

## Identifizierung von $\beta$ -Sitosterin als Hauptsterin des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata* Say)

Unsere bisherigen Arbeiten über Wirt-Parasit-Beziehungen beim Kartoffelkäfer beschäftigten sich vor allem mit den in *Solanum*- und *Lycopersicon*-Arten vorkommenden Steroidalkaloidglykosiden<sup>1</sup>. Nunmehr wurden auch die in diesen Pflanzen sowie in verschiedenen Entwicklungsstadien des Insekts auftretenden Sterine in die Untersuchungen einbezogen. Dies erschien uns wichtig, da Insekten nach bisher vorliegenden Literaturbefunden<sup>2</sup> im allgemeinen weder zu einer Synthese lebensnotwendiger Sterine noch offensichtlich zu grösseren Umwandlungen aufgenommener Steroide befähigt sind, also ihren jeweiligen Bedarf an essentiellen Sterinen aus der Nahrung decken müssen. Ein völliger Mangel an Sterinen führt zum Tod des Insekts, und nicht ausreichende Versorgung hat Wachstums- und Entwicklungsstörungen sowie Beeinträchtigung der Metamorphose und Vermehrungsrate zur Folge. Einige Insekten sind auf bestimmte Sterine angewiesen, beispielsweise *Dermestes vulpinus* Fabr.<sup>3</sup> und *Attagenus piceus* Oliv.<sup>4</sup> auf Cholesterin oder 7-Dehydrocholesterin. Die bisher untersuchten phytophagen Insekten können nicht nur Phytosterine, sondern auch Cholesterin, 7-Dehydrocholesterin und sogar 5 $\alpha$ -Cholestan-3 $\beta$ -ol verwerten<sup>5</sup>. Durchweg wird die Ansicht vertreten, dass alle Insekten, und zwar auch die phytophagen, als Zoosterin Cholesterin (und 7-Dehydrocholesterin) enthalten, was durch die Isolierung von Cholesterin aus Maikäfern (*Melolontha melolontha* L.) und Seidenraupen (*Bombyx mori* L.) sowie durch den Nachweis dieses Sterins in zahlreichen weiteren Insekten auch bewiesen schien<sup>6-8</sup>. Daneben soll in *Bombyx mori*<sup>7</sup> sowie in *Musca vicina* Macq.<sup>8</sup> resorbiertes und offensichtlich noch nicht umgewandeltes  $\beta$ -Sitosterin vorkommen. Kürzlich stellten BARBIER, REICHSTEIN, SCHINDLER und LEDERER<sup>9</sup> fest, dass Bienen (*Apis mellifica* L.) als Zoosterin 24-Methylencholesterin enthalten, eine Verbindung, die auch in der Nahrung der Bienen, im pflanzlichen Pollen, als Phytosterin vorkommt.

Im folgenden soll über die von uns aus Imagines und Puppen des Kartoffelkäfers sowie vergleichend hierzu aus Blättern der Kartoffelpflanze (*Solanum tuberosum* «Aquila») isolierten Sterine kurz berichtet werden.

Aus 22300 mit Kartoffelblättern gefütterten Käfern<sup>10</sup> (1237 g Trockengewicht) wurde durch erschöpfende Extraktion mit Petroläther, Verseifung des Rohfettes (335 g) und Behandlung des unverseifbaren Anteils (18 g) mit Digitonin eine Rohsterin-Fraktion (1,2 g) gewonnen. Dünnschichtchromatographisch (Silicagel «Riedel de Haen», Benzin (Sdp. 80–90°)/Essigester/Benzol (85:10:5, v/v), Sichtbarmachung mit Antimon(III)-chlorid/Eisessig) liessen sich 3 Substanzen (A–C) mit den Rf-Werten A = 0,81, B = 0,70 und C = 0,48 nachweisen (Cholesterin: Rf = 0,48). Durch Säulenchromatographie an Silicagel oder Florisil mit Benzin (Sdp. 80–90°)/Essigester/Benzol (90:5:5, v/v) liess sich das Gemisch im präparativen Maßstabe auftrennen, wobei nach Entfernung geringer Mengen nicht steroider Begleitstoffe für die Substanzen A–C die in Tabelle I angeführte Verteilung ermittelt wurde.

Ebenso wurden aus 7500 Puppen (140 g Trockengewicht, 21 g Rohfett, 2,6 g Unverseifbares, 0,25 g Rohsterin) sowie aus 7100 g Kartoffelblättern (Trockengewicht, 162 g Rohfett, 33 g Unverseifbares, 4,5 g Rohsterin<sup>11</sup>) die gleichfalls in Tabelle I genannten Fraktionen isoliert, die dünn-schichtchromatographisch mit den aus Käfern gewonnenen Substanzen A–C übereinstimmen.

Substanz C, und zwar sowohl aus Käfern und Puppen als auch aus Kartoffelblättern, ist mit  $\beta$ -Sitosterin identisch. Dies ergab sich auf Grund der Elementaranalysen, der Infrarotspektren<sup>12</sup>, der Schmelz- und Mischschmelzpunkte sowie der spezifischen Drehungen des Sterins und seiner Derivate (Tabelle II) und wurde durch Vergleich mit authentischem  $\beta$ -Sitosterin<sup>13</sup> (Mischsmp., IR-Spektrum) bestätigt. Weiterhin besitzt die bei katalytischer Hydrierung des Acetats (PtO<sub>2</sub>/Eisessig) entstehende Verbindung die für Stigmastanol-acetat in der Literatur angeführten Konstanten (Tabelle II). Das aus Kartoffelblättern isolierte  $\beta$ -Sitosterin, jedoch nicht das aus Käfern und Puppen, dürfte nach dem IR-Spektrum (zusätzliche schwache Bande bei 970 cm<sup>-114</sup>), dem Wasserstoffverbrauch bei der Mikrohydrierung sowie nach der titrimetrisch bestimmten Brom-Aufnahme<sup>15</sup> geringe Mengen Stigmasterin enthalten. Auch Kartoffelknollen enthalten als Hauptsterin  $\beta$ -Sitosterin, daneben wenig Stigmasterin<sup>16</sup>.

Tab. I. Verteilung der Substanzen A–C in den Sterin-Fractionen von Imagines und Puppen des Kartoffelkäfers sowie von Kartoffelblättern

| Substanz | Imagines | Puppen | Kartoffelblätter |
|----------|----------|--------|------------------|
| A        | 1,5%     | Spuren | 60,4%            |
| B        | 1,4%     | Spuren | 6,8%             |
| C        | 97,1%    | ~ 100% | 32,8%            |

<sup>1</sup> K. SCHREIBER, Züchter 27, 289 (1957); Ent. exp. appl. 1, 28 (1958). – H. BUHR, R. TOBALL und K. SCHREIBER, Ent. exp. appl. 1, 209 (1958).

<sup>2</sup> H. LIPKE und G. FRAENKEL, Ann. Rev. Entomol. 1, 17 (1956). – A. J. CLARK und K. BLOCH, J. biol. Chem. 234, 2578, 2583, 2589 (1959). – R. E. MONROE, Nature (Lond.) 184, 1513 (1959); sowie 3–8 u. a.

<sup>3</sup> G. FRAENKEL, J. A. REID und M. BLEWETT, Biochem. J. 35, 712 (1941).

<sup>4</sup> H. MCKENNIS, J. biol. Chem. 167, 645 (1947).

<sup>5</sup> G. FRAENKEL und M. BLEWETT, Biochem. J. 37, 692 (1943). – Z. H. LEVINSON und E. D. BERGMANN, Biochem. J. 65, 254 (1957).

<sup>6</sup> H. LETTRÉ in H. LETTRÉ, H. INHOFFEN und R. TSCHESCHE, Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Naturstoffe, 2. Aufl. (Stuttgart 1954), vol. 1, p. 132. – S. D. BECK und G. G. KAPADIA, Science (Wash.) 126, 258 (1957).

<sup>7</sup> W. BERGMANN, J. biol. Chem. 107, 527 (1934).

<sup>8</sup> E. D. BERGMANN und Z. H. LEVINSON, Nature (Lond.) 182, 723 (1958).

<sup>9</sup> M. BARBIER, T. REICHSTEIN, O. SCHINDLER und E. LEDERER, Nature (Lond.) 184, 732 (1959). – M. BARBIER und O. SCHINDLER, Helv. chim. Acta 42, 1998 (1959). – M. BARBIER, M.-F. HÜGEL und E. LEDERER, Bull. Soc. Chim. biol. 42, 91 (1960).

<sup>10</sup> 24 h vor Abtötung wurde die Nahrungszufuhr eingestellt.

<sup>11</sup> Dieses Rohsterin enthielt noch beträchtliche Mengen (etwa 30%) eines chromatographisch leicht abtrennbaren Kohlenwasserstoffs vom Smp. 65,5° (aus Äthanol), vermutlich Triakontan (E. GILDEMEISTER und F. HOFFMANN, Die ätherischen Öle, 4. Aufl. (Berlin 1960), vol. IIIa, p. 3).

<sup>12</sup> Herrn Dr. K. HELLER, Wissenschaftliche Laboratorien des VEB Jenapharm, Jena, danken wir für Aufnahme und Diskussion der IR-Spektren.

<sup>13</sup> Herrn Dr. R. K. CALLOW, London, sind wir für die freundliche Überlassung von authentischem  $\beta$ -Sitosterin (Smp. 138–140°) sehr verbunden.

<sup>14</sup> J. J. JOHNSON, M. F. GROSTIC und A. O. JENSEN, Analyt. Chem. 29, 468 (1957).

<sup>15</sup> M. BARBIER und O. SCHINDLER, Helv. chim. Acta 42, 1998 (1959).

<sup>16</sup> J. J. SCHWARTZ und M. E. WALL, J. Amer. chem. Soc. 77, 5442 (1955).

Tab. II. Vergleich der physikalischen Konstanten von Substanz C aus Imagines und Puppen des Kartoffelkäfers sowie aus Kartoffelblättern mit  $\beta$ -Sitosterin

|                            |                           | Substanz C<br>aus Imagines | aus Puppen | aus Kartoffel-<br>blättern | $\beta$ -Sitosterin<br>Literatur |                               |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------|------------|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Acetat                     | Smp.                      | 140–141°                   | 140–141°   | 136–137°                   | 137° <sup>21</sup>               | 140° <sup>22</sup>            |
|                            | $[\alpha]_D$ (Chloroform) | – 36,6°                    | – 39,0°    | – 38,7°                    | – 37° <sup>21</sup>              | – 37,1 $\pm$ 2° <sup>22</sup> |
|                            | Smp.                      | 129°                       | 128–128,5° | 128,5–129°                 | 126–127° <sup>21</sup>           | 129,5° <sup>22</sup>          |
| Benzoat                    | $[\alpha]_D$ (Chloroform) | – 42,6°                    | – 43,2°    | – 40,5°                    | – 42° <sup>21</sup>              | – 42 $\pm$ 3° <sup>22</sup>   |
|                            | Smp.                      | 143–146°                   | —          | 147°                       | 146–147° <sup>21</sup>           | 147° <sup>22</sup>            |
|                            | $[\alpha]_D$ (Chloroform) | – 13,8°                    | —          | – 13,2°                    | – 14° <sup>21</sup>              | —                             |
| Hydrierprodukt<br>(Acetat) | Smp.                      | 134°                       | —          | 133–134°                   | 138° <sup>21</sup>               | 134° <sup>22</sup>            |
|                            | $[\alpha]_D$ (Chloroform) | + 12,3°                    | —          | + 15,4°                    | + 14° <sup>21</sup>              | + 15,5 $\pm$ 2° <sup>22</sup> |

Substanz A<sup>17</sup> kristallisiert aus 70prozentigem Isopropanol in farblosen Nadeln vom Smp. 108–109° und  $[\alpha]_D$  + 46,9° in Chloroform (Acetat: Smp. 122–123°,  $[\alpha]_D$  + 56,0° in Chloroform), zeigt keine Liebermann-Burchard-Reaktion und dürfte vermutlich in die Gruppe der Triterpene gehören. Weitere Substanz A konnte in dem nicht mit Digitonin fällbaren Anteil des Unverseifbaren (aus Kartoffelblättern) dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden.

Die in nur geringen Mengen isolierte Substanz B hat einen Smp. von 130° (aus Kartoffelblättern) bzw. von 152° (aus Kartoffelkäfern) und gibt eine stark positive Liebermann-Burchard-Reaktion. Ob es sich hier um ein 4-Methylsterin vom Typ des Lophenol (4 $\alpha$ -Methyl-5 $\alpha$ -cholest-7-en-3 $\beta$ -ol)<sup>18</sup> oder des Citrostadienol (4 $\alpha$ -Methylstigmasta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol)<sup>19</sup> handelt, soll durch weitere Untersuchungen geklärt werden (Lophenol<sup>20</sup> und Substanz B zeigen zum Beispiel im Dünnschichtchromatogramm gleiche Rf-Werte und Nachweisreaktionen).

Nach diesen Ergebnissen ist  $\beta$ -Sitosterin nicht nur das Hauptsterin der Kartoffelblätter, sondern auch das Hauptsterin der mit diesem Substrat ernährten Kartoffelkäfer. Somit dürfte bei diesem phytophagen Insekt keine Umwandlung des mit der Nahrung aufgenommenen Phytosterins in ein spezielles Zoosterin erfolgen. Hiermit wird der grundsätzliche Befund von BARBIER, REICHSTEIN, SCHINDLER und LEDERER<sup>9</sup>, dass Körper- und Nahrungssterine eines nicht zoophagen Insekts identisch sein können, auch für den Kartoffelkäfer bestätigt. Hervorzuheben ist die bevorzugte Aufnahme bzw. Verwertung von  $\beta$ -Sitosterin, denn die in Kartoffelblättern zusätzlich vorhandenen Substanzen A und B sowie auch Stigmasterin

konnten im Insekt nur in Spuren bzw. gar nicht nachgewiesen werden (vgl. Tabelle I).

**Summary.**  $\beta$ -Sitosterol is the principal sterol in the adults and pupae of the Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) as well as in the leaves of the potato plant (*Solanum tuberosum* 'Aquila'). These results led us to suspect that this phytophagous insect utilizes the dietary phytosterol without conversion.

K. SCHREIBER, G. OSSKE und G. SEMBDNER

Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin, Forschungsstelle Mühlhausen/Thüringen (Deutschland), 24. Mai 1961.

<sup>17</sup> Die IR-Spektren der Substanzen A aus Käfern und Kartoffelblättern zeigen keine Unterschiede.

<sup>18</sup> C. DJERASSI, J. S. MILLS und R. VILLOTTI, J. Amer. chem. Soc. 80, 1005 (1958). – C. DJERASSI, G. W. KRAKOWER, A. J. LEMIN, L. H. LIU, J. S. MILLS und R. VILLOTTI, J. Amer. chem. Soc. 80, 6284 (1958).

<sup>19</sup> A. WEIZMANN und Y. MAZUR, J. org. Chem. 23, 832 (1958). – Y. MAZUR, A. WEIZMANN und F. SONDHEIMER, J. Amer. chem. Soc. 80, 1007, 6293 (1958).

<sup>20</sup> Wir danken Herrn Prof. W. KLYNE, London, bestens für die freundliche Überlassung von Lophenol sowie weiterer Vergleichssubstanzen aus der «Steroid Reference Collection» des Medical Research Council.

<sup>21</sup> W. BERGMANN in R. T. HOLMAN, W. O. LUNDBERG und T. MALKIN, Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids (London 1952), vol. 1, p. 18.

<sup>22</sup> D. R. IDLER, S. W. NICKSIC, D. R. JOHNSON, V. W. MELOCHE, H. A. SCHUETTE und C. A. BAUMANN, J. Amer. chem. Soc. 75, 1712 (1953).

## Operative Entfernung des Gehörorganes ohne Schädigung angrenzender Labyrinthteile bei Putenküken

Für Untersuchungen der ontogenetischen Entwicklung von Lautäusserungen sowie bei der Analyse des Zusammenwirkens von arteigenen Lauten mit Ausdrucksbewegungen ist es unter Umständen unerlässlich, das Gehörorgan auszuschalten<sup>1–3</sup>. Verschiessen des äusseren Gehörganges oder Entfernung der Gehörknöchelchen bewirkt nur einen Empfindlichkeitsverlust von etwa 40 db. Zerstört man das innere Ohr, so werden meist die angrenzenden Labyrinthteile in Mitleidenschaft gezogen, und das Versuchstier ist in seinem Gesamtverhalten so sehr verändert, dass es schwer wird, im einzelnen Ursache

und Wirkung einander zuzuordnen. Überdies ist mit einer erheblichen Sterblichkeitsrate bei den operierten Tieren zu rechnen.

SCHWARTZKOPFF hat – in Anlehnung an frühere Veröffentlichungen von EWALD, TRENDLENBURG, TULLIO et al. – an Dompfaffen und anderen Singvögeln verschiedene Methoden der Exstirpation der Lagna und des Ductus cochlearis erprobt und weiterentwickelt<sup>4</sup>. Wir

<sup>1</sup> R. HÜCHTER und J. SCHWARTZKOPFF, Exper. 14, 106 (1958).

<sup>2</sup> E. MESSMER und I. MESSMER-BERGSTEIN, Z. Tierpsychol. 13, 341 (1956).

<sup>3</sup> W. M. SCHLEIDT, M. SCHLEIDT und M. MAGG, Behaviour 16, 254 (1960).

<sup>4</sup> J. SCHWARTZKOPFF, Z. vgl. Physiol. 31, 527 (1949).