

Pheromone 84 [1]. Der Sexualpheromonkomplex des „Braunen Bären“ *Arctia caja* (Lepidoptera: Arctiidae)

Pheromones, 84 [1]. The Sex Pheromone Complex of the Arctiid Moth
Arctia caja (Lepidoptera: Arctiidae)

H. J. Bestmann, F. Kern, A. Mineif, H. Platz und O. Vostrowsky

Institut für Organische Chemie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg,
Henkestraße 42, D-8520 Erlangen, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **47c**, 132–135 (1992); eingegangen am 31. Juli 1991

Arctia caja, Arctiidae, Sex Pheromone Complex, (3Z,6Z)-*cis*-9,10-Epoxyheneicosadiene,
(3Z,6Z,9Z)-3,6,9-Heneicosatriene, (3Z,6Z)-*cis*-9,10-Epoxyeicosadiene

By means of GC, GC/MS and GC-coupled electroantennogram techniques, (3Z,6Z,9Z)-3,6,9-heneicosatriene (**1**), (3Z,6Z)-*cis*-9,10-epoxyheneicosadiene (**2**) and (3Z,6Z)-*cis*-9,10-epoxyeicosadiene (**3**) were structurally elucidated as the biologically active components of the pheromone complex of *Arctia caja* (Lepidoptera: Arctiidae).

Der „Braune Bär“ *Arctia caja* (Lepidoptera, Arctiidae) ist eine in Europa weitverbreitete, nordwärts bis nach Lappland vorkommende Bärenspinnerart. Der Falter zeigt eine charakteristische Zeichnung, schwarzbraune Flecken auf den weißgelben Vorderflügeln und dunkelblaue Flecken auf den orangeroten Hinterflügeln. Er fliegt in Wäldern und Gärten von Juni bis August, die Raupe, die mit langen schwarzbraunen und rostroten Haaren versehen ist, lebt an krautigen Pflanzen und Büschen und überwintert. Aus der Familie Arctiidae (Bärenspinner) war seit langer Zeit 2-Methylheptadecan als Sexuallockstoff von *Holmelina*-Arten bekannt [2], in den letzten Jahren wurden Linol- und Linolenaldehyd und vorwiegend (Z)-ungesättigte C₂₁-Polyenkohlenwasserstoffe mit methylenunterbrochenen Doppelbindungen und deren Monoepoxyderivate als Strukturen der Weibchenpheromone (vgl. Resultate und Diskussion) in einigen Arten aufgeklärt [3].

Material und Methoden

Insektenmaterial

In der Nähe von Erlangen, BRD, wurde ein Ei-gelege mit Jungraupen gefunden. Die Aufzucht der Raupen erfolgte mit Löwenzahn (*Taraxacum officinale*) und ergab nach einer Puppenruhe von 8–10 Tagen gut entwickelte Falter. Im Labor wur-

de unter Kunstlichtbedingungen für die Weibchen ein Beginn der Lockphase (*calling*) 6 h nach Anfang der Scotophase beobachtet.

Isolierung und Identifizierung

Von frisch geschlüpften weiblichen Tieren wurden in der Lockperiode das 8. und 9. Abdomensegment mit der Intersegmentalmembran („Pheromondrüse“) unter dem Mikroskop abgetrennt und mit je 15 µl Hexan extrahiert bzw. die separierten Drüsen in Glaskapillaren zur gaschromatographischen Analyse nach der Feststoffprobengeber-Technik [4] eingeschmolzen. Die GC-Analysen wurden mittels Gaschromatographen HP 5890 A, ausgestattet mit splitless Injektor, FID, Feststoffprobengeber und Integrator, durchgeführt (Inj. 240 °C, Det. 260 °C, 25 m FSCC SE 54, 2 min 60 °C, 60–260 °C, 6 °C/min, hold, 2 ml N₂/min). GC-gekoppelte Elektroantennogramme wurden mit einem Packard-United-Technologies-427-Modell und einem 1:1-Säuleneluat-Split zwischen FID und Elektroantennogramm-Detektor [5] registriert (splitless, Inj. 240 °C, Det. 260 °C, 25 m FSCC SP 2340, 3 min 70 °C, 70–195 °C, 4 °C/min, hold, 2 ml N₂/min). Die GC/MS-Analyse erfolgte mit einem Finnigan-MAT-90-Massenspektrometer (splitless, Inj. 200 °C, Interface 200 °C, 25 m FSCC SP 2340, 2 min 60 °C, 60–195 °C, 4 °C/min, 2 ml He/min, EI-Spektren, 1 sec/scan).

Elektrophysiologischer Test

Elektroantennogramme [6] wurden an isolierten Männchenantennen unter Verwendung von Glas-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. J. Bestmann.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0939–5075/92/0100–0132 \$ 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 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.

kapillarelektroden und Ag-Draht/AgCl durchgeführt. Filterpapiere in Glaskartuschen, die mit unterschiedlichen Testsubstanzen beladen waren und mittels einem zeitlich begrenzten Luftstrom auf die Antenne geblasen wurden, dienten als Reizquellen.

Darstellung der Alkadienepoxide **2** und **3** als Isomerengemische

Jeweils 100 µl einer CH₂Cl₂-Lösung von 5×10^{-3} mmol (3Z,6Z,9Z)-Eicosatrien bzw. -Heneicosatrien, die aus früheren Untersuchungen zur Verfügung standen [7], wurden bei Raumtemperatur 30 min mit 5×10^{-3} mmol *m*-Chlorperbenzoesäurelösung (50 µl CH₂Cl₂) behandelt. 1 µl des Reaktionsgemisches wurde mit 100 µl Hexan verdünnt und diese Lösung direkt zur GC- und GC/MS-Analyse verwendet.

Resultate und Diskussion

Der Extrakt eines Weibchenequivalents (1 female equivalent FE) wurde gaschromatographisch synchron mittels FID und einer Männchenantenne als pheromonspezifischem Detektor analysiert und drei physiologisch wirksame Verbindungen (**a**, **b** und **c** in Abb. 1a) im Verhältnis von etwa 1:1:10 im EAG-Detektor registriert.

Abb. 1b zeigt das Chromatogramm der flüchtigen Verbindungen einer einzelnen Pheromondrüse, aufgenommen mittels Feststoffprobegebertechnik. Das Massenspektrum der zuerst eluierten, biologisch aktiven Verbindung (**a** in Abb. 1a) mit dem Moleküllon $m/z = 290$ entsprach dem eines Heneicosatriens. Kochromatographie und Vergleich des Spektrums mit authentischem Material ergab, daß es sich um (3Z,6Z,9Z)-3,6,9-Heneicosatrien (**1**, Formel 1) handelt. Das Spektrum der Hauptmenge **c** ergab die Summenformel C₂₁H₃₈O, so daß als Struktur ein C₂₁-Alkadienepoxid, wie es als Pheromonkomponente einiger Arctiidenarten und als synthetische Lockstoffkomponente für Männchen mehrerer Geometriden- und Noctuidenarten der Unterfamilie Catocalinae bekannt ist [3], vermutet wurde.

Die (Z)-stereoselektive Monoepoxidierung von (3Z,6Z,9Z)-3,6,9-Heneicosatrien (**1**) mit *m*-Chlorperbenzoesäure führt zu einem Gemisch dreier positionsisomerer *cis*-Epoxyheneicosadiene [8], das sich gaschromatographisch in die Einzelkomponenten auftrennen läßt (Abb. 1c), deren

Retentionsreihenfolge bekannt ist (6,7-epoxy vor 3,4-epoxy und 9,10-epoxy) [9] und deren Massenspektren sich deutlich voneinander unterscheiden. Das auf unpolaren GC-Säulen zuletzt eluierte (3Z,6Z)-*cis*-9,10-Epoxyheneicosadien (**2**, **c** in Abb. 1a, b und c), dessen Spektrum sich durch ein signifikantes C₈H₁₂-Bruchstück ($m/z = 108$,

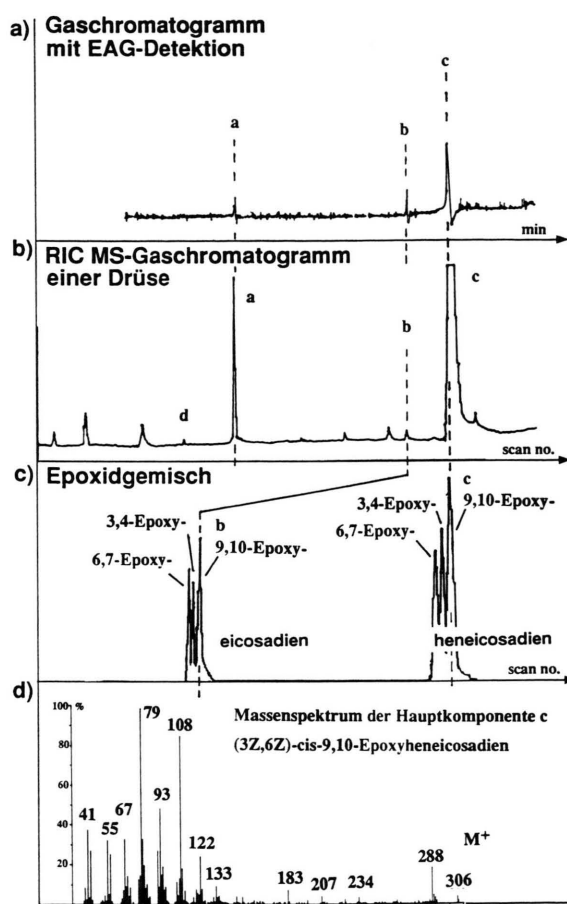
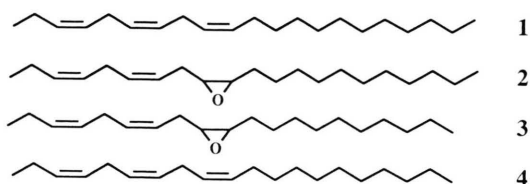


Abb. 1. a. Gaschromatogramm (FSCC SP2340) der flüchtigen Inhaltsstoffe eines Extraktes eines Weibchenequivalents (1 FE) von *Arctia caja* mit einer Männchenantenne als biologischem Detektor (**a** (3Z,6Z,9Z)-3,6,9-Heneicosatrien, **b** (3Z,6Z)-*cis*-9,10-Epoxyeicosadien und **c** (3Z,6Z)-*cis*-9,10-Epoxyheneicosadien); b. RIC MS-Chromatogramm (FSCC SP2340) einer Pheromondrüse eines weiblichen Falters, aufgenommen mittels Feststoffprobegebertechnik (**d** (3Z,6Z,9Z)-3,6,9-Eicosatrien); c. RIC MS-Chromatogramm eines Gemisches der positionsisomeren Epoxyeicosadiene und Epoxyheneicosadiene (FSCC SE 52); d. EI-Massenspektrum der Pheromonhauptkomponente **c**, (3Z,6Z)-*cis*-9,10-Epoxyheneicosadien (GC/MS, 70 eV).

Abb. 1 d) gegenüber den anderen beiden Isomeren auszeichnet, war sowohl bezüglich Retentionszeit als auch Spektrum identisch mit dem Naturstoff **c**.



Formel 1.

Das Massenspektrum der dritten physiologisch aktiven Verbindung **b** mit der Molmasse 292, dem Fragment $M^+ - 18$ ($-H_2O$) und wiederum mit dem auffälligen geradzahigen Bruchstück $m/z = 108$ ließ das zu **c** norhomologe Alkadienepoxid (3*Z*,6*Z*)-*cis*-9,10-Epoxyeicosadien (**3** in Formel 1) als Struktur vermuten. Durch Monoepoxidierung eines (3*Z*,6*Z*,9*Z*)-3,6,9-Eicosatriens und anschließende gaschromatographische Isomerentrennung konnte auch hier gezeigt werden, daß das Naturprodukt **b** sowohl im Massenspektrum als auch in der Retentionszeit mit dem von den drei Positionsisomeren zuletzt eluierten (3*Z*,6*Z*)-*cis*-9,10-Epoxyeicosadien (**3**) identisch ist. Das dem Alkadienepoxid **3** entsprechende (3*Z*,6*Z*,9*Z*)-3,6,9-Eicosatrien (**4**, Formel 1) konnte ebenfalls in der Weibchendrüse nachgewiesen werden (**d** in Abb. 1 b), war jedoch elektrophysiologisch unwirksam. Dies kann bedeuten, daß der Kohlenwasserstoff (**4**) nur einen Biosynthese-Precursor für **3** darstellt, der keine für die biologische Aktivität essentielle Wirkung besitzt.

(3*Z*,6*Z*)-*cis*-9,10-Epoxyheneicosadien (**2**) und das norhomologe (3*Z*,6*Z*)-*cis*-9,10-Epoxyeicosa-

dien (**3**) sind beides chirale Verbindungen. Bisher ist es nicht möglich zu entscheiden, ob jeweils nur ein Enantiomeres oder eine definierte Mischung beider das eigentliche Pheromon darstellen bzw. die optimale Aktivität hervorrufen. Zur Klärung dieser Frage arbeiten wir zur Zeit eine Synthese der reinen Enantiomeren aus, um sowohl die absolute Konfiguration des Naturprodukts zu bestimmen als auch einen Wirksamkeitsvergleich mittels elektrophysiologischer Testverfahren durchführen zu können.

Das Epoxid (3*Z*,6*Z*)-*cis*-9,10-Epoxyheneicosadien (**2**) wurde bereits früher als Hauptkomponente der Pheromonkomplexe der Arctiiden *Cretonotos gaxis* [10], *C. transiens* [10], *Cymbalophora pudica* [11], *Phragmatobia fuliginosa* [12, 13], *Estigmene acrea* [14] und *Hyphantria cunea* [15–17] identifiziert, wobei es in den ersten drei Fällen ebenfalls vom entsprechenden Alkatrienkohlenwasserstoff (**1**) begleitet wurde. In keinem der Fälle konnte bis heute die absolute Konfiguration der Naturstoffe bestimmt werden. Optisch aktive Formen von (3*Z*,6*Z*)-9,10-Epoxyalkadienen mit Kettenlängen von 18–21 Kohlenstoffatomen wurden im Freiland als Lockstoffe für Geometriden und Noctuiden der Unterfamilie Catocalinae getestet [9, 18], wobei oftmals nur ein Enantiomeres Attraktivwirkung zeigte [18]. Das (3*Z*,6*Z*,9*Z*)-Heneicosatrien (**1**) wurde, häufig vom C_{20} -Alkatrien (**4**) begleitet, als Pheromonhauptkomponente in *Mocis*-Arten [19], in *Anticarsia gemmatilis* [20] und *Caenurgis erecta* [21] (alle Noctuidae, Unterfamilie Catocalinae) identifiziert und erwies sich im Freiland für einige Spannerarten (Geometridae) als attraktiv [18]. Dies weist auf Beziehungen bezüglich der Evolution der Pheromonsysteme bei den drei Schmetterlingsfamilien hin.

- [1] Als 83. Mitteilung gilt: G. Melikyan, A. Mineif, O. Vostrowsky und H. J. Bestmann, *Synthesis* **1991**, 633; 82. Mitteilung: H. J. Bestmann, F. Kern, D. Schäfer, O. Vostrowsky und I. Hasenfuss, *Naturwissenschaften* **78**, 465 (1991).
- [2] W. L. Roelofs und R. T. Carde, *Science* **171**, 684 (1971).
- [3] H. Arn, M. Tóth und E. Priesner, List of Sex Pheromones of Lepidoptera and Related Attractants. OILB-SROP, Paris (1986 und ff.).
- [4] A. B. Attygalle, M. Herrig, O. Vostrowsky und H. J. Bestmann, *J. Chem. Ecol.* **13**, 1299 (1987).
- [5] D. Struble und H. Arn, *Techniques in Pheromone Research* (H. E. Hummel und T. E. Miller, Herausg.), S. 161, Springer Verlag, Berlin 1984.
- [6] D. Schneider, *Z. vergl. Physiol.* **40**, 8 (1957); D. Schneider, *Jahrbuch der Max-Planck-Gesellschaft* **1963**, 150.
- [7] H. J. Bestmann, K. Roth, K. Michaelis, O. Vostrowsky, H. J. Schäfer und R. Michaelis, *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 417.
- [8] Wir danken Herrn Prof. Dr. W. Francke (Hamburg) für die Bereitstellung einer Probe des Positionsisomeren-Gemisches des Epoxides **2** für Vergleichszwecke.
- [9] B. S. Hansson, G. Szöcs, F. Schmidt, W. Francke, C. Löfstedt und M. Tóth, *J. Chem. Ecol.* **16**, 1887 (1990).
- [10] H. J. Wunderer, K. Hanson, Th. W. Bell, D. Schneider und J. Meinwald, *Exp. Biol.* **46**, 11 (1986).
- [11] B. Frerot, J. R. Pouginy, M. L. Milat, P. Rollin und C. Malosse, *C. R. Acad. Sci. P.* **306**, 3:157 (1988).
- [12] C. Descoins, *Intern. Congr. Entomol.*, Hamburg, BRD (1984).
- [13] V. G. Kovalev und L. A. Nikolaeva, *Zool. Zh.* **65**, 802 (1986).
- [14] A. S. Hill und W. L. Roelofs, *J. Chem. Ecol.* **7**, 655 (1981).
- [15] A. S. Hill, *Euchem. Conf. Borgholm*, Schweden, Proceedings (1979).
- [16] J. Einhorn, J.-Y. Lallemand, P. Zagatti, M. Gallois, H. Virelizier, J. Riom und P. Menassieu, *C. R. Acad. Sci. Pa.* **294**, 2:41 (1982).
- [17] A. S. Hill, V. G. Kovalev, L. N. Nikolaeva und W. L. Roelofs, *J. Chem. Ecol.* **8**, 383 (1981).
- [18] J. W. Wong, E. W. Underhill, S. L. McKenzie und M. D. Chisholm, *J. Chem. Ecol.* **11**, 727 (1985).
- [19] P. J. Landolt, R. R. Heath und N. C. Leppla, *Environ. Entomol.* **15**, 1272 (1986).
- [20] R. R. Heath, J. H. Tumlinson, N. C. Leppla, J. R. McLaughlin, B. Dueben, E. Dundubis und R. H. Guy, *J. Chem. Ecol.* **9**, 645 (1983).
- [21] E. W. Underhill, P. Palaniswamy, S. R. Abrams, B. K. Bailey, W. F. Steck und M. D. Chisholm, *J. Chem. Ecol.* **9**, 1413 (1983).