

Carotenoids from the Haemolymph of the Mopani Moth Caterpillars *Gonimbrasia belina*

Whilst the presence of carotenoids, specially β -carotene in the integument and other organs of insects, is a well-established fact^{1,2}, few reports are available about their presence in the haemolymph of insects³⁻⁵ and none have so far been found on the occurrence of carotenoids in the haemolymph of Saturniid moths. The caterpillars of the Mopani moth *Gonimbrasia belina*, which feed exclusively on the Mopani tree (*Colophospermum mopani*) and are a popular delicacy of the indigenous African population, contain an intensely coloured haemolymph which we have now investigated for its carotenoid content.

Materials. Haemolymph was collected from the caterpillars during the prepupation period at the stage when they stop feeding and leave the trees. During the maximum growth period the sampling of the haemolymph is very difficult, since the midgut is full of undigested plant material and the haemolymph easily gets contaminated with plant pigments. During the prepupation period, the guts are empty and the sampling of haemolymph does not present any problems. The caterpillars were anaesthetized with chloroform and the haemolymph drained through an incision on the abdominal side. One caterpillar yielded an average of 2.5 ml of haemolymph, a total of 60 animals were used.

Experiments and results. The haemolymph was a golden yellow and viscous liquid which coagulated within seconds under the formation of a dark pigment, probably due to the action of tyrosinase⁶. To prevent any possible changes the haemolymph was collected in chloroform-methanol (1:1) and immediately extracted⁷. All operations were carried out under vacuum or nitrogen. The final yield was 1.1 mg of chloroform soluble lipids per ml of haemolymph. Preliminary thin-layer chromatography on silica gel G in benzene-hexane (1:1) showed a fast moving spot of medium intensity (Rf 0.68) and a very strong spot at the start. To facilitate the isolation of the carotenoids, the total lipids were first separated on a silicic acid column into phospholipids and neutral lipids. The latter were sub-fractionated on silica gel G plates using petroleum ether-ether-acetic acid (80:20:1). In this system only the polar carotenoid remained on the start, while the non-polar pigment moved almost with the front of the solvent. The eluted non-polar pigment moved on silica gel G plates in undecane-methylene chloride (8:2) as a single spot (Rf 0.80). The absorption spectrum had λ_{max} (carbon disulphide) 473, 503 nm; (chloroform) 455, 484 nm. This is in good agreement with that of α -carotene λ_{max} (carbon disulphide) 477, 509 nm; (chloroform) 454, 485 nm¹. The IR-spectrum (in carbon tetrachloride and cyclohexane) had the following major peaks: CH stretching 2920, 2840 cm⁻¹, C = C stretching 1650 cm⁻¹, CH deformation 1480 cm⁻¹, CH out-of-plane vibration (*trans*) 970 cm⁻¹, CH out-of-plane vibration (*cis*) 760 cm⁻¹. There were no peaks indicating the presence of any carbon-oxygen bonds.

The purity of the polar substance was examined on silica gel G plates. In methylene chloride-ethyl acetate (8:2) the pigment travelled as a single spot (Rf. 0.30). The strong polar character was emphasized by immobility in undecane-methylene chloride (8:2)⁸. The substance had λ_{max} (chloroform) 440 (inflexion), 454, 482 nm. The IR-spectrum was obtained with melts between potassium bromide plates⁹. A medium strong band at 1730 cm⁻¹ indicated the presence of esters and a strong peak at 3350 cm⁻¹ the presence of another free secondary OH-group (OH-deformation 1045 cm⁻¹). Other major peaks: CH stretching 2890, 2820 cm⁻¹, C = C stretching 1660 cm⁻¹, CH in-plane vibration 1389 cm⁻¹, CH out-of-

plane vibration (*trans*) 975 cm⁻¹, CH out-of-plane vibration (*cis*) 765 cm⁻¹. The substance, obviously an ester, was hydrolysed with 10% methanolic KOH (24 h at room temperature) and the substance purified on a silica gel G plate in petroleum ether-benzene (1:1) λ_{max} (petroleum ether) 268, 330 (*cis*-peak), 425 (inflexion) 440, 470 nm. The IR-spectrum was characterized by the disappearance of the C=O band at 1730 cm⁻¹ and an intensification of the *cis*-peak at 765 cm⁻¹. Other major peaks: OH stretching 3400 cm⁻¹, CH stretching 2920, 2850 cm⁻¹, C=C stretching 1660 cm⁻¹, CH-deformation 1480 cm⁻¹, CH deformations 1390, 1375 cm⁻¹, secondary OH bending 1045, 1035 cm⁻¹, CH out-of-plane vibration (*trans*) 975 cm⁻¹.

Discussion. The absorption maxima of the non-polar carotenoid are in a good agreement with the figures given in the literature for α -carotene¹. The IR-spectrum of the substance confirmed the assumption that the substance was a carotene hydrocarbon but the quantity of the available material was not sufficient for further experiments.

For the non-polar pigment results indicated that it was xanthophyl. Although there were some differences in the absorption maxima for the carbon disulphide solution, the figures for xanthophyl esters and xanthophyl in petroleum ether and chloroform are in good agreement with the figures given in the literature¹⁰⁻¹². The IR-spectra supported the assumption that the substance was a cyclic carotenoid with 2 secondary OH-groups of which one in the original substance was esterified with an unknown acid. It is rather striking that both the original ester and the pure alcohol showed strong peaks for *trans* and *cis* groupings. It has been shown that not all naturally occurring carotenoids are all *trans*-forms¹³. The presence of both *cis* and *trans* peaks in various isomeric forms of asymmetric carotenoids makes the identification far more difficult than in symmetrical ones¹⁴. Owing to the absence of a double peak in the 970 cm⁻¹ region which is characteristic for central *monocis*-forms¹⁵, one could assume that the substance may be neo-xanthophyl B or neo-xanthophyl U. This is also supported by the presence of a peak at 1380 cm⁻¹¹⁴.

The 2 carotenoids described have also been found in the midgut and the skin where they form part of the colour pattern. It is doubtful whether the carotenoids are also present in the fat bodies. If the haemolymph is drained off

¹ P. KARRER and E. JUCKER, *Carotenoids* (Elsevier, New York 1950), p. 82.

² T. W. GOODWIN, *The Comparative Biochemistry of the Carotenoids* (Chapman and Hall, London 1952), p. 214.

³ T. W. GOODWIN and S. SRISUKH, *Biochem. J.* **45**, 263 (1949).

⁴ T. W. GOODWIN and S. SRISUKH, *Biochem. J.* **48**, 199 (1951).

⁵ N. N. KARPUNINA, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **137**, 961 (1961).

⁶ R. DENNELL, *Proc. R. Soc. B* **134**, 79 (1947).

⁷ S. H. W. CMELIK, *J. Insect Physiol.*, in print.

⁸ E. STAHL, H. R. BOLLIGER and L. LEHNERT, *Sympos. über Carotinoide der Dt. Ges. f. Ernährung in Mainz* (October 1961).

⁹ H. H. STRAIN, M. R. THOMAS, H. L. CRESPI and J. J. KATZ, *Biochem. Biophys. Acta* **52**, 517 (1961).

¹⁰ H. H. STRAIN, M. R. THOMAS and J. J. KATZ, *J. org. Chem.* **26**, 5061 (1961).

¹¹ R. KUHN and A. SMAKULA, *Z. physiol. Chem.* **197**, 163 (1931).

¹² K. W. HAUSER and A. SMAKULA, *Z. angew. Chem.* **47**, 663 (1934); **48**, 152 (1935).

¹³ L. ZECHMEISTER, *Experientia* **10**, 1 (1954).

¹⁴ K. LUNDE and L. ZECHMEISTER, *J. Am. chem. Soc.* **77**, 1647 (1955).

¹⁵ S. LIAAEN-JENSEN and A. JENSEN, in *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids* (Pergamon Press, Oxford 1965), p. 150.

completely and the fat bodies dissected as fast as possible, they will not contain any carotenoids. On the other hand if the fat bodies are allowed to stay in contact with some residues of the haemolymph for a few minutes, the carotenoids will immediately be adsorbed by the fat bodies. Findings concerning the presence of carotenoids in fat bodies of insects^{3,16} should therefore be treated with a certain amount of criticism.

Zusammenfassung. Die Hämolymphe der Raupe des Mopanifalters *Gonimbrasia belina* enthält karotinoide Farbstoffe, die durch Extraktion mit Methanol-Chloroform isoliert und durch Säulen- sowie Dünnschicht-

chromatographie gereinigt wurden. Zwei Farbstoffe wurden gewonnen, die α -Carotin und Xanthophylester sein können. Diese Farbstoffe sind auch im Hauptpigment sowie im Darmkanal, nicht aber in den Fettkörpern vorhanden.

S. H. W. CMELIK

Department of Biochemistry,
University College of Rhodesia,
Salisbury (Rhodesia), 6 July 1969.

¹⁶ M. FAWZI, H. OSMAN and G. H. SCHMIDT, *Biochem. Z.* 334, 441 (1961).

Chemische Sensibilisierung der Strahlenschädigung bei Rattenembryonen

Es interessierte uns die Frage, ob embryonale Schädigungen, die mit kleinen Strahlenmengen ausgelöst werden, durch Chemikalien beeinflusst und vielleicht sogar verstärkt werden. Als mutmasslichen Strahlensensibilisator wählten wir Jodazetamid (JAA), das für seine strahlensensibilisierende Wirkung bei Mikroorganismen¹⁻⁵, Säugerzellen⁶⁻⁸ und Säugetieren⁹ bekannt ist. Zudem zeigten Experimente an Mitochondrien¹⁰, dass JAA die strahleninduzierte Hemmung des P/O-Quotienten verstärkt und somit auf den Energiestoffwechsel einwirkt, der für die Erholung von Strahlenschädigungen bedeutsam ist.

Material und Methode. (Näheres siehe MICHEL in Publikation.) Bestrahlt wurden in utero 9tägige Rattenembryonen, die sich in bezug auf Missbildungen in einem sehr sensiblen Stadium befinden. Die Festsetzung des Embryonalalters erfolgte durch die Vaginalpfropfmethode. Für die Bestrahlung verwendeten wir Strahledosen von 12 $\frac{1}{2}$, 25, 50 und 100 R (200 keV, 12 mA, 1 mm Al- + 0,5 mm Cu; 36,5 R/min, Fokusabstand 40,7 cm). Eine Stunde vor Bestrahlung wurde Jodazetamid i.p. (0,925 mg/kg Körpergewicht) injiziert. Am 13. Tag der Tragzeit wurden die Muttertiere getötet und die Feten makroskopisch und mikroskopisch untersucht. Gleichzeitig wurden die Zahl und Lage toter Implantationen ermittelt.

Resultate. Bei den Experimenten mit JAA und Bestrahlung (12 $\frac{1}{2}$ –100 R) traten unter 246 Implantationen total 36 (14,5%) postimplantative Todesfälle auf (Tabelle I).

Nach alleiniger Röntgenbestrahlung waren von 235 Implantationen nur 19 (8,1%) abgestorben. Die Injektion von JAA vor der Bestrahlung führte zu einer signifikanten Erhöhung der strahlenbedingten Letalität ($\chi^2=$

4,111 bei $P < 0,05$). In bezug auf die Lage der abgestorbenen Früchte zeigte sich interessanterweise, dass in Ovarnähe mehr Resorptionen auftraten als in der Mitte oder am Vaginalende des Uterus ($\chi^2 = 6,007$ bei $P < 0,05$).

Bei kleinen Strahledosen liessen sich makroskopisch vor allem Augenanomalien feststellen, die daher als Hauptkriterium für Strahlenschädigung bewertet wurden. Sowohl Mikrophthalmie als auch Anophthalmie wurden beobachtet. Bei Mikrophthalmie liess sich jedoch eine eindeutige Klassifizierung erst durch mikroskopische Messung durchführen.

Neben Augenmissbildungen traten auch vereinzelte Kopfabnormitäten (Höckerbildungen, Mikrozephalie und andere) auf. Es zeigte sich, dass die alleinige Applikation von JAA nur in einem von 73 Feten eine Augenschädigung hervorrief (Tabelle II).

¹ C. J. DEAN und P. ALEXANDER, *Nature* 196, 1324 (1962).

² C. J. DEAN und P. ALEXANDER, *Progr. biochem. Pharmac.* 7, 46 (1965).

³ P. ALEXANDER, J. T. LETT und C. J. DEAN, *Progr. biochem. Pharmac.* 7, 22 (1965).

⁴ D. L. DEWEY und B. D. MICHAEL, *Biochem. biophys. Res. Comm.* 27, 392 (1965).

⁵ D. K. MYERS und T. KARAZIN, *Rad. Res.* 35, 612 (1968).

⁶ M. QUINTILIANI, E. STROM, M. BIANCHI und M. BOCCACCI, *International Atomic Energy Agency Vienna*, 295 (1962).

⁷ M. R. BIANCHI, M. BOCCACCI, M. QUINTILIANI und E. STROM, *Progr. biochem. Pharmacol.* 7, 384 (1965).

⁸ D. K. MYERS und DONNA E. SLADE, *Rad. Res.* 30, 186 (1967).

⁹ H. MOROSON und H. A. SPIELMAN, *Int. J. Radiat. Biol.* 17, 87 (1966).

¹⁰ H. FRITZ-NIGGLI, *Experientia* 22, 666 (1966).

Tabelle I. Wirkungen von Jodazetamid und Röntgenstrahlen beim 9tägigen Embryo

Kriterien	Ko	JAA	12 $\frac{1}{2}$ R	JAA + 12 $\frac{1}{2}$ R	25 R	JAA + 25 R	50 R	JAA + 50 R	100 R	JAA + 100 R
Total Implantationen	103	76	54	54	62	51	60	61	59	80
Implantation/Tier	12,8	12,6	10,8	10,8	12,4	10,2	12,0	12,2	11,8	11,4
Anzahl lebender Feten	98	73	50	52	60	41	54	54	52	63
% lebende Feten	95,1	96,0	92,6	96,3	96,7	80,4	90,0	88,5	88,1	78,8
Postimplantative Resorptionen	5	3	4	2	2	10	6	7	7	17
% postimplantative Resorptionen	4,8	3,8	7,1	3,5	3,1	17,8	10,0	11,1	11,5	20,5
Feten ohne sichtbare Missbildungen	98	72	49	47	55	31	42	29	5	2
%-Werte	100	98,6	98,0	90,3	91,6	75,6	77,7	53,7	9,6	3,2
Anzahl geschädigte Feten	—	1	1	5	5	10	12	25	47	61
% geschädigte Feten	—	1,4	2,0	9,6	8,3	24,4	22,2	46,2	90,4	96,8

Injektion von JAA (0,925 mg/kg Körpergewicht) 1 h vor Bestrahlung. Makroskopische Missbildungen und Resorptionen 13tägiger Feten.