

Die Bombardierkäfer und ihre Explosionschemie

V. Mitteilung über Insekten-Abwehrstoffe

Von Doz. Dr. H. SCHILDKNECHT und Dr. K. HOLOUBEK*)

Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen

Prof. Dr. J. Stammer zum 60. Geburtstag gewidmet

Es wurden die Schüsse der Bombardierkäfer *Brachynus sclopeta* Fabr., *Br. explosens* Duft. und *Br. crepitans* L. untersucht und als ein Gemisch aus p-Benzo- und Toluchinon erkannt. Die gleichen Stoffe konnten im Hinterleib von zwei getrockneten Exemplaren einer afghanischen *Pheropsophus*-Art (*Ph. catoirei* Dej.) nachgewiesen werden. Die Chinone entstehen in einer explosionsartig verlaufenden, enzym-katalysierten Reaktion aus den entsprechenden Hydrochinonen und Wasserstoffperoxyd. Der gleichzeitig frei werdende Sauerstoff liefert den zum Ausschleudern und Zerstäuben nötigen Druck.

Einleitung

Es verwundert uns nicht, daß schon in der ältesten entomologischen Literatur¹⁾ das seltsame Gebaren der „Bombardierkäfer“ geschildert wurde; oft recht anschaulich und mit viel Liebe, wovon das folgende Beispiel Zeugnis geben soll, einem Auszug einer Darstellung des Pastors *Wilhelm*²⁾:

„So wie die mütterliche Natur den Geschöpfen mannigfaltige Waffen gegen ihre Feinde gab; so hat sie auch diesen Käfer mit einem ganz eigenen Verteidigungsmittel ausgerüstet. Er läßt nämlich seinen Verfolgern, deren er unter den Laufkäfern manchen hat, einen bläulichen Dunst, den ein ziemlicher Gestank und Knall begleitet, ins Gesicht. Erschrocken, wir wissen nicht, ob über den Schuß, oder über den Gestank, rennt sein Feind davon.“

..... Läßt man sie gegen einen Spiegel feuern, so bekommt er einen Dampfflecken. Leute, die sehr gut hören, sehen, und fühlen können, weil sie immer ihre Einbildungskraft zu Hilfe nehmen, vergleichen den Schuß mit dem Knall eines Pistols, glauben Pulver zu riechen und eine gewisse Wärme zu fühlen.....

..... Es müßte äußerst unterhaltend seyn, die ganze Einrichtung genau zu kennen. Gewiß würden wir auch da, wie bey allen Werken des Schöpfers, uns des Erstaunens über die Einfachheit, Zweckmäßigkeit und Verbindung der verschiedenen Elemente nicht enthalten können.“

Außer diesen guten Beobachtungen zur Verhaltensweise des Bombardierkäfers finden wir bei *Bergsträsser*³⁾ noch eine genaue Beschreibung des äußeren Habitus und die ersten Gedanken über den Mechanismus des Bombardierkäferschusses, den er für einen „Windschuß“, d.h. für die Wirkung komprimierter Luft hält. Er schreibt:

„Es ist allerdings zu bewundern, wie dieses Insect so viele Luft in solcher Eile zusammenpressen kann, da es hinten bloß ein kleines Bläschen im Leibe hat.....“

Das war eine irrige Vorstellung, aber richtig erkannt hatte der Beobachter, daß das Depot für die Explosionsstoffe kleine Bläschen sind, die zu einem Pygidialdrüsen-System gehören, das in allen seinen Teilen paarig ist und in symmetrischer Anordnung im Bereich der hintersten drei Abdominalsegmente liegt. Die Pygidialblasen enden in

kurzen Ausführungsgängen, die zu beiden Seiten des Anus in winzige, durch vierteilige Klappen verschließbare Öffnungen münden.

Mit diesen Pulverkammern mußte man beginnen, wenn das „Pulver“ vor dem Schuß gefaßt werden sollte, um dann erst die „Zündung“ in den Chitinkapseln, die explosionsartige Zersetzung der Treibladung und die Rauchgase, die Endprodukte also, untersuchen zu können.

Die Chemie der Pygidialblasen

Anatomie und Reaktion der Blasen

Nach den hervorragenden anatomischen Studien von *Dierckx*⁴⁾ durften wir annehmen, daß die Hauptmenge der explodierenden Verbindungen in zwei Pygidialblasen gespeichert sein mußte; es sind nierenförmige Reservoirs, die im Ende des Hinterleibes (daher der Name: πυγγή = Steiß, Hinterleib) liegen und mit einigen Kunstgriffen unverletzt herausoperiert werden können (s. Abb. 1).



A 95.1

Abb. 1. Eine Sammelblase, die in den abdominalen Fettkörper eingebaut und von einem starken Tracheengeflecht umspinnen ist (Vergr. 50-fach)

*) Dissertation von K. Holoubek, Erlangen 1959. IV. Mitteilung Z. Naturforsch. 156, 200 [1960].

¹⁾ De Geer: Mémoires pour servir à l'histoire des insectes tom 7, Stockholm 1752.

²⁾ Unterhaltungen aus der Naturgeschichte der Insecten, erster Theil. Augsburg, in der Mart: Engelbrechtschen Buchhandlung, 1796.

³⁾ Bergsträsser: Nomenclatur I, Selbstverlag, Hanau 1778.

⁴⁾ Fr. Dierckx, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. 126, 622 [1898]; La Cellule 16, 61 [1899]. — Resumé: Bull. Soc. Entomol. France 1899, 200; La Cellule 18, 255 [1901].

Wenn man das Organ durch Einlegen in 2n Salzsäure inaktiviert, kann man vorsichtig mit der Pinzette ein dünnes, peritoneales Häutchen abziehen und hat dann einen länglichen Schlauch vor sich, der in Abständen Gasblasen einschließt (vgl. Abb. 2).

[A 95.2]

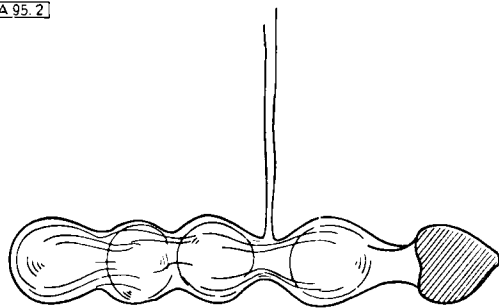
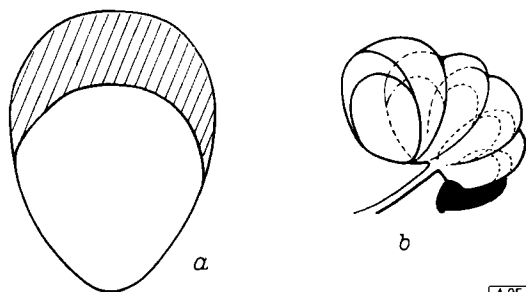


Abb. 2. Schemazeichnung der entfalteten Bombardierkäfer-Blase mit Chitinkapsel

Der Schlauch erhält durch das umgebende Häutchen die charakteristische Gestalt der Pygidialblase. Sie macht oberflächlich betrachtet, den Eindruck, als sei sie aus etwa einem Dutzend von Segmenten zusammengesetzt, ähnlich wie eine Apfelsine aus einzelnen Scheiben. Bei näherer Betrachtung sieht man jedoch, daß die Trennwand zwischen diesen Segmenten oder Kammern den Querschnitt nicht vollständig, sondern nur zu etwa einem Drittel in der skizzierten Weise (s. Abb. 3) ausfüllt, so daß ein großes, durch die ganze Blase gehendes Lumen bleibt.



[A 95.3]

Abb. 3. Pygidialblase: a Querschnitt durch eine „Kammerwand“; b vorne angeschnitten

Alle Operationen zur Freilegung der Blase müssen besonders sorgfältig vorgenommen werden, da selbst bei der kleinsten Verletzung der Blaseninhalt stark aufschäumt. Dabei färbt sich die ausgetretene Flüssigkeit zuerst gelb, rötlich und dann sogar violett bis schwarz und gleichzeitig riecht es stechend, wie beim Schießen der Käfer.

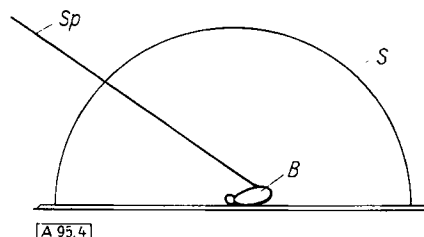
Analyse der Blaseninhaltsstoffe und deren Reaktionsprodukte

Unsere ersten Fragen waren nun, welches Gas entwickelt sich, wie entsteht es und aus welcher Verbindung? Denn daß es nicht von Haus aus vorliegt, etwa in komprimierter Form, wie das Rougemont⁵⁾ angenommen hat, und auch nicht wie von Dierckx⁴⁾ behauptet, nur in einer Flüssigkeit gelöst ist, konnten wir vor allem dadurch beweisen, daß beim Zerstören der Blase in angesäuertem Wasser keinerlei Gasentwicklung zu beobachten war. Das Gas mußte also erst aus einer vorher flüssigen oder gelösten Verbindung entstanden sein. Die Frage, ob bei der Gasbildung auch Luftsauerstoff nötig ist, wie das 1848 Karsten⁶⁾ behauptet hat, haben wir ebenfalls sehr einfach klären können (s. Abb. 4).

⁵⁾ Ph. De Rougemont, Mitt. Schweiz. Entomol. Ges. 6, 99 [1884].
⁶⁾ H. Karsten, Arch. Anatomie Physiol. 1848, 368.

Dazu legten wir das Bombardierorgan von *Brachynus crepitans* unter eine Seifenblase. In diese durchsichtige Gaskammer kann man mit einem mit Speichel befeuchteten Spatel ohne Zerstörung der Seifenhaut eindringen und somit unter Schutzgas und von allen Seiten gut einsehbar operieren. Wie an der Luft, so fängt auch unter Stickstoff beim Zerstören der Pygidialblase das Bombardierkäfer-Sekret sofort das Schäumen an und wiederum unter Bildung von gelb bis violett gefärbten Substanzen. Man kann auch mit einigem Geschick die Blase allein, ohne Käfer also, durch Drücken mit dem Spatel zum Schießen bringen, ohne daß der Luftsauerstoff zugegen sein müßte.

Die einzige Angabe in der Literatur über die Zusammensetzung des Reaktionsgases findet sich bei Rougemont⁵⁾.



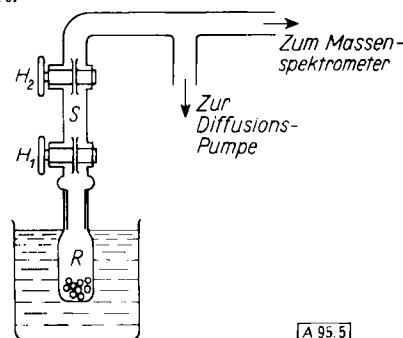
[A 95.4]

Abb. 4. Künstliches Schießen der *Brachynus*-Blase (B) in Stickstoff in einer Seifenblase (S) mit einem Spatel (Sp)

Nach diesen Versuchen schien es uns erforderlich, einzelne freipräparierte Blasen zur Reaktion zu veranlassen und das dabei gebildete Gas quantitativ zu untersuchen. Für dieses Vorhaben hat sich die Mikromethode nach Berg⁷⁾ als geeignet erwiesen, die es gestattet, Gasmengen von 0,4 bis 1,0 mm³ zu analysieren. Demnach erwies sich das Reaktionsgas als völlig CO₂-frei. Es bestand zu rund 95–98% aus Sauerstoff.

Dieses Ergebnis wurde massenspektrometrisch kontrolliert⁸⁾ (s. Abb. 5).

In ein kleines Schliffkölbehen R mit 1 ml Inhalt wurden etwa 20 Blasen gefüllt, mit Aceton-Troekeneis eingefroren und mit einem Glasstab zerrieben. Dann wird das Kölbehen, immer in einem Kühlbad eingetaucht, mit einer ebenfalls sehr kleinen Schleuse S verbunden, die Verbindung zum Massenspektrometer hergestellt und evakuiert.



[A 95.5]

Abb. 5. Entwicklungsapparat für das *Brachynus*-Gas zur massenspektrometrischen Analyse

Nun läßt man bei geöffnetem Hahn 1 und 2 in die kleine Apparatur Argon als Schutzgas einströmen, schließt den Hahn 1, saugt das restliche Argon wieder ab und entfernt für einige Zeit das Kühlbad. Die eingefrorenen Blasen tauen dann wieder auf, wobei das Gewebe zerstört wird und sich das zu untersuchende Gas entwickelt. Inzwischen hat man auch Hahn 2 wieder geschlossen. Öffnet man jetzt Hahn 1, so verteilt sich das Reaktionsgas auf Schleuse S und Kölbehen R. Wir haben zur Vermeidung von Fehlern durch die flüchtigen Bestandteile der Blasen nur das Gas in der Schleuse untersucht, d. h. bei geschlossenem Hahn 1 und durch den Hahn 2 das Reaktionsgas zum Massenspektrometer gesaugt.

⁷⁾ W. E. Berg, Science [Washington] 104, 575 [1946].

⁸⁾ Für die Anfertigung und Deutung des Massenspektrogrammes danken wir Dipl.-Phys. H. Gutbier.

Das Massenspektrum zeigt — neben Argon — die Massenslinien 28, 32 und 43 mit großer Intensität (s. Tabelle 1). Als höchste Masse wurde 73 registriert.

Masse	relative Ionenintensität	Stoff
28	410	N ₂
32	4800	O ₂
43	600	?

Tab. 1. Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse des *Brachynus*-Gases

Wie aus dem Gesamtspektrum hervorgeht, lassen sich die Massenslinien 28 und 32 eindeutig N₂ bzw. O₂ zuordnen. Dagegen ist die relativ stark auftretende Massenslinie 43 nicht ohne weiteres deubar. Aus dem zeitlichen Intensitätsabfall der einzelnen Massenslinien, der sich auf Grund der endlichen Größe des Vorratsvolumens ergibt und umgekehrt proportional der Wurzel aus der Molekülmasse ist, wurde ferner berechnet, daß die Masse des zum Ionenradikal M 43 gehörigen Moleküls etwa 74 bis 80 ME beträgt. Um welches Molekül es sich dabei handelt, wissen wir noch nicht. Der im Massenspektrum auftretende Sauerstoff scheint aber bereits im Reaktionsraum in molekularer Form vorzuliegen. Eine Massenslinie 44, die CO₂ zuzuordnen wäre, fehlte völlig. Da sich die relativen Ionenintensitäten zueinander verhalten wie die dazugehörigen Stoffmengen, folgt für N₂ (Masse 28) und O₂ (Masse 32) aus den oben aufgeführten Intensitäten, daß sich die gasförmigen Reaktionsprodukte aus

92,1 % Sauerstoff und
7,9 % Stickstoff

zusammensetzen.

Das Ergebnis der massenspektroskopischen Analyse des Reaktionsgases kommt den nach der Mikroanalyse von Berg ermittelten Werten in zufriedenstellender Weise nahe. Die Kombination der Ergebnisse beider Methoden läßt eine Deutung des „Restgases“ als N₂ zu.

Es mußte nun geklärt werden, woraus der Sauerstoff entstand, d. h. von welcher Zusammensetzung die flüssige oder auch nur gelöste Muttersubstanz war. Wir dachten zuerst an Peroxyde, also zersetzliche und stark sauerstoffhaltige Verbindungen und noch mehr an Persäuren, wie die Peroxy-ameisensäure und Peroxy-essigsäure, die zu Sauerstoff und Carbonsäuren zerfallen konnten. Erst nachdem alle Versuche fehlgeschlagen waren, diese Verbindungen oder ihre Zersetzungsprodukte zu finden, entschlossen wir uns als alleinige Vorstufe des Sauerstoffs das Wasserstoffperoxyd anzunehmen.

Bei all den Versuchen, die der Erfassung der Vorstufe des Sauerstoffs dienten, mußte die Blase natürlich so aufgearbeitet werden, daß die übliche Gasentwicklung ausblieb. Zu diesem Zweck wurden die unverletzt isolierten Pygidialblasen der Bombardierkäfer in ein kleines Reagenzglas mit wenigen cm³ Alkohol gebracht und auf -50 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur erstarrten die Blasen sofort und konnten mit einem Glasstab pulverisiert werden, ohne daß die geringste Gasentwicklung zu beobachten gewesen wäre. Diese bleibt auch bei höheren Temperaturen aus, wenn man die ungelösten Gewebetelle bei tiefer Temperatur abzentrifugiert. Vereintigt man aber diese stabile Lösung bei Raumtemperatur wieder mit den vorher abgetrennten Blasenhäuten, so ist augenblicklich eine starke Sauerstoff-Entwicklung zu beobachten. Die Blasenhäute müssen also einen Stoff enthalten, der die Reaktion der Inhaltsstoffe katalysiert, ein Enzym, das mit großer Wahrscheinlichkeit Katalase ist, da wir die gleiche Wir-

kung bei Zugabe von reiner Katalase beobachten konnten. Diese charakteristische Reaktion mit Katalase deutet wiederum darauf hin, daß die gesuchte Vorstufe für O₂ Hydroperoxyd ist. In den unzersetzten, stabilen, alkoholischen Lösungen konnte dann auch H₂O₂ quantitativ und qualitativ mit KJ, KMnO₄ und mit Titanylsulfat nachgewiesen und bestimmt werden. H₂O₂ war nicht mehr zu finden, wenn in Kontrollversuchen nach der Zugabe von Katalase-Suspension die Sauerstoff-Entwicklung stattgefunden hatte.

Die endgültige Entscheidung darüber, ob wirklich Hydroperoxyd vorliegt und vor allem, ob allein, brachte die Papierchromatographie. Das Auftragen der Substanz geschieht am besten so, daß man eine frisch isolierte Pygidialblase auf Chromatographiepapier legt und dort möglichst rasch mit Hilfe eines Objektträgers zerdrückt. Dabei reagiert zwar ein Teil der Blaseninhaltsstoffe, der Rest wird jedoch vom Papier so rasch aufgesaugt, und damit von dem zersetzenden Blasen Gewebe abgetrennt, daß man ihn unzersetzt chromatographieren kann.

Das Ergebnis dieser Chromatographie ist in Tabelle 2 zusammengestellt. Es zeigt sich, daß nur Hydroperoxyd mit Titanylsulfat-Reagens nachzuweisen ist; auch in dem System Essigester, Dioxan, Wasser, das von Rieche⁹⁾ zur Trennung der Hydroperoxyde und der echten Peroxyde angegeben wird.

Substanz	R _F -Werte im System		
	Methanol-Äther (10:1)	n-Butanol	Essigester, Dioxan, Wasser (20:45:46)
H ₂ O ₂	0,72	0,13	0,86
<i>Brachynus</i> -Sekret	0,72	0,13	0,86
Papier	Binzer 202	Binzer 202	S & S 2043b

Tab. 2. R_F-Werte des Peroxyd-Chromatogramms

Zur quantitativen Bestimmung des Hydroperoxyd-Gehaltes wurde die gelbe Lösung photometriert, die beim Zerdrücken von 6 Blasen in schwefelsaurer Lösung nach Versetzen mit Titanylsulfat-Reagens sich bildet. Die erforderliche Eichkurve wird durch Ausmessung der Extinktion bei 546 mμ verschieden konzentrierter, mit Titanylsulfat versetzter Lösungen von H₂O₂ aufgestellt.

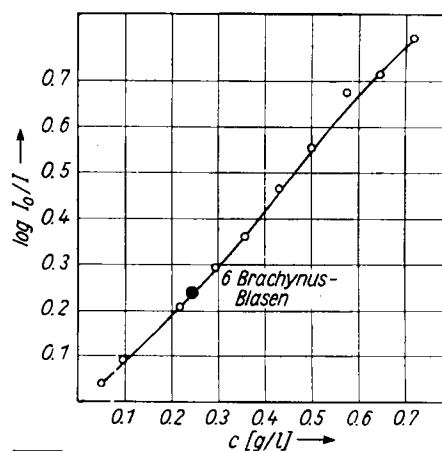
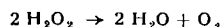


Abb. 6. Eichkurve für die photometrische Bestimmung der H₂O₂-Konzentration in der Blase

Berücksichtigt man, daß eine Blase durchschnittlich 1,24 mg wiegt, so geht aus Abb. 6 hervor, daß das Pygidial-Sekret zu einem überraschend hohen Prozentsatz — manchmal bis zu 28,5% — aus Hydroperoxyd besteht.

⁹⁾ A. Rieche, Angew. Chem. 70, 263 [1958].

Nun war aber die Gasentwicklung, der also die Reaktion



zugrunde liegt, immer von einer Gelbfärbung und nicht selten sogar von einer Violettfärbung des Blaseninhalts begleitet. Mit dem bisherigen Befund war diese nicht zu klären, d.h. wir mußten nach weiteren Begleitstoffen des Hydroperoxyds suchen, die zuerst farblos sind und dann im Verlaufe der Reaktion gelbe Verbindungen ergeben. Nun ist bei den Bombardierkäfer-Schüssen stets ein charakteristischer Geruch wahrnehmbar, der nach Vorproben zu schließen auf Chinone zurückzuführen war. Chinone lassen sich als Keto-Verbindungen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu Hydrazonen umsetzen, die sehr gut papierchromatographisch untersucht werden können. Zu diesem Zweck läßt man eine Bombardierkäfer-Blase wie beschrieben reagieren, wartet bis zum Ende der Gasentwicklung und bedeckt sie dann mit einer gesättigten Lösung von 2,4-DNP in 6n HCl. Über Nacht scheidet sich soviel 2,4-DNP ab, daß es auf einer Mikronutsche gesammelt werden kann. Man wäscht es mehrmals mit kaltem Wasser und verwendet es zur Darstellung des in Abb. 7 abgebildeten Chromatogramms. Zum Vergleich wurden rechts die Fällungsprodukte mit aufgetragen, die man aus einem Gemisch von p-Benzochinon, Toluchinon und H_2O_2 mit 2,4-DNP erhält.



A 95.7

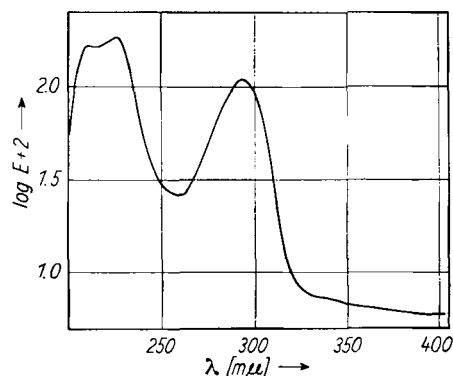
Abb. 7.
Papierchromatogramm
der Hydrazone
vom *Brachynus* (links),
verglichen mit denjenigen
eines Gemisches von
p-Benzochinon, Toluchinon
und H_2O_2 (rechts)

Das Chromatogramm zeigt eindeutig, daß die untersuchten Reaktionsprodukte aus einem Gemisch von p-Benzo- und Toluchinon bestehen. Allerdings waren auf dem Chromatogramm nicht nur die den Mono- und Bis-Hydrazonen entsprechenden Flecken (die starken Fleckenpaare) zu sehen, sondern noch sechs weitere.

Wir hielten diese zusätzlichen Flecken zuerst für die 2,4-DNP-Derivate weiterer, unbekannter Chinone. Deshalb wurden 31 andere Chinone¹⁰⁾ im gleichen System chromatographiert und mit dem Chromatogramm des Schusses verglichen. Dieses Verfahren führte jedoch nicht zum Ziel. Wir kamen aber zu dem Schluß, daß die unbekannten Sub-

¹⁰⁾ Prof. Dr. W. Flaig danken wir besonders, daß er uns viele Benzo- chinone zur Verfügung gestellt hat.

stanzen lediglich anomale 2,4-DNP-Derivate von p-Benzochinon und Toluchinon sein könnten. Interessanterweise treten sie nicht auf, wenn man die Chinone bei Abwesenheit von H_2O_2 fällt oder wenn man die Pygidialblasen in einer wäßrigen Lösung von Katalase zerdrückt und dann erst mit 2,4-DNP-Reagens die Chinone fällt. Es erscheinen im Chromatogramm nur mehr die Flecken des Mono- und Bishydrazons, womit bewiesen ist, daß bei der „Blasenreaktion“ nur Benzo- und Toluchinon entsteht. Untersuchungen über die Nebenreaktionen sind noch im Gange.

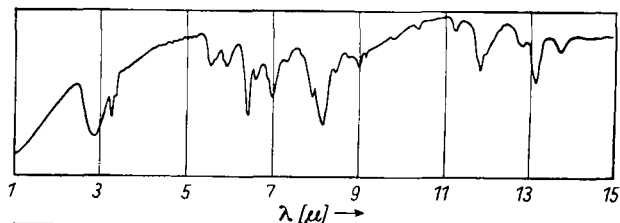


A 95.8

Abb. 8. UV-Spektrum des unzersetzten Pygidialblasen-Inhalts

Wie bereits erwähnt, ist die Blase im unberührten Zustand farblos und verfärbt sich erst während der Gasentwicklung. Vor der Reaktion müssen demnach farblose Verbindungen in gelöster Form vorliegen, die evtl. durch Oxidation mit Sauerstoff in Chinone übergehen. Solche Verbindungen können aber nur die entspr. Hydrochinone sein. In der Tat konnten wir sie einwandfrei in der bei -50°C hergestellten äthanolischen Lösung der Blaseninhaltsstoffe in Substanz und papierchromatographisch nachweisen. Zudem zeigt die Lösung das charakteristische Absorptionsspektrum der Hydrochinone (s. Abb. 8).

Der Verlauf der Kurve im Gebiet von 200 bis 230 $\text{m}\mu$ deutet darauf hin, daß die vom Bombardierkäfer gelieferte Probe eine Mischung aus mehreren Hydrochinonen darstellt. Es wäre denkbar, daß eine Mischung von Hydrochinon und Toluhydrochinon in einem bestimmten Verhältnis ein der *Brachynus*-Kurve genau entsprechendes Spektrum liefert. Auch das IR-Spektrum¹¹⁾ spricht dafür, daß ein Gemisch aus Hydrochinon und Toluhydrochinon vorliegt, worin das Hydrochinon überwiegt (s. Abb. 9).



A 95.9

Abb. 9. IR-Spektrum des unzersetzten Pygidialdrüsen-Sekrets

Der endgültige Nachweis, daß im Pygidialdrüsen-Sekret von *Brachynus* tatsächlich Hydrochinon und Toluhydrochinon nebeneinander vorliegen, läßt sich papierchromatographisch führen.

Zerstört man die Blasen unter Äthanol bei Raumtemperatur, so tritt starke Gasentwicklung ein, jedoch ohne daß Chinone in nennenswertem Maße entstehen. Es ist wahr-

¹¹⁾ Prof. Dr. W. Lüttke danken wir für die Aufnahme und Deutung des Spektrums.

scheinlich, daß durch die Zerstörung in Äthanol das Oxydationsmittel verdünnt und damit seine Wirksamkeit abgeschwächt wird. Dunstet man eine solche Lösung vorsichtig ein, dann bleiben farblose, sublimierbare Nadeln zurück, die beim Verreiben mit Chinon tiefblaues Chinhydron geben (Hydrochinone); diese Kristalle werden in wenig Äthanol aufgenommen und zur Chromatographie aufgetragen. In aufsteigender Technik ergeben sich unter Verwendung von S & S 2043b-Papier für das System Butanol: Benzol: Wasser (1:9:10) die R_f -Werte der Tabelle 3. Die farblosen Hydrochinon-Flecke wurden mit einer 2-proz. wäßrigen Phosphormolybdänsäure und nachfolgendem Begasen mit Ammoniak sichtbar gemacht.

Substanz	R_f -Werte	
Blaseninhalt	0,19	0,39
Hydrochinon	0,19	
Toluhydrochinon		0,39

Tab. 3. R_f -Werte des Hydrochinon-Chromatogramms

Der Nachweis der Hydrochinone als Vorstufen für die vom Bombardierkäfer produzierten Chinone erklärt nachträglich die schöne Beobachtung von Dumeril¹²⁾, daß die Pygidialblase eines *Brachynus* beim Zerdücken auf der Zunge zunächst kurze Zeit angenehm schmeckt, dann aber rasch ein Brennen des ganzen Mundes hervorruft: Hydrochinone schmecken süß, während Chinone etwa wie Pfeffer brennen.

Zusammengefaßt konnten wir sagen, daß neben Wasserstoffperoxyd hauptsächlich Hydrochinon und Toluhydrochinon in etwa 10-proz. Lösung in der Blase vorlag und daß diese Mischung mit Katalase in Sauerstoff, Wasser und p-Benzochinone zerfällt.

Daß die geschilderte Reaktion der Blaseninhaltsstoffe letzten Endes auch dem Schießmechanismus zugrunde liegen mußte, war sehr wahrscheinlich und konnte als sicher gelten, wenn es gelang die Produkte der Reaktionsfolge zu fassen, d.h. es mußten die Rauchgase bzw. der „Pulverdampf“ näher untersucht werden.

Der Schuß

Zunächst haben wir, wie bereits beschrieben¹³⁾, auf Chinone geprüft. Daneben gibt der Käfer beim Schuß ein Gas ab, das man sehr leicht nachweisen kann, indem man ihn unter Wasser schießen läßt. Bei jedem Schuß treten einige große und eine ganze Reihe von kleinen und kleinsten Gasblasen an die Wasseroberfläche. Das Wasser beginnt sich nach etwa 50 Entladungen gelb zu färben. Für die weitere Untersuchung des Sekretes war besonders eine ebenfalls beschriebene Absaugvorrichtung¹⁴⁾ geeignet, die den großen Vorteil hatte, daß Verunreinigungen ausgeschlossen werden, die den Käfern anhaften. Auch eine Entleerung des Mastdarmes, die vom Tier gern gleichzeitig mit oder kurz nach dem Schuß vorgenommen wird, stört wegen der Schwerflüchtigkeit dieser Exkremente (die viel Harnsäure enthalten; Murexid Probe) nicht. Der endgültige Nachweis der Chinone in einem auf diese Weise gewonnenen, wäßrigen Extrakt gelang wieder spektroskopisch, bzw. nach Zugabe von 2,4-DNP papierchromatographisch. Wieder traten neben den Derivaten von Benzo- und Toluchinon die von H_2O_2 herrührenden Nebenprodukte auf und auch im Sekret konnte durch Katalase-Zusatz die Bildung dieser unbekannten Verbindungen verhindert werden. Mit der Titansulfat-Probe ließ sich jedoch kein H_2O_2 nachweisen,

so daß man meinen möchte, daß die Umsetzung von Chinonen mit H_2O_2 einen wesentlich empfindlicheren Nachweis von Wasserstoffperoxyd erlaubt.

Zu den bisher beschriebenen Versuchen diente *Brachynus crepitans* L. Da sich die Schüsse der drei uns zur Verfügung stehenden Arten weder durch ihren Geruch noch durch ihre Wirkung auf die Haut oder irgend ein sonstiges Merkmal unterscheiden, liegt der Schluß nahe, daß alle drei Bombardierkäfer-Arten mit dem gleichen Substanzgemisch schießen. Um dies nachzuprüfen, wurden in der Absaugvorrichtung¹⁴⁾ Schüsse von *Brachynus crepitans* L., *Br. explodens* D. und *Br. sclopeta* Fabr.¹⁵⁾ getrennt gewonnen und durch Vorlegen einer gesättigten Lösung von 2,4-DNP in 6n HCl gleichzeitig in die 2,4-DNP-Derivate übergeführt. Die Ergebnisse der Papierchromatographie dieser Derivate sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

2,4-Dinitrophenylhydrazon von	Laufstrecke in cm						
<i>Br. explodens</i> D.	15,2	11,7	6,1	4,2	1,1	0,7	Start
<i>Br. crepitans</i> L.	15,2	11,5	6,1	4,0	1,1	0,6	Start
<i>Br. sclopeta</i> Fabr.	15,2	11,5	6,2	4,0	0,9	0,5	Start
p-Benzochinon + Toluchinon	15,5		6,3				
Farbe	blau	violett	rot	violett	blau	violett	braun

Tabelle 4.

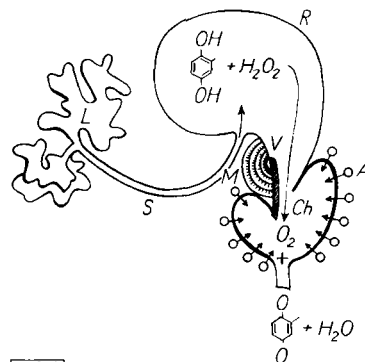
R_f -Werte des Hydrazon-Chromatogramms verschiedener *Brachynus*-Arten

Auch *Pheropsophus catoirei* Dej.¹⁶⁾, ein 17 mm großer Bombardierkäfer aus SW-Afghanistan, verfügt über die beiden Chinone. Der Käfer stand uns nur als Trockenpräparat zur Verfügung¹⁸⁾ und hatte natürlich infolge der Beunruhigung beim Fang den größten Teil seines Pulvers verschossen. Trotzdem waren noch nach Jahren durch Anteigen des Hinterleibes mit einer 2,4-DNP-Lösung Chinone nachweisbar, dagegen nicht mehr die entspr. Hydrochinone.

Bei den lebenden *Brachynus*-Arten fanden wir aber mit Hilfe des „Melkapparates“¹⁴⁾ auch Hydrochinone bei den ausgestoßenen Substanzen. Damit erklären sich alle beschriebenen Eigenschaften der im Schuß enthaltenen Verbindungen als die Eigenschaften der nachweisbaren Chinone und Hydrochinone.

Der Mechanismus des Schusses

Mit den bisherigen Untersuchungsergebnissen läuft ein Bombardierkäferschuß wie folgt ab (vgl. die schematische Darstellung Abb. 10):



[A 95.10]

Abb. 10. Schießmechanismus des Bombardierkäfers (schematisch) L Loben mit Drüsenzellen; S Sammelkanal; A Annexdrüsen; R Reservoir, Pygidialblase; M quergestreifte Muskulatur; V Ventilplatte; Ch Chitinkapsel

¹²⁾ M. C. Dumeril, Mém. Acad. Sci. Inst. Imp. France 31 (1^{re} Partie) 277 [1860].

¹³⁾ H. Schildknecht, Angew. Chem. 69, 62 [1957].

¹⁴⁾ H. Schildknecht, ebenda 71, 524 [1959].

¹⁵⁾ Für die Determination danken wir G. Scherer vom Museum Frey, Tutzing.

¹⁶⁾ G. Ebert hat uns zwei von ihm in der Gegend von Kandahar erbeutete Exemplare liebenswürdigerweise überlassen, Prof. M. Pavan eine große Zahl von *Br. sclopeta* Fabr.

Die Drüsenzellen sezernieren Hydrochinon, Toluhydrochinon und Hydroperoxyd. Dieses Sekretgemisch wird in der Sammelblase, der Pygidialblase, gespeichert, die an ihrem Ende durch eine muskulöse Klappe vom eigentlichen Reaktionsraum, der Chitinkapsel, abgeschlossen ist. Beim Schießen läßt der Käfer durch Öffnen der besagten Klappe das Pygidialdrüsen-Sekret in die Chitin-Kapsel eintreten, wo es in explosionsartiger Reaktion zum Pygidialdrüsen-Exkret umgesetzt wird, das wir bereits bei der Analyse des Schusses kennengelernt haben. Es ist anzunehmen, daß diese Reaktion durch ein enzymhaltiges Sekret der Annexdrüsen ausgelöst wird.

Sehr wahrscheinlich ist hier Katalase zugegen, denn eine stabile Lösung des Blaseninhaltes kann damit reagieren und umgekehrt ist es möglich, mit Hilfe eines Annexdrüsen-Sekretes eine Lösung von 10% Hydrochinon- und Toluhydrochinon in 25-proz. H_2O_2 unter sehr starker Gasentwicklung zu zersetzen. Das entstehende Gas liefert den zum „Schießen“, d.h. zum Ausschleudern und Zerstäuben der Chinone nötigen Druck.

Diskussion

Wie gezeigt wurde ist das Pygidialdrüsen-Sekret eine Lösung von Hydrochinon und Toluhydrochinon, die im Mittel 23% H_2O_2 enthält. Solche Lösungen sind jedoch in vitro in keinem Konzentrationsbereich stabil. Bereits nach kurzer Zeit färben sie sich im Reagensglas intensiv rot, wodurch sich der Beginn der Zersetzung der Hydrochinone anzeigt. Es entstehen viele Zersetzungsprodukte, von denen bisher 12 im Chromatogramm getrennt worden sind¹⁷⁾.

Um so erstaunlicher ist es, daß der Pygidialblasen-Inhalt im Inneren der Blase völlig farblos bleibt. Dies läßt sich beobachten, wenn man ein isoliertes Pygidialdrüsenpaar zusammen mit einem feuchten Wattebausch (Verdunstungsschutz) in einem kleinen Wägegläschen aufhebt. Der Blaseninhalt bleibt viele Stunden wasserklar. Selbst wenn nach ein bis zwei Tagen die Blase beginnt, sich infolge Verwesung schwarz zu färben, ist noch keine Zersetzung ihres Inhalts zu bemerken, der nach vier Tagen immer noch in reaktionsbereitem Zustand ist, wie das heftige Aufbrausen unter Chinon- und O_2 -Bildung beim Berühren der nunmehr stark verwesten Blase beweist.

Dagegen läßt sich im Versuch zeigen, daß die Pygidialblasen-Inhaltsstoffe nur im Inneren der Blase stabil sind und sich in kurzer Zeit zersetzen, wenn man sie aus der Blase entnimmt, etwa durch Punktieren der inaktivierten Blase mit einer feinen Kapillare.

Nach diesen Versuchen ist im biologischen System ein Prinzip wirksam, das eine Lösung von Hydrochinon und Hydroperoxyd stabilisiert. Dieses Prinzip ist entweder chemischer oder physikalisch-chemischer Natur, scheint aber an die Morphologie der Sammelblase des Pygidialdrüsen-systems gebunden zu sein. Eine Stabilisierung durch einen homogen in der Lösung verteilten chemischen Stabilisator ist unwahrscheinlich.

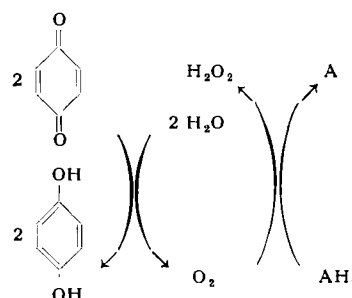
Noch wichtiger als die Frage nach der Art der Stabilisierung ist diejenige nach der Bildungsweise relativ hochkonzentrierter Lösungen von H_2O_2 neben Hydrochinon. Als ein Zellverband, in dem H_2O_2 gebildet wird ohne zugleich wieder zersetzt zu werden, so daß es zu beträchtlichen Ansammlungen dieses Zellgiftes in einem lebenden Organismus kommt, sind die Loben der Pygidial-Drüsen des Bombardierkäfers histologisch und für die Theorie der Zellatmung von außerordentlichem Interesse. Unseres Wissens wurde bei *Metazoen* noch kein in vivo gebildetes Hydro-

peroxyd in Substanz nachgewiesen, obwohl es durch die Wirksamkeit aerober Dehydrasen im Verlauf der Zellatmung in lebenden Zellen entsteht.

An dieser Stelle ist interessant, daß in neuester Zeit von Green¹⁸⁾ gefunden wurde, daß Substanzen vom p-Benzochinon-Typus, sog. Ubichinone¹⁹⁾, als „electron carrier“ in den Citronensäure-Cyclus eingreifen. Im gleichen Jahr führte Warburg²⁰⁾ den Begriff der „Chinon-Atmung“ ein. Es gelang ihm, Benzochinon und Wasser in einer Suspension von *Chlorella* zu Hydrochinon und Sauerstoff umzusetzen. Die nähere Untersuchung zeigte, daß diese „Chinon-Atmung“ nach dem Mechanismus der Hill-Reaktion verläuft, bei der CO_2 als wichtiges Zwischenprodukt eine Rolle spielt. Die Bilanz der Chinon-Atmung wird durch folgende Gleichung wiedergegeben:



Ähnlich könnte in den Drüsenzellen der Loben des Bombardierkäfers Hydrochinon und H_2O_2 in gekoppelter Reaktion entstehen, nach folgendem hypothetischen Schema:



Der erste Schritt wäre demnach eine „Chinon-Atmung“, in die sich reduzierende Substanzen der lebenden Zelle (AH_2) mit den entspr. Dehydrasen und Coenzymen einschalten, so daß im Endeffekt Chinon und Wasser zu Hydrochinon und Wasserstoffperoxyd umgesetzt wird.



Die experimentelle Überprüfung unserer Arbeitshypothese führte noch zu keinem eindeutigen Ergebnis, schon allein wegen der äußerst geringen Menge des Versuchsmaterials. Doch zeigte sich, daß beim Behandeln einer Chinon-Lösung mit den Loben des Käfers Chinon verbraucht wird. Außerdem liefert das Experiment einen Hinweis dafür, daß tatsächlich Hydrochinon gebildet werden könnte²¹⁾.

Die Fragen, die sich im Zusammenhang mit der Chemie der Pygidial-Drüsen bei *Brachynus*-Arten noch stellen lassen, sind mannigfaltig und im Augenblick kaum zu beantworten; so fragt man sich immer wieder: handelt es sich bei dem hochentwickelten, kompliziert gebauten Pygidialdrüsenapparat nur um eine Waffe, oder bedient sich der Bombardierkäfer lediglich einer interessanten und originellen Variante der Exkretion von Stoffwechsel-Endprodukten zu seiner Verteidigung? Daß es sich um eine solche handelt, scheint jedenfalls sicher zu sein. Vor allem Eisner²²⁾ hat durch das Experiment bewiesen, daß der Bombardierkäfer in seinem Explosionsapparat eine sehr wirkungsvolle Waffe gegen räuberische Insekten besitzt. Er brachte u.a. einen *Brachynus* vor den Eingang einer Laboratoriumskolonie der Ameise *Pogonomyrmex badius* (Latr.). Sobald eine der Ameisen in Kontakt mit dem Käfer kam, begann sie mit den Mandibeln seine Gliedmaßen anzugreifen. Der Bombardierkäfer reagierte darauf

¹⁸⁾ D. E. Green, Chem. Engng. News vom 8. Sept. 1958, S. 48.

¹⁹⁾ R. A. Morton, Nature [London] 182, 1764 [1958].

²⁰⁾ O. Warburg u. G. Krippahl, Z. Naturforsch. 13b, 509 [1958].

²¹⁾ H. Schildknecht u. K. Holoubek, unveröffentl.

²²⁾ T. Eisner, J. insect. Physiol. 2, 215 [1958].

mit einer genau auf die Angreiferin gezielten Entladung, worauf diese schnell, und sichtlich in Mitleidenschaft gezogen, die Flucht ergriff. Sie hatte eine Reihe von Anfällen auszustehen, in deren Verlauf sie die Beine von sich streckte und damit sinnlos gegen den Boden trommelte, was ihrem eiligen Fluchtbestreben sehr entgegenwirkte. Im Kontrollversuch wurde ein Bombardierer wehrlos, nachdem durch wiederholtes Reizen sein Sekretvorrat erschöpft

war. Den Ameisen ausgeliefert, hatte er schon nach wenigen Minuten Teile zweier Beine und eine ganze Antenne eingeblüht.

Die Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt, wofür wir auch an dieser Stelle aufrichtig danken. E. Kistner (Nürnberg) danken wir für Unterstützung bei der Durchsicht alter Literatur.

Eingegangen am 30. März 1960 [A 95]

Blitzlicht-Photolyse

Von Prof. Dr. G. PORTER*)

Department of Chemistry, The University, Sheffield (England)

Kurzlebige Reaktionszwischenprodukte lassen sich beobachten, indem man die Reaktion durch einen Photolyseblitz startet und das Absorptionsspektrum der Photolyseprodukte aufnimmt. Die Leistungsfähigkeit dieser Blitzlicht-Photolyse wird am Beispiel der Jod-Rekombination im Gaszustand und der chinon-sensibilisierten Oxydation mit O_2 in Lösung aufgezeigt.

Einleitung

Die große Vielfalt chemischer Umwandlungen basiert auf einer relativ kleinen Anzahl von Methoden, eine Reaktion in Gang zu bringen. Praktisch alle Umsetzungen werden eingeleitet entweder

- a) durch Mischen der Reaktionspartner,
- b) durch Erwärmen, oder
- c) durch die Anwendung von Strahlung oder eines elektrischen Feldes.

Für viele Zwecke, besonders für das Studium schneller Reaktionen, ist es notwendig, die Reaktion innerhalb einer kurzen Zeitspanne zu starten. Dazu muß man einen der oben angeführten Prozesse sehr rasch ablaufen lassen, und das ist gewöhnlich recht schwierig. Schnelles Mischen ist vielfach zur Untersuchung schnell ablaufender Reaktionen angewendet worden; es benötigt aber Zeiten $\geq 10^{-3}$ sec. Rasches Erhitzen ist sogar noch schwieriger und nur unter besonderen Bedingungen möglich, z.B. mit Stoßwellen in Gasen oder durch elektrisches Erhitzen einer leitenden Flüssigkeit, also bei stark ionisierten Lösungen.

Bei der Blitzlicht-Photolyse startet ein kurzer, intensiver Lichtblitz die Reaktion. Neuerdings sind kurzzeitige Stöße anderer Strahlungsarten, insbesondere Elektronen, in ähnlicher Weise verwendet worden, doch bieten sichtbares und UV-Licht eine bequemere Untersuchungsmethode und einen Startvorgang, den wir heute besser verstehen.

Da alle Substanzen sichtbares oder ultraviolettes Licht absorbieren, kann im Prinzip jedes chemische System durch einen Lichtblitz für einen Augenblick in seinem Gleichgewicht gestört werden. Die Methode ist daher allgemein anwendbar und — im Gegensatz zu den meisten Relaxationsmethoden — nicht auf Systeme beschränkt, die sich ganz oder beinahe im Gleichgewicht befinden. In geeigneten Fällen kann ein Blitz von einigen μsec Dauer eine fast vollständige Umwandlung der Reaktionspartner erzielen.

Methodik

Die Apparatur (Abb. 1) besteht im wesentlichen aus einem durchsichtigen Reaktionsgefäß, einer Blitzlampe und einer Vorrichtung zur Untersuchung der schnellen Änderungen, die auf den Blitz folgen. Fast ausnahmslos verwendet man elektronische Blitzlampen von einfacher Konstruktion. Sie bestehen aus einer Quarzröhre mit zwei Me-

tall-Elektroden, die mit einem Edelgas unter einem Druck von einigen cm Hg gefüllt ist. Die Energie wird in einem Kondensator gespeichert, der parallel zur Lampe geschaltet ist, und der Blitz wird mit Hilfe einer Zündelektrode entweder durch Kurzschließen einer Funkenstrecke oder durch

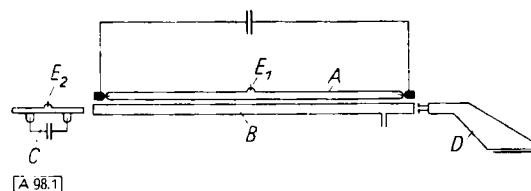


Abb. 1. Apparatur zur Blitzlicht-Photolyse: A = Photoblitzlampe; B = Reaktionsrohr; C = Spektralblitzlampe oder kontinuierliche Lichtquelle; D = Spektralapparat mit photographischer Platte oder Photometer; E_1, E_2 = Hilfselektroden

einen elektronischen Schalter gezündet, wobei die beiden letzteren mit Kondensator und Lampe in Serie geschaltet sind. Die Dauer des Blitzes hängt von der Energie und von der Art des Stromkreises ab¹⁻³⁾.

Die Energie, die im Kondensator gespeichert und in einem Blitz entladen wird, beträgt im allgemeinen zwischen einigen Hundert und einigen Tausend Joule; die Halbwertsdauer des Blitzes liegt gewöhnlich zwischen 1 μsec und 1 msec. Eine gebräuchliche und einfach herzustellende Versuchsanordnung ergibt einen 1000 J-Blitz von 20 μsec Halbwertsdauer.

Obwohl prinzipiell jeder physikalische Parameter verwendet werden kann, um die Reaktion nach dem Blitz zu verfolgen, so ist doch in der Praxis die Absorptionsspektroskopie die weitaus am besten geeignete Methode. Das Absorptionsspektrum kann auf zweierlei Arten sehr rasch aufgenommen werden:

1. Blitzlicht-Spektroskopie

Hierbei wird ein zweiter Elektronenblitz verwendet, der so eingestellt ist, daß er das Absorptionsspektrum in jedem beliebigen Moment nach dem Photolyseblitz aufnehmen kann. Geeignete Blitzlampen ergeben ein kontinuierliches Absorptionsspektrum mit nur wenigen störenden Linien, das den ganzen sichtbaren und ultravioletten Bereich bis zu Wellenlängen unter 2000 Å umfaßt. Ein einziger Blitz von einigen μsec Dauer ist intensiv genug, um diesen ganzen Spektralbereich bei mäßig hoher Auflösung aufzunehmen. Zu kinetischen Untersuchungen wird eine Serie von Spek-

¹⁾ G. Porter, Proc. Roy. Soc. [London], Ser. A 200, 284 [1950].

²⁾ M. I. Christie u. G. Porter, ebenda 212, 390, 398 [1952].

³⁾ G. Porter, Internat. Kolloqu. über schnelle Reaktionen in Lösungen; Z. Elektrochem. 64, 59 [1960].