen (Carbowax, Silicon und Marlophen) nicht auftrennen. Nach dem NMR.-Spektrum liegt aber ein Gemisch von 65% 2-endo-Hydroxy-epi-isofenchon (7a) und 35% 3-endo-Hydroxy-isofenchon (9a) vor.

9.2. *Mit  $\text{NaBH}_4$*  Eine Lösung von 100 mg (–)-Isofenchonchinon vom Smp. 69–70° in 25 ml Methanol wurde bei –65° mit einer Lösung von 10 mg  $\text{NaBH}_4$  in 1,5 ml Methanol versetzt. Die Reduktion und somit die Entfärbung der anfänglich gelben Lösung erfolgte innert 9–10 Min. Hierauf wurde mit 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  kongosauer gestellt und mit Methylchlorid ausgeschüttelt. Waschen mit 2N  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung, Wasser und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonne ergab 92 mg Rohprodukt. Nach Chromatographie an 10 g Kieselgel (Elutionsmittel: Äther-Petroläther-(1:3)) wurden 84 mg farbloses Öl erhalten, das nach dem NMR.-Spektrum aus 85% 7-endo-Hydroxy-epi-isofenchon (7a) und 15% 2-exo-Hydroxy-epi-isofenchon (8a) bestand.

9.3. *Katalytisch mit RANEY-Ni*. Eine Lösung von 150 mg (–)-Isofenchonchinon in 15 ml abs. Äthanol wurde zu 150 mg vorhydriertem RANEY-Nickel gegeben und bei Normaldruck hydriert. Nach 55 Min. war die anfänglich gelbe Lösung farblos und die für die Reduktion einer Ketogruppe benötigte Menge Wasserstoff verbraucht. Nach Abfiltrieren vom Katalysator wurden zur Bildung eines azeotropen Gemisches 100 ml Methylchlorid zugegeben und die Lösung über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Das Rohprodukt (142 mg) liess sich weder auf Dünnschichtplatten (Fließmittel: Äther-Petroläther-(4:1)) noch gas-chromatographisch an verschiedenen Säulen (Carbowax, Silicon und Marlophen) auftrennen. Nach dem NMR.-Spektrum liegt ein Gemisch von 30% 2-endo-Hydroxy-epi-isofenchon (7a), 60% 2-exo-Hydroxy-epi-isofenchon (8a) und 10% 3-endo-Hydroxy-isofenchon (9a) vor.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 16. Mitteilung: L. GSELL & CH. TAMM, Helv. 52, 150 (1969).
- [2] a) Vgl. A. Čapek, O. HANČ & M. TADRA, «Microbial Transformations of Steroids», Academia, Prag 1966; b) W. CHARNEY & H. L. HERZOG, «Microbial Transformations of Steroids, a Handbook», Academic Press, New York/London 1967; c) H. IIZUKA & N. NAITO, «Microbial Transformation of Steroids and Alkaloids», University of Tokyo Press, Tokyo-University Park Press, State College Pennsylvania 1967.
- [3] C. NEUBERG, Biochim. biophysica Acta 4, 170 (1950).
- [4] P. K. BHATTACHARYYA, B. R. PREMA, B. D. KULKARNI & S. K. PRADHAN, Nature 187, 689 (1960).
- [5] P. J. CHAPMAN, G. MEERMAN, I. C. GUNSLAS, Biochem. biophysic. Res. Commun. 20, 104 (1965).
- [6] a) W. H. BRADSHAW, H. E. CONRAD, E. J. COREY, I. C. GUNSLAS & D. LEDNICER, J. Amer. chem. Soc. 81, 5507 (1959); b) H. E. CONRAD, J. HEDEGAARD, I. C. GUNSLAS, E. J. COREY & HISASHI UDA, Tetrahedron Letters 1965, 561; c) P. J. CHAPMAN, G. MEERMAN, I. C. GUNSLAS, R. SRINIVASAN & K. L. RINEHART JR., J. Amer. chem. Soc. 88, 618 (1966).
- [7] H. E. CONRAD, RENÉ DU BUS, K. LIEB & I. C. GUNSLAS, «Enzymatic Keto-Lactonisation», IV Abstracts (Abstracts of the 6th International Congress of Biochemistry, New York) p. 310; JYH-FA KUO, R. PRAIRIE & I. C. GUNSLAS, *ibid.*, p. 317; P. K. BHATTACHARYYA, R. S. DHAVALIKAR & O. P. SHUKLA, *ibid.*, p. 297.
- [8] M. SCHERRER-GERVAL, L. GSELL & CH. TAMM, Helv. 52, 142 (1969).
- [9] a) G. JACOB, G. OURISSON & A. RASSAT, Bull. Soc. chim. France 1959, 1374; b) F. H. ALLEN & D. ROGERS, Chem. Commun. 1966, 837; c) K. FREUDENBERG & LWOWSKI, Liebigs Ann. Chem. 594, 76 (1955).
- [10] W. C. EVANS, J. M. RIDGION & J. L. SIMONSEN, J. chem. Soc. 1934, 137.

- [11] K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JONES & B. C. L. WEEDON, J. chem. Soc. 1946, 39.
- [12] a) H. RUPE & F. MÜLLER, Helv. 24, 265 E (1941); b) H. RUPE & W. THOMMEN, Helv. 30, 933 (1947).
- [13] CH. COULOMBEAU, «Sur le Mécanisme de la Réduction d'α-Dictones par le Zinc dans l'Acide Acétique». Thèse, Grenoble, 16 septembre 1965.
- [14] M. KARPLUS, J. chem. Physics 33, 316 (1960).
- [15] F. L. A. ANET, Canad. J. Chemistry 39, 786 (1961).
- [16] H. P. GERVAS & A. RASSAT, Bull. Soc. chim. France 1961, 743.
- [17] G. R. DUNCAN, J. Chromatography 8, 37 (1962).
- [18] Vgl. E. STAHL, «Dünnschichtchromatographie», 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1967.
- [19] a) L. CLAISEN & O. MANASSE, Liebigs Ann. Chem. 274, 71 (1893); b) W. GLUND, Ber. dtsch. chem. Ges. 48, 420 (1915).
- [20] a) O. WALLACH, Liebigs Ann. Chem. 263, 129 (1891); b) W. HÜCKEL, Ber. dtsch. chem. Ges. 80, 39 (1947).
- [21] O. WALLACH, Liebigs Ann. Chem. 275, 103 (1893).
- [22] W. HÜCKEL, H. KİDLER & H. WOŁOWSKI, Ber. dtsch. chem. Ges. 77, 220 (1944).
- [23] O. WALLACH, Liebigs Ann. Chem. 362, 174 (1908).
- [24] L. RUZICKA & F. LIEBL, Helv. 6, 267 (1923).
- [25] O. WALLACH, Liebigs Ann. Chem. 269, 326 (1892).
- [26] a) A. K. RUSHENZEVA & M. DELEKTORSKAJA, C. R. Acad. Sci. USSR 29, 41 (1940); b) A. K. RUSHENZEVA & M. DELEKTORSKAJA, J. Gen. Chemistry USSR, 10 1653 (1940); c) S. NAMETKIN & A. RUSCHENTZEFF, J. pr. Chem. 106, 39 (1923); d) S. NAMETKIN & A. K. RUSHENZEVA, Ž. obšč. Khim. 7, 1343 (1937).

## 165. Mikrobiologische Umwandlung von bicyclischen Monoterpenen durch *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM.

### 2. Teil. Hydroxylierung von Fenchon und Isofenchon<sup>1)</sup>

18. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen [1]

von B. Pfrunder und Ch. Tamm

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

(26. VI. 69)

*Summary.* (+)-Fenchone (**3a**) was transformed to 6-exo-hydroxy-fenchone ( $6\beta$ -hydroxy-1,3,3-trimethyl-nor-bornan-2-one) (**1a**) and to 5-exo-hydroxy-fenchone ( $5\beta$ -hydroxy-1,3,3-trimethyl-nor-bornan-2-one) (**4a**) by the mycelium of *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM. The structure of the two products was proven by a detailed analysis of the NMR spectra of the corresponding acetyl derivatives **2a** and **5a** respectively, and by  $\text{CrO}_3$ -oxidation. **1a** yielded the  $\beta$ -diketone **6a**, and **4a** the diketone **8a**. Whereas **8a** was stable to alkali **6a** was cleaved to the cyclopentane carboxylic acids **7** and **9**. – Incubation of (–)-fenchone (**3b**) yielded the enantiomeric hydroxylation products **1b** and **4b** in the same ratio. – (–)-Isofenchone (**11a**) was transformed by *Absidia orchidis* into the two epimers 6-endo-hydroxy-isofenchone ( $6\alpha$ -hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-one) (**12a**) and 6-exo-hydroxy-isofenchone ( $6\beta$ -hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-one) (**10a**).  $\text{CrO}_3$ -oxidation of both **10a** and **12a** gave the same  $\beta$ -diketone **6a**. – (+)-Isofenchone gave the corresponding enantiomeric hydroxy derivatives **10b** and **12b** on incubation with *Absidia orchidis*.

<sup>1)</sup> Über einen Teil dieser Ergebnisse wurde am 151st National Meeting der American Chemical Society, Pittsburgh, Pa., USA, 22.-31. März 1966, im Rahmen des «Symposium on Novel Microbiological Transformations of Medicinal Interest» vorgetragen.