

Weitere Voraussagen der Theorie betreffen die Vorgänge beim Kerneinfang eines K^- -Mesons. Da sich S hierbei ebenfalls nicht ändern kann, muß ein solcher Einfang immer zur

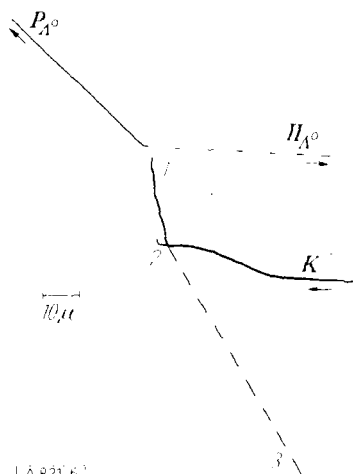


Bild 6

Prinzipische Skizze eines K^- -Einfanges in Ruhe. Das Ereignis wurde in der Kernemulsion beobachtet. Die Spuren 1, 2 und 3 stammen wahrscheinlich von Protonen oder α -Teilchen. Das gleichzeitig emittierte Λ^0 -Hyperon zerfällt hier zufällig bereits nach 10^{-12} sec (beobachtet in Bern)

Bildung eines Hyperons führen, das dieselbe Strangeness hat, wie das K^- -Meson. Die meisten Kerneinfänge von K^- -Mesonen wurden bis jetzt in der Kernemulsion beobachtet. Hierbei stellte man fest, daß tatsächlich ein verhältnismäßig großer Bruchteil der bei solchen Einfängen emittierten Teilchen Hyperonen oder Hyperfragmente sind.

Der Erfolg dieses Schemas darf aber nicht darüber hinwegtäuschen, daß viele der wesentlichen Probleme ungeklärt sind. Zunächst einmal ist unbekannt, was dieses Ordnungsschema physikalisch bedeutet, mit andern Worten, wie man es durch Erweiterung unserer Vorstellungen zwanglos erhalten könnte. Die Situation erinnert an die Zeit der Erforschung der Elektronenhülle, wo zwar die *Balmersche Serienformel* die Berechnung der Spektrallinien des H-Atoms mit guter Genauigkeit gestattete, aber ihre Begründung unbekannt war. Diese folgte bekanntlich erst viel später durch die Quantenmechanik. Daneben bleiben noch viele andere Fragen offen. Sie betreffen vor allem eine befriedigende Begründung der Vielzahl von gefundenen Elementarteilchen, sowie ihre Eigenschaften, wie Masse, Lebensdauer, Spin u. a. Bei der Untersuchung dieser Fragen sind wegen ihres fundamentalen Charakters ohne Zweifel noch bedeutsame Ergebnisse zu erwarten.

Eingegangen am 1. April 1957 [A 821]

Mikrobiologische Umwandlungen von Steroiden für technische Zwecke

Von Dr. E. VISCHER und Dr. Dr. h. c. A. WETTSTEIN

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel

Mikrobiologische Umwandlungen von Steroiden werden technisch verwendet, wenn die chemischen Methoden schwierig oder nicht ausreichend sind. Zunächst wird eine Übersicht über die möglichen Reaktionstypen, wie Hydroxylierung, Dehydrierung, Seitenketten-Abbau, stereospezifische Einwirkung auf Razemate usw. gegeben. Für die mikrobiologische Reaktion wird das gelöste Steroid zur Kultur des betreffenden Mikroorganismus zugegeben; nach einer gewissen Inkubationszeit werden die umgewandelten Steroide extrahiert und direkt oder, wenn Nebenprodukte entstanden sind, durch Gegenstromverteilung oder Chromatographie isoliert. Technisch werden besonders die Hydroxylierung in 11 α -, 11 β - und 21-Stellung, die 1,2-Dehydrierung sowie der Abbau von Seitenketten benutzt.

1. Einleitung

Vor genau 20 Jahren wurde erstmals beobachtet, daß bestimmte Mikroorganismen Enzyme produzieren, die Steroide in spezifischer Art und Weise anzugreifen vermögen. Die frühesten Arbeiten in dieser Richtung¹⁾, die mit den Namen von *Mamoli*, *Vercellone*, *Ercoli*, *Arnaudi*, *Butenandt* und *Wettstein* verbunden sind, betrafen fast ausschließlich Umwandlungen von Pregnan- und Androstan-Verbindungen mit Hilfe von Bakterien und gärenden Hefen. Dabei wurde einerseits Hydrierung von Carbonyl-Gruppen und dazu konjugierter C=C-Doppelbindungen und andererseits Dehydrierung von sekundären Hydroxyl-Gruppen beobachtet. Diese enzymatischen Reaktionen sind wohl theoretisch interessant, sie wurden aber in der Technik wohl kaum für die Herstellung von Steroidhormonen verwendet, da die entsprechenden Reaktionen auf chemischem Wege einfacher und billiger gelingen.

1949 beschrieben *Krámlí* und *Horváth*²⁾ erstmals die enzymatische Einführung einer Hydroxyl-Funktion in das

Steroid-Gerüst auf mikrobiologischem Wege, nämlich die Überführung von Cholesterin in 7-Hydroxy-cholesterin. Doch erst 1952 fanden solche Umwandlungen von Steroiden allgemeines Interesse, als nämlich *Peterson* und *Murray*^{3, 4)} zeigen konnten, daß Steroide durch einige Mikroorganismen besonders glatt am Kohlenstoff-Atom 11 hydroxyliert werden. Es wurden so Produkte erhalten, die speziell für die Herstellung von Nebennierenrinden-Hormonen wertvoll sind, da sie die für gewisse biologische Wirkungen ausschlaggebende Sauerstoff-Funktion in 11-Stellung aufweisen. Enzymatische Reaktionen dieser Art sind darum so wichtig, weil die rein chemische Einführung der genannten Sauerstoff-Funktion recht schwierig und nur unter Verwendung vielstufiger Verfahren möglich ist.

Ähnliche Hydroxylierungen, hauptsächlich in der 11 β -, 17 α - und 21-Stellung, ferner in der 6 α -, 6 β -, 18- und 19-Stellung, können zwar auch mit Hilfe von Nebennieren-Enzymen vorgenommen werden, doch sind diese Prozesse recht umständlich und deshalb technisch kaum tragbar.

¹⁾ Übersichtsreferate: u. a. F. G. Fischer in: *Neuere Methoden der präp. org. Chemie*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1943, S. 155; O. Hanc u. E. Riedl-Tumova, *Pharmazie* 9, 877 [1954].

²⁾ A. Krámlí u. J. Horváth, *Nature* [London] 162, 619 [1948]; 163, 219 [1949].

³⁾ D. H. Peterson u. H. C. Murray, *J. Amer. chem. Soc.* 74, 1871 [1952].

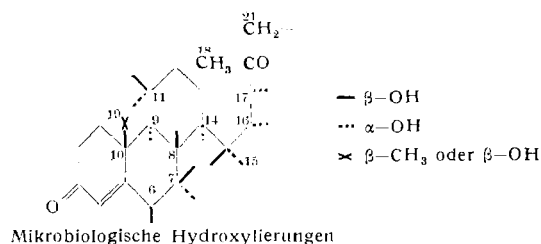
⁴⁾ D. H. Peterson u. H. C. Murray (Upjohn Co.), A. P. 2602769 vom 8. Juli 1952.

Im Gegensatz dazu lassen sich die mikrobiologischen Reaktionen ohne große Schwierigkeiten in den technischen Maßstab übertragen.

In den letzten Jahren haben sich eine ganze Anzahl von Forschungsgruppen auf dem Gebiete der mikrobiologischen Umwandlung von Steroiden betätigt und es ist erstaunlich, wie viele Reaktionstypen gefunden wurden. Dabei wurden Bakterien, Actinomyceten, Hefen und hauptsächlich niedere Pilze studiert. Im Rahmen dieses Referates kann nur auf die neuesten Übersichtsreferate von *Fried* und Mitarbeitern⁵⁾, *Peterson*⁶⁾, *Wettstein*⁷⁾, *Eppstein* und Mitarbeitern⁸⁾, *Finch*⁹⁾, *Enthoven*¹⁰⁾ und *Shull*¹¹⁾ verwiesen werden. Im folgenden Abschnitt werden lediglich die verschiedenen Reaktionstypen kurz erläutert und Arbeiten zitiert, welche in den genannten Übersichtsreferaten noch nicht berücksichtigt sind.

2. Die verschiedenen Reaktionstypen

Hydroxylierungen sind die am häufigsten aufgefundenen Reaktionen. Sie wurden bis jetzt in mindestens 13 verschiedenen Stellungen des Steroid-Gerüsts beobachtet, nämlich in der 6 β -, 7 α - und 7 β -¹²⁾, 8 β - oder 9 α -, 10 β -¹³⁾, 14 α -, 15 α - und 15 β -¹⁴⁾, 16 α -, 11 α -¹⁵⁾ und 11 β -¹⁵⁾, 17 α -¹⁶⁾

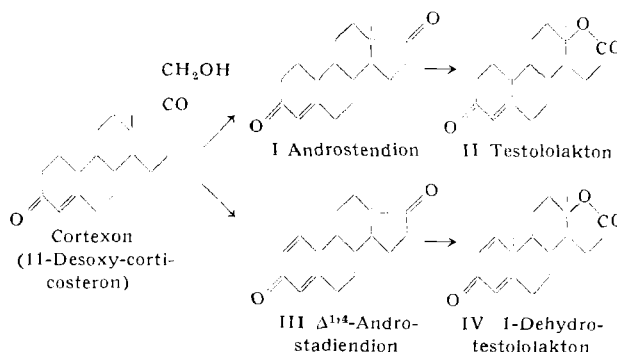


und 21-Stellung¹⁵⁾. Die vier letztgenannten Reaktionen sind für die Herstellung der Nebennierenrinden-Hormone besonders wichtig. Es ist auffallend, daß sowohl primäre, als auch sekundäre oder tertiäre Hydroxyl-Gruppen eingeführt werden können, ähnlich wie bei der Einwirkung der Nebennieren-Enzyme. Im Vergleich zu letzteren greifen aber die Enzyme aus Mikroorganismen vermehrt von der α -Seite der Molekel an, analog rein chemischen, voluminösen Agentien. Mikrobiologische Hydroxylierungen in 6 α -, 18- und 19-Stellung, wie sie in den Nebennieren stattfinden, gelangen bisher nicht.

Die enzymatische Dehydrierung von Steroiden ist eine weitere wichtige mikrobiologische Reaktion. So führen viele Organismen, hauptsächlich Bakterien, Δ^5 -3 β -Hydroxy-Steroide in die entsprechenden Δ^4 -3-Keto-Derivate, ferner gesättigte sekundäre Carbinole in die entsprechenden Ketone über; doch gelingen diese Reaktionen leicht auch auf chemischem Wege. Von großem praktischem Interesse ist die Einführung der zusätzlichen 1,2-Doppelbin-

dung in Δ^4 -3-Ketone, d. h. die Dehydrierung an den Kohlenstoff-Atomen 1 und 2¹⁵⁾.

Eine Reihe von Mikroorganismen sind befähigt, die Seitenkette von Pregnan-Verbindungen zur entsprechenden 17-Keto- oder 17 β -Hydroxy-Verbindung abzubauen. Dieser Abbau geht bei einigen Organismen noch weiter, indem der Ring D oxydativ aufgespalten wird unter Bildung eines 6-Ring-Laktons. Parallel zu diesen Reaktionen kann unter Umständen auch die 1,2-Doppelbindung im Ring A eingeführt werden.



Als weitere mikrobiologische Umwandlungen, die aber technisch weniger wichtig sind, seien genannt die Hydrierung, speziell die Überführung von 3-, 17- oder 20-Ketonen¹⁷⁾ in die entsprechenden Alkohole sowie die reduktive Öffnung von Epoxyden¹⁸⁾, dann die Epoxylierung von Steroiden mit isolierten Doppelbindungen, z. B. in 9,11-, 14- oder 16-Stellung, und schließlich die Hydrolyse von Estern und Äthern, beispielsweise Acetaten, Glucuroniden oder Glykosiden.

Die mikrobiologischen Reaktionen verlaufen selten ganz einheitlich. Bei den Hydroxylierungen beobachtet man oft die gleichzeitige Bildung von mehreren Monohydroxy-Steroiden oder von einem Gemisch von Monohydroxy- und Polyhydroxy-Derivaten. Auch kommen gemischte Reaktionen vor; so wurde z. B. parallel zu einer Hydroxylierung Absättigung einer C=C-Doppelbindung¹⁹⁾ oder gleichzeitig mit einer Dehydrierung in 1,2-Stellung eine Reduktion der 20-Keto-Gruppe beobachtet²⁰⁾. Gemischte Reaktionen bei gleichzeitigem Einwirken mehrerer Mikroorganismen sind verschiedentlich in der Patentliteratur beschrieben worden.

Schon länger ist bekannt, daß z. B. die mikrobiologischen Hydroxylierungen, Hydrierungen und Epoxylierungen einen stereospezifischen Verlauf nehmen, indem man ausschließlich das eine der beiden möglichen stereoisomeren Derivate der natürlichen optisch aktiven Steroide erhält. Erst kürzlich fanden wir²¹⁾ nun, daß bei der Einwirkung auf die geprüften racemischen Steroid-Verbindungen nur das natürliche Enantiomere umgewandelt und damit eine glatte Racematspaltung erzielt wird; bei Racematen einfacherer cycloaliphatischer Ketone trat in absolutem Sinne sterisch identische Reduktion beider Antipoden ein und damit auch hier im Endeffekt Racematspaltung²²⁾.

⁵⁾ J. Fried, R. W. Thoma, D. Perlman, J. E. Herz u. A. Borman, Recent Progr. Hormone Research 11, 149 [1955].

⁶⁾ D. H. Peterson in: Perspectives and Horizons in Microbiology, Rutgers Univ. Press, New Brunswick, N. J. 1955, S. 121.

⁷⁾ A. Wettstein, Experientia [Basel] 11, 465 [1955].

⁸⁾ S. H. Eppstein, P. D. Meister, H. C. Murray u. D. H. Peterson, Vitamins and Hormones 14, 359 [1956].

⁹⁾ C. A. Finch, Manufact. Chemist 25, 247 [1954]; 26, 118 [1955]; 27, 468 [1956].

¹⁰⁾ P. H. Enthoven, Chem. Weekbl. 52, 166 [1956].

¹¹⁾ G. M. Shull, Trans. N. Y. Acad. Scie. 19 11, 147 [1956].

¹²⁾ Nur bei 4,5-gesättigten Verbindungen.

¹³⁾ Bei der Inkubation von 19-Nor-testosteron; vgl. Pederson u. Mitarb., J. Amer. chem. Soc. 78, 1512 [1956]; 10 β -Orientierung gemäß Privatmittelg. Dr. Peterson.

¹⁴⁾ S. neuerdings S. Bernstein u. Mitarb., Chem. and Ind. 1956, 111; B. Camerino, R. Modelli u. C. Spalla, Gazz. chim. ital. 86, 1226 [1956]; B. Klüger, R. Siebert u. A. Schubert, Naturwissenschaften 44, 40 [1957].

¹⁵⁾ Literatur s. Abschnitt 4.

¹⁶⁾ S. neuerdings: W. J. McAleer u. E. L. Dulaney, Arch. Biochem. Biophysics 62, 111 [1956].

¹⁷⁾ S. neuerdings: S. A. Szpilfogel, M. S. de Winter u. W. J. Altsche, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 75, 402 [1956]; vgl. Fussn. 40a).

¹⁸⁾ B. Camerino u. A. Vercellone, Gazz. chim. ital. 86, 260 [1956].

¹⁹⁾ D. H. Peterson, S. H. Eppstein, P. D. Meister, B. J. Magerlein, H. C. Murray, H. M. Leigh, A. Weintraub u. L. M. Reineke, J. Amer. chem. Soc. 75, 412 [1953]; D. H. Peterson, H. C. Murray, S. H. Eppstein, L. M. Reineke, A. Weintraub, P. D. Meister u. H. M. Leigh, J. Amer. chem. Soc. 74, 5933 [1952].

²⁰⁾ S. A. Szpilfogel, P. A. van Hemert u. M. S. de Winter, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 75, 1227 [1956].

²¹⁾ E. Vischer, J. Schmidlin u. A. Wettstein, Experientia [Basel] 12, 50 [1956].

²²⁾ V. Prelog u. W. Acklin, Helv. chim. Acta 39, 748 [1956].

Der Mechanismus mikrobiologischer Hydroxylierungen sowie solcher mit Nebennieren-Enzymen scheint auf einer direkten Einführung von atmosphärischem Sauerstoff zu beruhen²³⁾.

3. Reaktionsbedingungen

Auf die mikrobiologischen Reaktionen wurden die Erfahrungen und Kenntnisse übertragen, die in den letzten 15 Jahren bei der Erforschung und industriellen Herstellung der Antibiotika gewonnen worden waren. Prinzipiell geht man folgendermaßen vor: Man züchtet den Mikroorganismus submers unter aeroben Bedingungen und unter Schütteln oder Rühren²⁴⁾, d. h. in Schüttelkolben oder Gärtanks, wobei Nährlösungen von möglichst einfacher Zusammensetzung verwendet werden. Die Temperatur²⁴⁾ wird je nach den Bedürfnissen des verwendeten Organismus zwischen 24 und 30 °C gehalten.

Man gibt das umzuwandelnde Steroid, gelöst in Alkohol, Aceton, Propylenglykol oder einem anderen mit Wasser mischbaren und für den Mikroorganismus wenig toxischen Lösungsmittel, entweder schon zur unbeimpften Nährlösung oder erst zur angewachsenen Kultur zu, und zwar auf einmal oder portionenweise. Meist wird die Zugabe zur Kultur bevorzugt, doch scheint der Zeitpunkt der Zugabe²⁴⁾ keinen ausschlaggebenden Einfluß auf die nachfolgende enzymatische Umwandlung zu haben. Die Kultur wird darauf für eine gewisse Inkubations-Zeit, die je nach Umsetzung einige Stunden bis Tage beträgt, unter den gleichen Bedingungen gehalten.

²³⁾ M. Hayano, M. C. Lindberg, R. I. Dorfman, J. E. H. Hancock u. W. von E. Doering, Arch. Biochem. Biophysics 59, 529 [1955]; M. Hayano, A. Saito, D. Stone u. R. I. Dorfman, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 21, 380 [1956]; M. L. Sweat, R. A. Aldrich, C. H. de Bruin, W. L. Fowlks, L. R. Heisell u. S. H. Mason, Fed. Proc. 15, 367 [1956].

²⁴⁾ Über den Einfluß der Versuchsbedingungen, wie mechanisches Rühren, Belüften, Temperatur und Art der Zugabe des Steroids am Beispiel der 11 α -Hydroxylierung, siehe Abschnitt 4.

Gelegentlich hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Pilzkulturen vor der Zugabe der Substrate unter sterilen Bedingungen zu filtrieren und dann die Steroide entweder mit dem Kulturfiltrat⁴⁾ oder mit der wäßrigen Suspension des Mycels²⁵⁾ allein zu inkubieren. Im letzteren Falle haftet das Enzym offenbar am Mycel, obschon die Steroid-Umwandlung extrazellulär stattfinden soll²⁶⁾.

Nach der Inkubation werden die Steroide aus dem Kulturfiltrat, dem Mycel oder direkt aus der ganzen Kultur extrahiert, wozu sich viele organische Lösungsmittel eignen. Am häufigsten werden Chloroform, Methylenchlorid oder Essigester verwendet. Es ist gelegentlich empfehlenswert, Kulturfiltrat und Mycel gesondert zu extrahieren und aufzuarbeiten, insbes. wenn sich aus dem Kulturfiltrat das einheitliche Umwandlungsprodukt gewinnen läßt, während im Mycel daneben noch das nicht umgesetzte Ausgangsmaterial zu finden ist. Statt durch Extraktion kann man die fermentierten Steroide auch durch Adsorption isolieren²⁷⁾. Hierzu rührt man nach beendeter Inkubation beispielsweise Aktivkohle (4 g Kohle pro g eingesetztes Steroid) und ein Filterhilfsmittel in die Kultur ein, wobei die Steroide quantitativ adsorbiert werden. Nach der Filtration können die Steroide mit geeigneten Lösungsmitteln stufenweise aus dem Filterkuchen eluiert werden, so daß bereits eine gewisse Auftrennung des Gemisches erzielt wird.

Die Isolierung der Umwandlungsprodukte in reiner Form bietet keine Schwierigkeiten, wenn die betreffende mikrobiologische Reaktion einheitlich und mit guter Ausbeute verläuft. In diesem Falle kann das Produkt direkt aus dem Rohextrakt kristallisiert werden. Wie aber bereits angedeutet wurde, entstehen bei diesen enzymatischen Umsetzungen häufig mehrere Produkte nebeneinander. Dann

²⁵⁾ G. M. Shull u. D. A. Kita, J. Amer. chem. Soc. 77, 763 [1955].

²⁶⁾ L. Bourgain, Dissert. Univ. Nancy 1956.

²⁷⁾ S. H. Eppstein u. H. M. Leigh (Upjohn Co.), A. P. 2759004 vom 14. August 1956.

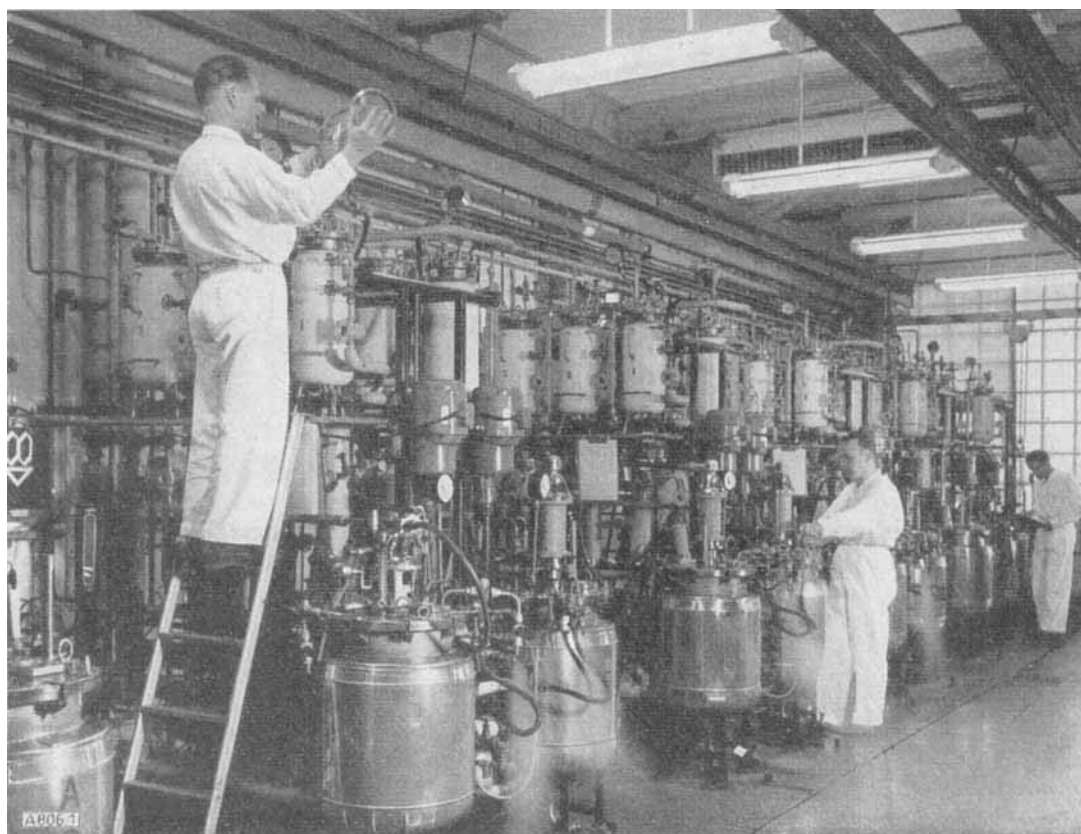


Bild 1. Biotische Entwicklungsabteilung der CIBA-Aktiengesellschaft in Basel: 501 Gärtanks mit Hilfsaggregaten

enthalten die Extrakte mehr oder weniger komplexe Steroid-Gemische, die in ihre Komponenten aufgetrennt werden müssen. Dies geschieht am besten durch Gegenstromverteilung oder Chromatographie an Aluminiumoxyd, Silicagel, Kieselgur und dergleichen. Auf Einzelheiten dieser Methoden kann hier nicht eingegangen werden. Die Identifizierung der so gewonnenen einheitlichen Umwandlungsprodukte geschieht schließlich mit den klassischen chemischen und physikalischen Methoden.

Ein unentbehrliches Hilfsmittel bei allen diesen Operationen ist die Papierchromatographie²⁸⁾. Es darf behauptet werden, daß ohne sie die rasche Entwicklung der Steroid-Fermentationen nicht möglich gewesen wäre. Man verwendet die Papierchromatographie erstens, um während der Inkubation der Steroide laufend den Grad der Umwandlung festzustellen. Weiter werden mit ihrer Hilfe die bei der Auftrennung der Steroid-Gemische anfallenden Fraktionen auf ihre Einheitlichkeit geprüft, und schließlich gibt sie bei der Identifikation wichtige Hinweise (Polarität, verschiedene Farbreaktionen, UV-Absorption) auf die Konstitution der erhaltenen Produkte. Oft ist sie auch die beste Methode, um komplizierte Fermentationsgemische präparativ aufzutrennen, wobei besonders der sog. „Chromatoblock“²⁹⁾ für Mengen bis zu einigen Gramm gute Dienste leistet.

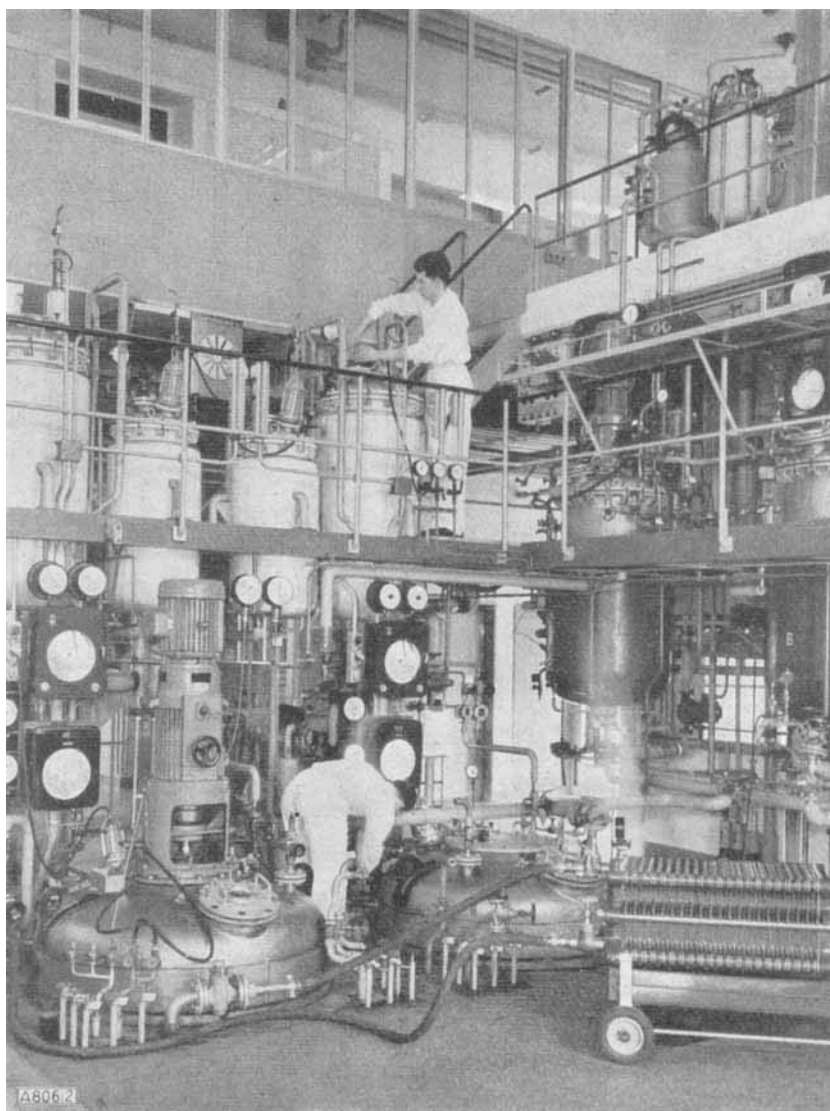


Bild 2. Biotische Entwicklungsabteilung der CIBA-Aktiengesellschaft in Basel: rechts auf Zwischenboden 500 l Gärtanks, links unten 5000 l Fermenter mit Rührerantrieb und Zulaufgefäßen

4. Technisch verwertbare Steroid-Fermentationen

Die Anwendung der mikrobiologischen Reaktionen in der Technik ist natürlich eine Frage der Wirtschaftlichkeit. Die Fermentation ist ein relativ teures Verfahren und lohnt sich nur, wenn sie zu Produkten führt, die mit chemischen Methoden gar nicht oder nur über vielstufige Prozesse erhältlich sind.

Die technisch verwendeten Apparaturen sind im Prinzip die gleichen, wie sie bei der Antibiotika-Fabrikation gebraucht werden, so daß sich eine nähere Beschreibung erübrigt. Auch hier wird von Kulturen in kleinstem Maßstabe ausgegangen, welche dann in Fermentern von beispielsweise 50 l Inhalt (s. Bild 1) herangezüchtet werden, die wiederum zum Animpfen größerer Gärtanks dienen (s. Bild 2). In den letzten und größten Gärtanks, die ein Fassungsvermögen von bis zu 100000 l haben, können dann die Steroide in Mengen von vielen kg inkubiert werden. Es ist klar, daß für die Technik nur enzymatische Reaktionen in Frage kommen, die überwiegend einheitlich verlaufen, da z. B. die

chromatographische Auftrennung von solchen Mengen eines komplizierteren Steroid-Gemisches nur schwierig zu bewerkstelligen ist. Zur Trennung im Großen bedient man sich meist, insbes. dann wenn Adsorptionsmethoden versagen, der Gegenstromverteilung unter Benützung der bekannten Luwesta- oder *Podbielniak*-Apparaturen. Gelegentlich ließen sich auch primär ziemlich uneinheitlich verlaufende Reaktionen durch geeignete Maßnahmen technisch so vervollkommen, daß die Bildung unerwünschter Nebenprodukte auf ein erträgliches Maß herabgesetzt wurde.

Die 11 α -Hydroxylierung

Für diese Reaktion werden technisch wohl ausschließlich Pilze verwendet, insbes. *Mucorales* der Gattung *Rhizopus* oder *Aspergillus*, obschon auch *Actinomyceten* die 11 α -Hydroxylierung bewirken können. Wie schon erwähnt, beschrieben *Peterson* und *Murray*^{3, 4)} als erste die Umwandlung von Progesteron in 11 α -Hydroxy-progesteron durch einen Stamm von *Rhizopus arrhizus* mit einer Ausbeute von 10%. Wenig später schon wurden 30–50proz. Ausbeuten erzielt mit einer nicht weiter definierten *Rhizopus* sp.^{30, 31)}

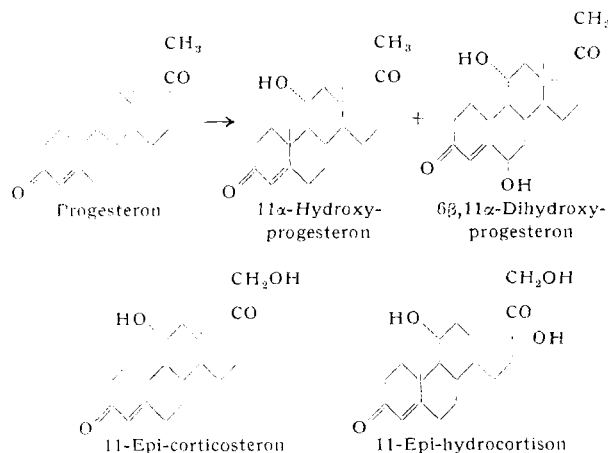
²⁸⁾ R. Neher: Chromatographie des stéroïdes in E. Lederer, ed.; La chromatographie en chimie organique, Masson et Cie., Paris, in Vorbereitung [1958]; E. Heftmann, Chem. Reviews 55, 679 [1955]; I. E. Bush, Brit. med. Bull. 10, 229 [1954]; Recent Progr. Hormone Res. 9, 321 [1954]; K. Savard, ebenda 9, 185 [1954]; A. Zaffaroni, ebenda 8, 51 [1953]; L. M. Reineke, Analytic. Chem. 28, 1853 [1956].

²⁹⁾ E. von Arx u. R. Neher, Helv. chim. Acta 39, 1664 [1956].

³⁰⁾ O. Mancera, A. Zaffaroni, B. A. Rubin, F. Sondheimer, G. Rosenkranz u. C. Djerassi, J. Amer. chem. Soc. 74, 3711 [1952].

³¹⁾ F. W. Kahnt, Ch. Meystre, R. Neher, E. Vischer u. A. Wettstein, Experientia [Basel] 8, 422 [1952].

und mit *Aspergillus niger*³²⁾. Bei einigen von diesen Umsetzungen entsteht als wesentliches Nebenprodukt das 6 β ,11 α -Dihydroxy-progesteron. Schließlich wurde in *Rhizopus*



*nigricans*³³⁾ der ideale Stamm gefunden, der nahezu quantitative Ausbeuten (bis 95%) an 11 α -Hydroxy-progesteron liefert. An weiteren 11 α -Hydroxylase bildenden Mikroorganismen sind z. B. *Pestalotia foedans*³⁴⁾ und *Eurotium chevalieri*³⁵⁾ bekannt.

Außer Progesteron wurden auch viele andere Steroide mit Hilfe dieser Organismen in die entsprechenden 11 α -Hydroxy-Derivate übergeführt. Man gelangte so u. a. zu den an C-11 epimeren Derivaten der genuinen Rindenhormone Corticosteron und Hydrocortison.

Die Merck-Gruppe studierte im einzelnen die Einwirkung von *Aspergillus ochraceus* in Schüttelkulturen auf Progesteron³⁶⁾. Unter normalen Bedingungen war das Progesteron nach 12 h gänzlich umgesetzt, und zwar zu 11 α -Hydroxyprogesteron (70%) und 6 β ,11 α -Dihydroxyprogesteron (15%). Bei längerer Inkubation nahm ersteres Reaktionsprodukt rasch ab und war nach 48 h völlig verschwunden, während das Dihydroxyprogesteron entsprechend zunahm. Es wurde dann gefunden, daß die unerwünschte Einführung der 6 β -Hydroxyl-Gruppe weitgehend unterbunden werden kann, wenn die Reaktion möglichst unter Ausschluss von Zink-Ionen vorgenommen wird, die offenbar für den Angriff der 6 β -Hydroxylase notwendig sind. So konnte die Ausbeute an 11 α -Hydroxyprogesteron auf über 80% gesteigert werden.

Dieselbe Reaktion mit *Aspergillus ochraceus* wurde unter verschiedenen Bedingungen im Gärtank studiert³⁷⁾. Gab man bis zu 600 mg Progesteron pro l zu, so war die maximale Umsetzung zu 11 α -Hydroxyprogesteron schon nach 4 h erreicht, bei höheren Zugaben (0,9–2,0 g Progesteron pro l) erst nach 12–16 Stunden. Längere Inkubation bewirkte wiederum die Bildung von 6 β ,11 α -Dihydroxyprogesteron. In weiteren Versuchen wurde festgestellt, daß der Zeitpunkt der gesamten Steroid-Zugabe und die Variation der Inkubationstemperatur zwischen 28 und 37 °C keinen Einfluß auf die Umsetzung haben. Hingegen ließ sich die Reaktion durch stärkere Belüftung und speziell Rührung sehr beschleunigen. Besonders erfolgreich waren Fermentationen unter starker Rührung, bei denen 4 g Progesteron pro l all-

mählich, d. h. in stündlichen Dosen von 150 mg pro l, innerhalb von 27 h zugegeben wurden. Die Umsetzung zu 11 α -Hydroxyprogesteron war hier nahezu quantitativ, und es wurden nur minimale Mengen von 6 β ,11 α -Dihydroxyprogesteron gebildet.

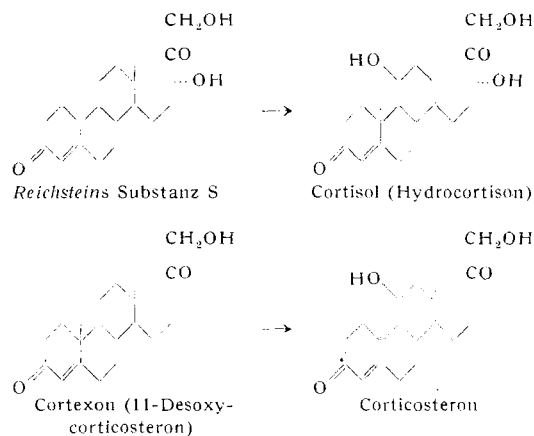
Die analogen Umsetzungen von Cortexon (11-Desoxycorticosteron) und Reichsteins Substanz S (17 α -Hydroxycortexon) zu den entsprechenden 11 α -Hydroxy-Derivaten scheinen allgemein einheitlicher zu verlaufen. Mit *Aspergillus ochraceus* werden auf alle Fälle keine weiteren Hydroxylierungsprodukte gebildet.

Abgesehen von der erwähnten Bildung von 6 β ,11 α -Dihydroxyprogesteron sind noch andere Fälle bekannt, wo parallel zur 11 α -Hydroxylierung eine weitere Hydroxyl-Gruppe eintritt. So wird z. B. Progesteron von *Cephalothecium roseum*³⁸⁾ und von *Dactylium dendroides*³⁹⁾ in 11 α ,17 α -Dihydroxyprogesteron und von *Aspergillus niger*⁴⁰⁾ in 11 α ,21-Dihydroxyprogesteron (11-Epi-corticosteron) umgewandelt^{40a)}.

Schließlich haben Dulaney und Mitarbeiter⁴¹⁾ über die Prüfung von je mehreren hundert Stämmen von *Aspergillus* und *Penicillium* auf ihre Fähigkeit zur Umwandlung von Progesteron berichtet. Bei den *Aspergilli* wurde häufig Bildung von 11 α -Hydroxyprogesteron und daraus von 6 β ,11 α -Dihydroxy- (in wenigen Fällen von 11 α ,17 α -Dihydroxy-)progesteron beobachtet. Analog lieferte Substanz S das 11-Epi-hydrocortison. Die *Penicillien* bildeten nur selten und verhältnismäßig wenig 11 α -Hydroxyprogesteron, in vielen Fällen aber ein 15-Hydroxyprogesteron.

Die 11 β -Hydroxylierung

Für die Herstellung von Nebennierenrinden-Hormonen ist die mikrobiologische 11 β -Hydroxylierung besonders wichtig, da sie direkt zu Produkten führt, in denen die 11-Hydroxyl-Gruppe die natürliche Konfiguration besitzt. Mikroorganismen, die eine 11 β -Hydroxylase produzieren, sind relativ selten. Colingsworth und Mitarbeiter⁴²⁾ konnten als erste Reichsteins Substanz S fermentativ in Cortisol (Hydrocortison) überführen, wobei sie einen Stamm von *Streptomyces fradiae* verwendeten. Die erzielten Ausbeuten waren allerdings sehr gering. Viel bessere Umset-



³²⁾ J. Fried, R. W. Thoma, J. R. Gerke, J. E. Herz, M. N. Donin u. D. Perlman, J. Amer. chem. Soc. 74, 3962 [1952].

³³⁾ D. H. Peterson, H. C. Murray, S. H. Eppstein, L. M. Reineke, A. Weintraub, P. D. Meister u. H. M. Leigh, ebenda 74, 5933 [1952].

³⁴⁾ G. M. Shull, J. L. Sardinias u. J. B. Routien (Chas. Pfizer & Co.), Can. P. 507009 vom 2. November 1954.

³⁵⁾ G. M. Shull, J. W. Davison u. J. B. Routien (Chas. Pfizer & Co.), E.P. 740858 vom 23. November 1955.

³⁶⁾ E. L. Dulaney, E. O. Stapley u. Ch. Hlavac, Mycologia 47, 464 [1955].

³⁷⁾ E. O. Karow u. D. N. Petsiavas, Ind. Engng. Chemistry 48, 2213 [1956].

³⁸⁾ P. D. Meister, L. M. Reineke, R. C. Meeks, H. C. Murray, S. H. Eppstein, H. M. Leigh Osborn, A. Weintraub u. D. H. Peterson, J. Amer. chem. Soc. 76, 4050 [1954].

³⁹⁾ E. L. Dulaney, W. J. McAleer, H. R. Barkemeyer u. Ch. Hlavac, Appl. Microbiol. 3, 372 [1955]. Dieser Mikroorganismus hydroxyliert Substanz S nur in 11 α -Stellung, 11-Desoxycorticosteron aber in 11 α - sowie in 11 α - und 17 α -Stellung.

⁴⁰⁾ E. Weisz, G. Wix u. M. Bodansky, Naturwissenschaften 43, 39 [1956].

^{40a)} Vgl. J. Schmidt-Thomé, diese Ztschr. 69, 238 [1957], wo u. a. eine gemischte 11 α - und 11 β -Hydroxylierung beschrieben ist.

⁴¹⁾ E. L. Dulaney, W. J. McAleer, M. Koslowsky, E. O. Stapley u. J. Jaglom, Appl. Microbiol. 3, 336 [1955].

⁴²⁾ D. R. Colingsworth, M. P. Brunner u. W. J. Haines, J. Amer. chem. Soc. 74, 2381 [1952].

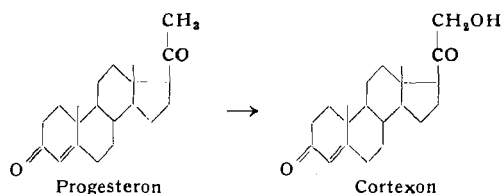
zungen wurden darauf mit *Cunninghamella blakesleeana*⁴³⁾ und mit *Curvularia lunata*²⁵⁾ erreicht. Auch ein Stamm der Gattung *Coniothyrium* scheint für diese Umsetzung brauchbar zu sein⁵⁾.

Bei der Umsetzung von Reichsteins Substanz S mit *Cunninghamella blakesleeana* entsteht neben Hydrocortison stets etwas Cortison, dessen Bildung nicht auf eine nachträgliche Oxydation des Hydrocortisons zurückgeführt wird⁴⁴⁾. Bei Zugabe verschiedener Phenole, Alkohole⁴⁵⁾, Polysaccharide und langkettiger Fettsäureester⁴⁶⁾ zu den Kulturen verläuft die Reaktion einheitlicher, und die Ausbeute an Hydrocortison kann auf 77% gesteigert werden, während man daneben noch 22% Cortison erhält.

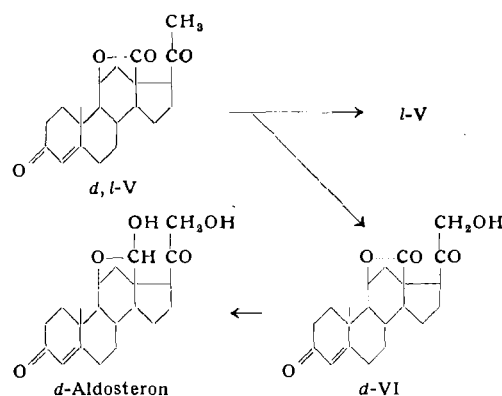
Eine interessante Hydroxylierung in 11 β - sowie in 21-Stellung, beschreiben Rubin und Mitarbeiter⁴⁷⁾, die mit einem *Curvularia lunata*-Stamm Progesteron direkt in Corticosteron überführen konnten.

Die 21-Hydroxylierung

Relativ wenige Mikroorganismen sind bekannt geworden, die die Methylketon- in eine Ketol-Seitenkette umzuwandeln vermögen. Solche Hydroxylierungen am C-21 gelangen mit *Ophiobolus herpotrichus*⁴⁸⁾, *Aspergillus niger*⁴⁹⁾ und *Wojnowicia graminis*⁵⁰⁾. So wurde u. a. Progesteron in Cortexon (11-Desoxy-corticosteron) übergeführt. An und



für sich ist diese mikrobiologische Reaktion technisch nicht sehr wichtig, da für denselben Zweck gute chemische Verfahren zur Verfügung stehen. Hingegen hat sie sich z. B. bei der Synthese des neuen, auf den Mineralstoffwechsel höchstwirksamen, genuine Rindenhormons Aldosteron als sehr nützlich erwiesen. Infolge des spezifischen Angriffes der mikrobiellen Enzyme nur auf die natürlichen Enantiomeren der Steroide, wobei die unnatürlichen Antipoden unverändert bleiben, ergab sich uns²¹⁾ die Möglichkeit, das racemische Zwischenprodukt *d,l*-V der Aldosteron-Syn-



⁴³⁾ F. R. Hanson, K. M. Mann, E. D. Nielson, H. V. Anderson, M. P. Brunner, J. N. Karnemaat, D. R. Colingsworth u. W. J. Haines, J. Amer. chem. Soc. 75, 5369 [1953].

⁴⁴⁾ F. R. Hanson, unveröffentl., zitiert aus Fußnote 8).

⁴⁵⁾ K. M. Mann, F. R. Hanson, P. W. O'Connell, H. V. Anderson, M. P. Brunner u. J. N. Karnemaat, Appl. Microbiol. 3, 14 [1955].

⁴⁶⁾ P. W. O'Connell, K. M. Mann, E. D. Nielson u. F. R. Hanson, ebenda 3, 16 [1955].

⁴⁷⁾ B. A. Rubin, C. Casas-Campillo, G. Hendrichs, F. Cordova u. A. Zaffaroni, Bacteriol. Proc. 1956, 33.

⁴⁸⁾ Ch. Meystre, E. Vischer u. A. Wettstein, Helv. chim. Acta 37, 1548 [1954].

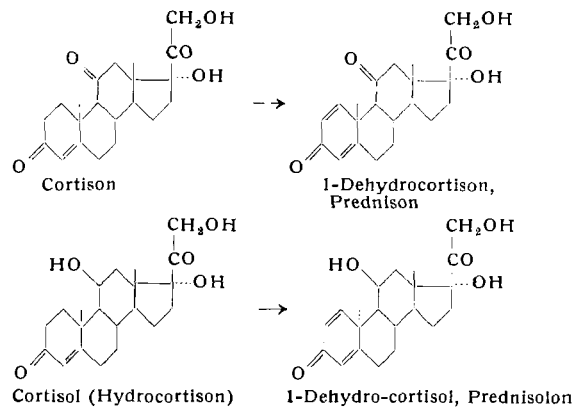
⁴⁹⁾ A. Zaffaroni, C. C. Campillo, F. Cordova u. G. Rosenkranz, Experientia [Basel] 11, 219 [1955]. Vgl. auch die 11 α ,21- und 11 β ,21-Dihydroxylierungen.

⁵⁰⁾ W. J. McAleer u. E. L. Dulaney, Arch. Biochem. Biophysics 62, 109 [1956].

these⁵¹⁾ in 21-Stellung zu hydroxylieren und gleichzeitig Racematspaltung zu bewirken. Wurde nämlich das racemische V mit *Ophiobolus herpotrichus* inkubiert, so erhielten wir das rechtsdrehende 21-Hydroxy-Derivat *d*-VI und daneben das linksdrehende Enantiomere (*l*-V) des Ausgangsmaterials. *d*-VI läßt sich durch chemische Methoden in das natürliche Aldosteron überführen.

Die 1,2-Dehydrierung

Die Einführung der 1,2-Doppelbindung im Ring A von Δ^4 -3-Keto-steroiden ist besonders wichtig, seit bekannt wurde, daß die dem Cortison und dem Hydrocortison entsprechenden 1-Dehydro-Verbindungen erhöhte Glucocorticoid- und verminderte Mineralcorticoid-Wirkungen besitzen⁵²⁾. Für die Herstellung dieser Substanzen sind neben



chemischen auch mikrobiologische Reaktionen sehr geeignet. Unter den Pilzen vermögen vor allem Stämme der Gattung *Fusarium*, *Calonectria*, *Ophiobolus*, *Alternaria*⁵³⁾ und *Didymella*⁵⁴⁾ die zusätzliche Doppelbindung mit guter Ausbeute einzuführen. Eine besonders rasche Dehydrierung wird mit *Corynebacterium simplex* erreicht⁵⁵⁾. Weiter sind für diese Umsetzung Stämme von *Bacillus sphaericus*⁵⁶⁾ und *Bacillus subtilis*⁵⁷⁾ geeignet. Bei letzterem wird interessanterweise die Ausbeute bedeutend verbessert, wenn man ihn in einer Mischkultur zusammen mit dem Pilz *Rhizopus nigricans* verwendet.

Mit diesen Organismen wurden nicht nur Cortison und Hydrocortison dehydriert, sondern es war auch möglich, andere Δ^4 -3-Keto-Steroide in die entsprechenden 1-Dehydro-Verbindungen überzuführen.

Diese 1,2-Dehydrierung geht gelegentlich parallel mit einem Abbau der Seitenkette.

Der Abbau der Seitenkette

Der Verlauf dieser Reaktion wurde bereits erläutert. Sie tritt ziemlich häufig auf, und zwar sowohl bei Pilzen als auch bei Actinomyceten. Die Methylketon-, Ketol- und Dioxyaceton-Seitenkette wird von Arten der Gattung *Aspergillus*⁵⁸⁾ und *Penicillium*^{58, 59)} leicht abgebaut; als Umsetzungsprodukte von Progesteron, Desoxycorticosteron und Substanz S erhält man so Androstendion I und Testolo-

⁵¹⁾ J. Schmidlin, G. Anner, J.-R. Billeter u. A. Wettstein, Experientia [Basel] 11, 365 [1955].

⁵²⁾ J. J. Bunim, M. M. Pechet u. A. J. Bollet, J. Amer. Med. Assoc. 157, 311 [1955].

⁵³⁾ E. Vischer, Ch. Meystre u. A. Wettstein, Helv. chim. Acta 38, 835 [1955].

⁵⁴⁾ E. Vischer, Ch. Meystre u. A. Wettstein, ebenda 38, 1502 [1955].

⁵⁵⁾ A. Noble, W. Charney, P. L. Perlman, H. L. Herzog, C. C. Payne, M. E. Tully, M. A. Jevnik u. E. B. Hershberg, J. Amer. chem. Soc. 77, 4184 [1955].

⁵⁶⁾ T. H. Stoudt, W. J. McAleer, J. M. Chernerda, M. A. Kozlowski, R. F. Hirschmann, V. Marlatt u. R. Miller, Arch. Biochemistry 59, 304 [1955].

⁵⁷⁾ F. Lindner, R. Junk, H. Kehl, G. Neesemann u. J. Schmidt-Thomé, Naturwissenschaften 43, 39 [1956].

⁵⁸⁾ D. H. Peterson, S. H. Eppstein, P. D. Meister, H. C. Murray, H. M. Leigh, A. Weintraub u. L. M. Reineke, J. Amer. chem. Soc. 75, 5768 [1953].

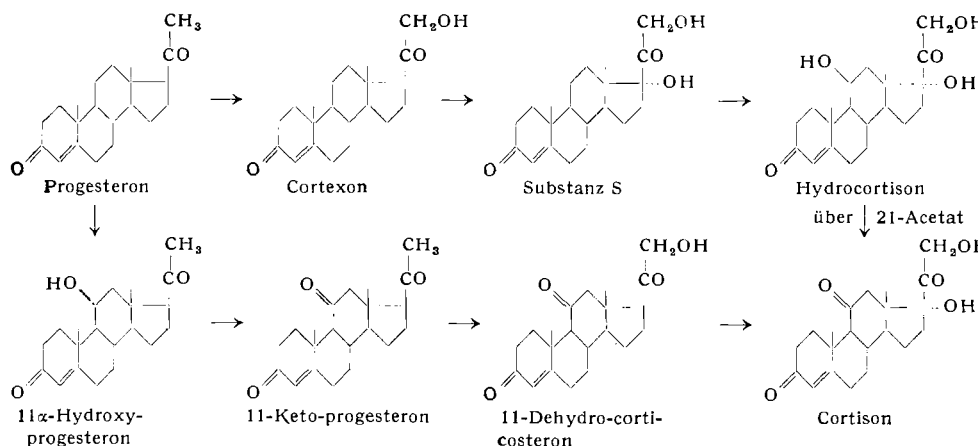
⁵⁹⁾ J. Fried, R. W. Thoma u. A. Klingsberg, ebenda 75, 5764 [1953].

laktone II. Die analoge Reaktion, aber unter gleichzeitiger Einführung der 1,2-Doppelbindung wird am Progesteron und Desoxycorticosteron von einigen *Fusarium*-Arten, besonders von *F. solani* und *F. causicum*⁶⁰⁾, bewirkt, wobei man Ausbeuten an $\Delta^1,4$ -Androstadiendion III von über 80% erzielt. Bei längerer Inkubation wird dieses weiter zu 1-Dehydro-testololaktone IV oxydiert. Im Falle von C²¹-Steroiden mit einer 17 α -Hydroxyl-Gruppe dehydriert *Fusarium* nur den Ring A, während die Seitenkette intakt bleibt^{53, 60)}. Analoge Abbaureaktionen können mit *Streptomyces lavendulae* und *Cylindrocarpon radicola*⁵⁷⁾ erreicht werden.

Die praktische Bedeutung dieser Reaktion liegt darin, daß das so in einer Stufe aus Progesteron leicht erhältliche $\Delta^1,4$ -Androstadien-3,17-dion durch Aromatisierung nach *Inhoffen*⁶¹⁾ direkt in das Follikel-Hormon Oestron übergeführt werden kann.

5. Mikrobiologische Reaktionsprodukte bei der Herstellung von Steroidhormonen

Praktisch kann man aus Progesteron ausschließlich durch drei mikrobiologische Hydroxylierungen, nämlich in der 11 β -, 17 α - und 21-Stellung, das Hydrocortison gewinnen.



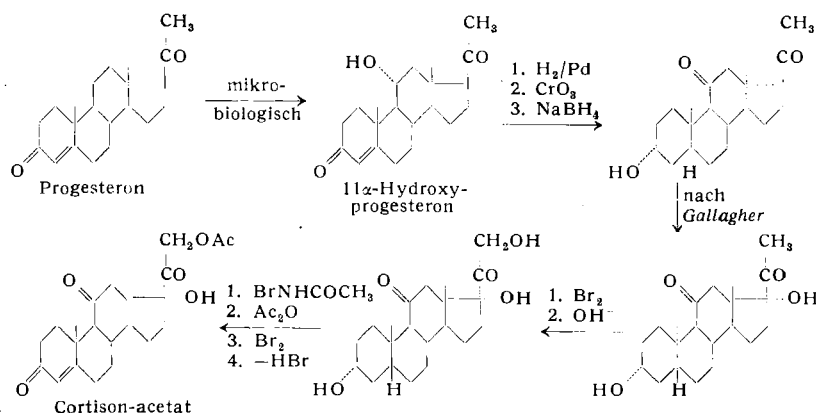
Für die Herstellung von Cortison, die zweckmäßig über die primäre 11 α -Hydroxylierung geschieht, wird zusätzlich noch eine chemische Verfahrensstufe (Oxydation) benötigt. Die zur Zeit realisierbaren Ausbeuten machen eine technische Anwendung von drei successiven mikrobiologischen Prozessen in einer Synthese wenig attraktiv, umso mehr als die Einführung der 17 α - und der 21-Hydroxyl-Gruppe auch auf rein chemischem Wege verhältnismäßig leicht gelingt.

Hingegen besitzen die 11 α - und die 11 β -Hydroxylierung für die technische Synthese der Rindenhormone größtes Interesse. Als Ausgangsmaterialien werden in erster Linie Progesteron, 17 α -Hydroxy-progesteron oder 17 α -Hydroxy-cortexon (*Reichsteins* Substanz S) verwendet.

In den letzten Jahren wurden mehrere Wege angegeben, um unter Verwendung der ausgezeichnet verlaufenden 11 α -Hydroxylierung von den genannten Ausgangsmaterialien zu Cortison und Hydrocortison zu gelangen. Hierfür sei auf

die Referate^{62, 63, 64, 9, 5, 65, 66)} verwiesen. Es seien lediglich einige Beispiele für solche Umsetzungen gegeben.

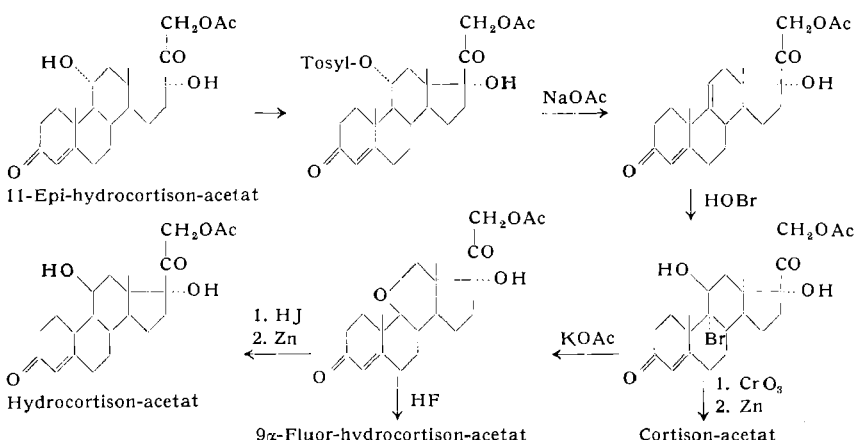
Von 11 α -Hydroxy-progesteron kann man nach



zu Cortison-acetat gelangen^{67, 68)}, wobei besonders bemerkenswert ist, daß die katalytische Hydrierung in diesem Falle nicht wie bei den 11-Keto- und 11 β -Hydroxy-steroiden zur 5 α (allo)-, sondern zur 5 β -Verbindung führt. Die vorübergehende Absättigung der Δ^4 -3-Keto-Gruppierung, die hier für die Einführung der Dioxyaceton-Seitenkette notwendig ist, wird bei einem von *Hogg* und Mitarbeitern⁶⁹⁾ beschriebenen Verfahren umgangen.

Ausgehend vom leicht zugänglichen 17 α -Hydroxy-cortexon (Substanz S) gelangt man mittels 11 β -Hydroxylierung direkt zum Hydrocortison, ein vom technischen Standpunkte aus sehr attraktives Verfahren. Wird hingegen eine 11 α -Hydroxyl-Gruppe eingeführt, so erhält man in bester Ausbeute 11-Epi-hydrocortison, das chemisch in Cortison bzw. Hydrocortison umgewandelt

werden muß. Dafür stehen mehrere Verfahren zur Verfügung, von denen eines nach



⁶²⁾ D. H. Peterson, Research 6, 309 [1953].

⁶³⁾ G. Rosenkranz u. F. Sondheimer, Progr. Chem. org. Natur. Prod. 10, 274 [1953].

⁶⁴⁾ C. Djerassi, Vitamins and Hormones 11, 205 [1953].

⁶⁵⁾ A. Wettstein u. G. Anner, Experientia [Basel] 10, 397 [1954].

⁶⁶⁾ G. Anner u. A. Wettstein, in Encyclopedia of Chemical Technology, Verlag Interscience Publishers, N. Y., im Druck.

⁶⁷⁾ Th. H. Kritchewsky, D. L. Garmaise u. T. P. Gallagher, J. Amer. chem. Soc. 74, 483 [1952].

⁶⁸⁾ O. Mancera, A. Zaffaroni, B. A. Rubin, F. Sondheimer, G. Rosenkranz u. C. Djerassi, ebenda 74, 3711 [1952].

⁶⁹⁾ J. A. Hogg, P. F. Beal, A. H. Nathan, F. H. Lincoln, W. P. Schneider, B. J. Magerlein, A. R. Hanzel u. R. W. Jackson, ebenda 77, 4436 [1955].

⁶⁰⁾ E. Vischer u. A. Wettstein, Experientia [Basel] 9, 371 [1953].
⁶¹⁾ H. H. Inhoffen, diese Ztschr. 53, 471 [1940]; E. B. Hersberg, M. Rubin u. E. Schwenk, J. org. Chemistry 15, 292 [1950].

verläuft. Diese von *Fried* und *Sabo*⁷⁰⁾ ausgearbeitete Methode hat den Vorteil, daß dabei weder die 3- noch die 20-Keto-Gruppe zu schützen sind, und daß sie zu Cortison und zu Hydrocortison, vor allem aber auch in einfacher Weise

⁷⁰⁾ J. Fried u. E. F. Sabo, J. Amer. chem. Soc. 75, 2273 [1953].

zu den entsprechenden in der 9 α -Stellung halogenierten Derivaten führt.

Die große Bedeutung mikrobiologischer Reaktionen bei der Herstellung von 1-Dehydro-Analogen der Steroid-Hormone und von Oestron wurde bereits erwähnt.

Eingegangen am 5. April 1957 [A 806]

Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie II*)

8. Amidomethylierungen¹⁾

Von Prof. Dr. H. HELLMANN

Chemisches Institut der Universität Tübingen

Prof. Dr. Georg Wittig zum 60. Geburtstag gewidmet

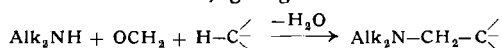
Die verschiedenen Möglichkeiten des Ersatzes eines H-Atoms durch einen Amidomethyl-Rest (R-CO-NH-CH₂-) werden beschrieben, die jeweils herrschenden Reaktionsmechanismen diskutiert und die Anwendungsbereiche umrissen.

- I. Definition und Bedeutung der Amidomethylierung
- II. Amidomethylierung mit N-Hydroxymethyl-amiden (Tscherniac, Einhorn)
 - a) N-Hydroxymethyl-carbonamide
 - b) Amidomethylierung an Aromaten
 - c) Amidomethylierung an β -Diketonen
- III. Amidomethylierung mit N-Halogenmethyl-carbonamiden (Cherbuliez, Böhme).
 - a) N-Halogenmethyl-carbonamide
 - b) Amidomethylierung von Aromaten
 - c) Amidomethylierung CH-acider Verbindungen
- IV. Amidomethylierung mit N-Dialkylaminomethyl-carbonamiden und deren quartären Salzen (Hellmann, Atkinson)

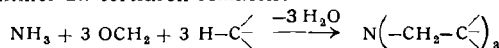
- a) N-Dialkylaminomethyl-amide
- b) Amidomethylierung mit quartären Salzen von N-Dialkylaminomethyl-phthalimiden an H-aciden Verbindungen
- c) Transaminomethylierungen kondensationsunfähiger N-Dialkylaminomethyl-carbonamide (Scheinbare Amidomethylierungen)
- d) Amidomethylierungen mit N-Dialkylaminomethyl-carbonamiden
 1. an Aminen und Amiden
 2. an Mercaptanen und Sulfinsäuren
 3. an CH-aciden Verbindungen
- V. Zusammenfassung und Ausblick
- VI. Arbeitsvorschriften

I. Definition und Bedeutung der Amidomethylierung

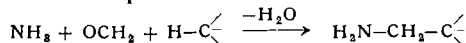
Während die Substitution eines Wasserstoff-Atoms durch eine Dialkylaminomethyl-Gruppe (Alk₂N-CH₂-) relativ leicht durch Kondensation von sek. Aminen mit Formaldehyd und nucleophilen bzw. potentiell nucleophilen Verbindungen zu erreichen ist, gelingt die Substitution durch



einen Monoalkylaminomethyl-Rest (Alk-NH-CH₂-) weniger glatt, und schließlich der Ersatz durch eine Aminomethyl-Gruppe (H₂N-CH₂-) zumeist gar nicht, weil sich in diesen Fällen auch die weiteren Wasserstoff-Atome am Stickstoff an der Reaktion beteiligen. Demzufolge führt die Mannich-Reaktion mit Ammoniak als Amin-Komponente fast immer zu tertiären Aminen:



und nur selten zu primären Aminen:

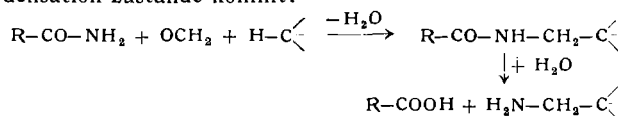


Die unerwünschte Reaktivität der Wasserstoff-Atome von Aminen und von Ammoniak pflegt man im allgemeinen durch Einführung von leicht wieder abspaltbaren Resten vorübergehend auszuschalten, beispielsweise durch Acylierung. Es wäre daher denkbar, das Ziel der Einführung einer Aminomethyl-Gruppe (H₂N-CH₂-) durch einen Zweistufenprozeß anzustreben, indem man zunächst eine Substitution durch einen Acylaminomethyl-Rest (R-CO-

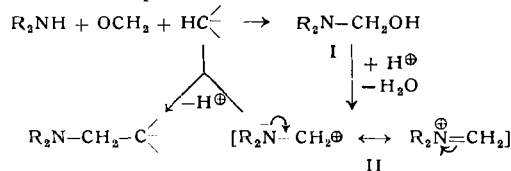
NH-CH₂-) vornimmt („Amidomethylierung“) und anschließend den Acyl-Rest hydrolytisch aus der Acylaminomethyl-Verbindung abspaltet. Es gibt bereits mehrere Möglichkeiten der Amidomethylierung, von denen die präparativ brauchbaren im folgenden beschrieben werden sollen.

II. Amidomethylierung mit N-Hydroxymethyl-amiden

Der einfachste Weg zur Amidomethylierung bestünde darin, daß man als Amin-Komponente für die Mannich-Reaktion acyliertes Ammoniak, d. h. ein Säureamid, verwendet; es erhebt sich jedoch die Frage, ob noch eine Kondensation zustande kommt:



Zur Beantwortung sei der Mechanismus der Mannich-Reaktion, über welchen weitgehend Klarheit besteht²⁾, skizziert. Danach vereinigt sich der Formaldehyd zunächst mit dem Amin unter Bildung eines Hydroxymethylamins (I), welches nach Aufnahme eines Protons Wasser abspaltet und in ein mesomeres Carbenium-Ion (II) übergeht. Dieses Ion, das als das eigentliche angreifende Agens in der Mannich-Reaktion anzusehen ist, aminomethyliert in elektrophiler Substitutionsreaktion geeignete nucleophile Kondensationspartner:



*) Aufsatz 7 dieser Reihe vgl. diese Ztschr. 69, 124 [1957].

¹⁾ Der vorliegende Aufsatz gibt auszugsweise den Inhalt verschiedener Vorträge wieder, welche im vergangenen halben Jahr in Basel, Biberach, Brackwede, Dresden, Greifswald, Heidelberg, Huls, Jena, Leipzig, München, Rostock und Stuttgart gehalten wurden.

²⁾ H. Hellmann u. G. Opitz, diese Ztschr. 68, 265 [1956].