Albumin (s_0 etwa 4,4 sved) ist kleiner und darum „beweglicher“ als das untersuchte Enzym. Der Diffusionskoeffizient des Albumins beträgt etwa $6,1 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{Sekunde}$. Es scheint darum, daß die 20- β -Dehydrogenase auf einen noch kleineren D hinweist. Der hier bestimmte Wert entspricht vielleicht dem wahren Zustand besser.

Man kann daraus schließen, daß auch bei niedrigeren Rotationsgeschwindigkeiten der Einfluß des

Zentrifugalfeldes auf die Diffusion sich nicht vernachlässigen läßt. Es ist notwendig, für die Bestimmung von D immer die allgemeinen Sedimentationsgleichungen und die von ihnen abgeleiteten Auswertungsmethoden anzuwenden.

Wir danken Herrn Dr. G. TRÄXLER, Beckman Instrumente GmbH, München, für die Hilfe bei der Ausführung der Sedimentationsversuche herzlich.

Mikrobiologische Hydroxylierungen von Steroiden

Von A. SCHUBERT, K. HELLER, L. KOPPE, D. ONKEN und R. SIEBERT

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien des VEB Jenapharm, Jena
(Z. Naturforsch. **17 b**, 436—439 [1962]; eingegangen am 18. August 1961)

Mit Hilfe des Schimmelpilzes *Calonectria decora* werden Progesteron-Derivate mit Sauerstoff-Funktionen an C_9 , C_{11} , C_{12} , C_{14} , C_{17} und C_{21} stereospezifisch in 12 β - oder 15 α -Stellung hydroxyliert. Aus diesen Umsetzungen wurden folgende Verbindungen erhalten: 9 α ,15 α -Dihydroxyprogesteron, 14 α ,12 β -Dihydroxyprogesteron, 15 α ,17 α ,21-Trihydroxyprogesteron, 11-Keto-15 α -Hydroxyprogesteron, 12-Keto-15 α -Hydroxyprogesteron.

In früheren Mitteilungen haben wir über Hydroxylierungen verschiedener Steroidverbindungen mit dem Schimmelpilz *Calonectria decora* berichtet¹⁻³.

Diese Untersuchungen wurden fortgesetzt. Wir haben versucht, Zusammenhänge zwischen dem Hydroxylierungs-Vermögen der Fermentsysteme dieses Schimmelpilzes und der Konstitution der als Substrat eingesetzten Steroide zu finden. Im einzelnen wurden dabei folgende Ergebnisse erzielt:

1. Umsetzung von 12 α -Hydroxyprogesteron zu 12-Keto-15 α -Hydroxyprogesteron

Bei der Inkubation von 12 α -Hydroxyprogesteron (I) mit *Calonectria decora* wird mit hoher Ausbeute eine Verbindung (II) mit Schmp. 235° bis 239°C und $[\alpha]_D$: +261° (CHCl₃) erhalten. UV- und IR-Spektrum lassen erkennen, daß die Δ^4 -3-Ketogruppe und die Acetylseitenkette erhalten geblieben sind.

Der Vergleich des Intensitätsverhältnisses der IR-Absorptionen der Δ^4 -3-Ketogruppe und der 20-

Ketogruppe bei I mit den entsprechenden Absorptionen bei II weist darauf hin, daß in II eine weitere Ketogruppe eingeführt worden ist.

Die Oxydation von II mit Chromsäure in Eisessig liefert das bereits bekannte Δ^4 -Pregnen-3.12.15.20-tetraon¹. Eine mit Substanz II identische Verbindung wird ebenfalls bei der Inkubation von 12-Ketoprogesteron mit *Calonectria decora* erhalten. Dieser Befund läßt nur die Möglichkeit zu, daß in der Verbindung I die 12 α -Hydroxylgruppe in eine 12-Ketogruppe überführt wurde und eine Hydroxylgruppe an C_{15} eingeführt worden ist.

Die Stellung der am Kohlenstoffatom 15 eingeführten Hydroxylgruppe wurde mit Hilfe der molaren Drehungsbeiträge der 15 α - bzw. 15 β -Hydroxylgruppe entschieden. Mit Hilfe der speziellen Teilbeiträge des molaren Drehwertes für 15 α -Hydroxyprogesteron⁴ und 15 β -Hydroxyprogesteron⁵ sowie für 12.15-Dihydroxyprogesteron¹ und 15-Ketoprogesteron⁴ wird für 12-Keto-15 α -Hydroxyprogesteron $[M]_D$: +930° und für 12-Keto-15 β -Hydroxyprogesteron $[M]_D$: +706° berechnet. Die molare Drehung beträgt für die Verbindung II $[M]_D$: +900° (CHCl₃). Diese experimentellen Ergebnisse

¹ A. SCHUBERT, G. LANGBEIN u. R. SIEBERT, Chem. Ber. **90**, 2576 [1957].

² A. SCHUBERT, R. SIEBERT u. L. KOPPE, Angew. Chem. **70**, 742 [1958].

³ A. SCHUBERT, G. HILGETAG, A. RIECHE, R. SIEBERT u. S.

SCHWARZ, Naturwissenschaften **45**, 623 [1958].

⁴ B. KLÜGER, R. SIEBERT u. A. SCHUBERT, Naturwissenschaften **2**, 40 [1957].

⁵ J. FRIED, R. W. THOMA, D. PERLMAN, J. E. HERZ u. A. BORMAN, Recent Progr. Hormone Res. **11**, 149 [1955].

gestatten den Schluß, daß die neue Verbindung II 12-Keto-15 α -Hydroxyprogesteron ist.

Dieser Befund läßt die Frage unbeantwortet, ob diese Dehydrierung der 12 α -Hydroxylgruppe im Ausgangsmaterial primär über ein 12 α ,12 β ,15 α -Trihydroxyprogesteron verläuft (diese Annahme ist naheliegend, weil unser Mikroorganismus in sehr guter Ausbeute die 12 β -Stellung hydroxyliert) oder ob eine Dehydrogenase, so wie sie für die Dehydrierung von Steroiden von TALALAY⁶ und SHIRASAKA⁷ beschrieben wird, eingreift.

Versuche, diese Frage durch Einwirken von ¹⁸O₂ während des Fermentations-Vorganges zu klären, sprechen für eine Dehydrierung. Eine sichere Entscheidung war jedoch nicht möglich*.

2. Hydroxylierung von 9 α -Hydroxyprogesteron zu 9 α ,15 α -Dihydroxyprogesteron**

Bei der Inkubation von 9 α -Hydroxyprogesteron (III) mit Kulturen des Schimmelpilzes *Calonectria decora* entsteht eine Verbindung (IV) mit Schmp. 240–242 °C und $[\alpha]_D$: +212° (CHCl₃). Die Elementaranalyse ergibt C₂₁H₃₀O₄ (346,5)

Ber.	C 72,80	H 8,73.
Gef.	C 72,80	H 8,71.

Die Ergebnisse der Elementaranalyse und die Analyse des IR-Spektrums zwischen 1000 und 1150 cm⁻¹ gestatten den Schluß, daß in III zusätzlich eine Hydroxylgruppe eingeführt wurde⁸. Die Oxydation mit Chromsäure in Eisessig liefert eine Substanz (V), deren IR-Spektrum neben der 3- und 20-Ketogruppe die Bande eines 5-Ringketons bei 1738 cm⁻¹ (CH₂Cl₂) aufweist. Das bedeutet, daß die neueingeführte Hydroxylgruppe in IV in 15- oder 16-Stellung stehen muß. Es ist bekannt, daß 1,3-Diketone in alkoholischer Kalilauge unter Ausbildung der Enolform eine UV-Absorption zwischen 280 und 320 m μ zeigen. Die Verbindung V besitzt in methanolischer Kalilauge keine UV-Absorption in dem Spektralbereich zwischen 280 und 320 m μ .

Damit scheidet die mögliche Substitution in 16-Stellung aus⁹. Die Hydroxylgruppe im Ring D der Verbindung IV kann demzufolge nur in 15-Stellung eingeführt worden sein.

Die sterische Zuordnung erfolgt mit Hilfe der molaren Rotationsdifferenzen. Für 9 α ,15 β -Dihydroxyprogesteron wird $[M]_D$: +720,8° berechnet^{10,11}. Die gemessene molare Drehung von IV beträgt $[M]_D$: +734° (CHCl₃). Aus diesem Grunde wird der Hydroxylgruppe am C₁₅ die α -Konfiguration zugeordnet.

Daraus folgt, daß bei der Inkubation von 9 α -Hydroxyprogesteron mit *Calonectria decora* 9 α ,15 α -Dihydroxyprogesteron (IV) entsteht.

3. Umsetzung von 14 α -Hydroxyprogesteron zu 12 β ,14 α -Dihydroxyprogesteron

Bei der Inkubation von 14 α -Hydroxyprogesteron (VI) mit *Calonectria decora* wird eine Substanz (VII) erhalten mit Schmp.: 240–242 °C und $[\alpha]_D$: +129° (CHCl₃). Die Werte der Elementaranalyse sind C₂₁H₃₀O₄ (346,5)

Ber.	C 72,80	H 8,73.
Gef.	C 72,78	H 8,77.

Elementaranalyse und IR-Spektrum gestatten wiederum den Schluß, daß in Verbindung VI eine Hydroxylgruppe eingeführt worden ist. Im IR-Spektrum der Verbindung VII ist die Absorptionsbande der 20-Ketogruppe gegenüber der entsprechenden Bande in der Ausgangssubstanz VI um 7 cm⁻¹ nach kleineren Wellenzahlen verschoben (Aufnahme in CH₂Cl₂). Die Änderung der Lage der 20-Ketoabsorption der Verbindung VII deutet darauf hin, daß die Hydroxylgruppe derart eingeführt wurde, daß eine Wechselwirkung (Wasserstoffbrücken-Bindung) zwischen dieser neuen Hydroxylgruppe und der Ketogruppe am Kohlenstoffatom 20 vorliegt. Die Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen der 12 β -Hydroxylgruppe und der 20-Ketogruppe wurde von uns bereits beschrieben¹.

⁶ P. TALALAY, *Physiol. Rev.* **1957**, 369.

⁷ M. SHIRASAKA, R. TAKASAKI u. M. TSURULA, *Nature* [London] **472**, 390 [1960].

* Herrn C. A. BUNTON, University College London und Herrn MARCEL GUT, The Worcester Foundation for Experimental Biology, Shrewsbury, Massachusetts, danken wir für die massenspektrographischen Untersuchungen und die Überlassung des H₂¹⁸O.

** Dissertation D. ONKEN, Jena 1960.

⁸ K. HELLER, *Z. Naturforsch.* **14b**, 298 [1959].

⁹ L. DORFMAN, *Chem. Reviews* **53**, 47 [1953].

¹⁰ A. SCHUBERT, D. ONKEN, R. SIEBERT u. K. HELLER, *Chem. Ber.* **91**, 2576 [1958].

¹¹ J. FRIED, R. W. THOMA, D. PERLMAN, J. E. HERZ u. A. BORMAN, *Recent Progr. Hormone Res.* **11**, 157 [1955].

Die Verbindung VII liefert ein Monoacetat (VIII) mit Schmp.: 216–218 °C und $[\alpha]_D$: +95° (CHCl₃).

Im IR-Spektrum des Monoacetats VIII liegt die Absorptionsbande der 20-Ketogruppe erwartungsgemäß im Bereich bei 1708 cm⁻¹.

Auf Grund dieser Befunde schließen wir, daß die Verbindung VII 12 β ,14 α -Dihydroxyprogesteron ist.

4. Umsetzung von 17 α ,21-Dihydroxyprogesteron (Reichsteins Substanz S) zu 15 α ,17 α ,21-Trihydroxyprogesteron

Die Umsetzung von Reichsteins Substanz S (IX) mit *Calonectria decora* führt zu einer Verbindung (X) mit Schmp.: 225–27 °C und $[\alpha]_D$: +146° (CH₃OH).

Die Elementaranalyse ergibt C₂₁H₃₀O₅ (362,5)

Ber. C 69,5 H 8,35.

Gef. C 68,92 H 8,23.

Das Ergebnis der Elementaranalyse deutet auf die Einführung einer Hydroxylgruppe hin.

Die Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin führt zu der Verbindung (XI) mit Schmp. 194 bis 196 °C und $[\alpha]_D$: +132° (CHCl₃). Im IR-Spektrum der Verbindung XI wird nur noch die 17 α -Hydroxylgruppe festgestellt. Insgesamt sind in XI zwei Acetoxygruppen vorhanden. Die eine befindet sich am Kohlenstoffatom 21, die Stellung der anderen ist noch nicht bekannt.

Die Oxydation der Verbindung X mit Chromsäure in Eisessig führt zu keiner einheitlichen Substanz. Im IR-Spektrum des Oxydationsprodukts tritt eine Absorptionsbande bei 1732 cm⁻¹ (Nujol) auf. Die 17,21-Dihydroxyseitenkette ist dabei zum überwiegenden Teil erhalten geblieben, so daß diese Bande mit großer Wahrscheinlichkeit auf ein C₁₅- oder C₁₆-Keton zurückzuführen ist.

Durch den Nachweis der Identität der Verbindung XI mit einer authentischen Probe von Δ^4 -Pregnen-3,20-dion-17 α -ol-15 α ,21-diacetat* wurde bewiesen, daß es sich bei der Verbindung X um 15 α ,17 α ,21-Trihydroxyprogesteron (15 α -Hydroxy-Reichsteins Substanz S) handelt.

BERNSTEIN und Mitarbb. erhielten die gleiche Substanz bei der Inkubation von Reichsteins Substanz S mit *Hormodendrum viride*¹².

5. Umsetzung von 11-Ketoprogesteron zu 11-Keto-15 α -Hydroxyprogesteron

Die Umsetzung von 11-Ketoprogesteron (XII) mit einer Kultur des Schimmelpilzes *Calonectria decora* liefert eine Verbindung (XIII) mit Schmp.: 224–228 °C und $[\alpha]_D$: +289° (CHCl₃). Die Elementaranalyse ergibt C₂₁H₂₈O₄ (344,45)

Ber. C 73,23 H 8,19.

Gef. C 73,14 H 8,35.

Elementaranalyse und IR-Spektrum zeigen, daß in Verbindung XII eine Hydroxylgruppe eingeführt worden ist.

Bei der Oxydation der Verbindung XIII mit Chromsäure in Eisessig erhält man eine Substanz (XIV) mit Schmp.: 215–222 °C und $[\alpha]_D$: +323,5° (CHCl₃). Das IR-Spektrum dieser Verbindung XIV zeigt die Absorptionsbande eines 5-Ringketons bei 1738 cm⁻¹ (CH₂Cl₂). Die durch den Mikroorganismus eingeführte Hydroxylgruppe kann daher nur an C₁₅ oder C₁₆ stehen. Das UV-Spektrum der Verbindung XIV in methanolischer Kalilauge zeigt zwischen 280 und 360 m μ keine Absorption. Damit ist in Verbindung XIV ein 1,3-Diketon ausgeschlossen⁹. Die Hydroxylgruppe in Verbindung XIII kann demnach nur an C₁₅ eingeführt worden sein.

Die Konfiguration der Hydroxylgruppe wurde wiederum mit Hilfe der molaren Drehungsbeiträge bestimmt. Die molare Drehung beträgt für Verbindung XIII $[M]_D$: +997° (CHCl₃). Mit den molaren Drehungen von 11-Ketoprogesteron¹³, 15 α - und 15 β -Hydroxyprogesteron^{4,5} wird für 11-Keto-15 α -Hydroxyprogesteron $[M]_D$: +832,5° und für 11-Keto-15 β -Hydroxyprogesteron $[M]_D$: +608,1° berechnet.

Aus diesen Befunden schließen wir, daß es sich bei der Verbindung XIII um 11-Keto-15 α -Hydroxyprogesteron handelt.

* Herrn S. BERNSTEIN danken wir für die Überlassung einer Probe von Δ^4 -Pregnen-3,20-dion-17 α -ol-15 α ,21-diacetat.

¹² S. BERNSTEIN, L. J. FELDMAN, W. S. ALLEN, R. H. BLANK u. C. E. LINDEN, Chem. and Ind. 1956, 111.

¹³ J. P. MATHIEU, A. PETIT u. B. H. R. BARTON, Constantes Selectionnees Pouvoir Rotatoire Naturel I Steroide, Masson u. Cie., Paris 1956.

Den beschriebenen Umsetzungen von Progesteron-Derivaten mit Hilfe der Fermentsysteme des Schimmelpilzes *Calonectria decora* ist gemeinsam, daß stereospezifische Hydroxylierungen an Kohlenstoffatom 12 oder 15 bzw. an Kohlenstoffatom 12 und 15 stattfinden. Die Hydroxylierung in 12 β - und 15 α -Stellung bei Progesteron und bei verschiedenen Pregnanderivaten mit *Calonectria decora* wurde von uns bereits beschrieben^{1, 14}. Bemerkenswert ist die

Tatsache, daß nur bei Progesteron die 12 β - und 15 α -Stellung gleichzeitig hydroxyliert wurden. Bei Derivaten des Progesterons mit einer zusätzlichen Sauerstoff-Funktion wird nur die 12 β - oder die 15 α -Stellung hydroxyliert. Es zeigte sich, daß das stereospezifische Hydroxylierungs-Vermögen der Fermentsysteme des Schimmelpilzes *Calonectria decora* nur auf Progesteron und Progesteron-Derivate mit Sauerstoff-Funktion beschränkt ist.

¹⁴ A. SCHUBERT u. R. SIEBERT, Chem. Ber. **91**, 1856 [1958].

Die Abwehrstoffe einiger Carabiden, insbesondere von *Abax ater*

XII. Mitteilung über Insektenabwehrstoffe*

Von H. SCHILDKNECHT und K. H. WEIS

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg

(Z. Naturforschg. **17 b**, 439—447 [1962]; eingegangen am 4. April 1962)

Zahlreiche Ordnungen der Arthropoden, vor allem viele Familien der Coleopteren, sind mit Organen ausgerüstet, die der Produktion von Wehrstoffen dienen. Besonders auffallend wehren sich die Laufkäfer. Wir konnten bei allen untersuchten 19 Arten der Unterfamilie Carabinae und bei den 6 untersuchten Arten der Unterfamilie Harpalinae ein Gemisch von Methacrylsäure (87 bis 94%) und Tiglinsäure (6 bis 13%) identifizieren. Nicht näher aufgeklärt wurde das neben den Säuren noch in geringer Menge vorhandene Öl.

Die Unterfamilie der Carabiden ist eine der größten innerhalb der Coleopteren. SCHERNEY¹ spricht von ca. 20 000 Arten und gibt an, daß hiervon etwa 900 bei uns aufgefunden worden sind.

Die Carabiden interessieren im Rahmen unserer Arbeiten wegen der am Hinterleib ausmündenden Pygidialdrüsen, aus denen sie — werden sie gereizt — farblose, flüssige und leicht flüchtige Sekrete ausstoßen. Beim Einfangen der Tiere geschah es bisweilen, daß sie diese Flüssigkeit treffsicher uns ins Gesicht und nicht selten in die Augen spritzten.

Hinsichtlich des Geruchs der Abwehrstoffe waren deutlich zwei Gruppen von Carabiden zu unterscheiden. Die eine, Vertreter der Unterfamilie Carabinae — jedoch auch einige Harpalinae — sezernieren einen, wie SCHERNEY¹ sich ausdrückt, „scharfen, eigenartig aromatisch riechenden Saft“, der im Auge ein zwar vorübergehendes, doch schmerzhaftes Brennen erzeugt. HORION² spricht von einem inten-

siven, moschusartigen Geruch, der an den Fingern haftet. Der Geruch konnte mitunter schon dann wahrgenommen werden, wenn ein Stein, unter dem ein solcher Käfer Zuflucht gefunden hatte, angehoben wurde. Das Sekret ist besonders flüchtig, kann aber andererseits leicht zu einem zähen Harz polymerisieren. Bei häufigem Umgang mit den Käfern beobachteten wir zuweilen auch auf der Haut der Hand, nach vorhergehender Rötung, Blasen.

Die andere Gruppe, deren Vertreter ausschließlich Angehörige der Unterfamilie Harpalinae waren, schieden zwar auch ein farbloses, leicht flüchtiges Sekret ab, welches jedoch nicht aromatisch, sondern stechend roch. Dieses Sekret haben wir als Ameisensäure identifiziert³.

Indessen weisen alle Arten von Carabiden, mit Ausnahme der Bombardierkäfer⁴, bei denen die Pygidialblasen mit einer Explosionskammer verbunden sind, einen ähnlichen Bau des Wehrgans⁵ auf,

* XI. Mitt.: Z. Naturforschg. **17 b**, 350 [1962].

¹ F. SCHERNEY, Die neue Brehmbücherei, Heft 245, Verlag A. Ziemsen, Wittenberg 1959.

² A. HORION, Käferkunde für Naturfreunde, Frankfurt/M. 1949.

³ H. SCHILDKNECHT u. K. H. WEIS, Z. Naturforschg. **16 b**, 361 [1961].

⁴ H. SCHILDKNECHT u. K. HOLOUBEK, Angew. Chem. **73**, 1 [1961].

⁵ E. N. PAWLOWSKY, Gifttiere und ihre Giftigkeit, S. 149, Verlag Gustav Fischer, Jena 1927.