

Eine Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von drei Juvenilhormonen von Insekten

Nachweis von 10.11-Epoxy-3.7.11-trimethyl-2-*trans*-6-*trans*-dodecadiensäuremethyl-ester in *Melolontha melolontha*

A Method for the Qualitative and Quantitative Determination of Three Natural Insect Juvenile Hormones

Evidence of Methyl 10,11-epoxy-3,7,11-trimethyl-2-*trans*-6-*trans*-dodecadienoate in *Melolontha melolontha*

K. H. Trautmann, A. Schuler

Dr. Maag AG, Dielsdorf, Schweiz

M. Suchý und H.-K. Wipf

Socar AG, Dübendorf, Schweiz

(Z. Naturforsch. **29 c**, 161–168 [1974] ; eingegangen am 12. Dezember 1973)

Quantitative Determination, Insects, Juvenile Hormones

A method is presented permitting the qualitative and quantitative determination of all three presently known hormones (JH 1–3). The determination is based on the method of radioactive isotope dilution, whereby a very small known amount of tritium-labelled JH-1 is added to the ether extract of the particular species. The addition of radioactive JH-1 permits the isolation of all three hormones, because of their similar behaviour during the chosen work up.

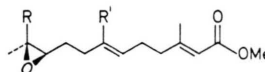
The quantitative determination was carried out by gas chromatography and the identification was confirmed with the help of retention-times and GC-MS combination. The method was checked by using an extract of *Hyalophora cecropia*. For the first time methyl 10,11-epoxy-3,7,11-trimethyl-2-*trans*-6-*trans*-dodecadienoate (JH-3) could also be identified as the juvenile hormone of *Melolontha melolontha*. In *Vanessa io* larvae, *Tenebrio molitor* larvae and adults and in *Musca domestica* larvae none of the three known hormones could be detected.

The preparation of JH-1 labelled with tritium in the methyl group of the ester was accomplished with very high specific activity (4.34 Ci/mmol) of the tritiated acid with diazomethane.

Die Juvenilhormone spielen in der Insektenentwicklung eine entscheidende Rolle^{1–3}. Das erste von den drei bis heute bekannten natürlichen Hormonen wurde 1967 von Röller *et al.*⁴ aus dem Wildseidenspinner *Hyalophora cecropia* isoliert und als der *cis*-10.11-Epoxy-7-äthyl-3.11-dimethyl-2-*trans*-6-*trans*-tridecadiensäuremethylester (JH-1) identifiziert. Im Jahre 1968 konnte die Arbeitsgruppe Meyer⁵ in der gleichen Species neben dem JH-1 als Haupthormon noch ein zweites Hormon (JH-2) aufklären, nämlich die analoge 7-Methyl-Verbindung. Beide Juvenilhormone wurden auch in den beiden zu *Cecropia* nahe verwandten Faltern *Hyalophora gloverii*⁶ und *Samia cynthia*⁷ gefunden. Judy *et al.*⁸ konnten kürzlich aus dem Kulturmedium von *Manduca sexta*-*Corpora allata* neben JH-2 den um eine weitere Methylengruppe ärmeren 10.11-Epoxy-farnesensäuremethylester (JH-3) isolieren, der bereits von Bowers⁹ im Jahre 1965 als JH-aktive Verbin-

dung erkannt wurde. Bieber *et al.*^{10, 11} benützten die Methode der umgekehrten Verdünnungsanalyse zur quantitativen Bestimmung von JH-1, bei der sie einem Extrakt einen Überschuß an deuteriertem JH-1 zusetzten. In allen von ihnen untersuchten Species aus z. T. unterschiedlichen Insektenordnungen konnten sie JH-1 nachweisen.

Durch die obigen Resultate ergibt sich die Frage, ob die drei bekannten Hormone auch in anderen Species vorhanden sind. Wo dies nicht der Fall ist,



JH-1 R = R' = Äthyl
JH-2 R = Äthyl, R' = Methyl
JH-3 R = R' = Methyl

Sonderdruckanforderungen an K.-H. Trautmann, Dr. Maag AG, CH-8157 Dielsdorf.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

müssen andere, noch nicht bekannte Hormone wirksam sein. Wir haben deshalb eine Methode entwickelt, die es gestattet, alle drei Hormone gleichzeitig quantitativ zu bestimmen. Wir verwendeten dabei das Prinzip der radioaktiven Verdünnungsanalyse, bei der zu einem Ätherextrakt einer Species eine im Vergleich zum endogenen Hormongehalt kleine, bekannte Menge von tritiummarkierten JH-1 zugegeben wird. Die Tritiummarkierung des JH-1 wurde nach der von Trautmann¹² beschriebenen Modifikation der tritierenden Metylierung durchgeführt, wobei die für die Verdünnungsanalyse erforderliche sehr hohe spezifische Radioaktivität erreicht wurde. Die anschließende chromatographische Reinigung wurde durch die leicht zu messende Radioaktivität erleichtert und die Anwesenheit der drei Hormone wurde mittels Glaskapillar-Gaschromatographie und GC-MS-Kombination gesichert.

Am Beispiel der Aufarbeitungen von verschiedenen Insektenspecies aus z. T. unterschiedlichen Ordnungen wird die Methode diskutiert.

Material und Methoden

Reinigung der Lösungsmittel und Reagentien

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden über eine 40 cm hohe Füllkörperkolonne langsam destilliert. Die für die Dünnschichtchromatographie benutzten 0,5 mm Kieselgel-F₂₅₄ und 0,25 mm Alox-F₂₅₄-Platten wurden vorher durch aufsteigende Chromatographie mit Methanol gereinigt und danach entweder luft- oder für 1 Stunde bei 100 °C im Trockenschrank getrocknet. Das wasserfreie Natriumsulfat wurde mit Äther gewaschen, um eine Kontamination mit Weichmachern zu verhindern. Das für die Säulenchromatographie als Adsorbens verwendete Florisil (Fluka AG) wurde in einer Säule zuerst mit Essigsäureäthylester und darauf mit Diäthyläther gereinigt. Die Reaktivierung erfolgte während 14 Stunden im Vakuumtrockenschrank bei 120 °C.

Radioaktivitätsmessung

Die Messung der Radioaktivität geschah mit einem Packard Tri-Carb-Flüssigkeitsszintillationszähler nach der Methode des externen Standards mit einer Toluol-Butyl-PBD-Szintillationslösung (600 ml Toluol, 400 ml Dioxan, 80 g Naphthalin und 8 g Butyl-PBD). Die quantitative Messung der Radioaktivitätsverteilung auf der Dünnschichtplatte wurde mit dem Berthold-Scanner II durchgeführt.

Insektenmaterial

Die zum Nachweis benutzten Hausfliegenlarven (*Musca domestica*) waren im 3. und 4. Stadium und stammten aus einer Laborzucht. Ebenfalls aus einer Laborzucht kamen die Mehlkäfer-Larven und Adulte (*Tenebrio molitor* L.). Alle Larven waren noch nicht im letzten Stadium und die Käfer (Männchen und Weibchen) waren 4 bis 6 Tage alt. Die Maikäfer (*Melolontha melolontha*) wurden im Mai 1973 bei Güttingen (CH, Kanton Thurgau) gefangen. Die Tagpfauenaugenlarven (*Vanessa io*) wurden in der Nähe von Dielsdorf (CH, Kanton Zürich) gesammelt und befanden sich in mittleren Larvenstadien. Die beiden *Hyalophora cecropia*-Männchen wurden als diapausierende Puppen aus Kalifornien bezogen. Die Puppen wurden bei ca. 25 °C schlüpfen gelassen.

Tritiummarkierung von JH-1

Zur Darstellung der Säuren wurden 1,76 g (6 mmol) 10.11-Epoxy-7-äthyl-3.11-dimethyl-2.6-tridecadiensäuremethylester (Isomerengemisch) in 50 ml 0,5 N Natronlauge (Wasser:Äthanol = 1:1) suspendiert und 48 Stunden bei 35 °C gerührt. Darauf wurde mit 0,5 N Salzsäure genau auf pH 6,5–6,8 eingestellt und mit 25 ml Diäthyläther extrahiert. Die wäßrige Phase wurde wieder auf obiges pH eingestellt und erneut mit Äther ausgezogen. Der Vorgang wurde so lange wiederholt, bis das pH praktisch konstant blieb. Die Ätherphase wurde über Natriumsulfat getrocknet und der nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhaltene Rückstand an 30 g Kieselgel mit Hexan:Essigsäureäthylester = 1:1 chromatographiert. Ausbeute: 0,7 g Säure.

Zur Herstellung von trägerfreiem Tritiumwasser wurden 23,1 mg (0,102 mmol) PtO₂ in 0,5 ml abs. Dioxan (entwässert durch eine Al₂O₃-Akt. I-neutral-Säulenfiltration) in einem kleinen 2,5 ml fassenden Reaktionskölbchen suspendiert. Nach Kühlung mit flüssigem Stickstoff und Evakuieren wurden 3,5 Ci Tritiumgas (1,35 ml \cong 0,061 mmol T₂) in das Reaktionsgefäß eingebracht und darauf 2 Stunden geschüttelt. Mittels einer Pasteur-Pipette, welche in der Kapillare einen kleinen Wattepfropfen enthielt, wurde die Tritiumwasser-Lösung sehr vorsichtig abgesaugt und in ein 2 ml fassendes Kölbchen mit Schliffstopfen transferiert, in dem sich 11,35 mg (0,041 mmol) der Säure befanden. Die Lösung wurde 30 min unter gelegentlichem Umschwenken stehen gelassen und darauf das Lösungsmittel mit dem überschüssigen Tritiumwasser durch einen Transfer im Hochvakuum in ein Gefäß zum sicheren Aufbewahren überführt. Anschließend wurde das Kölbchen mit der Säure durch ein Wasserbad von 35 °C erwärmt, um noch die letzten Spuren an Tri-

tiumwasser zu entfernen. Dann wurde zur Säure 0,5 ml einer konzentrierten ätherischen Diazomethanolösung hinzugegeben. Zur Entfernung der letzten Spuren an Wasser war diese nach der Herstellung aus Nitrosomethylharnstoff und Kalilauge 2 Stunden über KOH-Plätzchen getrocknet und danach über eine 30 cm hohe Vigreux-Kolonnen destilliert worden. Die ersten 10 ml Destillat wurden verworfen und die darauf folgenden für die Umsetzung genommen. Nach einer halben Stunde wurde der Äther mit dem überschüssigen Diazomethan durch einen Transfer im Hochvakuum bei -50°C (Aceton-Trockeneismischung) vom gebildeten Ester abgetrennt. Der Rückstand wurde auf 2 Kieselgel F_{254} -0,25 mm-Platten aufgetragen und mit dem Laufmittel Diäthyläther : *n*-Hexan = 1 : 9 chromatographiert. Die der Referenzsubstanz entsprechende Bande wurde abgeschabt und mit 10 ml Methanol eluiert. Zur Entfernung von vielleicht noch labil gebundenem Tritium wurde das Eluat vollständig am Rotationsverdampfer eingengt, der Rückstand in 10 ml Methanol aufgenommen und die Radioaktivität gemessen.

Die radiochemische Reinheit wurde mit den DC-Systemen Äther : *n*-Hexan = 1 : 9 und Chloroform : Äther = 1 : 1 überprüft. Die mit dem Berthold-Radiodünnschichtscanner aufgenommenen Radiochromatogramme zeigten keine radiochemischen Verunreinigungen.

Die Bestimmung der spez. Radioaktivität geschah durch UV-Absorptionsmessung einer Methanolösung $\epsilon_{220} = 1,383 \cdot 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ausbeute: 9,59 mg (80% d. Th.). Spez. Radioaktivität: 4,34 Ci/mmol.

Die Isomerenzusammensetzung des markierten JH-1 wurde mit der GC-Säule I ermittelt. Der Anteil am 2-*trans*, 6-*trans*, 10-*cis*-Isomeren (JH-1) betrug 5,0%.

10.11-Epoxy-3.7.11-trimethyl-2-*trans*-6-*trans*-dodecadiensäuremethylester (JH-3)

Bei der Synthese von JH-3 wurde das *trans*-Geranylacetone mit [0.0-Diphenyl-phosphono]-essigsäuremethylester durch eine Wadsworth-Emmon's Reaktion¹³ in den 3.7.11-Trimethyl-2-*trans*/*cis*-6-*trans*-10-dodecatriensäuremethylester überführt. Das durch Chromatographie an Silicagel (Hexan : Äther = 95 : 5) gewonnene 2-*trans*-6-*trans*-Isomere wurde über das 10.11-Bromhydrin ins 10.11-Epoxid (JH-3) umgewandelt.

Ätherextraktion und chromatographische Reinigung

Nachfolgend soll am Beispiel der Maikäferaufarbeitung die Extraktion und die anschließende chromatographische Reinigung beschrieben werden.

Bei der Aufarbeitung der beiden *Cecropia*-Männchen vereinfacht sich die Reinigungsprozedur, weil das Hormon/Lipid-Verhältnis hier extrem hoch ist.

1200 g tiefgefrorene Maikäfer (Männchen und Weibchen) wurden wie folgt extrahiert: Je ca. 60 g der Tiere wurden zusammen mit 150 ml Diäthyläther und 30 g Natriumsulfat mit Hilfe eines hochtourigen Virtis-Homogenisators (Modell 45) unter Eiskühlung für 5 bis 10 min homogenisiert. Die in einer 6 l Flasche vereinigten Homogenate wurden auf einem Laborschüttler bei einer Frequenz von ca. 150 pro min für 2 Stunden geschüttelt und darauf in eine große Glasfilternutsche (Inhalt 2,7 l, P3) gegeben. Ohne Anlegen von Vakuum wurde der mit einem flachen Glasstopfen abgepreßte Homogenatkuchen zweimal mit je 300 ml und darauf noch zweimal mit je 200 ml Äther bei sehr schwachem Vakuum gewaschen. Zum Schluß wurde bei vollem Vakuum abgesaugt. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer (Badtemp.: 35°C) wurde ein grünes Öl (35 g) erhalten.

Zum Öl gab man 300 ml Äther und $1,606 \cdot 10^6$ dpm (entsprechend $0,049 \mu\text{g}$) markiertes JH-1 und fällte mit 400 ml Methanol nach der Methode von Dahm und Röllner¹⁴ bei -78°C . Die bei der gleichen Temperatur gemachte Filtration lieferte nach dem Einengen im Vakuum einen Filtratrückstand von 6,6 g.

Der Filtratrückstand wurde in 60 ml *n*-Hexan aufgenommen und 9-mal mit je 30 ml hexangesättigtem Acetonitril ausgeschüttelt. Der nach dem Einengen der vereinigten Acetonitrilextrakte im Vakuum verbliebene Rückstand wurde noch einmal der gleichen Verteilungsprozedur mit 50 ml *n*-Hexan und 8-mal 25 ml Acetonitril unterworfen. Rückstand 1,56 g.

Die 1,56 g wurden mit insgesamt 4 ml Chloroform auf eine Sephadex LH-20-Säule ($\phi = 2,2 \text{ cm}$, $l = 145 \text{ cm}$) gegeben, die vorher mit Methanol und Chloroform gewaschen worden war. Um ein Fluten der Sephadexkügelchen zu vermeiden, wurde die Säule mit einer 3–5 mm dicken Seesandschicht bedeckt. Die ersten 160 ml Eluat der Chloroform-Elution blieben unfractioniert. Anschließend wurden 30 Fraktionen zu 300 Tropfen (ca. 4,3 ml) abgenommen. Der nach dem Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum erhaltene Rückstand der radioaktiven Fraktionen (Fr. 5–15) wog 0,13 g.

Die 0,13 g der Sephadex-Chromatographie wurden mit *n*-Hexan auf eine 35 g Florisil-Säule ($\phi = 1,8 \text{ cm}$, $l = 40 \text{ cm}$) gegeben und zuerst mit 200 ml 2-prozentigem Essigsäureäthylester (Vorlauf) und danach mit 320 ml 5-prozentigem Essigsäureäthylester in *n*-Hexan chromatographiert, wobei ca. 10 ml Fraktionen abgenommen wurden. Die

radioaktiven Fraktionen (Fr. 5–15) wurden als Pool I und alle die der Radioaktivität nachfolgenden (Fr. 16–27) als Pool II zusammengefaßt. Das zusätzliche Erfassen der Fraktionen von Pool II war notwendig, da unter diesen chromatographischen Bedingungen eine partielle Auftrennung von JH-3 von den beiden anderen Hormonen erfolgt. Der Rückstand von Pool I betrug 6 mg und der von Pool II 5 mg.

Beide Rückstände wurden separat auf eine 0,5 mm dicke Kieselgel F₂₅₄-Platte (Merck) als 6 cm lange, schmale Streifen aufgetragen und zweimal mit dem Laufmittel *n*-Hexan : Chloroform : Essigsäureäthylester = 7 : 7 : 1 auf der gleichen Platte entwickelt. Der radioaktive Bereich von Pool I wurde mit dem Radiodünnschichtscanner und der JH-3 Bereich von Pool I und II mit Hilfe von mitgelaufener Referenzsubstanz festgelegt. Beide JH-3 Bereiche wurden nach dem sorgfältigen Abschaben von der Platte vereinigt (Bezeichnung Pool II a). Die im Vakuum erhaltenen Rückstände der beiden Essigestereluate wurden separat als 3–4 cm lange, schmale Streifen auf eine 0,25 mm dicke Alox F₂₅₄-Platte aufgetragen und zweimal mit dem Laufmittel Benzol : Essigsäureäthylester = 19 : 1 entwickelt. Der radioaktive Bereich von Pool I wurde wieder mit dem Scanner und die JH-3 Zone von Pool I und II a mit Hilfe der Referenzsubstanz ermittelt. Nach dem sorgfältigen Abschaben wurde sowohl Pool I als auch die beiden vereinigten JH-3 Zonen in Eluier-röhrchen, deren Wattepfropfen vorher mit Essigester und Äther entfettet wurden, mit wenig Essigester (2–3 ml) eluiert. Nach dem Einengen der beiden Eluate auf ein kleineres Volumen wurden diese mittels einer Kapillare in spitz ausgezogene Röhrchen (ϕ = 4,5 mm, l = 60 mm) transferiert, wobei 2–3-mal mit wenig *n*-Hexan nachgespült wurde. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels in einem evakuierten Exsiccator wurden die Rückstände mit je 0,05 ml *n*-Hexan aufgenommen. Das waren die beiden GC-Injektionslösungen. Von einem Aliquot der radioaktiven Pool I-Lösung, die JH-1 und JH-2 enthalten kann, wurde zur Ermittlung der Radioaktivitätsausbeute die Radioaktivität gemessen. Die Ausbeute betrug 67,1%. Zur Vermeidung von Verdampfungsverlusten wurden die beiden GC-Injektionslösungen, wenn immer möglich, bei –25 °C aufbewahrt.

Gaschromatographische Analyse

Zur Prüfung der beiden Hexanlösungen auf die drei Hormone verwendeten wir die Glaskapillar-GC mit zwei verschiedenen Säulen (Ucon und Emulphor). Die Probeinjektion auf die Ucon-Säule geschah nach der Methode von Grob¹⁵, die auf der

Emulphor-Säule dann ohne Split und ohne Lösungsmittel. Die quantitative Auswertung geschah mit Säule I. Zur Analyse wurde ein Fraktovap G 1 (Cabo Erba) mit dem automatischen digitalen Integrator CRS 208 (Infotronics) verwendet.

Trennbedingungen

Säule I: 20 m Glaskapillarsäule (0,32 mm i. D.) beschichtet mit Ucon 50 HB 5100 (H. Jaeggi, CH-9043 Trogen). Temperaturen: Injektor 200 °C; Säule: 1³/₄ min nach Injektion wurde der Split geöffnet und nach total 2¹/₂ min bei 90% Heizleistung auf 150 °C geheizt und danach isotherm gefahren. Trägergas: H₂ 1,25 atm; 1,5 ml/min Detektorgas: H₂ 1,25 atm; Luft 1,5 atm.

Säule II: 20 m Glaskapillarsäule (0,32 mm i. D.) beschichtet mit Emulphor (H. Jaeggi, CH-9043 Trogen). Temperaturen: Injektor 190 °C; Säule 170 °C (isotherm, splitlos); Trägergas: He 2,0 atm; 4 ml/min; Detektorgas: H₂ 1,5 atm; Luft 2,0 atm.

Kombinierte GC + MS Analyse

Bei der GC + MS Analyse wurde die oben erwähnte Emulphor-Säule (Säule II) mit einem Varian MAT Massenspektrometer CH 5 gekoppelt.

Ergebnisse und Diskussion

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der drei bekannten Juvenilhormone (JH-1, JH-2 und JH-3) in noch nicht untersuchten Insektenspecies aus verschiedenen Ordnungen und zur Beantwortung der damit verbundenen Frage, ob außer den drei Hormonen noch andere Hormonstrukturen vorhanden sein müssen, war es notwendig, diese Hormone qualitativ und quantitativ nachweisen zu können.

Um zur Entwicklung einer Analysenmethode das Prinzip der radioaktiven Isotopenverdünnungsanalyse anwenden zu können, war die Tritiummarkierung von JH-1 mit sehr hoher spezifischer Radioaktivität wegen des sehr niedrigen Hormongehalts der Insektenspecies notwendig. Das JH-1-haltige Isomerengemisch wurde deshalb in der Methylgruppe des Esters auf folgende Weise mit der sehr hohen spez. Radioaktivität von 4,34 Ci/mmol markiert: Man tauschte das Carboxylproton der durch Verseifung mit Natronlauge hergestellten Säure mit Tritium aus trägerfreiem Tritiumwasser aus und veresterte die Säure anschließend wieder mit Diazomethan (Abb. 1).

Zum Ätherextrakt einer Insektenspecies wurde eine im Vergleich zum endogenen Hormongehalt

sehr kleine, definierte Menge (meist $4,93 \cdot 10^{-2} \mu\text{g}$ entsprechend $1,6 \cdot 10^6 \text{ dpm}$) des markierten Juvenilhormons gegeben, das bei der quantitativen Bestimmung aller drei Hormone als innerer Standard und bei der Reinigungsprozedur als Tracer dient. Die Zugabe von nur einem radioaktiven Tracer zur gleichzeitigen quantitativen und qualitativen Bestimmung aller drei Hormone war nur deshalb möglich,

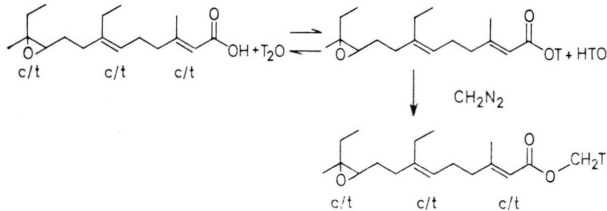
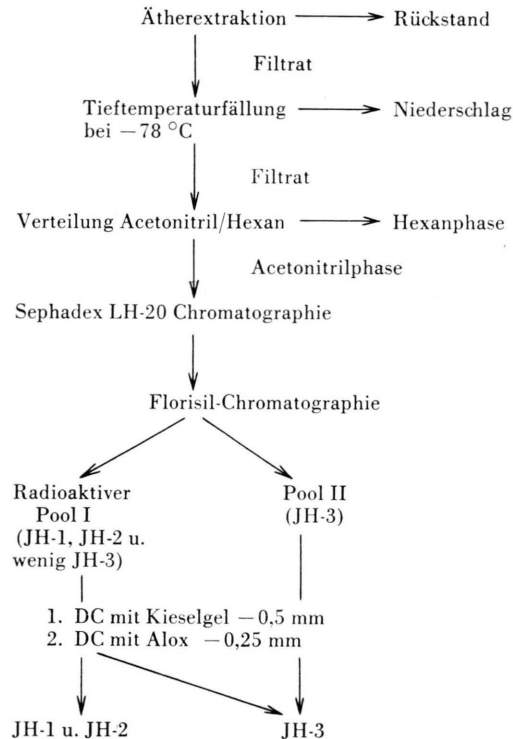


Abb. 1. Reaktionsfolge zur Herstellung von $[^3\text{H}]$ -Methoxy-10.11-epoxy-7-äthyl-3.11-dimethy-2.6-tridecadiensäuremethyl-ester (JH-1).

weil sich die drei strukturell sehr ähnlichen Hormone bei den gewählten Reinigungsstufen nahezu gleich verhalten. Die zur Isolierung der drei Hormone benutzte Reinigungsprozedur ist in Abb. 2 aufgezeigt. Zusätzlich zu den für den Nachweis von JH-1 und JH-2 in *Hyalophora gloverii* von Röllner und Dahm¹⁴ gewählten Reinigungsstufen kamen noch die Acetonitril-Hexan-Verteilung und die Säulenchromatographie mit Florisil dazu. Beide Reinigungsschritte wurden wegen der schnellen Durchführbarkeit und guten bis sehr guten Anreicherungsgrad gewählt. Der mit der Verteilung erzielte Anreicherungsfaktor lag je nach aufgearbeiteter Species zwischen 5 und 15 und für die Florisil-Chromatographie zwischen 20 und 50. Die Radioaktivitätsverluste betrugen für beide Stufen ungefähr 5%. Da bei der Florisil-Chromatographie eine partielle Auftrennung des JH-3 von den beiden anderen Hormonen eintritt, wurden zur quantitativen Erfassung von JH-3 außer den radioaktiven Fraktionen (Pool I) alle nachfolgenden als Pool II erfaßt. Das restliche in Pool I befindliche JH-3 wurde durch die beiden anschließenden Dünnschichtchromatographien abgetrennt und mit dem von Pool II vereinigt. Dadurch erfolgte eine vollständige Abtrennung von JH-3 von den beiden unter unseren Bedingungen adsorptionschromatographisch nicht trennbaren JH-1 und JH-2.

Die gaschromatographische Prüfung von Pool I auf JH-1 und JH-2 und von Pool II auf JH-3 geschah mit einer hochauflösenden Ucon-Glaskapillarsäule nach der Methode von Grob¹⁵ und mit der

Abb. 2. Reinigungsprozedur zum Nachweis von JH-1, JH-2 und JH-3 im Ätherextrakt der Insekten species. (Methodische Details s. Material und Methoden.)



Emulphor-Säule. Unter beiden GC-Bedingungen wurden nicht nur die zu bestimmenden Hormone voneinander getrennt, sondern auch deren Isomere (Tabn. I und II). Sowohl mit Hilfe der Retentionszeit als auch durch Koinjektion mit der entsprechenden Referenzsubstanz und der GC-MS-Bestimmung wurde die Identität eines Peaks mit einem der drei Hormone in allen Fällen gesichert.

Die Berechnung der ursprünglichen endogenen Menge der drei Hormone im Ätherextrakt geschah nach folgender Formel:

$$H_e = (C/a) - H_{ex}.$$

Es bedeutet:

- H_e endogene Hormonmenge;
- H_{ex} exogene Hormonmenge;
- a Radioaktivitätsausbeute;
- C gaschromatographisch bestimmte Hormonmenge.

Die Subtraktion des zum Ätherextrakt gegebenen radioaktiven JH-1 (H_{ex}) kann für die Berechnung des endogenen JH-1 bei H_e/H_{ex} -Verhältnissen über 100 vernachlässigt werden, da der damit verbundene

Tab. I. Retentionszeit von JH-1, JH-2 und JH-3 im GLC (Säule 2, Emulphor).

JH	Retentionszeit [min]
JH-1 (2- <i>trans</i> ; 6- <i>trans</i> ; 10- <i>cis</i>)	11,6
JH-2 (2- <i>trans</i> ; 6- <i>trans</i> ; 10- <i>cis</i>)	9,5
JH-3 (2- <i>trans</i> ; 6- <i>trans</i>)	6,9

Tab. II. Retentionszeiten der *cis/trans* Isomere von JH-1 im GLC (Säule 2, Emulphor).

JH-1	Retentionszeit [min]
2- <i>cis</i> ; 6- <i>cis</i> ; 10.11- <i>cis</i>	7,6
2- <i>cis</i> ; 6- <i>cis</i> ; 10.11- <i>trans</i>	7,9
2- <i>cis</i> ; 6- <i>trans</i> ; 10.11- <i>cis</i>	9,0
2- <i>cis</i> ; 6- <i>trans</i> ; 10.11- <i>trans</i>	9,2
2- <i>trans</i> ; 6- <i>cis</i> ; 10.11- <i>cis</i>	10,1
2- <i>trans</i> ; 6- <i>cis</i> ; 10.11- <i>trans</i>	10,5
2- <i>trans</i> ; 6- <i>trans</i> ; 10.11- <i>cis</i> (JH-1)	11,6
2- <i>trans</i> ; 6- <i>trans</i> ; 10.11- <i>trans</i>	11,9

Fehler kleiner als 1% wird. Bei einer notwendigen Korrektur ist aber zu beachten, daß H_{ex} als Isomerengemisch nur 5% des gaschromatographisch erfaßten 2-*trans*, 6-*trans*, 10-*cis*-Isomeren (JH-1) enthält und dementsprechend bei einer $5 \cdot 10^{-2} \mu\text{g}$ Zugabe zum Ätherextrakt auch nur $2,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}$ subtrahiert werden müssen.

Bei der Berechnung von JH-2 und JH-3 wurde ebenfalls die Radioaktivitätsausbeute zugrunde gelegt. Zur Überprüfung, ob für alle drei Strukturhomologe die Ausbeute gleich oder doch sehr ähnlich wie mit radioaktivem JH-1 ist, wurde zu einem Ätherextrakt von *Tenebrio*-Larven, einer Species, die nach vorausgegangener Analyse keine der drei Verbindungen als Juvenilhormon enthält, außer $5 \cdot 10^{-2} \mu\text{g}$ markiertes JH-1 je $5 \mu\text{g}$ von JH-1 und JH-3 hinzugegeben. Der Extrakt wurde darauf der gleichen Reinigungsprozedur unterworfen, wie oben beschrieben, und der Gehalt der zugegebenen Hormone über die Radioaktivitätsausbeute berechnet. 99,7% des JH-1 und 99,4% des JH-3 wurden wiedergefunden. Da die gaschromatographisch ermittelten Ausbeuten für das JH-1 (74,2%) und JH-3 (74,0%) sehr gut mit der Radioaktivitätsausbeute (74,4%) übereinstimmen, wurde damit bewiesen, daß ein möglicher

Tritiumaustausch der Tracerverbindung während der Reinigungsprozedur, der eine zu kleine Ausbeute und damit einen zu hohen Gehalt an Hormon vor-tauschen würde, nicht vorkommt.

Die Nachweisempfindlichkeit für die drei Hormone ist von drei Faktoren abhängig, nämlich von der Empfindlichkeit des gaschromatographischen Systems, von der Ausbeute an Hormon und vom Volumen der GC-Injektionslösung. Bei der größten Empfindlichkeit des Gaschromatographen entspricht ein auf dem Gaschromatogramm noch gut sicht- und auswertbarer Peak von 1 cm Höhe einer durchschnittlichen Hormonmenge von 1,6 ng. Die Ausbeuten bewegten sich in der Regel zwischen 60 und 75% und das minimale mit einem noch kleinen Fehler herstellbare Volumen der Injektionslösung beträgt $50 \mu\text{l}$. Bei der Injektion von $1 \mu\text{l}$ ergibt sich aus diesen Werten eine Hormonmenge von ca. $1,5 \cdot 10^{-1} \mu\text{g}$, die ein Ätherextrakt zur sicheren Bestimmung von jedem der drei Hormone besitzen muß. Diese kleine Menge liegt weit unter dem Hormongehalt eines 1 Tag alten einzigen *Cecropia*-Männchens, das nach unseren Untersuchungen $0,54 \mu\text{g}$ JH-1 und $0,15 \mu\text{g}$ JH-2 enthält. Der Fehler der Bestimmungsmethode dürfte für alle drei Hormone zwischen 5 und 10% liegen und ist wegen der sehr kleinen Hormonkonzentrationen in den Insekten-species akzeptierbar.

In Tab. III sind die Ergebnisse der Aufarbeitung von fünf Insekten-species zusammengestellt. Die Gehalte an den drei Juvenilhormonen sind für einen objektiven Vergleich in Nanogramm pro Gramm extrahierte Species angegeben. Die beiden 1 Tag alten *Cecropia*-Männchen wurden in erster Linie zur qualitativen Überprüfung der Analysenmethode aufgearbeitet. Die Werte zeigen, daß bereits die erst 1 Tag alten Männchen beachtliche Hormonmengen besitzen. Das Verhältnis von JH-1 und JH-2 ist ungefähr 4:1. Ebenfalls zur Ordnung der Lepidopteren gehörend, wurden Larven des Tagpfauenauges (*Vanessa io*) untersucht. Aufgrund der Nachweisempfindlichkeit der Methode muß der Gehalt für jedes der drei Hormone kleiner sein als $0,2 \text{ ng}$ pro g Species. Da aber der minimale Hormongehalt im Stadium aktiver Corpora allata bei ca. 2 ng pro g liegen sollte¹⁶, ist es sehr wahrscheinlich, daß in den Pfauenaugenlarven keines der drei Hormone vorhanden ist. Dieses unterschiedliche Ergebnis bei den beiden Schmetterlingsarten ist vielleicht damit zu erklären, daß *Cecropia* zur Familie der Saturniidae

Tab. III. Gehalt der aufgearbeiteten Insektenspecies an JH-1, JH-2 und JH-3.

Insektenspecies	Extraktions- gewicht [g]	Mittleres Gewicht pro Tier [g]	Anzahl Tiere	Gehalt *		
				[ng Hormon/g Gewicht] JH-1	JH-2	JH-3
<i>Hyalophora cecropia</i> (Männchen) 1 Tag alt	ca. 2	ca. 1	2	540	150	—
<i>Vanessa io</i> (Larven)	699	0,49	ca. 1400	—	—	—
<i>Melolontha melolontha</i> (Käfer, Männchen und Weibchen)	1200	1,04	ca. 1150	—	—	4,1
<i>Tenebrio molitor</i> Larven	2750	0,16	ca. 17200	—	—	—
Käfer (4–6 Tage alt)	579	0,14	ca. 4100	—	—	—
<i>Musca domestica</i> (Larven, 3. und 4. Stadium)	ca. 600	0,027	ca. 22000	—	—	—

* Ein Strich in der Tabelle bedeutet, daß ein eventueller Gehalt an den 3 Hormonen unter der Nachweisbarkeitsgrenze von 0,1–0,2 ng pro g Lebendgewicht liegt. Die *Cecropia*-Männchen wurden auf JH-3 nicht untersucht.

und *Vanessa io* zur Familie der Nymphalidae gehören. Bei *Tenebrio molitor* (Coleoptera, F. Tenebrionidae) wurden sowohl Käfer als auch Larven analysiert. Auch hier wurde in beiden Stadien keines der drei Hormone festgestellt. Bei den Maikäfern (*Melolontha melolontha*, Fam. Scarabaeidae), der anderen untersuchten Käferart, wurden dagegen 4,1 ng JH-3 pro g Körpergewicht gefunden. Außer dem gaschromatographischen Nachweis (Abb. 3) wurde die Struktur mittels der GC-MS-Analyse gesichert. Das Molekularion wurde nicht beobachtet, jedoch traten im oberen Massenbereich die folgenden charakteristischen Fragmente auf m/e 251 ($M^+ - CH_3$), 249/48 ($M^+ - OH/H_2O$), 234 ($M^+ - CH_3OH$), 219 ($M^+ - CH_3OH, CH_3$) und 206 ($M^+ - CH_3OH, CO$). Im mittleren Massenbereich sind die Ionen m/e 163, 153, 149, 135, 121 und 114 am intensivsten. Davon ist m/e 114 als Umlagerungsprodukt ($\text{CH}_3\text{COOCH}_3$) $^+$ besonders charakteristisch. Ferner wurde auch im *Galleria*-Juvenilhormontest¹⁶ eine entsprechende Hormonaktivität in der GC-Injektionslösung nachgewiesen. In den Hausfliegenlarven (*Musca domestica*) als Vertreter der Dipteren sind nach unseren Ergebnissen alle drei Hormone nicht vorhanden, doch fanden Bieber *et al.*¹¹ einen JH-1 Gehalt von ca. 1,6 ng pro g Species.

Die obigen Ergebnisse zeigen die Brauchbarkeit der radioaktiven Isotopenverdünnungsmethode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der drei

bis jetzt bekannten Juvenilhormone und zeigen, daß wahrscheinlich in allen untersuchten Insektenordnungen auch noch andere Hormonstrukturen für die Juvenilhormonwirkung verantwortlich sind. Ein gro-

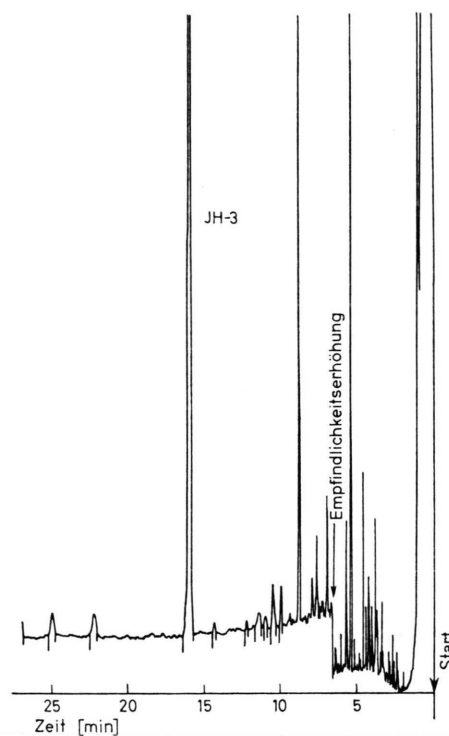


Abb. 3. GC-Nachweis von JH-3 im Pool II der Maikäferaufarbeitung mit Säule I. (Experimentelle Einzelheiten s. Material und Methoden.)

ßer Vorteil der Methode besteht darin, daß das als Tracer und innerer Standard zum Ätherextrakt zugegebene radioaktive JH-1 jede Trennstufe zur Abtrennung der Lipide hinsichtlich Hormonausbeute und optimaler Trennung leicht überprüfbar macht.

Herrn Dr. N. Neuner und Herrn G. Zarske, Givaudan AG, CH-Dübendorf, gilt unser besonderer Dank für die freundliche Hilfe bei den GC-MS-Aufnahmen. Ebenfalls zu Dank verpflichtet sind wir Frau E. M. Eggenberger für die Durchführung der *Galleria*-Juvenilhormontests.

- ¹ V. B. Wigglesworth, *Advances Insect Physiology* **2**, 247 [1964].
- ² C. M. Williams, *Biol. Bull.* **124**, 355 [1963].
- ³ H. A. Schneiderman u. L. J. Williams, *Science* [Washington] **143**, 325 [1964].
- ⁴ H. Röller, K. H. Dahm, C. C. Sweeley u. B. M. Trost, *An-*

- gew. Chem. Int. Ed. Engl.* **6**, 179 [1967].
- ⁵ A. S. Meyer, H. A. Schneiderman, E. Hanzmann u. J. H. Ko, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **60**, 853 [1968].
- ⁶ K. H. Dahm u. H. Röller, *Life Sci.* **9**, 1397 [1970].
- ⁷ H. Röller u. K. H. Dahm, *Proc. Conf. Workshop on Hormonal Heterophyly*, 1971, in press.
- ⁸ K. J. Judy, D. A. Schooley, L. L. Dunham, M. S. Hall, B. J. Bergot u. J. B. Siddall, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **70**, 1509 [1973].
- ⁹ W. S. Bowers, M. J. Thompson u. E. C. Uebel, *Life Sci.* **4**, 2323 [1965].
- ¹⁰ M. A. Bieber, C. C. Sweeley, D. J. Faulkner u. M. R. Petersen, *Analyt. Biochem.* [New York] **47**, 264 [1972].
- ¹¹ M. A. Bieber, C. C. Sweeley, M. R. Petersen u. D. J. Faulkner, *Entomological Society of America*, Paper No. 104, 29. Nov. 1971.
- ¹² K. H. Trautmann, *Z. Naturforsch.* **27 b**, 263 [1972].
- ¹³ W. S. Wadsworth u. W. D. Emmons, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 1733 [1961].
- ¹⁴ K. H. Dahm u. H. Röller, *Life Sci.* **9**, 1397 [1970].
- ¹⁵ K. Grob, *Chromatographia* **5**, 3 [1972].
- ¹⁶ De Wilde, G. B. Staal, C. A. D. De Kort, A. De Loof u. G. Baard, *Proc. Kon. nederl. Akad. Wetensch., Ser. C* **71**, 321 [1968].