

PETER KARLSON, HANS HOFFMEISTER, HANS HUMMEL,
PETER HOCKS *) und GERHARD SPITELLER **)

Zur Chemie des Ecdysons, VI¹⁾

Reaktionen des Ecdysonmoleküls

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Marburg/Lahn,
dem Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin N*)
und dem Chemischen Institut der Universität Wien **)

(Eingegangen am 4. November 1964)***)

Im Ecdyson läßt sich die α,β -ungesättigte Ketongruppierung nicht katalytisch hydrieren. Durch Perjodat-Oxydation wird eine Glykolgruppierung nachgewiesen. Salzsäure spaltet aus dem Ecdysonmolekül unter milden Bedingungen zwei Moleküle Wasser ab; dabei entsteht ein $\Delta^{7,14,6}$ -Keton, das sich in ein $\Delta^{8(9),14,6}$ -Keton umlagert. Aus den Versuchen wird geschlossen, daß das Ecdyson ein Δ^7 -6-Keton der 5α - oder 5β -Cholestan-Reihe mit Hydroxylgruppen in 14 und 25 ist. Das Massenspektrum macht eine Hydroxylfunktion in 22 wahrscheinlich. Aus Analogiegründen wird eine Hydroxylgruppe in Stellung 3 angenommen; die letzte Hydroxylgruppe muß dann in 2 oder 4 lokalisiert sein.

Ecdyson, das Häutungshormon der Insekten, ist ein C_{27} -Steroid mit der Seitenkette des Cholesterins. Es enthält eine α,β -ungesättigte Ketogruppe und 5 Hydroxylgruppen²⁾. In den vorhergehenden Mitteilungen dieser Reihe^{3,4)} wurde gezeigt, daß es sich bei der ungesättigten Carbonylfunktion um ein Δ^7 -6-Keton oder um ein $\Delta^{5(6),7}$ -Keton handeln mußte. Eine Hydroxylgruppe ist an C-25 lokalisiert; für eine zweite ist die Stellung 3 wahrscheinlich, da Ecdyson biosynthetisch aus Cholesterin gebildet wird⁵⁾.

Viele dieser Ergebnisse waren durch den physikalisch-chemischen Vergleich des Ecdysons mit Modellsubstanzen erhalten worden. Die vorliegende Arbeit beschreibt einige chemische Umsetzungen am Ecdyson selbst. Obwohl die Kostbarkeit des Materials nur wenige solcher Versuche erlaubte und die meisten Reaktionen im Mikromaßstab durchgeführt werden mußten, lassen sich aus den Ergebnissen wesentliche Rückschlüsse auf die Lage der funktionellen Gruppen im Ecdyson ziehen. Insbesondere die Untersuchung des mit Säure erhaltenen Umwandlungsproduktes ermöglichte die Aufstellung einer Ecdysonformel, in der lediglich die Lage zweier Hydroxylgruppen noch offen ist.

***) Mit Nachträgen vom 12. April 1965.

1) V. Mitteil.: C. RUFER, H. HOFFMEISTER, H. SCHAIRER und M. TRAUT, Chem. Ber. **98**, 2383 [1965], vorstehend.

2) P. KARLSON, H. HOFFMEISTER, W. HOPPE und R. HUBER, Liebigs Ann. Chem. **662**, 1 [1963].

3) H. HOFFMEISTER, C. RUFER, H. H. KELLER, H. SCHAIRER und P. KARLSON, Chem. Ber. **98**, 2361 [1965].

4) H. HOFFMEISTER und C. RUFER, Chem. Ber. **98**, 2376 [1965].

5) P. KARLSON und H. HOFFMEISTER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **331**, 298 [1963].

KATALYTISCHE HYDRIERUNG VON ECDYSON

Wie wir schon bald nach der ersten Isolierung festgestellt haben, läßt sich Ecdyson weder mit Pt noch mit Pd katalytisch hydrieren. Auch unter energischen Bedingungen (100 at, 120°) wird das α,β -ungesättigte Ketonssystem nicht abgesättigt.

Wir haben nun diese Versuche wieder aufgenommen*) und das Verhalten von Ecdyson mit dem einiger Modellsbstanzten verglichen. Hierzu wurden Δ^7 -6-Ketone, Δ^4 -3-Ketone, Δ^5 (6)-7-Ketone und Δ^9 (11)-12-Ketone der Steroidreihe unter Standardbedingungen im Mikromaßstab hydriert. Die Ergebnisse gibt Tab. 1 wieder.

Tab. 1. Katalytische Hydrierung verschiedener Steroide mit α,β -ungesättigter Ketogruppe

	Steroid	λ_{\max} (m μ) (e)	H ₂ -Aufnahme (Äquivalent)	Dauer	λ_{\max} (m μ) nach Hydrierung und (e)
Δ^7 -6-Ketone	Ecdyson	241 (12400)	1	5 Stdn.	245 (8000)
	Ergosten-(7)-ol-(3 β)-on-(6)-acetat	245 (14000)	—	20 Stdn.	245 (12000)
	Ergostadien-(7.22)-ol-(3 β)-on-(6)-acetat	245 (14000)	1 ^{a)}	20 Stdn.	245 (12500)
	Ergostadien-(7.22)-diol-(3 β .5 α)-on-(6)-3-acetat	250 (14000)	1 ^{a)}	20 Stdn.	248 (14000)
	23.24-Dinor-cholen-(7)-diol-(3 β .5 α)-on-(6)-säure-(22)-3-acetat	248 (13000)	—	20 Stdn.	248 (12000)
Δ^4 -3-Ketone	Androsten-(4)-ol-(17 β)-on-(3)	241 (15000)	1 ^{b)}	10 Min.	—
	Testosteron	241 (15500)	1	7 Min.	—
	Progesteron	241 (17000)	1	15 Min.	—
Δ^5 (6)-7-Ketone	Cholesten-(5)-on-(7)	238 (12000)	1 ^{c)}	30 Min.	—
	Cholesten-(5)-triol-(3 β .16 β .27)-on-(7)-16-acetat	238 (13800)	1	40 Min.	—
Δ^9 (11)-12-Ketone	Δ^9 (11)-Dehydrohecogenin-acetat	237 (13300)	1 ^{d)}	3 Stdn.	—
	Cholesten-(9(11))-triol-(3 β .16 β .27)-on-(12)-triacetat	238 (15000)	1	4 Stdn.	—

a) Absättigung der Doppelbindung in der Seitenkette.

b) Absättigung der Δ^4 -Doppelbindung.

c) Absättigung der Δ^5 -Doppelbindung.

d) Hydrierung der Ketogruppe.

Die zuletzt aufgeführten drei Verbindungstypen lassen sich unter den gewählten Bedingungen glatt hydrieren, wobei die UV-Absorption des ungesättigten Keton-systems verschwindet. Beim Ecdyson dagegen und bei den Vergleichsstanzten der Δ^7 -6-Keton-Reihe nimmt die Extinktion nur geringfügig ab. Es ist auch aus der Literatur bekannt, daß sich die Δ^7 -Doppelbindung nicht hydrieren läßt; Ausnahmen erklären sich durch eine Verschiebung der Doppelbindung in eine hydrierbare Stellung⁶⁾.

Die Aufnahme von 1 Moläquiv. Wasserstoff durch Ecdyson wird unten diskutiert werden.

PERJODATOXYDATION VON ECDYSON

Ecdyson verbraucht in neutraler, wäßriger Lösung in der Kälte schleppend etwa 1 Moläquiv. Perjodat. Ein genauer Endpunkt ist nicht erkennbar. Bei 80–90° werden von einer wäßrigen Ecdysonlösung definiert 2 Moläquiv. Perjodat verbraucht⁷⁾. Da eine α -Ketolgruppierung nicht vorliegen konnte⁴⁾, vermuteten wir zunächst zwei Glykolgruppen im Molekül.

*1) Bearbeitet von P. HOCKS.

6) J. M. HEILBRON, A. L. MORRISON und J. C. E. SIMPSON, J. chem. Soc. [London] 1933, 302.

7) Dissertat. H. HOFFMEISTER, Univ. München 1963.

Um dieses Ergebnis besser beurteilen zu können, mußten Vergleichsuntersuchungen mit anderen Steroiden durchgeführt werden. Wir haben uns zunächst bemüht, ein geeignetes Lösungsmittel für diese Titrationsen zu finden. Sowohl das in der Zuckerchemie gebräuchliche Methanol als auch Diäthylenglykoldimethyläther, Dimethylsulfoxid, Dioxan, Tetrahydrofuran, Acetonitril und Äthanol werden bei Temperaturen über 50° in so erheblichem Umfang oxydiert, daß beim Arbeiten im Mikromaßstab die Blindwerte die gleiche Größenordnung erreichen wie der Meßwert⁸⁾.

Die verschiedenen Polyhydroxy-steroiden, die wir zum Vergleich mit Ecdyson untersucht haben, sind in Tab. 2 zusammengestellt. Wenngleich wegen der erwähnten Schwierigkeit mit dem Blindwert die gefundenen Werte keinen Anspruch auf Genauigkeit erheben, zeigt sich doch, daß bei Reaktionstemperaturen um 80° auch einfache Hydroxylgruppen in erheblichem Maße angegriffen werden. Danach wird man im Zweifel sein müssen, ob das zweite Äquivalent Perjodat, das von Ecdyson erst in der Hitze verbraucht wird, auf eine zweite Glykolgruppe schließen läßt. Eine Glykolgruppe ist jedoch anzunehmen.

Tab. 2. Perjodat-Verbrauch (Äquivv. NaJO₄) verschiedener Hydroxysteroiden in neutraler Lösung

Hydroxysteroid	Gesamtverbrauch	Blindwert	Nettoverbrauch ^{a)}	theoretisch zu erwartender Verbrauch
5 α -Pregnanol-(3 β)-on-(20)	0.2	0.2	0.0	0.0
Cholesterin	0.2	0.1	0.1	0.0
3 α .7 α .12 α -Trihydroxy-cholansäure-methylester	0.3	0.1	0.2	0.0
24-Methyl-26.27-dinor-5 β -cholestan-tetraol-(3 α .7 α .12 α .24)	0.9	0.3	0.6	0.0
Cholesten-(4)-ol-(6 α)-on-(3)	0.5	0.2	0.3	0.0
Cholesten-(4)-ol-(6 β)-on-(3)	0.1	0.1	0.0	0.0
Cholestan-triol-(3 β .5 α .6 β)	0.2	0.1	0.1 ^{b)}	1.0
Cholesten-(5)-diol-(3 β .4 β)	0.8	0.1	0.7	1.0
Cholesten-(5)-diol-(3 β .4 α)	1.0	0.2	0.8	1.0
11-Desoxy-corticosteron	1.1	0.1	1.0	1.0
Digitogenin	1.2	0.2	1.0	1.0
Ecdyson	2.7	0.9	1.8	—

a) Mittelwert aus mindestens zwei Versuchen.

b) Glykole mit tertiär gebundenen OH-Gruppen werden von Perjodat um Größenordnungen langsamer oxydiert als solche mit sekundären⁹⁾.

SÄUREABBAU VON ECDYSON

Behandelt man Ecdyson mit Salzsäure, so wird das Hormon schnell inaktiviert; es entstehen zwei Hauptprodukte und mehrere andere Substanzen. Am übersichtlichsten verläuft die Umwandlung, wenn man das Hormon in 5*N* wäßr. HCl 1 Min. auf 90–100° erhitzt und die Lösung dann in NaHCO₃-Lösung eingießt. Nach chromatographischer Auftrennung des Rohprodukts lassen sich in je etwa 20% Ausbeute ein konjugiertes Dienon „A“, λ_{\max} 293 m μ , $\epsilon = 15800$, und ein Keton „B“ mit einem nicht zur Carbonylfunktion konjugierten Dien-System (λ_{\max} 244 m μ ¹⁰⁾, $\epsilon = 15400$) isolieren. Die Massenspektren zeigen für A und für B eine Spitze für das Molekül-Ion

⁸⁾ Diplomarb. H. HUMMEL, Univ. München 1964.

⁹⁾ Methoden der organ. Chemie (Houben-Weyl), IV. Aufl., Bd. II, S. 360 f., Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1953.

¹⁰⁾ Das von uns in l. c.⁷⁾ mit 248 m μ angegebene Maximum ist auf 244 zu korrigieren.

bei der Massenzahl 428. Aus dem Ecdysonmolekül wurden also zwei Moleküle Wasser herausgespalten.

Wir haben den Abbau auch mit verdünnter Salzsäure durchgeführt und dabei Zeit und Temperatur variiert. Verfolgt man das Entstehen der Hauptprodukte durch Dünnschichtchromatographie entsprechender Proben, dann erkennt man, daß sich zunächst das Produkt A bildet. Bei längerer HCl-Einwirkung nimmt B auf Kosten von A zu. Die Umwandlung $A \rightarrow B$ läßt sich auch direkt UV-spektrophotometrisch beobachten: Versetzt man eine alkoholische Lösung von reinem A mit 1% 5*n* HCl, so verändert sich das Spektrum; nach 15 Stdn. sind 80% von A in B übergegangen, wie sich aus der Änderung der Extinktionen bei 293 und 244 μ errechnen läßt.

Die Struktur der Verbindungen A und B wird unten im Zusammenhang mit den anderen Befunden diskutiert.

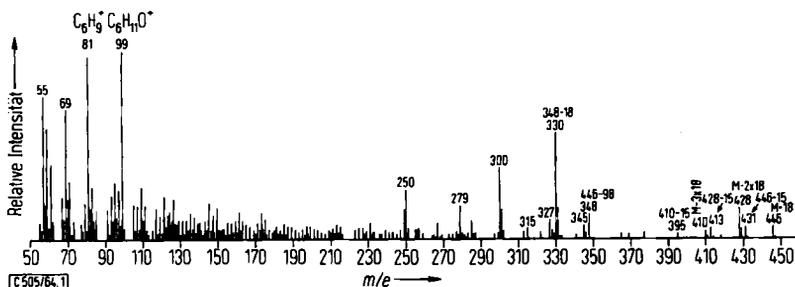
PYROLYSE VON ECDYSON

Erhitzt man Ecdyson in einem Mikro-Sublimationsapparat auf 300–350°, so kondensieren sich 90% der Substanz am „kalten Finger“. Bei dieser Reaktion entstehen zwei Hauptprodukte, die sich durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel auftrennen lassen. Die stärker polare Substanz entspricht in ihrem chromatographischen Verhalten den Salzsäure-Abbauprodukten, ist damit jedoch nicht identisch. Ihr IR-Spektrum weist eine intensive Carbonylbande bei 1715/cm auf; Vergleiche mit ähnlichen Substanzen zeigen, daß hier zwei gesättigte Oxogruppen vorliegen müssen. Das UV-Spektrum zeigt ein Maximum bei 242 μ (Dien-System). Die Substanz reagiert positiv im Zimmermann-Test.

Das unpolare Produkt der Pyrolyse enthält keine Hydroxylgruppe mehr, wie das IR-Spektrum beweist. Die Intensität der Carbonylbande bei 1725/cm spricht wiederum für ein Diketon; die Doppelbindungsbanden eines Dien-Systems liegen bei 1580 und 1600/cm. Das UV-Spektrum zeigt ein Maximum bei 242 μ . Auch diese Substanz reagiert positiv mit Zimmermann-Reagenz. — Eine weitere Charakterisierung der Substanzen war wegen der geringen Mengen, die wir für die Reaktion zur Verfügung hatten, nicht möglich.

DAS MASSENSPEKTRUM DES ECDYSONS

Außer den oben erwähnten Umwandlungsprodukten A und B wurde auch das Ecdyson selbst der massenspektroskopischen Analyse unterworfen*) (Abbild. 1).



Massenspektrum des Ecdysons (Atlas CH 4-Gerät, TO 4-Ionenquelle, Verdampfungstemperatur ca. 150–170°, Elektronenenergie 70 eV)

*) Bearbeitet von G. SPITELLER.

Die thermische Empfindlichkeit des Ecdysons und das Vorhandensein mehrerer polarer Gruppen machen die Aufnahme des Massenspektrums auch unter Verwendung von Direkt-einführverfahren schwierig. Aus der Intensitätsänderung verschiedener Spitzen während der Aufnahme läßt sich erkennen, daß die Probe teilweise thermisch zersetzt wird. Besondere Schwierigkeiten bei der Auswertung bereitete das Vorhandensein von Petrolätherspuren, die aus der Probe nicht entfernt werden konnten und sich im unteren Massenbereich bemerkbar machen.

Wegen der leichten Zersetzbarkeit des Ecdysons läßt sich nicht entscheiden, ob die bei der höchsten Massenzahl (MZ) gelegene Spitze (446) dem Molekül-Ion des Ecdysons oder einem aus diesem entstandenen Dehydratisierungsprodukt entspricht. Da sich aus den Verbrennungsanalysen und der röntgenographischen Molekulargewichtsbestimmung die Summenformel eindeutig zu $C_{27}H_{44}O_6$ (MG 464) ergeben hatte, ist das Ion der MZ 446 bereits ein Monodehydratationsprodukt. Spitzen bei den MZ 428 und 410 zeigen, daß aus Ecdyson noch ein zweites und drittes Mol. Wasser eliminiert werden kann. Das Auftreten von Bruchstücken bei 446-15, 428-15 und 410-15 deutet darauf hin, daß mindestens eine leicht abspaltbare und daher vermutlich an ein quartäres C-Atom gebundene Methylgruppe vorhanden ist.

Von besonderer Bedeutung für die Auswertung sind die Ionen der MZ 99 und 81, die an Intensität alle anderen überragen. Wie eine metastabile Spitze bei der MZ 66.5 (ber. 66) anzeigt, entsteht das Bruchstück der MZ 81 aus dem der MZ 99 durch Abspaltung von einem Mol. H_2O . Als einzig mögliche Summenformel für das Ion der MZ 81 ergibt sich C_6H_9 ; das Fragment der MZ 99 muß daher die Bruttoformel $C_6H_{11}O$ haben und kann demnach nur eine Doppelbindung (oder einen Ring) enthalten. Unter Zugrundelegung der Annahme, daß Ecdyson ein Steroid ist, und unter Berücksichtigung der Tatsache, daß bei Steroiden die Eliminierung eines C_6 -Teilchens weder aus dem Ring A noch aus den Ringen B und C möglich ist, kann das Fragment nur aus der Seitenkette entstanden sein. Diese Annahme wird sehr gestützt durch das Auftreten eines korrespondierenden Ions bei $446-98 = 348$, aus dem durch Wasserabspaltung ein Schlüsselbruchstück der MZ 330 gebildet werden kann. Diese Reaktionen werden unten noch diskutiert werden.

Die weiterhin auftretenden Ionen mit der MZ 300, 279 und 250 entstehen durch thermische Zersetzung der Probe. Aus dem vorhandenen Spektrenmaterial läßt sich keine Struktur für diese Bruchstücke ableiten.

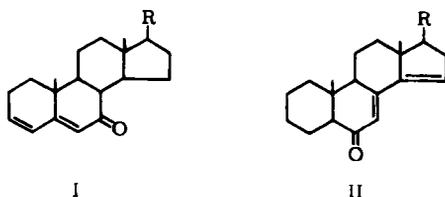
DISKUSSION

Für die Konstitutionsermittlung des Ecdysons sind die Umwandlungsprodukte, die mit Salzsäure entstehen, von besonderer Bedeutung; bei dieser Reaktion werden zwei Moleküle Wasser abgespalten. Eines davon entstammt der Seitenkette; Ecdyson trägt an C-25 eine tertiäre OH-Gruppe, die in saurem Medium leicht eliminiert wird. Die gleiche Wasserabspaltung erleiden auch Modellverbindungen: Aus Cholesten-(4)-ol-(25)-on-(3) und aus 5β -Cholestan-diol-(3 β ,25)-3-monoacetat wird unter den hier angewandten Bedingungen Wasser abgespalten.

Die zweite leicht eliminierbare OH-Gruppe muß am Ringsystem lokalisiert sein. Durch ihre Abspaltung entsteht eine Doppelbindung, die zum chromophoren System des Ecdysons konjugiert ist: Das Produkt A enthält nach den spektroskopischen Be-

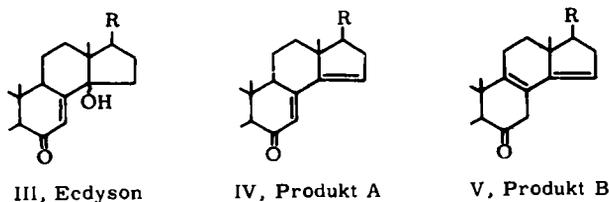
funden (vgl. auch das IR-Spektrum in l. c.²⁾) noch die im Ecdyson vorliegende α,β -ungesättigte Ketongruppierung sowie eine neue, dazu konjugierte Doppelbindung. Dieses System ist aber instabil: Bei weiterer Säureeinwirkung lagert sich A in B um, wobei die Doppelbindung aus der Konjugation zur Ketogruppe herauswandert.

Wäre Ecdyson ein $\Delta^{5(6)}$ -7-Keton, so müßte das Produkt A ein $\Delta^{3,5}$ -7-Keton-System enthalten (I). Solche Ketone haben bekanntlich ihr UV-Maximum bei 279 $m\mu$ und nicht, wie A, bei 293 $m\mu$. Völlig unverständlich wäre jedoch die Umlagerung von I in ein Keton, dessen Dien-System zur Oxogruppe nicht konjugiert ist. Schließlich ist eine Wasserabspaltung aus Stellung 3 oder 4 unter so milden Bedingungen unwahrscheinlich, und das Ergebnis der katalytischen Hydrierung spricht ebenfalls gegen diese Struktur. Sie kann somit ausgeschlossen werden.



Wenn im Ecdyson ein Δ^7 -6-Keton vorliegt, dann sind die beschriebenen Reaktionen leicht zu verstehen. Das Dienon A wäre dann als $\Delta^{7,14}$ -6-Keton (II) zu formulieren. Die UV-Absorption dieses Systems ist zwar nicht bekannt, errechnet sich aber nach l. c.¹¹⁾ zu 294 $m\mu$ mit einer wahrscheinlichen Extinktion um 16000; die Daten für A (λ_{max} 293 $m\mu$, $\epsilon = 15800$) stimmen damit sehr gut überein. Die Umlagerung von A in B wird ohne weiteres erklärlich: Für die Doppelbindung in Δ^7 eines Dienons vom Typ II muß man fordern, daß sie im sauren Medium nach $\Delta^{8(9)}$ verschoben wird, denn dadurch verringert sich die Ringspannung des Ringes B. Die Instabilität von $\Delta^{7,14}$ -Dienen findet sich in der Literatur^{12,13)} verschiedentlich beschrieben. — Die gefundenen spektroskopischen Daten für B (= V) entsprechen denen eines $\Delta^{8(9),14}$ -Dien-Systems; für dieses werden in der Literatur Maxima zwischen 242 und 244 $m\mu$ mit Extinktionen von 15000 bis 18000 angegeben.

Die Reaktion des Ecdysons in salzsaurem Medium läßt sich nunmehr durch folgende Partialformeln wiedergeben:



¹¹⁾ L. F. FIESER und M. FIESER, *Steroide*, S. 22, Verlag Chemie, Weinheim 1961.

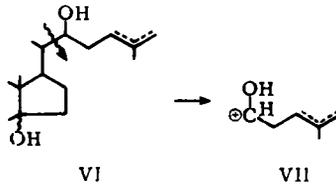
¹²⁾ A. WINDAUS, K. DITHMAR, H. MURKE und F. SÜCKFÜLL, *Liebigs Ann. Chem.* **488**, 91 [1931].

¹³⁾ R. B. TURNER, *Chem. Reviews* **43**, 1 [1948].

Für die Ausbildung der Doppelbindung in Δ^{14} ist dabei angenommen, daß im Ecdyson eine Hydroxylfunktion an C-14 vorliegt. Von dieser tertiären OH-Gruppe ist bekannt, daß sie besonders labil ist, gleichgültig, ob es sich um 14α - oder 14β -OH handelt.

An sich wäre es auch möglich, daß die Δ^{14} -Doppelbindung durch die Abspaltung einer OH-Gruppe an C-15 entsteht, obwohl hierzu energiereichere Bedingungen nötig sein dürften. Die Entscheidung ergibt sich aus dem Hydrierungsversuch: Die Aufnahme von 1 Moläquiv. H_2 ohne Eingriff in das absorbierende System läßt sich zwanglos als Hydrogenolyse der OH-Gruppe an C-14 erklären. Durch das Verschwinden dieser Hydroxylgruppe verschiebt sich das UV-Maximum von 241 $m\mu$ nach 245 $m\mu$. Diese Lage des Maximums ist typisch für unbeeinflusste Δ^{7-6} -Ketone.

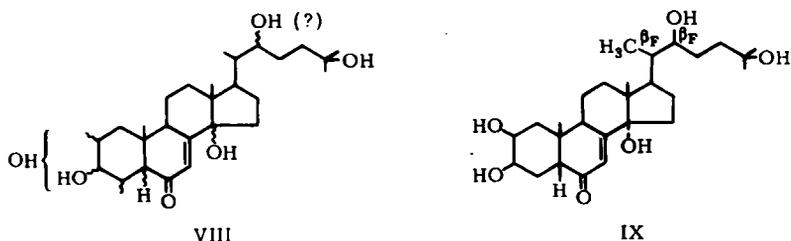
Von den fünf Hydroxylgruppen des Ecdysons haben wir bisher eine an C-25, eine weitere an C-14 lokalisieren können. Eine gewisse Wahrscheinlichkeit für eine Hydroxylgruppe an C-22 läßt sich aus dem Massenspektrum ableiten; allerdings ist die folgende Interpretation noch nicht zwingend, da keine Vergleichsspektren bekannter Steroide vorliegen. Wie oben dargelegt, entsteht aus der Seitenkette verhältnismäßig leicht ein sauerstoffhaltiges C_6 -Bruchstück, das am besten durch eine Spaltung zwischen C-20 und C-22 erklärt wird (VI \rightarrow VII):



Die oben gewählte Formulierung entspricht der Erfahrung, daß solche Bruchstücke nur dann in größerer Intensität vorkommen, wenn eine funktionelle Gruppe vorliegt, die eine Ladungsstabilisierung ermöglicht. Das korrespondierende Bruchstück mit der MZ 348 enthält noch die Hydroxylgruppe an C-14, die sicher leicht verloren geht; dadurch entsteht dann das Schlüsselbruchstück der MZ 330.

Dieselben Bruchstücke würden auch entstehen, wenn wie bei anderen Steroiden zunächst die Bindung zwischen C-13 und C-17 gespalten wird. Man kann sich leicht überlegen, daß durch radikalische Verschiebung eines H-Atoms vom OH an C-22 nach C-17 ein stabiles Aldehydmolekül abgespalten werden kann. Wenn beide Reaktionen nebeneinander herlaufen, ist die Intensität der Spitzen bei MZ 99 und 330 verständlich.

Schließlich bleibt noch anzuführen, daß alle bisher bekannten natürlich vorkommenden Steroide eine Sauerstoff-Funktion an C-3 tragen; wir werden deshalb auch im Ecdyson eine Hydroxylgruppe in dieser Position annehmen dürfen. Nach dem Glykolcharakter, der durch die Perjodat-Titration belegt wird, ist für die letzte Hydroxylgruppe die Stellung 2 oder 4 anzunehmen. Eine Diolstruktur in Ring A würde auch die Pyrolyse-Reaktion erklären; die dabei entstehenden Diketone würden aus der Wasserabspaltung zum Enol hervorgehen und eine Ketogruppe in 2, 3 oder 4 liefern, die für den positiven Zimmermann-Test verantwortlich ist. Damit ergibt sich für das Ecdyson folgende, noch nicht in allen Teilen gesicherte Formel (VIII):



Parallel zu den hier beschriebenen chemischen Versuchen zur Konstitutionsermittlung wurde von W. HOPPE und R. HUBER die Röntgenstrukturanalyse der Ecdysonkristalle durchgeführt. Wie in der nachstehenden VII. Mitteilung¹⁴⁾ gezeigt wird, ergeben sich mit dieser völlig unabhängigen Methode nicht nur alle hier aufgeführten Strukturmerkmale in gleicher Weise, sondern darüber hinaus noch die Position der fehlenden OH-Funktion und die sterische Anordnung der OH-Gruppen. Nach den Ergebnissen von W. HOPPE und R. HUBER ist Ecdyson das 2 β .3 β .14 α .22 β .25-Pentahydroxy-5 β -cholesten-(7)-on-(6) (IX).

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danken wir für eine Sachbeihilfe.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Hydrierung von Ecdyson: 4 mg (10^{-5} Mol) Ecdyson (oder entsprechende Mengen eines Vergleichssteroids) wurden in 5 ccm Methanol mit 5 mg Palladium (10%) auf Kohle bei Raumtemperatur hydriert, bis kein Wasserstoff mehr aufgenommen wurde. Die abfiltrierte Lösung wurde eingedampft und in einem Anteil des Rückstandes UV-spektrometrisch die Extinktion bestimmt.

Der Rückstand der Ecdyson-Hydrierung zeigte im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel GF₂₅₄ nach STAHL im System Benzol/Methanol (70:30) drei Substanzflecke: wenig Ausgangsmaterial (R_F 0.40), wenig einer unbekanntenen Nebenzone (R_F 0.45) und ein Hauptprodukt, das mit dem R_F 0.60 wesentlich weniger polar als Ecdyson selbst war.

Oxydation mit Perjodat: 0.01 mMol der dünn-schichtchromatographisch einheitlichen Hydroxysteroiden wurden in 2.0 ccm (bei schlechter Löslichkeit in 5.0 ccm) reinem Methanol unter Schütteln tropfenweise mit 2.0 ccm neutraler 0.05 *m* NaJO₄-Lösung versetzt. In einer Mikrodestillationsapparatur mit Vorlage wurde die Reaktionsmischung 2 Stdn. auf 80° erwärmt. Schließlich wurde 6 Min. zum Sieden erhitzt, um die bei der Reaktion entstandenen flüchtigen Spaltprodukte quantitativ in die mit salzsaurer 2.4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung beschickte Vorlage überzutreiben. Die abgekühlte Reaktionslösung wurde mit überschüss. KJ-Lösung versetzt, mit wenig 2*n* HCl angesäuert und sofort mit 0.02 *n* Na₂S₂O₃ unter den üblichen Bedingungen titriert. Für jede Bestimmung wurde ein Blindversuch (nur mit Lösungsmittel und Reagenzien) angesetzt. Der Blindwert wurde vom Thiosulfatverbrauch abgezogen.

Wurde die Oxydation bei Raumtemperatur ausgeführt, so war das Ende der Reaktion auch nach 2 Tagen noch nicht erreicht.

Salzsäureabbau von Ecdyson: Für die chromatographische Bestimmung der besten Reaktionsbedingungen wurden jeweils 500 μ g Ecdyson mit 0.5 ccm Salzsäure der jeweiligen Konzentration übergossen und 2–20 Stdn. stehengelassen oder sofort über freier Flamme zwischen 0.5 und

¹⁴⁾ R. HUBER und W. HOPPE, Chem. Ber. 98, 2403 [1965], nachstehend.

10 Min. im Sieden gehalten. Die Lösung goß man in 4 ccm gesätt. NaHCO_3 -Lösung und extrahierte mit Essigester. Die vereinigten Essigesterauszüge wurden mit Wasser neutral gewaschen und der Essigesterrückstand auf Kieselgel-Dünnschichtplatten (Machery & Nagel, N-HR/UV₂₅₄) im System Methylenchlorid/Aceton/Äthanol (80 : 20 : 5) zweimal chromatographiert. Erst beim zweiten Lauf trennten sich die Substanzen A (R_F 0.5) und B (R_F 0.65) sauber auf; R_F -Werte 0.5 und 0.65. Die im UV-Licht sichtbaren Flecke färben sich mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz¹⁵⁾ olivgrün, einige Nebensubstanzen violett an.

Im Hauptversuch wurden 10 mg *Ecdyson* 1 Min. in 5 n HCl erhitzt und aufgearbeitet, wie oben beschrieben. Die Trennung erfolgte auf 1 mm dicken Kieselgelplatten, die ausgeschnittenen Zonen wurden 48 Stdn. im Soxhlet mit Essigester extrahiert. Die Substanzen A und B wurden dann aus wäbr. Äthanol umkristallisiert.

Substanz A: 2.2 mg, farblose Nadeln, Schmp. 244°, Mol.-Gew. 428. UV: λ_{max} 293 m μ , ϵ 15800. IR: OH 3390; C=O 1650; C=C 1610 und 1595/cm, sehr stark.

Substanz B: 1.7 mg, derbe Prismen, Schmp. 158°, Mol.-Gew. 428. UV: λ_{max} 244 m μ , ϵ 15400. IR: OH 3400, C=O 1708; C=C 1660/cm.

¹⁵⁾ W. J. McALEER und M. A. KOZLOWSKI, Arch. Biochem. Biophysics 66, 120 [1957].