

Diskriminierungspheromone der sozialen Wüstenassel *Hemilepistus reaumuri*

Discriminative Pheromones of the Social Desert Isopod *Hemilepistus reaumuri*

Hermann Schildknecht, Ulrike Eßwein, Werner Hering und Christine Blaschke

Organisch-Chemisches Institut der Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 270,
D-6900 Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland

Karl Eduard Linsenmair

Zoologisches Institut der Universität Würzburg, Röntgenring 10,
D-8700 Würzburg, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **43c**, 613–620 (1988); received March 9, 1988

Pheromones, Crustacean, Social Desert Isopod, Terpenoids

A vital chemical communication can be observed in the Tunisian desert isopod *Hemilepistus reaumuri*. These crustaceans live in social units which are strictly closed to alien conspecifics. It was attempted to analyze the highly evolved family-specific recognition system by identifying their pheromonal compounds both from the extracts of surface washings of intact animals and from the exuvia.

Unter den Krebsen wurden nur die Oniscidea zu echten Landtieren. Da die meisten Arten einen wenig effektiven Verdunstungsschutz haben, überrascht es nicht, sie vor allem in feuchten Habitaten zu finden [1–3]. Die Gattung *Hemilepistus* vermochte sich jedoch trotz schlechter phylogenetischer Voraussetzung an Wüstengebiete anzupassen. In ausgedehnten Halbwüstengebieten Asiens und Nordafrikas sind diese Asseln zu den quantitativ bedeutendsten Herbi- und Detritivoren der natürlichen Macrofauna geworden [4].

Wie konnten sich gerade Krebse so außerordentlich erfolgreich an wüstenhafte Lebensbedingungen anpassen? Die Untersuchungsergebnisse beweisen, daß nicht in erster Linie morphologisch-physiologische Adaptationen entscheidend sind, sondern ethnologische: neben einem komplexen Orientierungsverhalten vor allem das hochentwickelte Sozialverhalten [5–7].

Abgesehen von einer auf die Winterruhe folgenden Ausbreitungsphase lebt *H. reaumuri* immer in sozialen Einheiten. Im Alter von etwa 10 Monaten bilden die Wüstenasseln sozial und sexuell monogame Paare und danach mit den Jungen des einzigen Wurfs zusammen einen Familienverband. Die Mitglieder dieser Verbände erkennen sich ortsunabhängig, praktizieren Kooperation und Arbeitsteilung

und sind besonders friedfertig gegenüber ihren Sozietsangehörigen. Fremde Individuen dagegen werden je nach Ort und Situation entweder heftig angegriffen oder gemieden. Nie werden Fremde freiwillig in eine Familienhöhle eingelassen. Der gegenseitigen Erkennung – im max. etwa 150 Individuen umfassenden Familienverband – dienen chemische Merkmale.

Die chemischen Erkennungsmerkmale

Folgende Befunde weisen darauf hin, daß die Identifikationsleistung auf einer interindividuellen und interfamiliären Variabilität chemischer Signale beruht.

- 1) Wo sich Familienmitglieder in größerer Zahl und häufig aufhalten, wird die familienspezifische Charakteristik auch auf den Untergrund übertragen.
- 2) Intensive, direkte Körperkontakte zwischen Individuen aus verschiedenen Familien führen im Regelfall sofort zur Verfremdung aller Beteiligten.
- 3) Mit polaren Lösungsmitteln erhält man Extrakte, die, auf fremde Individuen aufgetragen, diese langfristig verfremden oder, auf Attrappen aufgebracht, diese aggressionsauslösend machen.

Alles spricht dafür, daß die Spezifität und Diversität der chemischen Erkennungsmerkmale auf genetisch determinierte Sekrete zurückzuführen ist und nicht auf aus der Umgebung oder direkt von der

Reprint requests to Prof. Dr. H. Schildknecht.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/88/0700–0613 \$ 01.30/0



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 digitized 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.

Nahrung stammenden Körperhaftgerüchen beruht, wie sie z. T. in Hymenopterensozietäten als Gruppenabzeichen verwendet werden [6–9].

Damit mußten die chemischen Erkennungsmerkmale direkt vom Individuum abnehmbar sein. Deswegen waren das Ausgangsmaterial für unsere Untersuchungen zuerst verschiedene Waschextrakte lebend gebaderter Tiere, dann aber auch ihrer abgestreiften Häute (Exuvien).

Analyse des Waschextraktes

Obwohl die Acetonextrakte mit mehreren Artefakten verunreinigt waren, haben wir sie mittels der GC-MS-Kopplung analysiert, da die biologischen Teste auf wirksame Komponenten hinwiesen; vgl. Tab. I.

Dadurch, daß es uns gelungen ist, neben den vielen identifizierten Verbindungen auch halogenhaltige Substanzen nachzuweisen, konnte fast schon wieder ein chemischer Beweis dafür erbracht werden, daß die Wüstenasseln marinen Ursprungs sind. Umgekehrt sind dann aber solche Verbindungen für

individual- und familienspezifische chemische Abzeichen nicht geeignet.

Nicht überrascht waren wir über die Vielzahl der Lipoide, die eigentlich bei einem Hautextrakt nicht fehlen dürfen. Dieses Bild änderte sich etwas bei der Analyse etherischer Extrakte, die aus der wäßrigen Phase der Pentanol/Wasser-Verteilung gewonnen worden waren. Es wird beherrscht von Aromaten, wozu auch halogenierte Carbonsäuren wie 3-(Chlor-hydroxyphenyl)propion-, 3-(Brom-hydroxyphenyl)-propion- und 4-(Brom-hydroxyphenyl)buttersäure gehören, die man bei den noch ausstehenden biologischen Versuchen nicht vergessen sollte.

Bei einer Pentanol/Wasser-Verteilung der mit Wasser/Methanol gebadeten Tiere reagierten 112 Asseln von 9 Familien auf die Inhaltsstoffe der wäßrigen Phase ziemlich heftig. Der Pentanolextrakt dieser Phase zeigt die gleiche Aktivität. Dabei fanden wir auch im Gegensatz zu allen anderen gaschromatographisch untersuchten Extrakten überraschend zwei schwefelhaltige Verbindungen. Ansonsten war die Zusammensetzung vergleichbar mit denen der vorher analysierten Extrakte; vgl. Tab. II.

Tab. I. Im Acetonextrakt der Badeflüssigkeit der Wüstenassel mit einer GC-MS-Analyse identifizierte Verbindungen.

Ketone und Ether:	Ester:
Pentenon	Nonyloxyethylacetat
Methyloctylfuran	Myristinsäuremethylester Pentadekansäuremethylester Palmitoleinsäuremethylester Palmitinsäuremethylester Heptadecensäuremethylester Linolsäuremethylester Linolensäuremethylester Ölsäuremethylester Stearinsäuremethylester Myristinsäureisopropylester
Carbonsäuren:	Aromaten:
Heptansäure	Benzoësäure
Pelargonsäure	Phenylsäure
Caprinsäure	4-(Hydroxyphenyl)buttersäure
Laurinsäure	Benzosäurebenzylerster
Myristinsäure	Vanillin
Pentadekansäure	N,N-Diethyltoluamid
Palmitoleinsäure	Hydroxy-methylacetophenon
Palmitinsäure	Benzophenon
Margarinsäure	3-(Chlor-hydroxyphenyl)propionsäure
Linolsäure	3-(Brom-hydroxyphenyl)propionsäure
Ölsäure	3-(Dibrom-hydroxyphenyl)propionsäure
Stearinsäure	4-(Brom-hydroxyphenyl)buttersäure

Tab. II. Durch eine GC-MS-Analyse identifizierte Verbindungen aus dem Pentanolextrakt der mit Wasser/Methanol gebadeten Wüstenasseln.

Pentenon
3-Ethyl-4-Methyl-2,5-pyrroldion
Nonyloxyethylacetat
Carbaminsäureester
3-(Chlor-hydroxyphenyl)propionsäure
3-(Brom-hydroxyphenyl)propionsäure
4-(Brom-hydroxyphenyl)buttersäure
Vanillin
Vanillinsäuremethylester
3,5-Di-t-butyl-4-hydroxy-benzaldehyd
Methylacetophenon
Di-t-butyl-p-benzoquinon
N,N-Diethyltoluamid
2-Phenyl-2-methoxyphenyl-propan
Myristinsäuremethylester
Palmitinsäuremethylester
Önanthsäure
Pelargonsäure
Laurinsäure
Myristinsäure
Pentadekansäure
Palmitoleinsäure
Palmitinsäure
Margarinsäure
Linolsäure
Ölsäure
Stearinsäure

Trotzdem müssen Hinweise auf stickstoffhaltige Verbindungen, evtl. sogar auf Pyrrolidone und Di-thiocarbamate ernst genommen werden. Mit einem vergleichbaren Extrakt konnte das Substanzspektrum sogar noch um das 2,6-Di-t-butyl-p-benzoquinon erweitert werden, ein Befund, der schon deswegen diskutiert werden muß, da wir immer wieder einmal bei den Signalstoffen der Insekten Benzoquinone gefunden haben.

Zur weiteren Reinigung einer wäßrigen Phase wurden die höher molekularen Substanzen durch Ultrafiltration abgetrennt und das Filtrat mit Sephadex G-10 nochmals gereinigt. Danach registrierten wir immer noch eine biologische Aktivität. Chemisch gesehen bestätigt sich unsere Vermutung, daß auch Nucleoside bei der Wüstenassel verhaltensaktiv sein könnten.

Das Bild über die substantielle Zusammensetzung des Asselbadewassers wird nicht klarer, eher verworren, wenn man die wäßrige Phase weiter mittels einer HPLC auftrennt. Dies kommt nicht zuletzt von den Verunreinigungen, die durch die benötigten großen Lösungsmittelmengen eingeschleppt werden.

Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie wurden einzelne Fraktionen als

Tyrosin, Phenylalanin, Uridin, Cytidin, Guanosin, Inosin, Allantoin und Harnsäure identifiziert.

Diesem Wirrsal chemischer Informationen glaubten wir zu entgehen durch eine vernünftige Reduktion derselben, indem wir nur die abgestreiften Häute, die Exuvien, untersuchten.

Zuvor aber versuchten wir, die Aminosäurezusammensetzung der Asselcuticula kennenzulernen.

Analyse der freien Aminosäuren aus der Asselhaut

Da es sich nach den bisherigen Analyseergebnissen bei den Familienabzeichen um ein Multikomponentensystem handeln konnte, versuchten wir, durch eine Aminosäurenanalyse einzelne Familien zu charakterisieren. Bei 6 Familien haben wir die einzelnen Individuen mit Watte, die mit bdestilliertem Wasser getränkt war, abgetupft und mit einem Mikroaminosäureanalysator die von der Asselhaut entnommenen Aminosäuren qualitativ und quantitativ bestimmt; vgl. Tab. III. Wir stellten fest, daß die meisten Aminosäuren bei allen Familien vorkommen, manche aber nur bei einer Familie. Methionin, Norleucin und Arginin nur bei F1 und Histidin nur bei F6. Dagegen ist der Gehalt an Asparaginsäure, Threo-

Tab. III. Aminosäure-Zusammensetzung einzeln abgetupfter Asselfamilien (Gehalt in Mol % pro Individuum).

Aminosäuren	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Cysteinsäure	6,63	6,31	8,21	19,17	8,28	6,69
Taurin	8,96	4,84	7,10	14,57	2,86	2,99
Asparaginsäure	3,89	4,73	6,06	3,16	4,89	6,66
Threonin	4,16	9,53	5,33	4,66	5,14	5,01
Serin	7,32	14,48	11,82	3,80	19,15	26,03
Glutaminsäure	8,46	11,76	14,27	9,90	10,67	5,11
Prolin	11,20	15,58	—	—	6,06	—
Glycin	7,77	13,42	12,05	20,96	16,90	21,57
Alanin	5,12	6,54	15,34	12,77	6,79	8,94
Valin	2,74	3,78	6,29	3,87	3,41	3,93
Methionin	1,14	—	—	—	—	—
Isoleucin	2,29	2,42	4,45	2,94	1,62	1,49
Leucin	2,06	1,58	—	4,16	2,38	2,23
Norleucin	1,37	—	—	—	—	—
Tyrosin	2,29	—	—	—	2,33	1,96
Phenylalanin	2,29	—	—	—	1,51	1,44
Lysin	7,32	5,03	4,18	—	7,96	4,38
Histidin	—	—	—	—	—	1,52
Arginin	6,63	—	—	—	—	—
unbekannte A.S.	8,69	—	4,87	—	—	—

nin, Valin und Isoleucin für alle Familien vergleichbar. Andererseits findet man deutliche Konzentrationsverschiebungen für Cysteinsäure bei F4, Serin bei F5 und F6 und für Glycin bei F6.

Analyse der Exuvienextrakte

Die abgestreiften Häute (Exuvien) der Wüstenassel wurden nacheinander mit Wasser, Methanol, Aceton, Ether und Cyclohexan extrahiert.

Mit Ausnahme des Cyclohexan-Extraktes waren alle Extrakte biologisch wirksam. Da der nach einer Reihe von Extraktionen verbliebene Exuvienrückstand weiterhin biologisch aktiv war, nahmen wir eine Nachextraktion im Ultraschallbad vor. Die Rückstände blieben jedoch weiter biologisch wirksam.

Bei der weiteren Analyse nahmen wir uns die Wasser- und Methanol-Extrakte vor. Die lipophilen trennten wir von den polaren Substanzen durch eine Pentanol/Wasser- bzw. Ether/Wasser-Verteilung. Der mit Pentanol behandelte, biologisch aktive, wässrige Exuvienextrakt konnte mit Sephadex G-10 in 11 Fraktionen aufgeteilt und durch HPLC weiter analysiert werden. Danach wurden NMR-spektroskopisch wieder

Tyrosin, Phenylalanin, Uridin, Cytidin, Guanosin, 2-Desoxyuridin, Allantoin und Harnsäure

identifiziert. Uracil wurde auch noch nach einer

Ether/Wasser-Verteilung des wässrigen Extraktes in einer HPLC-Fraktion nachgewiesen.

Bei der nächsten Analyse haben wir die mit Pentanol aus dem methanolischen Extrakt isolierten Verbindungen in Ether aufgenommen und die Komponenten mit einer GC/MS-Kopplung identifiziert; vgl. Abb. 1.

Der vordere Bereich des Elutionsdiagramms (vgl. Tab. IV) enthält mehrere cyclische Monoterpene. Diese sind sich in ihrer Fragmentierung teilweise so ähnlich, daß die Aufnahmebedingungen oft einen größeren Einfluß auf das Massenspektrum haben als die unterschiedliche Struktur der Verbindungen. Wir verglichen daher die Spektren aller Fraktionen, in denen wir Monoterpene vermuteten, mit Literaturdaten [10] und mit Spektren, die auf den von uns eingesetzten Geräten erhalten und in einer Computerbibliothek gespeichert worden waren. Auch die Retentionszeit nach Kovats wurde berücksichtigt. Charakteristisch für die meisten cyclischen Monoterpene ist ein starkes Signal bei der Masse $M^+ - 43$, dessen Entstehung Weinberg und Djerassi [11] am Menthen untersucht haben. Die von uns analysierten Verbindungen weisen neben $M^+ - 43$ intensive Signale bei den Massen m/z 93, 121 und 136 auf, ein Indiz für zweifach ungesättigte cyclische Monoterpene.

Die Exuvienextrakte enthalten auch verschiedene Fettsäuren und deren Methylester. Im Methanol-Extrakt konnten auch nach einer Ether/Wasser-Ver-

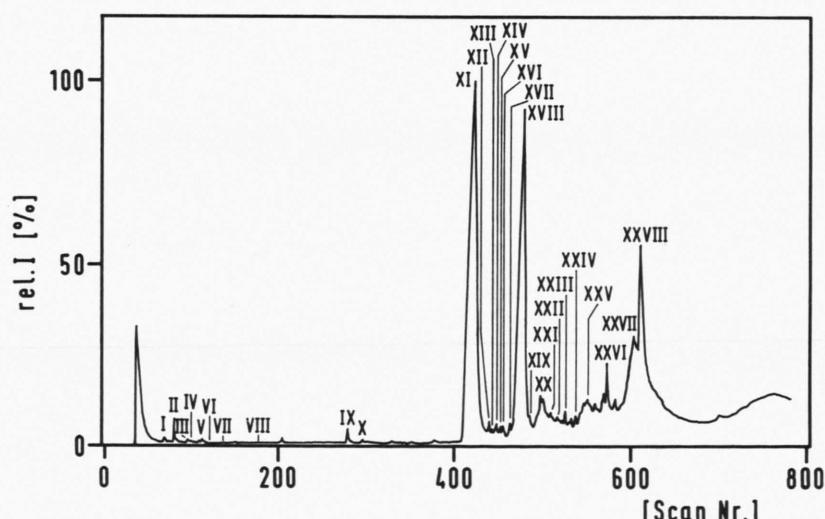


Abb. 1. Totalionenstromchromatogramm der mit Pentanol aus dem methanolischen Extrakt der Exuvien der Wüstenassel isolierten Substanzen. 5% OV-1 30 m Glassäule; Temperaturprogramm 60–200 °C, 4 °C/min; Injektor 220 °C.

Tab. IV. Durch eine GC-MS-Analyse identifizierte Verbindungen des Exuvienextraktes. I-XXVIII entspricht den Signalen im MS-Spektrum der Abb. I.

I	α -Thujen
II	Sabinen
III	α -Terpinen
IV	p-Cymol
V	Sabinenhydrat
VI	Phenol
VII	Terpinolen
VIII	Verbenon
IX	Terpenketon
X	Terpenalkohol
XI	Benzoesäurebenzylester
XII	aliphatisches Keton
XIII	Myristinsäure
XIV	Benzoesäurephenylester oder Benzoesäurexylylester
XV	Fettsäuremethylester
XVI	N,N-Diethyltoluamid
XVII	Palmitinsäuremethylester
XVIII	Phthalester
XIX	Palmitoleinsäure
XX	Palmitinsäure
XXI	Fettsäuremethylester
XXII	Fettsäuremethylester
XXIII	Diterpenderivat
XXIV	Pimarinsäuremethylester
XXV	Methylether eines Norditerpenalkohols
XXVI	Diterpenalkohol
XXVII	Pimarinsäure
XXVIII	Phthalester

teilung mittels einer GC/MS-Kopplung vor allem wieder Fettsäureester, aber auch 4-Hydroxyphenyl-essigsäure-methylester und Indolyl-(3)-essigsäure-methylester nachgewiesen werden.

Schließlich versuchten wir durch eine Headspace-Analyse flüchtige Pheromone in den Exuvien nachzuweisen. Das negative Ergebnis der Biotele zeigte jedoch, daß die familienspezifischen Abzeichen, wenn überhaupt, nur wenig flüchtig sind!

Haemolymphextrakte

Die familienspezifischen Erkennungsmerkmale von *Hemilepistus reaumuri* könnten aus der Haemolymph stammen [7]. Tatsächlich gewannen wir nach Abtrennung der Proteine und Polysaccharide durch Etherextraktion eine biologisch hochwirksame Lösung, die gaschromatographisch aufgetrennt werden konnte. Weitere Untersuchungen werden eben noch vorgenommen.

Diskussion

Die Analyse der Waschextrakte von *Hemilepistus reaumuri* war durch verschiedene Körperausscheidungen und Umweltkontaminationen, aber auch durch Verunreinigungen aus den benötigten großen Mengen an Lösungsmitteln erschwert. Wir erhofften uns deswegen durch Isolierung der unsichtbaren Wirkstoffe von der Haut der Tiere mit Wattetupfern ein übersichtlicheres Ergebnis. Im Biotele zeigte sich aber, daß immer noch in der Haut eine Aktivität zurückbleibt.

Um einen größeren Überblick zu gewinnen, wurden dann die Exuvien extrahiert. Auch in diesen Extrakten findet man wieder Fettsäuren und ihre Methylester; jedoch in erheblich geringerer Konzentration. Bei Crustaceen sind Fettsäuren als Bestandteil aller Glycerophospholipide bekannt [12].

Betrachtet man die freien Fettsäuren, so überwiegen bei den Krebstieren im Gegensatz zu den Insekten die gesättigten bei weitem die ungesättigten Säuren gleicher Kettenlänge [13]. Zwar unterscheidet sich die Zusammensetzung von Gattung zu Gattung [14], doch scheint es innerhalb einer Art einen Zusammenhang zwischen Reifegrad und dem Anteil der verschiedenen Säuren zu geben [15].

Wir haben schon früher festgestellt, daß Fettsäuremethylester keine typischen Reaktionen bei *Hemilepistus reaumuri* hervorrufen. Auch Testversuche mit freien Fettsäuren lieferten recht unterschiedliche, teils widersprüchliche Ergebnisse. Die Reaktionen der Tiere lassen Vermutungen über eine Funktion der Fettsäuren zu, eine wesentliche Beteiligung an der Bildung der Familienpheromone möchten wir aber ausschließen.

Die chemische Analyse der Exuvienextrakte führt uns dann aber zu einer Naturstoffklasse, die eine der mächtigsten unter den natürlichen Wirkstoffen ist, zu den Terpenoiden. Wie die Tab. IV zeigt, stehen gleich zu Anfang die Monoterpene α -Thujen, Sabinen und Terpinolen – also Verbindungen, die man gerne den etherischen Ölen aus Pflanzen zuschreibt. Im Würzburger Labor wurde deswegen die biologische Wirksamkeit von Terpinolen, Sabinen und α -Thujen geprüft. Dabei wurden einzelne Tiere kurzfristig isoliert, mit diesen Substanzen bestrichen und danach wieder zu ihrer Familie zurückgesetzt. Das Resultat waren sehr starke Angriffe. Auffallend war die eindeutige Reaktion von zwei Familien auf Terpinolen, während eine andere mit Sabinen bestri-

chene Tiere bevorzugt angriff. Auch α -Thujen rief starke Aggressivität hervor.

Wenn man aufgrund unserer Versuche die ersten Verbindungen erkannt hat, die in aktiven Assel-extrakten nachweisbar und sogar als Syntheseprodukte wirksam sind, so ist damit noch lange nicht gesagt, daß die beschriebene chemische Kommunikation allein auf der spezifischen Struktur vielleicht eines Terpenoids beruht, denn die chemische Basis des bei der Wüstenassel vermuteten Pheromons ist nach unseren Erfahrungen divergent; womit vielleicht, wie bei anderen von uns untersuchten Säugertpheromonen, erst ein typisch strukturiertes Substanzprofil verschiedener Stoffe optimal wirksam wird!

Experimenteller Teil

Der Biotest nach Linsenmair

Die Testsubstanzen wurden auf tropfenförmig auszogene Glasstäbe aufgetragen und nach dem Verdunsten des Lösungsmittels den Asseln vor die Antennen gehalten. Die dem Betasten folgenden Verhaltensweisen werden unterteilt in:

keine Reaktion, Zurückweichen, längeres Betasten, Betasten und Benagen, Zustoßen, Angriff.

Aktive Substanzen erzeugen dasselbe aggressive Verhalten wie fremde Artgenossen. Nach Betasten des Glasstabes stoßen die Tiere zu und folgen dem Glasstab, wenn dieser weggezogen wird. Bei inaktiven Substanzen ergaben sich nach dem Betasten des Glasstabes keine weiteren Reaktionen. Ein intensives Betasten und Benagen erfolgt bei Fraktionen, die Nahrungsbestandteile (z. B. Zucker) enthalten. Bei geringen Konzentrationen der Testsubstanzen oder undeutlichen Testergebnissen kann man die zu prüfenden Substanzen auch direkt auf das Tier auftragen. Zur Kontrolle der Ergebnisse wird natürlich immer ein Test mit indifferentem Glasstab vorgenommen. Getestet werden je 5 Familien mit mindestens 20 Mitgliedern. Die optimale Testzeit ist morgens zwischen 8.00 und 11.00 Uhr und abends nach 19.00 Uhr, entsprechend den Aktivitätsperioden der Wüstenasseln.

Aminosäurenanalyse

Die Bestimmung der freien Aminosäuren geschah mit dem Labotron-Mikro-Analysator. Die Proben

wurden gleichzeitig auf einer 23 cm und einer 165 cm langen Säule aufgetrennt. Nach der Elution mit Citratpuffer und anschließender Reaktion mit Ninhydrin, wurde die Extinktion bei 570 nm und 440 nm gemessen. Die Absolutwerte der Aminosäuren konnten durch einen Vergleich der Kurvenflächen mit einem Standard-Testgemisch errechnet werden.

Untersuchung der Waschextrakte

Die Tiere werden mit Methanol/Wasser gebadet und mit Aceton/Wasser nachgewaschen. Die Untersuchung dieser Extrakte wurde durch die große Menge von Aceton-Artefakten (Diacetonalkohol, Triacetonalkohol, Mesityloxid, Phoron, Triacetoamin) erschwert. Als weitere Verunreinigung enthalten alle Extrakte Phthalester. Die nach einer Pentanol/Wasser-Verteilung gewonnene wäßrige Phase haben wir mit Sephadex G-10 in 8 Fraktionen aufgeteilt; sie wurden mittels HPLC weiter untersucht. Das Säulenmaterial war Nucleosil C-18 und Polygosil C-18; Elutionsmittel waren verschiedene Essigsäure/Wasser-, Essigsäure-/Methanol/Wasser- und Methanol/Wasser-Gemische.

Als stationäre Phasen in der GC-MS-Kopplung besonders geeignet erwiesen sich für die Pentanolfraktion Durabond DB-1, für die wäßrige Fraktion OV-1. Die massenspektrometrische Bestimmung der Molgewichte erfolgte durch chemische Ionisation nach der Trennung auf OV-101. Mit diesem Trennmaterial erhielten wir in Verbindung mit dem Massenspektrometer auch Informationen über die Substanzen der mit Pentanol aus dem Wasser/Methanol-extrakt gewonnenen Lösung.

Untersuchung der Exuvienextrakte

Die Exuvien haben wir zuerst gereinigt und anschließend mit Methanol extrahiert. Der Methanol-extrakt wurde zur Abtrennung polarer Substanzen mit Pentanol/Wasser verteilt. Die Pentanolphase wurde in Ether aufgenommen und durch Kopplung von Gaschromatographie und hochauflösendem Massenspektrometer (Micromass ZAB-2F) analysiert. Als stationäre Phasen besonders geeignet erweisen sich Durabond DB-1, OV-1 und OV-101. Die Molmassen einiger Verbindungen wurden durch chemische Ionisation nach Trennung auf einer gepackten Säule mit 3% OV-101 stationär bestimmt.

In dem vorderen Bereich des Elutionsdiagramms identifizierten wir cyclische Monoterpen. Die Mas-

Tab. V. Massenfeinbestimmung der Schlüsselbruchstücke von Fraktion I.

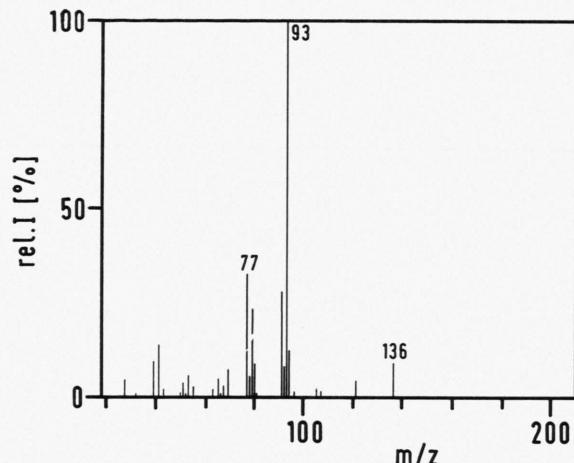
<i>m/z</i>	gemessene Masse	Differenz zur theor. Masse (mmu)	elementare Zusammensetzung
77	77.0400	-1.0	C ₆ H ₅
79	79.0568	-2.2	C ₆ H ₇
91	91.0538	0.8	C ₇ H ₇
93	93.0712	-1.0	C ₇ H ₉
121	121.0975	3.9	C ₉ H ₁₃
136	136.1261	-1.3	C ₁₀ H ₁₆

senspekten der Fraktion I und II sind sich sehr ähnlich. Lediglich die Intensitäten der Massen bei *m/z* 79 und bei *m/z* 92 sind verschieden. Das Molekülion *m/z* 136 wurde bei beiden Fraktionen durch chemische Ionisation bestätigt. Die wichtigsten Fragmente sind in Tab. V aufgeführt.

Erst nach einem gründlichen Vergleich mit Spektren der Computerbibliothek wurde Fraktion I als α-Thujen erkannt (Abb. 2).

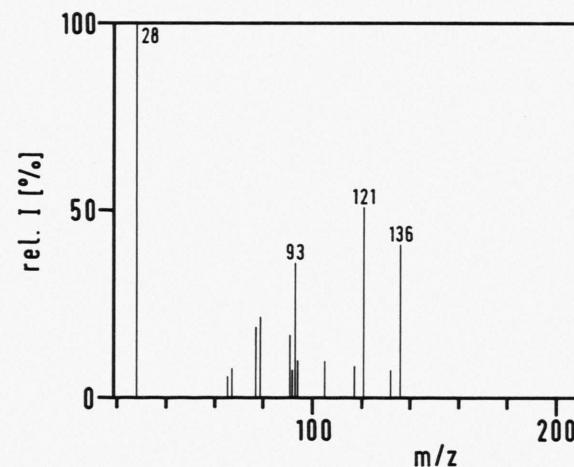
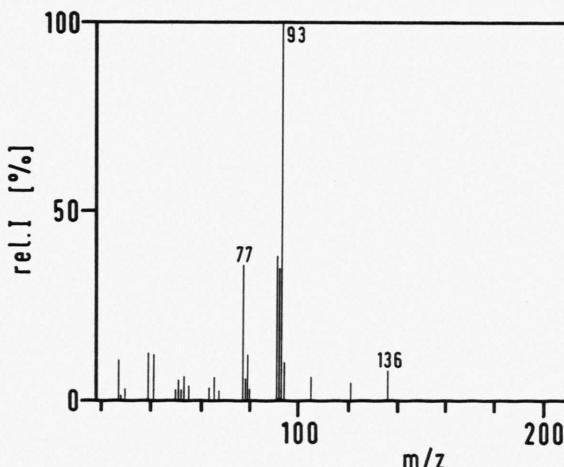
Das Massenspektrum der Fraktion II (Abb. 3) könnte sowohl das von Sabinen als auch von Phelandren sein; die Retentionszeit aber spricht nur für Sabinen. Für die Fraktion VII schlagen wir nach einem Spektren- und Retentionsvergleich Terpinolen vor (Abb. 4). Im letzten Drittel des Elutionsdiagramms liegen eine Reihe cyclischer Diterpene. Wir identifizierten Fraktion XXIV anhand eines Litera-

turvergleichs [16] als Pimarsäuremethylester. Die freie Pimarsäure liegt in Fraktion XXVII vor. Charakteristisch ist die Abspaltung der Methylgruppe an C-7, die von dem Molekülion bei *m/z* 302 (C₂₀H₃₀O₂) zu dem Ion *m/z* bei 287 führt. Der Basepeak *m/z* 121 hat die Zusammensetzung C₉H₁₃. Ein Schlüsselbruchstück ist das Ion bei *m/z* 167 (C₁₀H₁₅O₂), das



MS VON 80

Abb. 3. Massenspektrum von Fraktion II (Sabinen).



MS VON 68

Abb. 2. Massenspektrum von Fraktion I (α-Thujen).

MS VON 124

Abb. 4. Massenspektrum von Fraktion VII (Terpinolen).

durch Abspaltung von $C_{10}H_{15}$ aus dem Molekülion m/z 302 entsteht. Ein Vergleich mit Pimarsäure-methylester zeigt, daß die Fragmentierung bis auf die Esterfunktion identisch ist.

Die Bestimmung der genauen Struktur der weiteren Diterpene gelang aufgrund der geringen Substanzmenge nicht. So weist das Massenspektrum der Fraktion XXIII als höchstens und zugleich intensivstes Fragment das Ion bei m/z 254 ($C_{19}H_{26}$) auf. Nach dem Verlust einer Methylgruppe zu m/z 239 folgen nur noch Abspaltungen von CH- und CH_2 -Gruppen zu wenig intensiven Ionen. Hinweise auf funktionelle Gruppen fanden wir nicht. In Fraktion XXV liegt der Methylester eines Norditerpenalkohols ($C_{20}H_{32}O$) vor. Ein Diterpenalkohol mit einem Molekulargewicht von $M=288$ ($C_{20}H_{32}O$) wurde in Fraktion XXVI nachgewiesen.

Die Konzentration der hier erhaltenen Fettsäuren und deren Methylester ist erheblich geringer als in den Acetonextrakten. Die außerdem noch nachge-

wiesenen Verbindungen haben wahrscheinlich keine wesentliche biologische Bedeutung.

Der Wasser-Extrakt der Exuvien wurde zur Abtrennung der lipophilen Bestandteile wieder mit Pentanol behandelt. Als Säulenmaterial in der HPLC haben wir Nucleosil C-18 und Polygosil C-18 eingesetzt. Als Eluens verwendeten wir verschiedene Essigsäure/Wasser, Essigsäure/Methanol/Wasser und Methanol/Wasser-Gemische.

Die Trennung der Wasserphase nach einer Ether-/Wasser-Verteilung erfolgte durch Mitteldrucksäulen mit Fractogel TSK-HW-40 als Gelmaterial. Für die Etherphase dieser Verteilung wurde bei der GC-MS-Kopplung eine Quarzkapillare Durabond DB-5 eingesetzt.

Dank

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung auch dieser Arbeit.

- [1] E. B. Edney, Am. Zool. **8**, 309–326 (1968).
- [2] M. Warburg, Am. Zool. **8**, 545–559 (1968).
- [3] M. Warburg, K. E. Linsenmair und K. Bercovitz, Symp. Zool. Soc. Lond. **54**, 339–367 (1984).
- [4] M. Shachak und A. Yair, Symposia of the Zoological Society in London **53**, 295–314 (1984).
- [5] K. E. Linsenmair, Symp. Zool. Soc. London **54**, 423–453 (1984).
- [6] K. E. Linsenmair, Fortschritte der Zoologie **31**, 411–436 (1985).
- [7] K. E. Linsenmair, in: Kin Recognition in Animals (D. J. L. Fletcher und C. D. Michener), pp. 121–208, J. Wiley & Sons, Chichester-New York 1987.
- [8] B. Hölldobler und Michener, in: Evolution of social behaviour (H. Markl), pp. 35–38, Verlag Chemie, Weinheim-Florida 1980.
- [9] D. J. C. Fletcher und C. D. Michener, in: Kin recognition in Animals, J. Wiley & Sons, Chichester-New York 1987.
- [10] Yasuhide Yukawa und Sho Ito, Spectral Atlas of Terpenes and Related Compounds, Hirokawa Publ. Company Inc., Tokyo 1973.
- [11] D. S. Weinberg und C. J. Djerassi, J. Org. Chem. **31**, 115 (1966).
- [12] R. G. Parnova, Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. **18**, 330 (1982).
- [13] R. G. Young, Agr. Exp. St. Mem. **410**, 14 (1967).
- [14] S. Teshina, A. Kanazawa und H. Okamoto, Kagoshima Daigaku Suisangakuku Kiyo **25**, 41 (1976).
- [15] R. J. Morris, J. Mar. Biol. Ass. U.K. **53**, 27 (1973).
- [16] H. H. Brun, R. Ryhage und E. Stenhagen, Acta Chem. Scand. **12**, 789 (1959).