

- [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 -Dicétones 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. GERVAIS & 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. dtsh. chem. Ges.* 48, 420 (1915).
- [20] a) O. WALLACH, *Liebigs Ann. Chem.* 263, 129 (1891); b) W. HÜCKEL, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 80, 39 (1947).
- [21] O. WALLACH, *Liebigs Ann. Chem.* 275, 103 (1893).
- [22] W. HÜCKEL, H. KINDLER & H. WOŁOWSKI, *Ber. dtsh. 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 Isofenchon¹⁾

18. Mitteilung über Reaktionen mit Mikroorganismen [1]

von **B. Pfrunder** und **Ch. Tamm**

Institut für Organische Chemie der Universität Basel

(26. VI. 69)

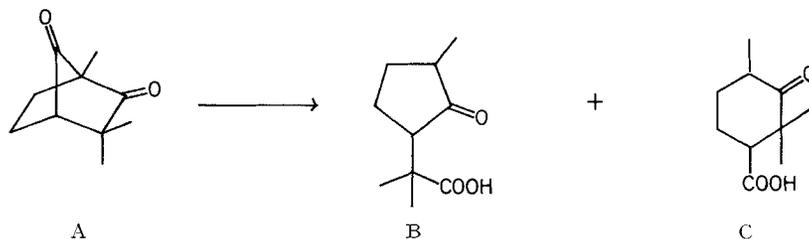
Summary. (+)-Fenchone (**3a**) was transformed to 6-exo-hydroxy-fenchone (6 β -hydroxy-1,3,3-trimethyl-nor-bornan-2-one) (**1a**) and to 5-exo-hydroxy-fenchone (5 β -hydroxy-1,3,3-trimethyl-nor-bornan-2-one) (**4a**) by the mycelium of *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM. The structure of the two products was proven by a detailed analysis of the NMR. spectra of the corresponding acetyl derivatives **2a** and **5a** respectively, and by CrO₃-oxidation. **1a** yielded the β -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 α -hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-one) (**12a**) and 6-exo-hydroxy-isofenchone (6 β -hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-one) (**10a**). CrO₃-oxidation of both **10a** and **12a** gave the same β -diketone **6a**. – (+)-Isofenchone gave the corresponding enantiomeric hydroxy derivatives **10b** and **12b** on incubation with *Absidia orchidis*.

¹⁾ 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.

Nachdem wir bei der Inkubation der beiden α -Diketone Campherchinon und Isofenchonchinon mit einer Mycelsuspension von *Absidia orchidis* (VUILL.) HAGEM selektive und stereospezifische Reduktion der 1,2-Dicarbonyl-Gruppierungen zu α -Ketonen festgestellt hatten, interessierte uns das Verhalten der entsprechenden Monoketone gegenüber diesem Mikroorganismus. Wie bereits in der vorstehenden Mitteilung erwähnt wurde, trat beim Campher unter analogen Bedingungen keinerlei Umwandlung ein [1]. Anders verhalten sich hingegen, wie im folgenden gezeigt wird, Fenchon (**3**) und Isofenchon (**11**).

1. Fenchon. – Bei Fenchon hatten CHAPMAN *et al.* [2] vor einigen Jahren die Bildung von 1,2-Fencholid und 2,3-Fencholid nach Inkubation mit einer *Corynebacterium*-Spezies beobachtet. Doch nahm die Reaktion nach Inkubation mit einer Mycelsuspension von *Absidia orchidis* einen anderen Verlauf, indem (+)-Fenchon (**3a**) nach Schütteln während 4 Tagen bei 28° zwei neue Produkte ergab, die beide im Dünnschichtchromatogramm langsamer liefen. Nach chromatographischer Reinigung an Kieselgel erhielten wir zwei reine krist. Stoffe vom Smp. 70–70,5°; $[\alpha]_D^{24} = +49^\circ \pm 3^\circ$ (Chloroform) bzw. vom Smp. 84,5–85°; $[\alpha]_D^{24} = +59^\circ \pm 3^\circ$ (Chloroform) in einer Gesamtausbeute von ca. 50%. Die beiden Produkte sind neu. Aufgrund der chemischen und physikalischen Eigenschaften kommt dem ersteren die Struktur **1a**, dem letzteren diejenige von **4a** zu. Es handelt sich somit um Monohydroxy-Derivate des (+)-Fenchons.

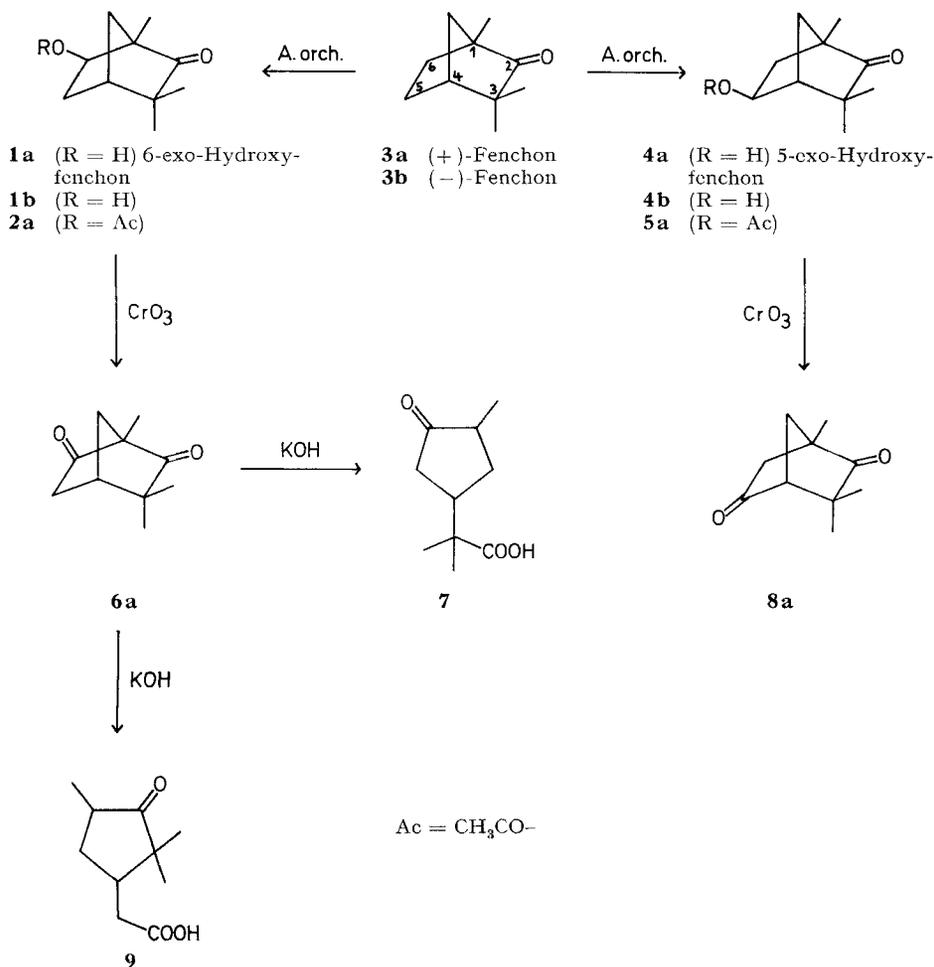
Die Elementaranalyse von **1a** stimmte auf die Summenformel $C_{10}H_{16}O_2$. Das IR.-Spektrum in CCl_4 -Lösung zeigte HO-Banden bei 3620 cm^{-1} (scharf) und 3480 cm^{-1} (breit), wobei letztere konzentrationsabhängig ist. Infolgedessen handelt es sich hier um eine intermolekulare Assoziation. Bei 1740 cm^{-1} war die C=O-Streckschwingung einer Carbonylgruppe sichtbar. Behandlung von **1a** mit Acetanhydrid in Pyridin bei 36° ergab das Mono-O-acetylderivat **2a**. Bei der Oxydation mit CrO_3 in Eisessig entstand das Diketon **6**. Im IR.-Spektrum von **6** waren zwei Carbonylbanden bei 1765 cm^{-1} und 1735 cm^{-1} , wie dies für β -Diketone charakteristisch ist (vgl. [3]), sichtbar. Das UV.-Spektrum in Cyclohexan zeigte Absorptionsmaxima bei 197 nm ($\log \epsilon = 3,22$), 212 nm ($\log \epsilon = 2,89$), 318 nm ($\log \epsilon = 2,22$) und 329 nm ($\log \epsilon = 2,22$). Diese Absorption ist mit dem Vorliegen von zwei isolierten Ketogruppen im Einklang. Behandlung des β -Diketons mit 1-proz. methanolischer KOH bei 48° während 3 Std. ergab ein Kristallisat, das sich nach dem NMR.-Spektrum als ein Gemisch von zwei Ketocarbonsäuren erwies. Es hat somit die für β -Dicarbonylverbindungen charakteristische Säurespaltung stattgefunden. Trotz vielen Versuchen war es nicht möglich, das Säuregemisch zu trennen. Auch die Methylester und *p*-Bromphenacylester konnten weder gas-chromatographisch noch durch Chromatographie an der Kieselgelsäule getrennt



werden. Es gelang jedoch, die Konstitution der beiden unbekanntenen Säuren als **7** bzw. **9** mit Hilfe von spektroskopischen Methoden zu bestimmen.

Das IR.-Spektrum des Säuregemisches zeigte zwei C=O-Streckschwingungen. Die Bande bei 1740 cm^{-1} deutet auf ein Fünfringketon und diejenige bei 1710 cm^{-1} auf eine Carboxylgruppe hin. Die Säurespaltung des β -Diketons hat ausschliesslich Carbonsäuren mit einem Cyclopentanring ergeben und keine Cyclohexanoncarbonsäure. Infolgedessen müssen sich die beiden Carbonylgruppen im β -Diketon in 2,6-Stellung befinden. Die ursprünglich noch mögliche Alternative eines 6,7-Diketons **A** hätte bei der Säurespaltung wahrscheinlich ein Gemisch der zwei Ketocarbonsäuren **B** und **C** ergeben, von denen die eine einen Cyclohexanring besitzt.

Daraus folgt, dass die mikrobielle Hydroxylierung des (+)-Fenchons in 2-Stellung stattgefunden hat. Einen ersten Hinweis auf die Konfiguration der 2-Hydroxy-Gruppe lieferte das IR.-Spektrum. Es zeigte keine intramolekulare Assoziation mit der 6-Ketogruppe. Ein eindeutiger Konfigurationsbeweis liess sich auf Grund des 100-



MHz-NMR.-Spektrums des Acetylderivats **2a** erbringen, indem durch Spin-Spin-Entkopplung alle Signale zugeordnet werden konnten. Durch diese Doppelresonanzversuche waren die folgenden Kopplungen feststellbar (vgl. Fig. 1): Einstrahlung auf H_C ergab $J_{CF} = 4,5$ Hz und $J_{CD} = 1,5$ Hz sowie Einstrahlung auf H_E ergab $J_{ED} = 11,0$ Hz und $J_{EB} = 2,5$ Hz. Die einzelnen Protonen zeigen die folgenden Multiplizitäten:

H_A erscheint als Multipllett mit $J_{AB} = 7,0$ Hz; $J_{AF} = 3,5$ Hz und $J_{AE} = 0,5$ Hz. Die weitreichende Kopplung zwischen H_A und H_E beweist die endo-Stellung von H_A bzw. die exo-Stellung der 6-Acetoxygruppe. Sie verschwindet, wenn auf der Frequenz von H_E eingestrahlt wird.

H_B tritt als Multipllett auf, mit $J_{BF} = 14,0$ Hz; $J_{BA} = 7,0$ Hz; $J_{BE} = 2,5$ Hz und $J_{BC} = 0,5$ Hz. Die Kopplung zwischen H_B und H_E verschwindet, wenn auf der Frequenz von H_E eingestrahlt wird. Der Torsionswinkel zwischen H_B und H_C beträgt ca. 79° [4]. Dieser Wert entspricht nach KARPLUS [5] einer Kopplungskonstante $J < 0,5$ Hz. Gefunden wurden $J \simeq 0,5$ Hz.

H_C erscheint als unaufgelöstes Dublett mit $J_{CF} = 4,5$ Hz. Dieser Wert passt sehr gut auf einen Torsionswinkel von 44° (vgl. [4] [5] und die für 3-endo-Hydroxy-campher gefundenen Werte [1]). Die Kopplung J_{CE} von $1,5$ Hz war nicht direkt aus dem Spektrum zu entnehmen. Wird jedoch auf H_E eingestrahlt, so wird das Signal von H_C intensiver und schärfer.

H_D verursacht ein Quadruplett, dessen linke Hälfte schlecht sichtbar ist, mit den Kopplungen $J_{DE} = 11,0$ Hz, welche beim Einstrahlen auf H_E verschwindet, und $J_{DC} = 1,5$ Hz, welche beim Einstrahlen auf H_C verschwindet.

H_E erscheint als ein unaufgelöstes Dublett, dessen rechte Hälfte schlecht sichtbar ist, mit den Kopplungen $J_{ED} = 11,0$ Hz (vgl. H_D); $J_{EC} = 1,5$ Hz (vgl. H_C) und $J_{EA} = 0,5$ Hz (vgl. H_A).

H_F gibt ein Multipllett mit den Kopplungen $J_{FB} = 14,0$ Hz; $J_{FA} = 3,5$ Hz und $J_{FC} = 4,5$ Hz (vgl. H_C).

Damit ist die exo-Stellung des H-Atoms an C-6 bzw. die 6-Acetoxygruppe bzw. die 6-exo-Stellung des mikrobiologisch eingeführten Hydroxyls sichergestellt. Es liegt das 6-exo-Hydroxy-fenchon vor²⁾.

Das zweite Hydroxylierungsprodukt vom Smp. $84,5\text{--}85^\circ$ des (+)-Fenchons besitzt, wie bereits erwähnt, die Konstitution **4a** mit der Summenformel $C_{10}H_{16}O_2$. **4a** ist somit isomer mit **1a**. Das IR.-Spektrum zeigte in CCl_4 HO-Banden bei 3625 cm^{-1} (scharf) und bei 3495 cm^{-1} (breit). Letztere verschwindet bei Änderung der Konzentration. Es handelt sich hier um eine intermolekulare Assoziation. Bei 1743 cm^{-1} war eine C=O-Schwingung sichtbar. Mit Acetanhydrid in Pyridin bei 36° lieferte **4a** das Mono-O-acetylderivat **5a**. Behandlung mit CrO_3 in Eisessig bei 22° ergab das krist. Diketon **8**, das von **6** verschieden war. Das zweite Hydroxylierungsprodukt ist somit kein Epimeres vom ersteren. Das IR.-Spektrum des Diketons in CCl_4 zeigte bei 1760 cm^{-1} nur eine einzige C=O-Streckschwingung. Nach 5-stündiger Behandlung mit methanolischer KOH bei 46° wurde **8** unverändert zurückgewonnen. Unter diesen Bedingungen war beim isomeren Diketon **6** eine vollständige Säurespaltung eingetreten. Die Stabilität gegenüber Alkali und das Auftreten einer einzigen Carbonyl-

²⁾ Die an sich sehr unwahrscheinliche Möglichkeit einer nachträglichen Dehydrierung der mikrobiologisch eingeführten HO-Gruppe und Reduktion der ursprünglichen Ketogruppe ist damit ausgeschlossen.

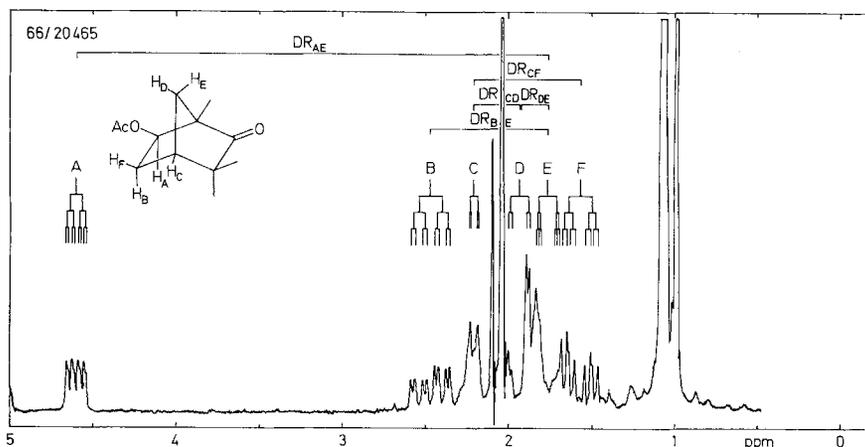


Fig. 1. 100-MHz-NMR.-Spektrum von 6-exo-Acetoxy-fenchon (6 β -Acetoxy-1,3,3-trimethyl-norbornan-2-on) (**2a**) in $CDCl_3$ ³⁾

schwingung im IR.-Spektrum schliesst eine β -Dicarbonylgruppierung aus. Es liegt deshalb ein γ -Diketon der Struktur **8** vor. Damit ist auch die 5-Stellung der mikrobiologisch eingeführten Hydroxylgruppe festgelegt. Ihre Konfiguration liess sich auch in diesem Falle mit Hilfe des 100-MHz-NMR.-Spektrums von **4a** und Doppelresonanzversuchen eindeutig bestimmen (vgl. Fig. 2). Dadurch liess sich die folgende Zuordnung treffen:

Einstrahlung auf H_A ergab $J_{AD} = 6,5$ Hz; $J_{AF} = 1,7$ Hz; $J_{AC} = 1,0$ Hz und $J_{AE} = 1,0$ Hz sowie Einstrahlung auf H_B ergab $J_{CF} = 1,5$ Hz und $J_{CE} = 1,0$ Hz und schliesslich wurden durch Einstrahlung auf H_C die Kopplungen $J_{BC} = 2,0$ Hz; $J_{CF} = 1,5$ Hz; $J_{CA} = 1,0$ Hz und $J_{CE} = 1,0$ Hz ermittelt. Die Signale der einzelnen Protonen zeigten die folgenden Aufspaltungen:

H_A erscheint als unaufgelöstes Dublett mit $J_{AD} = 6,5$ Hz; $J_{AF} = 1,7$ Hz und $J_{AC} = 1,0$ Hz. Die Aufspaltungen verschwinden bei Entkopplung von H_A . Bei der letzteren handelt es sich um eine weitreichende Kopplung, die nur mit der endo-Stellung von H_A bzw. der exo-Stellung der HO-Gruppe vereinbar ist.

H_B tritt als Quadruplett auf mit $J_{BE} = 10,5$ Hz und $J_{BC} = 2,0$ Hz. Diese Aufspaltung verschwindet bei Entkopplung von H_C .

H_C erscheint als unaufgelöstes Singulett. Es lassen sich aber folgende Kopplungen nachweisen: $J_{CA} = 1,0$ Hz nach Entkopplung von H_A ; $J_{CB} = 1,0$ Hz, indem Entkopplung von H_B eine schwache Aufspaltung des H_C -Signals bewirkt; $J_{CF} = 1,0$ Hz, die nicht eindeutig ist, sowie $J_{CF} = 1,5$ Hz.

H_D verursacht ein Multipllett mit $J_{DF} = 13,5$ Hz, $J_{DA} = 6,5$ Hz, das bei Entkopplung von H_A verschwindet, sowie $J_{DE} = 2,2$ Hz.

³⁾ Aufgenommen mit einem VARIAN-Spektrometer HA-100; Feldänderungsgeschwindigkeit 1 Hz/s; chemische Verschiebungen in δ -Werten mit Tetramethylsilan (TMS) als internem Standard ($\delta = 0$). DR. bedeutet Doppelresonanz. Den Herren PD Dr. R. F. ZÜRCHER und Dr. F. STUBER, CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, sei auch an dieser Stelle für diese Messungen bestens gedankt.

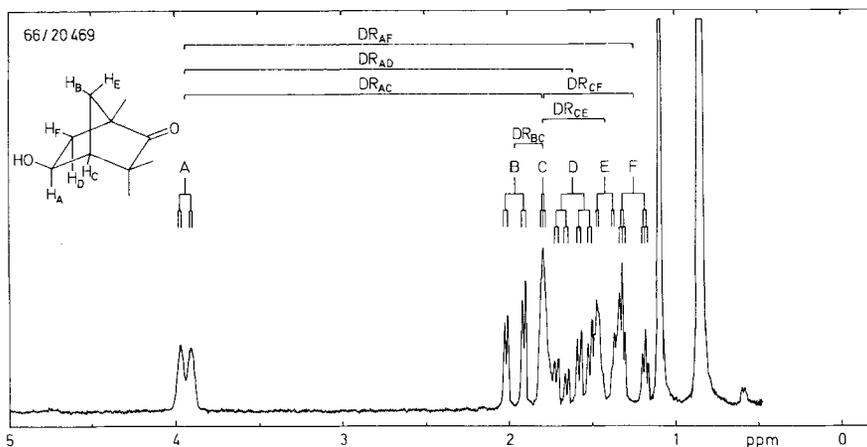


Fig. 2. 100-MHz-NMR.-Spektrum von 5-exo-Hydroxy-fenchon (β -Hydroxy-1,3,3-trimethyl-norbornan-2-on) (**4a**) in $C_6D_6 + D_2O^3$

H_E erscheint als Multipllett, dessen linke Seite nicht aufgelöst ist, mit $J_{EB} = 10,5$ Hz; die bei Einstrahlung auf H_B verschwindet; $J_{EC} = 1,0$ Hz, welche nicht eindeutig nachweisbar ist, doch verändert sich das Signal bei Einstrahlung auf H_C ; $J_{EA} = 1,0$ Hz, die sich bei Einstrahlung auf H_A verändert, sowie $J_{ED} = 2,2$ Hz. Diese Kopplung ist aus der Aufspaltung von H_D ersichtlich.

H_F tritt als Sextett in Erscheinung. Seine linke Seite wird teilweise durch das Signal von H_E verdeckt. Folgende Kopplungen liessen sich feststellen: $J_{FD} = 13,5$ Hz; $J_{FA} = 1,5$ Hz und $J_{FC} = 1,5$ Hz. Letztere verschwindet bei Einstrahlung auf H_C .

Damit ist die 5-exo-Stellung der mikrobiologisch eingeführten HO-Gruppe sicher-gestellt²⁾.

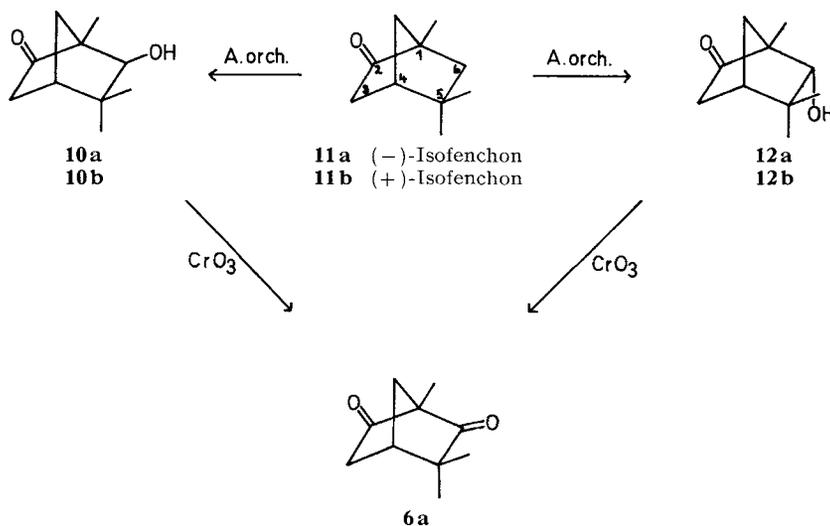
Um die Stereospezifität der mikrobiellen Hydroxylierung näher abzuklären, inkubierten wir das enantiomere (–)-Fenchon (**3b**) mit einer wässrigen Mycel-suspension von *Absidia orchidis* unter den gleichen Bedingungen. Wir erhielten zwar die beiden gleichen, enantiomeren Hydroxylprodukte **1b** und **4b**, jedoch in verschiedenem Mengenverhältnis, nämlich ca. 60% von **1b** und ca. 30% von **4b**.

2. Isofenchon. – (–)-Isofenchon (**11a**) ergab nach Inkubation mit einer wässrigen Mycelsuspension von *A. orchidis* während 3,5 Tagen zwei neue Reaktionsprodukte (Ausbeute ca. 60%), die im Dünnschichtchromatogramm langsamer liefen. Das Dünnschichtchromatogramm des Rohprodukts zeigte noch 6 weitere, allerdings bedeutend schwächere Flecke, die aber aus der Nährlösung stammten und deshalb nicht weiter untersucht wurden. Nach dreimaliger Chromatographie des Rohprodukts an Kieselgel erhielten wir zu etwa gleichen Teilen zwei ölige Produkte, die nach längerem Stehen erstarrten, sich aber nicht umkristallisieren liessen. Das bei 63–64,5° schmelzende Produkt besitzt die Konstitution **10**, dasjenige vom Smp. 70–71° Struktur **12**. Die Analysenwerte beider Stoffe passten auf die Formel $C_{10}H_{16}O_2$ eines Monohydroxyderivats von **11**. Das IR.-Spektrum von **10** in CCl_4 -Lösung zeigte Hydroxyl-

banden bei 3610 cm^{-1} (scharf) und 3460 cm^{-1} (breit). Letztere verschwand nach Verdünnen der Lösung. Sie dürfte durch intramolekulare Assoziation zustande kommen.

Das IR.-Spektrum von **12** in CCl_4 -Lösung zeigte bei 3605 cm^{-1} nur eine schwache Hydroxylbande, hingegen bei 3460 cm^{-1} eine sehr breite Schwingung, die nach Verdünnung erhalten blieb. Es dürfte sich hier um eine intermolekulare Assoziation handeln.

Sowohl **10** als auch **12** ergaben bei der Oxydation mit CrO_3 in Eisessig dasselbe krist. Diketon, das nach allen Kriterien mit dem β -Diketon **6a** identisch war. Es liegt ein Epimerenpaar vor. Das Diketon **6a** war durch Oxydation des Hydroxylierungsproduktes **1a** des (+)-Fenchons (**3a**) erhalten worden (siehe 1.). Damit ist die 6-Stellung der Hydroxylgruppe in **10** und **12** gesichert. Anhaltspunkte über die Konfiguration der Hydroxylgruppen von **10** und **12** ergeben die IR.-Spektren, indem die intramolekulare Assoziation von **12** mit der 2-Ketogruppe auf eine endo-ständige Stellung deutet. Die Zuordnung liess sich mit Hilfe des 100-MHz-NMR.-Spektrums von **10** und **12** und Doppelresonanzversuchen beweisen (vgl. Fig. 3).



Aus den DREIDING-Modellen der beiden Verbindungen ist ersichtlich, dass bei **12a** eine weitreichende Kopplung (W-Struktur) zwischen dem exo-ständigen Proton H_A und H_B möglich ist. Eine Kopplung zwischen H_A und H_D ist jedoch nicht zu erwarten. Bei **10a** ist hingegen eine weitreichende Kopplung zwischen den H_A und H_B kaum möglich, hingegen scheint eine solche zwischen H_A und H_D wahrscheinlich. Um dies abzuklären, mussten zuerst die Signale von H_A , H_B und H_D im Spektrum lokalisiert werden.

Das NMR.-Spektrum von **12a** (vgl. Fig. 3) zeigt bei 3,56 ppm ein schwach verbreitertes Singulett, das dem Methinproton H_A zugeordnet werden kann. Bei 1,52 ppm und 1,41 ppm erscheint ein Dublett, dessen Kopplungskonstante von 11 Hz die Vermutung nahe legt, dass es sich hier um H_C oder H_D handelt. Proton B muss sich im Signalhaufen zwischen 2,5 ppm und 1,8 ppm befinden. Beim Einstrahlen mit der

Frequenz von 2710 Hz trat eine Verschärfung der Signale bei 3,56 ppm (H_A) und 1,52 ppm bzw. 1,41 ppm (Dublett von H_C oder H_D) ein. Damit kann das Signal bei 2,1 ppm H_B zugeordnet werden. Gleichzeitig ist die weitreichende Kopplung zwischen H_A und H_B bewiesen. Diese ist aber nur möglich, wenn H_A exoständig angeordnet ist. Die Hydroxylgruppe nimmt somit die endo-Stellung ein.

Das 100-MHz-Spektrum von **10a** (vgl. Fig. 4) zeigt bei 3,10 ppm ein verbreitertes Singulett, das H_A zugeordnet werden kann. Zwischen 1,8 ppm und 1,4 ppm ist ein Signalhaufen von 3–4 Protonen sichtbar. Bei 1,49 ppm und 1,38 ppm erscheint wieder eines der beiden Protonen H_C bzw. H_D als Dublett mit $J \approx 11$ Hz. Wird auf H_A eingestrahlt, so wird das Dublett schärfer, d. h. die Kopplung von H_A ist verschwunden. Folglich handelt es sich hier um H_D , das mit H_C , welches sich im Signalhaufen be-

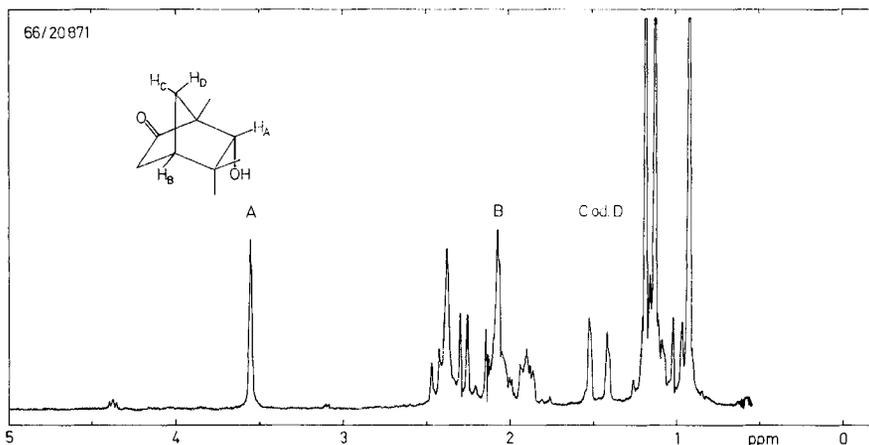


Fig. 3. 100-MHz-NMR.-Spektrum von 6-endo-Hydroxy-isofenchon (6 α -Hydroxy-1,5,5-trimethylnorbornan-2-on) (**12a**) in $CDCl_3 + D_2O^3$)

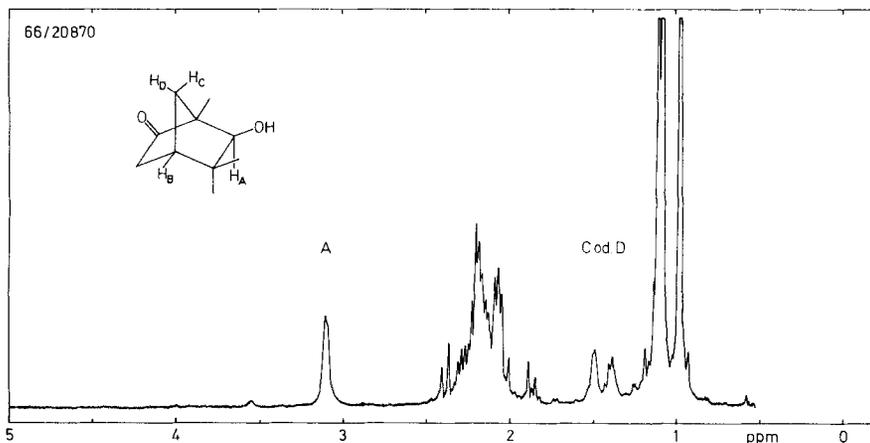


Fig. 4. 100-MHz-NMR.-Spektrum von 6-exo-Hydroxy-isofenchon (6 β -Hydroxy-1,5,5-trimethylnorbornan-2-on) (**10a**) in $CDCl_3 + D_2O^3$)

findet, koppelt ($J \approx 11$ Hz). Beim Einstrahlen auf H_D verschwindet die Kopplung von 1,5 Hz, mit der H_A durch H_D aufgespalten wird. Gleichzeitig vereinfacht sich der Signalhaufen in der Gegend von 2,2 ppm, wo sich H_C befinden dürfte. Damit ist die endo-Stellung von H_A bzw. die exo-Konfiguration der HO-Gruppe sichergestellt.

Umsetzung des enantiomeren (+)-Isolenchons (**11b**) mit *A. orchidis* unter analogen Bedingungen ergab die beiden optischen Antipoden der oben beschriebenen Hydroxylierungsprodukte, also **10b** und **12b** in genau gleicher Ausbeute und gleichem Mengenverhältnis.

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; Fehlergrenze ca. $\pm 2^\circ$. Substanzproben zur Messung der spez. Drehungen und Spektren wurden 20 Min. bei $35^\circ/15$ Torr und zur Elementaranalyse 1 Std. bei $25^\circ/0,02$ 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 IR 8, die NMR.-Spektren mit einem VARIAN-Spektrometer, Modell A-60, im Spektrollaboratorium unseres Instituts (K. AEGERTER) aufgenommen. Zur Säulenchromatographie nach DUNCAN [6] diente Kieselgel (Korngrösse 0,05–0,20 mm). Für die Dünnschichtchromatographie (DC.) [7] 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° 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 Impfmateriale für die Nährlösung verwendet. Nährlösung: 3,5% Glucose, 3,0% Bacto-Pepton, 0,5% Maislauge. Zum Versuch wurden 1000-ml-ERLENMEYER-Kolben mit je 200 ml Nährlösung benutzt. Die Gefässe wurden 40 Min. im Dampfautoklaven bei 120° sterilisiert und dann beimpft. Die ERLENMEYER-Kolben wurden auf einer rotierenden Schüttelmaschine (170 Umdrehungen/Min.) 48 Std. bei 27° inkubiert. Nach Zugabe des Substrats (50–90 mg pro ERLENMEYER-Kolben) wurde während 72–120 Std. weitergeschüttelt. Bei der Umsetzung in Mycelsuspension 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 Mycelsuspension wurde das Substrat, gelöst in wenig Methanol oder Aceton, gegeben.

3. Hydroxylierung von (+)- und (-)-Fenchon

3.1. *Umsetzung von (+)-Fenchon (3a) mit A. orchidis.* Eine Lösung von 2,13 g (+)-Fenchon in 15 ml Methanol wurde auf 30 l-Liter-ERLENMEYER-Kolben verteilt, die das Pilzmycel in je 150 ml Nährlösung suspendiert enthielten, das 60 Std. auf der rotierenden Schüttelmaschine gewachsen war. Die Umsetzung wurde bei 28° durchgeführt und anhand der Dünnschichtchromatographie von entnommenen Proben verfolgt. Nach 96 Std. wurde das Mycel abfiltriert, mit Methylenchlorid-Methanol-(9:1) nachgewaschen und die wässrige Lösung 4mal mit je 350 ml Methylenchlorid-Methanol-(9:1) extrahiert. Die dabei entstandene Emulsion trennte sich beim langsamen Filtrieren durch gewöhnliche Watte. Nach Waschen mit Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonnen, wurden 1,73 g braunes Rohprodukt erhalten, das im Dünnschichtchromatogramm neben Edukt zwei langsamer laufende Flecke erkennen liess. Beim Besprühen mit H_2SO_4 und anschliessendem Erwärmen auf 95° färbten sich diese zwei Flecke violett. Sechs weitere schwache Flecke waren sichtbar. Es wurde aber auf eine Isolation dieser Substanzen verzichtet, da das Dünnschichtchromatogramm eines Extraktes einer ohne Substrat unter gleichen Bedingungen gewachsenen Kultur von *A. orchidis* ebenfalls diese Flecke zeigte. Das Rohprodukt

wurde an 220 g Kieselgel chromatographiert (Elutionsgemisch: Äther-Petroläther-(4:1)). Erhalten wurden die folgenden Fraktionen (Reihenfolge der Elution): 492 mg (+)-Fenchon (**3a**), 87 mg Material aus drei kleinen Fraktionen (verworfen), 90 mg 6-exo-Hydroxy-fenchon (**1a**), 285 mg Gemisch von **1a** und **3a** und 128 mg 5-exo-Hydroxy-fenchon (**3a**). Durch nochmalige Chromatographie des Gemisches von **1a** und **3a** (285 mg) an 100 g Kieselgel (Elutionsgemisch: Äther-Petroläther-(2:1)) wurden neben 78 mg Gemisch von **1a** und **3a** 45 mg reines **1a** und 72 mg reines **3a** erhalten. Kristallisieren der **1a**-haltigen Fraktionen aus Pentan-Methylenchlorid-(9:1) ergab 122 mg 6-exo-Hydroxy-fenchon (6 β -Hydroxy-1,3,3-trimethyl-nor-bornan-2-on) (**1a**) in farblosen Kristallen vom Smp. 70–70,5°; $[\alpha]_D^{24} = +49^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1,457$ in Chloroform); UV.-Spektrum in Cyclohexan: Maxima bei 195 (3,23); 292 (1,45); 309 (1,41) nm ($\log \epsilon$).

$C_{10}H_{16}O_2$ (168,23) Ber. C 71,39 H 9,95% Gef. C 72,26 H 10,22%

Kristallisation der **4a**-haltigen Fraktionen aus Pentan-Methylenchlorid-(9:1) ergab 189 mg 5-exo-Hydroxy-fenchon (5 β -Hydroxy-1,3,3-trimethyl-nor-bornan-2-on) (**4a**) in farblosen Nadeln vom Smp. 84,5–85°; $[\alpha]_D^{24} = +59^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1,309$ in Chloroform); UV.-Spektrum in Cyclohexan: Maxima bei 192 (3,04); 275 (1,61); 280 (1,61); 288 (1,61); 304 (1,56) nm ($\log \epsilon$).

$C_{10}H_{16}O_2$ (168,23) Ber. C 71,39 H 9,59% Gef. C 71,59 H 9,60%

3.2. 6-exo-Acetoxy-fenchon (6 β -Acetoxy-1,3,3-trimethyl-nor-bornan-2-on) (**2a**). Eine Lösung von 58 mg 6-exo-Hydroxy-fenchon (**1a**) in 1,5 ml abs. Pyridin und 1,35 ml Acetanhydrid wurde bei 36° stehengelassen. Nach 40 Std. wurde mit Eis versetzt, mit HCl kongosauer gestellt und 4mal mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Nach 3maligem Waschen mit Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonne resultierten 57 mg Rohprodukt, das durch Chromatographie an 6 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:2) als Elutionsmittel gereinigt wurde. Es resultierten 45 mg farbloses Öl; $[\alpha]_D^{22} = +16^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 0,813$ in Chloroform).

3.3. 5-exo-Acetoxy-fenchon (5 β -Acetoxy-1,3,3-trimethyl-nor-bornan-2-on) (**5a**). Eine Lösung von 70 mg 5-exo-Hydroxy-fenchon (**4a**) ergab nach der wie bei 3.2. durchgeführten Acetylierung 72 mg Rohprodukt, das durch Chromatographie an 10 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:2) als Elutionsmittel, gereinigt wurde. Es resultierte ein farbloses Öl, das nach längerem Stehen bei –8° Kristalle vom Smp. 27–28° ergab; $[\alpha]_D^{22} = +19^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1,025$ in Chloroform). Signale im NMR.-Spektrum in Deuteriochloroform: 5,18 ppm (Dublett von H an C-3; $J = 5,4$ Hz); 2,05 ppm Singulett (CH_3CO-); 1,15–1,05 ppm (3 CH_3-).

3.4. 1,3,3-Trimethyl-nor-bornan-2,6-dion (**6a**) aus **1a**. Eine Lösung von 180 mg 6-exo-Hydroxy-fenchon (**1a**) in 10 ml Eisessig wurde mit 10 ml 4-proz. CrO_3 -Lösung (4 g CrO_3 in 100 ml Eisessig + 2 ml H_2O) bei 22° versetzt. Nach 4 Std. Rühren wurde die Lösung mit der doppelten Menge Wasser versetzt, mit 50-proz. KOH neutralisiert und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit 2N H_2SO_4 , 10-proz. $KHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Das an 20 g Kieselgel chromatographierte Rohprodukt (Elutionsmittel: Äther-Petroläther-(3:2)) ergab nach Umkristallisieren aus Pentan 146 mg farblose Kristalle vom Smp. 27–28°; $[\alpha]_D^{24} = +29^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1,792$ in Chloroform). IR- und UV.-Spektrum vgl. theoret. Teil.

$C_{10}H_{14}O_2$ (166,21) Ber. C 72,26 H 8,49% Gef. C 72,01 H 8,51%

3.5. 1,5,5-Trimethyl-nor-bornan-2,5-dion (**8a**) aus **4a**. Eine Lösung von 200 mg 5-exo-Hydroxy-fenchon (**4a**) in 10 ml Eisessig wurde mit 10 ml 4-proz. CrO_3 -Lösung versetzt und 16 Std. bei 22° stehengelassen. Die wie bei 3.5. beschriebene Aufarbeitung ergab nach chromatographischer Reinigung an 15 g Kieselgel mit Äther-Petroläther-(3:2) als Elutionsmittel und Kristallisation aus Pentan 162 mg farblose Nadeln vom Smp. 44–45°; $[\alpha]_D^{24} = +80^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1,055$ in Chloroform). IR.-Spektrum vgl. theoret. Teil.

$C_{10}H_{14}O_2$ (166,21) Ber. C 72,26 H 8,49% Gef. C 72,18 H 8,47%

3.6. Spaltung von 1,3,3-Trimethyl-nor-bornan-2,6-dion (**6a**) mit KOH. Eine Lösung von 62 mg **6a** in 1-proz. methanolischer KOH wurde 3 Std. bei 48° stehengelassen. Ausschütteln mit Methylenchlorid ergab keinen Eindampfrückstand. Hierauf wurde die Reaktionslösung mit verd. H_2SO_4 kongosauer gestellt und erneut mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und über eine VIGREUX-Kolonne eingedampft. Das saure Rohprodukt (58 mg) lieferte aus Pentan-Methylenchlorid-(4:1) 43 mg Kristalliat vom Smp.

75–80°, bestehend aus den Cyclopentancarbonsäuren **7** und **9**. Das Säuregemisch liess sich weder durch Umkristallisieren noch durch Dünnschichtplattenchromatographie (Fließmittel: Äther-Eisessig-(99:1)) zerlegen. Eine Probe von 28 mg wurde in 3 ml abs. Äther gelöst und bei 22° mit einem Überschuss einer frisch bereiteten Lösung von Diazomethan in Äther versetzt. Nach 5 Min. wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand nochmals analog mit ätherischem Diazomethan behandelt. Nach Eindampfen resultierten 22 mg farblose Flüssigkeit. Im Dünnschichtchromatogramm in zwei Fließmitteln (Methanol-Methylenchlorid-(1:99) und Äther-Petroläther-(5:3)) liessen sich die beiden erhaltenen isomeren Methylester nicht trennen. Gas-chromatographische Trennversuche an verschiedenen Säulen (Carbowax, Silicon, Marlophen und Neopentylglycol-succinat-H₃PO₄) waren ebenfalls erfolglos.

3.7. Reinigung von (-)-Fenchon (3b) über das Semicarbazon (vgl. [8]). Eine Lösung von 10 g rohem (-)-Fenchon (Präparat der FLUKA AG., Buchs SG; enthält nach dem Gas-Chromatogramm weitere nicht identifizierte Stoffe, die weder mit Campher noch mit Isofenchon identisch sind) in 50 ml Äthanol wurde mit 10 g Semicarbazid-hydrochlorid und 10 g Na-Acetat in 20 ml Wasser versetzt und vier Tage bei 22° gerührt. Darauf wurde die Lösung vier Wochen bei 22° stehengelassen. Das noch klare Reaktionsprodukt wurde zu 200 ml Wasser gegeben, wobei sich ein Niederschlag bildete, und mit Wasserdampf destilliert. Dadurch liessen sich unverändertes Fenchon und weitere wasserdampfflüchtige Terpene abscheiden. Das nicht wasserdampfflüchtige, rohe Fenchon-semicarbazon ergab nach 3maliger Umkristallisation aus Äthanol-Wasser 3,18 g Nadeln vom Smp. 181–182°. 3,10 g dieser Kristalle wurden in 75 ml H₂SO₄-H₂O-(1:2) unter Rühren bei 50° gelöst, und nach 3,5 Min. mit der doppelten Menge Eiswasser versetzt und schliesslich mit Petroläther ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit 10-proz. KHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und über eine VIGREUX-Kolonnen eingedampft. Es resultierten 1,76 g (-)-Fenchon (**3b**); $[\alpha]_D^{24} = -71^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,52$ in Äthanol). Nach Gas-Chromatographie war das Präparat mindestens zu 99% rein.

3.8. Umsetzung von (-)-Fenchon (3b) mit A. orchidis. 8,5 ml einer Lösung von 1,22 g (-)-Fenchon in Methanol wurden auf 17 l-Liter-ERLENMEYER-Kolben gleichmässig verteilt, welche das Pilzmycel von *A. orchidis* in je 150 ml Nährlösung enthielten, das während 60 Std. auf der rotierenden Schüttelmaschine gewachsen war. Der nach den Angaben von 3.1. erhaltene Rohextrakt (752 mg) wurde zweimal an je 100 g Kieselgel (Elutionsmittel: Äther-Petroläther-(4:1)) chromatographiert. Aus Pentan-Methylenchlorid-(9:1) resultierten 79 mg 6-*exo*-Hydroxy-fenchon (6 β -Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on) (**1b**) vom Smp. 70–70,5°; $[\alpha]_D^{24} = -47^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1,983$ in Chloroform); sowie 59 mg 5-*exo*-Hydroxy-fenchon (3 β -Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on) (**4b**) vom Smp. 84,5–85°; $[\alpha]_D^{24} = -60^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1,491$ in Chloroform). Das IR.-Spektrum von **1b** ist identisch mit demjenigen von **1a**, das IR.-Spektrum von **4b** mit demjenigen von **4a**.

4. Hydroxylierung von (+)- und (-)-Isofenchon

4.1. Umsetzung von (-)-Isofenchon (11a) mit A. orchidis. 12 ml einer Lösung von 1,48 g (-)-Isofenchon in Methanol wurden auf 24 l-Liter-ERLENMEYER-Kolben verteilt, die Mycel von *A. orchidis* in je 150 ml Nährlösung enthielten, das während 60 Std. auf der rotierenden Schüttelmaschine gewachsen war. Die Umsetzung wurde bei 28° während 84 Std. durchgeführt und anhand der Dünnschichtchromatographie von entnommenen Proben verfolgt. Nach Abfiltrieren des Mycels und Nachwaschen mit Methylenchlorid-Methanol-(9:1) wurde die wässrige Lösung 4mal mit je 300 ml Methylenchlorid-Methanol-(9:1) extrahiert. Die dabei entstandene Emulsion trennte sich beim langsamen Filtrieren durch Watte. Nach Waschen mit Wasser, Trocknen über Na₂SO₄ und Eindampfen über eine VIGREUX-Kolonnen wurden 695 mg Rohprodukt erhalten, das im Dünnschichtchromatogramm neben Edukt zwei langsamer laufende Flecke erkennen liess. Weitere sechs schwache Flecke waren sichtbar, die nicht isoliert wurden (vgl. 3.1.). Nach dreimaliger Chromatographie des Rohprodukts (784 mg) an 225 g Kieselgel (Elutionsmittel: Äther-Petroläther-(4:1)) waren beide Flecke getrennt und weitgehend gereinigt. Sie fielen als Öle an, die nach einiger Zeit zu einer Kristallmasse erstarrten. Umkristallisieren gelang nicht. Erhalten wurden:

1) 115 mg 6-*exo*-Hydroxy-isofenchon (6 β -Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on) (**10a**) vom Smp. 63–64,5°; $[\alpha]_D^{23} = -28^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 2,670$ in Chloroform). NMR.- und IR.-Spektren vgl. theoret. Teil.

C₁₀H₁₆O₂ (168,23) Ber. C 71,39 H 9,59% Gef. C 71,21 H 9,93%

2) 131 mg *6-endo-Hydroxy-isofenchon* (*6 α -Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on*) (**12a**) vom Smp. 70–71,5°; $[\alpha]_D^{23} = -18^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 5,025$ in Chloroform). NMR.- und IR.-Spektren vgl. theoret. Teil.

$C_{10}H_{16}O_2$ (168,23) Ber. C 71,39 H 9,95% Gef. C 71,27 H 9,86%

4.2. *1,3,3-Trimethyl-nor-bornan-2,6-dion* (**6a**) aus **10a** bzw. **12a**. Eine Lösung von 45 mg *6-endo-Hydroxy-isofenchon* (**10a**) in 5 ml Eisessig wurde bei 22° mit 5 ml 4-proz. CrO_3 -Lösung (4 g CrO_3 in 100 ml Eisessig + 2 ml H_2O) versetzt. Nach 4 Std. wurde die Lösung mit der 3fachen Menge Wasser versetzt, mit 50-proz. KOH neutralisiert und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Die Auszüge wurden mit 2N H_2SO_4 , 10-proz. $KHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und über eine VIGREUX-Kolonnen eingedampft. Das an 5 g Kieselgel chromatographierte Rohprodukt (Elutionsmittel: Äther-Petroläther-(3:2)) ergab nach dem Umkristallisieren aus Pentan 35 mg farblose Kristalle vom Smp. 27–28°; $[\alpha]_D^{24} = +32^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 1,568$ in Chloroform); Misch-Smp. mit **6a** aus **1a** (s. 3.4.) ohne Depression. Die IR.-Spektren waren identisch. – Die analoge Reaktion mit 45 mg *6-exo-Hydroxy-isofenchon* (**12a**) ergab 32 mg krist. **6a**.

4.3. *Umsetzung von (+)-Isufenchon* (**11b**) mit *A. orchidis*. 5 ml einer Lösung von 730 mg (+)-Isufenchon in Methanol wurden auf 10 l-Liter-ERLENMEYER-Kolben verteilt, die Mycel von *A. orchidis* in je 150 ml Nährlösung enthielten, das während 60 Std. auf der rotierenden Schüttelmaschine gewachsen war. Bei der Umsetzung und Isolierung wurde wie bei 4.1. beschrieben vorgefahren. Nach 3maliger Chromatographie des Rohproduktes (378 mg) an 100 g Kieselgel (Elutionsmittel: Äther-Petroläther-(4:1)) konnten die zwei Hydroxylierungsprodukte **10b** und **12b** getrennt und weitgehend gereinigt werden. Sie fielen als Öle an, die nach einiger Zeit zu einer Kristallmasse erstarrten, sich aber nicht umkristallisieren liessen. Erhalten wurden: 1) 61 mg *6-exo-Hydroxy-isofenchon* (*6 β -Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on*) (**10b**) vom Smp. 63–64,5°; $[\alpha]_D^{23} = +25^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 2,132$ in Chloroform). Das IR.-Spektrum war mit demjenigen von **10a** identisch; 2) 64 mg *6-endo-Hydroxy-isofenchon* (*6 α -Hydroxy-1,5,5-trimethyl-nor-bornan-2-on*) (**12b**) vom Smp. 70–71,5°; $[\alpha]_D^{23} = +20^\circ \pm 3^\circ$ ($c = 2,013$ in Chloroform). Das IR.-Spektrum war mit demjenigen von **12a** identisch.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 17. Mitteilung: B. PFRUNDER & CH. TAMM, *Helv.* 52, 1630 (1969).
- [2] P. J. CHAPMAN, G. MEERMAN, I. C. GUNSALUS, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 20, 104 (1965).
- [3] CH. TAMM & R. ALBRECHT, *Helv.* 43, 768 (1960); H. MÜHLE & CH. TAMM, *Helv.* 46, 268 (1963).
- [4] F. L. A. ANET, *Canad. J. Chemistry* 39, 786 (1961).
- [5] M. KARPLUS, *J. chem. Physics* 33, 316 (1960).
- [6] G. R. DUNCAN, *J. Chromatography* 8, 37 (1962).
- [7] Vgl. E. STAHL, «Dünnschichtchromatographie», 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Göttingen und Heidelberg 1967.
- [8] O. WALLACH, *Liebigs Ann. Chem.* 269, 326 (1892).