

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die Untersuchungen beschrieben, die zur Identifizierung und Synthese flüchtiger Inhaltsstoffe von Insekten durchgeführt wurden, und in deren Rahmen u. a. eine Reihe von neuen Naturstoffen entdeckt wurde. Die analytischen Techniken waren im wesentlichen Gaschromatographie und kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie, die von Mikroreaktionen zur Derivatisierung von Naturextrakten ergänzt wurden. Die untersuchten Insekten sind verschiedene Arten aus der Ordnung der Köcherfliegen, die Kastanienminiermotte *Cameraria ohridella*, die Fruchtfliege *Myoleja lucida* und die Zwiebelfliege *Delia antiqua*. Jede Thematik wird in einem eigenständigen Kapitel behandelt, dort wird auch auf die jeweilige Motivation der Untersuchungen eingegangen.

In der Einleitung wird neben einer kurzen Einführung zur chemischen Kommunikation insbesondere auf biogenetische Zusammenhänge von Naturstoffen eingegangen, deren Kenntnis für die Identifizierung neuer Strukturen von Bedeutung ist.

Im ersten Teil der Arbeit werden die Ergebnisse der Untersuchungen von Köcherfliegen vorgestellt. Zum ersten Mal wurden in dieser Insektenordnung Vertreter der Substanzklasse der bicyclischen Acetale identifiziert. Zunächst werden die Identifizierung und Synthese von 1,3-Diethyl-4,6-dimethyl-2,7-dioxabicyclo[2.2.1]heptan (**42**), einem neuen Naturstoff aus *Glyphotaelius pellucidus*, beschrieben. Theoretische Überlegungen zu biosynthetischen Zusammenhängen, zum gaschromatographischen Retentionsverhalten und zur massenspektrometrischen Fragmentierung führten zu dem Strukturvorschlag, der durch anschließende Synthese bewiesen wurde. Zur Darstellung eines Diastereomerenmischens wurde 4,6-Dimethyl-6-nonen-3-on (**41**) in das Epoxyketon umgewandelt, welches leicht zu **42** cyclisierte. Zur Darstellung der enantiomerenreinen Verbindungen wurden u. a. die SAMP/RAMP-Hydrasonmethode und die asymmetrische Dihydroxylierung nach Sharpless eingesetzt. Wie aus den Massenspektren und den NMR-Spektren hervorgeht, liegt der Naturstoff in der 3-*endo*-Konfiguration vor. Die Stellung der Methylgruppe an Position 6 und auch die absolute Konfiguration der Verbindung konnten jedoch nicht bestimmt werden, da hierfür kein Material mehr vorlag.

Ein weiteres bicyclisches Acetal wurde mit (1*R*,3*S*,5*S*,7*S*)-1-Ethyl-3,5,7-trimethyl-2,8-dioxabicyclo[3.2.1]octan (**58b**) in *Potamophylax* spp. gefunden. Die Zuordnung der relativen und absoluten Konfiguration gelang durch (stereoselektive) Synthese und anschliessendem Vergleich der gaschromatographischen Retentionszeiten.

In weiteren Spezies wurden die schon aus vorangehenden Untersuchungen bekannten kurzkettigen Ketone und sekundären Alkohole, sowie weiterhin Kohlenwasserstoffe, Carbonsäuren, Carbonsäureester und aromatische Verbindungen identifiziert. Die am häufigsten wiederkehrenden Verbindungen sind 2-Heptanon, 2-Heptanol, 2-Nonanon und 2-Nonanol, welche teilweise von ungesättigten Vertretern begleitet werden. Besonders zu erwähnen ist hier (*Z*)-4-Nonen-2-on (**82**) aus Psychomyiiden, welches als Naturstoff vorher nicht bekannt war. Arten aus der Familie Limnephilidae unterscheiden sich von Vertretern aus anderen Familien im Hinblick auf die Strukturen der flüchtigen Inhaltsstoffe. Sie produzieren zumeist in Position 3 oxygenierte, verzweigte Ketone und Alkohole, wie z. B. 4-Methyl-3-heptanon (**51**), 4-Methyl-3-heptanol (**66**) und auch dimethylverzweigte Verbindungen wie 4,6-Dimethyl-3-nonanon (**40**). Von letzterer Struktur leiten sich auch die beiden in dieser Arbeit identifizierten bicyclischen Acetale ab.

Es wurden weiterhin verschiedene Spezies aus der chilenisch-patagonischen Subregion untersucht, die allesamt nur in dieser Region beheimatet sind. Die Analyse der flüchtigen Inhaltsstoffe ergab ein den europäischen Arten vergleichbares Bild: viele Arten produzieren 2-Heptanon (**37**) und 2-Nonanon (**3**) sowie die hiervon abgeleiteten Verbindungen. In je einem Vertreter der Limnephilidae und der Hydrobiosidae wurden in Position 3 oxygenierte Strukturen gefunden. Abweichend hiervon sind in der Familie Philorheithridae zugehörigen Spezies eine Vielzahl von ungesättigten und verzweigten Kohlenwasserstoffen vorhanden.

Im folgenden Kapitel werden die Untersuchungen zur chemischen Kommunikation bei der Kastanienminiermotte *Cameraria ohridella* vorgestellt. Das Ziel war zunächst, eine Substanz zu identifizieren, die eine elektrophysiologische Aktivität aufwies und deren Massenspektrum auf die Struktur eines Tetradecadienals schließen ließ. Die gesuchte Substanz lag jedoch in derart geringen Mengen in den Naturextrakten vor, dass die Detektion dieser Substanz, insbesondere nach einer notwendigen Fraktionierung des Extraktes, nicht gelang. Durch die Synthese von Vergleichssubstanzen wurde zunächst zum einen bestätigt, dass es sich in der Tat um ein Tetradecadienal handelte und zum anderen die Doppelbindungen konjugiert vorliegen sollten. Bevor die Charakterisierung abgeschlossen werden konnte, wurde die Identifizierung des Sexualpheromons von *C. ohridella* als (8*E*,10*Z*)-Tetradecadienal (**115**)

bekanntgegeben. Durch die daraufhin durchgeführte Synthese auf einem unabhängigen Weg konnte diese Identifizierung bestätigt werden. Die Schlüsselschritte zum Aufbau des konjugierten Doppelbindungssystems waren dabei die stereoselektive Reduktion einer Dreifachbindung sowie eine stereoselektiv geführte Wittig-Reaktion. Das Produkt wurde in guten Ausbeuten und in hoher Reinheit erhalten.

Darüber hinaus wurden die dem Pheromon strukturell verwandten Substanzen 7-Undecynylformiat (7Y-11Fo), 7-Dodecynylformiat (7Y-12Fo), 9-Tridecinal (9Y-13Al) und 9-Tridecynylformiat (9Y-13Fo) dargestellt und deren Aktivität sowohl in elektrophysiologischen Experimenten als auch in Feldtests überprüft. Eine bei allen Substanzen vorhandene EAG-Aktivität äußerte sich nur bei 7Y-12Fo und 9Y-13Al in einer verhaltensmodifizierenden Wirkung. Zur Erklärung dieses Phänomens wird zunächst ein Überblick über literaturbekannte vergleichbare Experimente und deren Deutungen gegeben, und diese Ergebnisse dann auf die vorliegenden Untersuchungen übertragen.

Zum Paarungsverhalten von männlichen Fruchtfliegen der Art *Myoleja lucida* gehört das Errichten von Territorien auf den Blättern der Wirtspflanze (Rote Heckenkirsche, *Lonicera xylosteum*). Die Territorien werden dabei mit einem Sekret markiert, welches einerseits Weibchen anlockt, andererseits das Territorium auch attraktiv für andere Männchen macht. Auch Weibchen zeigen dieses Blattmarkierungsverhalten. Der Hauptbestandteil dieser Markierungen sind einfach und doppelt ungesättigte Kohlenwasserstoffe sowie einfach methylverzweigte gesättigte Kohlenwasserstoffe. Zwischen Männchen und Weibchen besteht dabei ein Unterschied hinsichtlich der Kettenlänge dieser Verbindungen: in Männchen liegt das Maximum bei den C₂₉-Verbindungen, bei Weibchen hingegen bei den C₂₇-Verbindungen. Männchen produzieren darüber hinaus (*R*)-3-Hydroxyhexansäureethylester (**133**). Diese Substanz wurde synthetisiert, eine Überprüfung in Biotests steht genau wie im Falle der Kohlenwasserstoffe allerdings noch aus.

Im letzten Kapitel des Ergebnisteils werden schließlich die Untersuchungen zur chemischen Kommunikation bei der Zwiebelfliege *Delia antiqua* vorgestellt. Da über die intraspezifische Kommunikation nur sehr wenig bekannt ist, wurde zunächst eine Bestandsaufnahme der von den Fliegen abgegebenen flüchtigen Verbindungen gemacht. Hierzu erfolgte die Probennahme mittels der *head space*-Technik. Die in diesen Proben identifizierten Substanzen sind zum einen verzweigte und unverzweigte sekundäre Alkohole und Ketone, wie z. B. (*R*)-6-Methyl-2-heptanol (**146**), und zum anderen verzweigte primäre Alkohole mit

der Hauptkomponente 4,8-Dimethyl-1-nonanol (**151**). In weiteren Experimenten wurde die Produktion von **146** in Abhängigkeit vom Alter, Geschlecht und physiologischen Zustand der Fliegen untersucht. (*R*)-**146** und einige der einfach und doppelt verzweigten primären Alkohole wurden synthetisiert.

Da es Hinweise auf ein von den Fliegen produziertes Alarmpheromon gab, wurde dieser Frage ebenfalls nachgegangen. In den Experimenten und Analysen konnte allerdings dessen Identität nicht aufgeklärt werden.

Ebenso gibt es Anhaltspunkte für an der Eiablage der Fliegen beteiligte Semiochemikalien. Es blieb allerdings bisher ungeklärt, ob es sich um ein Pheromon oder um ein evtl. von Mikroorganismen produziertes Kairomon handelte. In eigenen Experimenten zeigte sich, dass in einigen Extrakten von eierlegenden Weibchen die Konzentration von kurzkettigen Carbonsäuren im Vergleich zu virginen Weibchen leicht erhöht war. Ob diese eine Rolle bei der Eiablage spielen, muss jedoch in Biotests erst noch überprüft werden. Es wurden weiterhin Eier auf Zwiebeln inkubiert und ein *head space*-Extrakt angefertigt. Die hieraus identifizierten Substanzen unterschieden sich jedoch nicht von denen aus einer von Zwiebeln gewonnenen Probe.

7 Summary

The present thesis describes the identification and synthesis of volatile compounds from insects, leading to the identification of various new natural compounds. The analytical techniques employed were gas chromatography and combined gas chromatography-mass spectrometry, as well as micro reactions for derivatisations of natural extracts. The insects studied were several species belonging to the order Trichoptera (caddis flies), the horse chestnut leafminer *Cameraria ohridella* (Lepidoptera), the fruit fly *Myoleja lucida* (Diptera), and the onion fly *Delia antiqua* (Diptera). Each subject is presented in a self-contained chapter, in which the motivations for the investigations are also presented.

In the introduction, concepts of chemical communication and biogenetic relationships of natural compounds are discussed, whose knowledge is of importance for the identification of new structures.

In the first part, the results of the investigations of volatile compounds of caddis flies are presented. Bicyclic acetals were identified in this insect order for the first time. The structure of a new natural compound from *Glyphotaelius pellucidus*, 1,3-diethyl-4,6-dimethyl-2,7-dioxabicyclo[2.2.1]heptane (**42**), could be elucidated. Considerations concerning biogenetic relationships, mass-spectrometric fragmentation patterns and gas-chromatographic retention behaviour led to the structure proposal, which could be proven by synthesis of the compound. A mixture of all diastereomers was obtained by converting 4,6-dimethyl-6-nonen-3-one (**41**) into the epoxy ketone, which cyclized easily to **42**. The SAMP/RAMP-hydrazone method and asymmetric dihydroxylation according to Sharpless were employed in the enantioselective synthesis of the compounds. The configuration of the natural compound is 3-*endo*, as was deduced from NMR and mass spectra. The complete relative and the absolute configuration could not be determined due to lack of material.

Extracts of males and females of *Potamophylax* spp contained another bicyclic acetal, (1*R*,3*S*,5*S*,7*S*)-1-ethyl-3,5,7-trimethyl-2,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane. The relative and absolute configuration was determined by means of enantioselective synthesis and enantioselective gas chromatography.

In other species, the short-chain ketones and secondary alcohols known from former investigations were identified; as well as hydrocarbons, carboxylic acids and their esters, and

aromatic compounds. 2-Heptanone, 2-heptanol, 2-nonanone, and 2-nonanol were found most frequently, sometimes they were accompanied by unsaturated analogs like (*Z*)-4-nonen-2-one from psychomyiids. This latter compound also is a new natural compound. Volatile compounds found in limnephilids are different from those of other families: they produce branched ketones and alcohols oxygenated in position 3, e. g. 4-methyl-3-heptanone, 4-methyl-3-heptanol, and 4,6-dimethyl-3-nonanone, among others. The bicyclic acetals identified here are derived from this latter compound.

Furthermore, the volatile compounds of some species of the Chilean-Patagonian subregion were studied, all species being endemic to this region. The analyses revealed that they generally produce the same compounds as their European counterparts: 2-heptanone and 2-nonanone and compounds derived hereof. Members of the families Limnephilidae and Hydrobiosidae contained compounds oxygenated in position 3. Several unsaturated and branched hydrocarbons are peculiar to Philorheithrids.

In the following chapter the investigations concerning the chemical communication of the horse chestnut leafminer *Cameraria ohridella* are presented. Initially, the aim was to identify an electrophysiologically active compound, which mass spectrum suggested the structure of a tetradecadienal. Unfortunately, the compound could not be detected due to the minute amounts present in the extracts. Syntheses of reference compounds validated the structure proposal of a tetradecadienal and showed that the double bonds should be conjugated. Before the structure elucidation could be finished, the identification of the sex pheromone of *C. ohridella* as (*8E,10Z*)-tetradecadienal was published. This was confirmed by an independent synthesis and comparison of the mass spectra. The key steps in establishing the conjugated double bond system were a stereoselective reduction of a triple bond and a stereoselective Wittig reaction.

In addition, the pheromone analogs 7-undecylnyl formate (7Y-11Fo), 7-dodecylnyl formate (7Y-12Fo), 9-tridecynal (9Y-13Al), and 9-tridecylnyl formate (9Y-13Fo) were synthesized in order to examine their activity in electrophysiological experiments and field trials. All analogs were electrophysiologically active, but only 7Y-12Fo and 9Y-13Al revealed behaviour modifying properties. The literature is revised before discussing the present results.

Males of the fruit fly *Myoleja lucida* establish territories on the leaves of their host plant, *Lonicera xylosteum*, and mark them with substances produced in their rectal glands. These secretions attract females and also makes the territory attractive to other males. Females also

show leaf marking behaviour. The main components of this secretions are singly and doubly unsaturated hydrocarbons as well as singly branched saturated hydrocarbons. Analyses of male and female secretions exhibited a difference in chain length between the sexes: males show a maximum concentration of C₂₉-compounds, while in females C₂₇-hydrocarbons are dominant. Additionally, males produce ethyl (*R*)-3-hydroxyhexanoate (**133**). **133** was synthesized, and shall be tested in bio assays, as well as the hydrocarbons.

Finally, the investigations concerning the chemical communication of the onion fly, *Delia antiqua*, are presented. *Head space* extracts were analysed in order to have a survey of compounds produced by the insects. Branched and unbranched ketones and secondary alcohols like (*R*)-6-methyl-2-heptanol (**146**) were identified, as well as branched primary alcohols, with 4,8-dimethyl-1-nonanol (**151**) as the main component. In further experiments the production of **146** in dependence of age, sex, and physiological state of the flies was investigated. (*R*)-**146** and some of the primary alcohols were synthesized.

Possibly, the flies also produce an alarm pheromone. In the present experiments and analyses the identity of this compound could not be clarified.

Similarly, experiments of other groups led to the hypothesis, that semiochemicals are involved in the egg laying behaviour of females. It could not be established, whether it is a pheromone or a kairomone. In own experiments some abdominal extracts of egg-laying females showed a higher concentration of short chain carboxylic acids, as compared to virgin females. A possible behaviour modifying function has to be established in bio assays. *Head space* extracts of eggs incubated on onion slices did not differ from those of onion alone.