

Hermann Schildknecht und Heinrich Birringer¹⁾

Arthropodenabwehrstoffe, XXXVII²⁾

Über die Steroide des Schlammschwimmers *Ilybius fenestratus*, II³⁾

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Heidelberg

(Eingegangen am 15. November 1968)

Die komplexen Prothorakal-Wehrdrüsen des 12 mm großen *I. fenestratus* produzieren eine wäßrige Emulsion, in der neben 28 μg Δ^4 -Androstenol-(17 β)-on-(3) (Testosteron) nun auch 16 μg $\Delta^{1,4}$ -Androstadienol-(17 β)-on-(3) und 1 μg Δ^4 -Pregnenol-(20 β)-on-(3) nachgewiesen werden.

Aus dem proteinfreien Prothorakal-Wehrdrüsensekret isolierten wir durch Gelchromatographie die Hauptkomponente: 8-Hydroxy-chinolin-carbonsäure-(2)-methyl ester²⁾. Die Begleitsubstanzen erhielten wir daneben nur als Gemisch; durch mehrfache Dünnschichtchromatographie aber konnten wir daraus drei reine Steroide gewinnen. Eine vierte Zone enthielt eine Mischung mehrerer polarer Substanzen, die wir noch nicht untersucht haben.

Die farblose, kristalline Substanz der Zone I absorbiert bei 241.5 $\text{m}\mu$ ($\log \epsilon = 4.22$). Die Absorptionswerte lassen sich dem π - π^* -Übergang eines α,β -unge-sättigten Ketons zuordnen⁴⁾. Eine schwächere Absorptionsbande bei 312 $\text{m}\mu$ mit $\epsilon = 76$ wird durch den n - π^* -Übergang der Carbonylgruppe hervorgerufen, ebenso wie der negative Cottoneneffekt mit einem Maximum bei $\lambda = 331 \text{ m}\mu$ und $\Delta\epsilon_{\text{max}} = -1.32$. Nicht nur das Circulardichrogramm (Abbild. 1) spricht für ein Δ^4 -3-Keto-steroid⁵⁾, sondern auch das Massenspektrum.

Für solche Steroidstrukturen sind intensive Spitzen bei m/e 124 charakteristisch⁶⁾, wie sie unser Spektrum auch zeigt (Abbild. 2). Außerdem fragmentieren derartige

1) Aus der Diplomarb. H. Birringer, Univ. Heidelberg 1967.

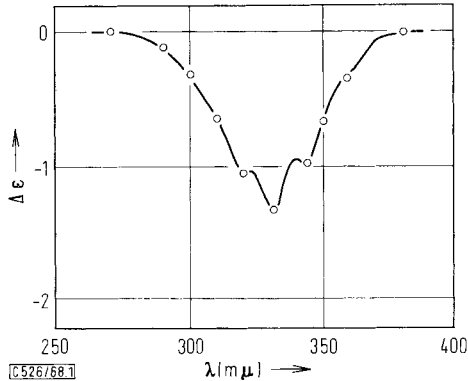
2) XXXVI. Mitteil.: H. Schildknecht, H. Birringer und D. Krauß, Z. Naturforsch. 24b, 38 (1969).

3) H. Schildknecht, H. Birringer und U. Maschwitz, Angew. Chem. 79, 579 (1967); Angew. Chem. internat. Edit. 6, 558 (1967).

4) A. I. Scott, Interpretation of the Ultraviolet spectra of Natural Products, in: D. H. R. Barton und W. Doering, International Series of Monographs on Organic Chemistry, Vol. 7, S. 55, Pergamon Press, Oxford-London-Edinburgh-New York-Paris-Frankfurt 1964.

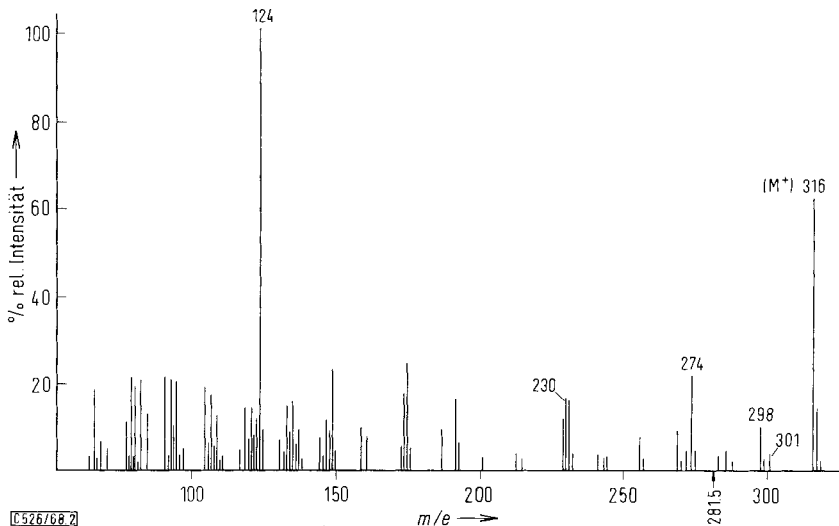
5) L. Velluz, M. Legrand und M. Grosjean, Optical Circular Dichroism, S. 218, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. und Academic Press, New York 1965.

6) G. Spitteller, Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen, S. 218, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. 1966.



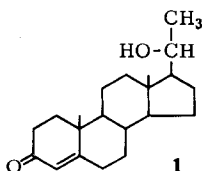
Abbild. 1. Circulardichrogramm der Substanz der Zone I; aufgenommen in Dioxan mit dem Dichrograph der Fa. Roussel-Jouan, Paris

Steroide durch Abspalten von Keten aus dem Ring A; damit ist auch die zweite charakteristische Spitze bei $M - 42 = 274$ erklärt. Berücksichtigt man nun noch, daß sich aus dem Intensitätsverhältnis $M/M + 1$ eine maximale C-Atomzahl von 21 errechnen läßt, so darf man aus den bisherigen Daten bereits schließen, daß ein C_{21} -Steroid mit der Struktur eines Δ^4 -Pregnenons-(3) vorliegt. Das Ketosteroid muß aber noch hydroxyliert sein; das geht aus dem Mol.-Gewicht von 316 hervor und aus der Spitze bei m/e 298, die durch Eliminierung von Wasser aus dem Molekül-Ion entsteht. Diese Annahme wird durch ein metastabiles Ion mit $m^* = 281.5$ und außerdem durch die Bildung eines Acetats erhärtet. Auch über die Stellung der Hydroxylgruppe lassen sich aus dem Massenspektrum noch einige Hinweise entnehmen: Steroide zerfallen häufig unter Spaltung der Bindung zwischen C-13 und

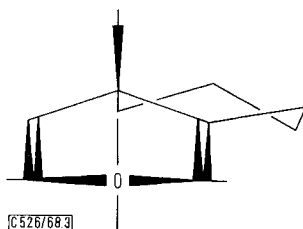


Abbild. 2. Massenspektrum der Substanz der Zone I; aufgenommen mit dem Massenspektrometer CH 4 der Atlaswerke MAT

C-17 sowie zwischen C-14 und C-15. Bei Δ^4 -3-Keto-steroiden mit unsubstituierten Ringen A bis C findet man also charakteristische Spitzen bei m/e 230 und 229⁷⁾. Nachdem auch in unserem Massenspektrum diese Spitzen mit der erwarteten Intensität auftreten, kann die Hydroxylgruppe nur noch an den C-Atomen 15, 16 und 17 oder 20 und 21 sitzen. Mit Hilfe des IR-Spektrums läßt sich davon lediglich C-21 ausschließen, da die Bande für die ν_{C-OH} -Schwingung bei 1112/cm liegt und damit keine primäre Alkoholgruppierung vorliegen kann. Aus biogenetischen Gründen ist schließlich am wahrscheinlichsten die Substitution an C-20; die meisten natürlich vorkommenden Pregnanderivate haben hier eine funktionelle Gruppe. Ein Vergleich der IR-Spektren von authentischem Δ^4 -Pregnenol-(20 β)-on-(3) und der Substanz aus Zone I, sowie der entsprechenden Acetate, beweist dann auch die Identität der beiden Verbindungen.



Neben dem bereits aufgefundenen³⁾ C₁₉-Steroid Testosteron der Zone II kommt demnach in dem Prothorakal-Wehrdrüsensekret von *Ilybius fenestratus* auch das C₂₁-Steroid **I** vor. Zone III aber enthielt — nach Vorversuchen zu schließen — wieder ein C₁₉-Steroid, das bei 244 m μ mit ϵ 14900 absorbiert. Neben diesem Maximum zeigt das UV-Spektrum nur noch eine Inflexion bei etwa 300 m μ . Demnach könnte sowohl ein Δ^4 -3-Keto-steroid, als auch ein Δ^1, Δ^4 -3-Keto-steroid vorliegen; denn für beide Strukturen hat man $\lambda_{max} = 244$ m μ errechnet⁸⁾. Da aber für Δ^4 -3-Keto-steroiden meist um 2–6 m μ kleinere Absorptionswerte gefunden werden, müssen wir eher ein Dienon annehmen. Dafür aber haben wir eine weitgehende Veränderung der Circular dichroismuskurve im Vergleich zu Δ^4 -3-Keto-steroiden zu erwarten. Bei gekreuzt konjugierten Dienon-Systemen ist sowohl die erste als auch die zweite Sphäre symmetrisch; wir dürfen hier also die normale Oktantenregel anwenden⁹⁾, nach der wir für einfache Δ^1, Δ^4 -3-Keto-steroiden einen negativen Cottoneneffekt fordern

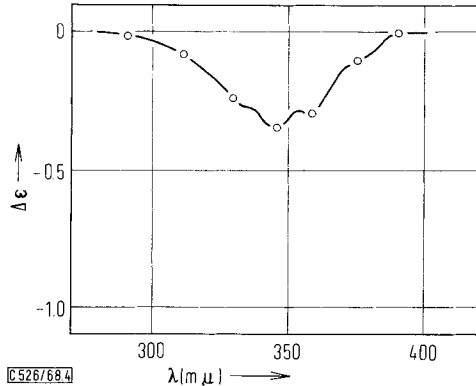


Abbild. 3. Oktantenprojektion eines Δ^1, Δ^4 -3-Keto-Steroides
(Nur die Ringe A und B sind gezeichnet)

⁷⁾ L. Peterson, *Analytic. Chem.* **34**, 1781 (1962).

⁸⁾ L. F. Fieser und M. Fieser, *Steroide*, S. 22 bis 24, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1961.

⁹⁾ G. Sztatzke, in *G. Sztatzke: Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry*, S. 210–212, Heyden and Son Ltd., London 1967.

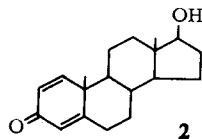


Abbild. 4. Circulardichrogramm der Substanz aus Zone III; aufgenommen in Dioxan mit dem Dichrograph der Fa. Roussel-Jouan, Paris

müssen (Abbild. 3). Ferner ist zu erwarten, daß der Absolutwert dieses Cotton-effektes kleiner ist als bei einfachen Δ^4 -3-Keto-steroiden, weil durch die Einführung der zweiten Doppelbindung auch die zweite Sphäre symmetrisch geworden ist (inhärent symmetrischer Chromophor mit dissymmetrischer Störung)¹⁰. In Übereinstimmung damit zeigt das Circulardichrogramm der Substanz der Zone III (Abbild. 4) einen negativen Cotton-effekt mit $\lambda_{\max} = 346 \text{ m}\mu$ und $\Delta\epsilon_{\max} = -0.35$; diese Werte stimmen sehr gut mit den bereits veröffentlichten für einfache Δ^1, Δ^4 -3-Keto-steroiden¹¹ überein.

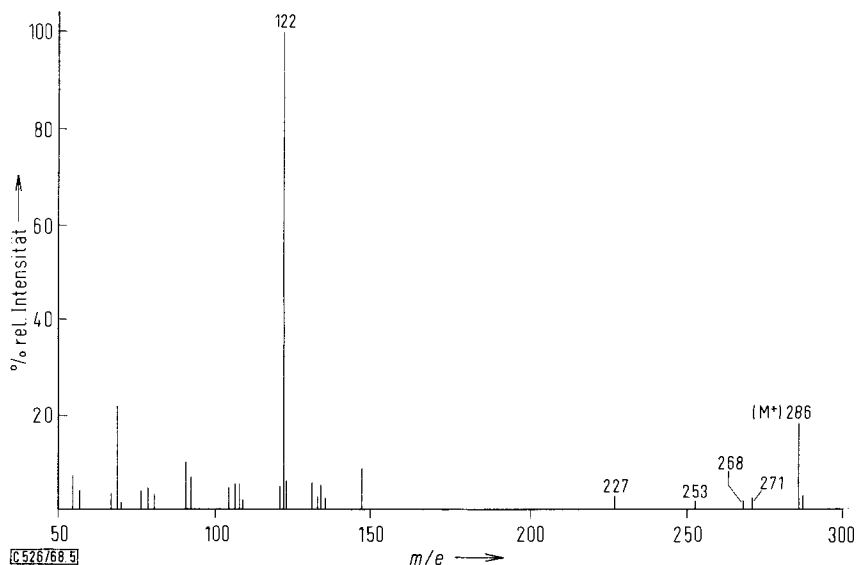
Das IR-Spektrum der Substanz aus Zone III ähnelt in den Schlüsselbanden sehr dem Spektrum von Testosteron, wenn man davon absieht, daß hier nur eine $\nu_{\text{O-H}}$ -Bande bei $3420/\text{cm}$ auftritt. Auffallend ist jedoch eine neue Bande bei $1600/\text{cm}$, die wir der Valenzschwingung der $\text{C}=\text{C}$ -Bindung zwischen C-1 und C-2 zuordnen.

Durch das Massenspektrum (Abbild. 5) wird die Struktur eines Δ^1, Δ^4 -3-Keto-steroids ebenfalls bestätigt. Charakteristisch ist hier die ausgeprägte Spitze bei m/e 122 — entsprechend der Spitze bei m/e 124 der Δ^4 -3-Keto-steroiden — wie sie unser Spektrum zeigt (vgl. Abbild. 5). Da das Mol.-Gew. gerade um zwei Masseneinheiten kleiner ist als bei Testosteron, lag die Vermutung nahe, daß die Substanz der Zone III Δ^1, Δ^4 -Androstadienol-(17 β)-on-(3) (2) ist. Ein Vergleich mit einer Probe, die wir durch Dehydrierung von Testosteron hergestellt haben, bestätigt dies. Die IR-Spektren der synthetischen und der aus dem Käfer isolierten Verbindung stimmen überein, ebenso die IR-Spektren der entsprechenden Acetate.



¹⁰ A. Moscowitz, *Tetrahedron* [London] **13**, 48 (1961).

¹¹ L. Velluz, M. Legrand und M. Grosjean, *Optical Circular Dichroism*, S. 222, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. und Academic Press, New York 1965.



Abbild. 5. Massenspektrum der Substanz der Zone III; aufgenommen mit dem Atlas CH 4

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Dr. Otto Röhm-Gedächtnisstiftung danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit durch Geld- und Sachmittel.

Beschreibung der Versuche

Gewinnung der Steroide

Die frisch präparierten Prothorakal-Wehrdrüsen des *Ilybius fenestratus* werden — wie beschrieben²⁾ — zerdrückt, mit Methanol extrahiert und der Extrakt durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 in farbstoffhaltige und steroidhaltige Fraktionen getrennt. Eine Auftrennung des Steroidgemisches gelingt durch präparative Dünnschichtchromatographie mit 250 μ dicken Schichten aus Kieselgel GF₂₅₄ (Merck); R_F -Werte s. Tab.

R_F -Werte der Substanzen der Zonen I—III

| Substanz | R_F -Wert im Laufmittel | | |
|---|---|---|---|
| | Cyclohexan/Essigester (1:1) 1 mal entw. | Essigester/ Äthanol (6:1) 2 mal entw. | Essigester/ Äthanol (6:1) 1 mal entw. |
| Δ^4 -Pregnenol-(20 β)-on-(3) (1) | 0.32 | 0.48 | — |
| Testosteron | 0.25 | 0.38 | 0.65 |
| $\Delta^{1,4}$ -Androstadienol-(17 β)-on-(3) (2) | 0.16 | 0.26 | 0.58 |

Aus den drei Zonen, die man unter UV-Licht mit der Wellenlänge $\lambda = 254 \mu\mu$ markiert hat, lassen sich die Steroide isolieren, indem man das abgeschabte Adsorbens in Mikrosäulen mit Methanol extrahiert. Zur Entfernung von gelöstem Kieselgel werden die Lösungen eingedampft; der Rückstand wird mit äthanolfreiem Chloroform aufgenommen und die Lösung in Mikrosäulen über Glaswolle und Sand filtriert. Nach dem Verdampfen des Lö-

sungsmittels im Stickstoffstrom erhält man die Steroide zunächst als farblose Öle, die aber meist nach einigen Stunden kristallin erstarrten. Aus den Prothorakal-Wehrdrüsen von 450 Käfern ließen sich bei dieser Arbeitsweise 400 μg Δ^4 -Pregnenol-(20 β)-on-(3) (**1**), 12 mg Testosteron und 7 mg $\Delta^{1,4}$ -Androstadienol-(17 β)-on-(3) (**2**) gewinnen. **1** schmilzt bei 168.5 bis 170.5°, **2** bei 163.5–166.5°.

*Darstellung der Acetate von 1 und 2*¹²⁾: Jeweils etwa 200 μg der Steroidalkohole **1** und **2** wurden in etwa 0.5 ccm einer Mischung von trockenem Pyridin/Acetanhydrid (5:3) gelöst und 16 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Stickstoffstrom wurde der Rückstand durch präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel GF₂₅₄ (Merck) mit Cyclohexan/Essigester (1:1) als Laufmittel gereinigt. Die Umsetzungen verliefen praktisch quantitativ.

¹²⁾ T. Reichstein und K. Gätzi, Helv. chim. Acta **21**, 1189 (1938).