

CHROM. 7337

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE RADIOAKTIV MARKIERTER INSEKTENPHEROMONE

METABOLITEN DES [^3H]BOMBYKOLS

GERHARD KASANG und NORBERT WEISS

Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München (B.R.D.) und Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie, Seewiesen (B.R.D.)

(Eingegangen am 1. Oktober 1973; geänderte Fassung eingegangen am 17. Dezember 1973)

SUMMARY

Thin-layer chromatographic analysis of radioactively labelled insect pheromones. Metabolites of [^3H]bombykol

Highly labelled [^3H]bombykol is extensively metabolized on the antennae of the silkmoth *Bombyx mori* into free fatty acids and fatty acid esters. The metabolites of the acid fraction consist of one long-chain unsaturated fatty acid of the type of 10-*trans*, 12-*cis*-hexadecadienoic acid (ca. 90%) and of one short-chain unidentified fatty acid (ca. 10%). The neutral fraction contains except unchanged [^3H]bombykol at least six long-chain ^3H -labelled fatty acid esters.

EINLEITUNG

Die Sexualpheromone sind von grosser Bedeutung für die Orientierung und Fortpflanzung vieler Insekten^{1,2}. Seit ihrer Anwendung in der biologischen Schädlingsbekämpfung³ steigt ständig das Interesse für diese Naturstoffe, insbesondere für die hochwirksamen und hochspezifischen Sexuallockstoffe^{4,5} der Schmetterlinge. Das Bombykol war das erste Sexualpheromon, dessen chemische Konstitution in mühevoller Arbeit von Butenandt und Mitarbeitern⁶ aufgeklärt werden konnte.

Der Seidenspinner *Bombyx mori* und das nach ihm benannte Pheromon Bombykol standen seit Jahren auch im Mittelpunkt unserer Forschungen⁷. Durch die Synthese^{8,9} des [12,13- $^3\text{H}_2$]Hexadecadien-(10-*trans*,12-*cis*)-ols-(1) ([^3H]Bombykol) wurde es zum ersten Male möglich, unter physiologischen Bedingungen Adsorptions-, Penetrations- und Stoffwechselprozesse eines Sexualpheromons auf dem Sinnesorgan (Antenne) eines Insekts zu studieren^{7,9-12}. Während des Eindringens in die Antenne wird das Pheromon chemisch umgewandelt. Die Dünnschichtchromatographie (DC) erwies sich als besonders geeignet, um die sehr kleinen Mengen (bis 10^{-12} g) des applizierten Pheromons und der dabei gebildeten Metaboliten chromatographisch zu trennen und nachzuweisen. Bewährt hat sich diese Analysenmethode auch dann,

wenn nach der Extraktion aus dem biologischen Material die radioaktiv markierten Pheromone und Metaboliten von grossen Mengen radioinaktiver Insektenlipide begleitet wurden.

Im folgenden wird beschrieben, wie sich die lipidartigen, radioaktiven Metaboliten mit Hilfe der ein- und zweidimensionalen DC in Klassen auftrennen und diese durch Verteilungs- und Argentationschromatographie noch weiter in Gruppen und einzelne Komponenten aufspalten lassen. Die Identifizierung einiger Komponenten erfolgte durch Vergleich mit definierten Substanzen.

EXPERIMENTELLES

Biologisches Material

Bei den Versuchstieren handelte es sich ausschliesslich um männliche und weibliche Seidenspinner (*Bombyx mori* L.). Die Seidenspinner wurden als Puppen von Gunze (Japan) und der Sunrise Taiwan Enterprise Corporation (Formosa) bezogen. Die geschlüpften Seidenspinner sind stets einzeln und nach Geschlechtern getrennt aufbewahrt worden. Für die Stoffwechselversuche wurden vorwiegend die Antennen der männlichen Tiere verwendet, für Vergleichstests und Kontrollexperimente benutzten wir weibliche Tiere.

Radioaktives Material

Die radioaktiven Substanzen bestanden aus [^3H]Bombykol und/oder seinen ^3H -markierten Metaboliten. Das [^3H]Bombykol wurde in zwei Ansätzen durch katalytische Tritiierung⁸ des Hexadecen-(10-*trans*)-in-(12)-ol-(1) erhalten. Im ersten Ansatz betrug die spezifische Aktivität 31.7 mCi/mg, nach Verbesserung der Tritiierungstechnik konnte sie auf 125.6 mCi/mg gesteigert werden¹³. [^3H]Bombykol mit dieser spezifischen Aktivität enthält pro Molekül ungefähr ein Tritiumatom. Die Nachweisgrenze für dieses markierte Pheromon liegt bei 10^8 Molekülen (Flüssig-Szintillationsspektrometrie).

Test- und Vergleichssubstanzen

Die radioinaktiven Substanzen bestanden aus etwa 100 verschiedenen langkettigen, lipidartigen Verbindungen, die z.T. in unserem Labor synthetisiert und z.T. von C. Roth (Karlsruhe, B.R.D.), Merck (Darmstadt, B.R.D.), Schuchardt (München, B.R.D.), Fluka (Buchs, Schweiz), und Serva (Heidelberg, B.R.D.) bezogen wurden.

Einige ungesättigte Fettsäuren, die von den genannten Firmen käuflich erworben wurden, sind von uns durch Hydrierung mit LiAlH_4 in entsprechende Fettalkohole überführt worden. In den Tabellen II bis VI sind die Substanzen der genannten Hersteller mit charakteristischen Symbolen gekennzeichnet.

Lösungs- und Fliessmittel

Als Lösungsmittel für die genannten Substanzen verwendeten wir vorwiegend Kohlenwasserstoffe, z.B. *n*-Pentan, *n*-Hexan, *n*-Heptan, Petroläther (Kp. 60–80°), Cyclohexan und Toluol. Es handelte sich immer um sehr reine Lösungsmittel (Merck). In Kohlenwasserstoffen schwer lösliche Test- oder Vergleichssubstanzen wurden in Äthanol oder Methanol gelöst.

Bei der fraktionierten Extraktion der ^3H -markierten Metaboliten gelangten als Lösungsmittel hauptsächlich *n*-Kohlenwasserstoffe und ein Gemisch aus Chloroform und Methanol (2:1) zur Anwendung. Ebenso wie die in den Fliessmitteln (Tabelle I) benutzten Lösungsmittel waren alle entweder p.a. oder Uvasole (Merck). Lediglich einige halogenhaltige organische Lösungsmittel enthielten zur Stabilisierung 0.5–1 % Äthanol.

TABELLE I
FLIESSMITTEL

Nr.	Lösungsmittel	Volumenverhältnis
1	Toluol	
2	<i>n</i> -Hexan-Diäthyläther	80:20
3	<i>n</i> -Hexan-Diäthyläther	70:30
4	<i>n</i> -Hexan-Diäthyläther	50:50
5	<i>n</i> -Hexan-Diisopropyläther	98:2
6	<i>n</i> -Hexan-Essigsäureäthylester-Eisessig	95:5:0.5
7	<i>n</i> -Hexan-Diisopropyläther-Methanol-NH ₃ 12.5%ig	100:20:10:0.15
8	<i>n</i> -Hexan-Diäthyläther-Methanol-NH ₃ konz.	100:20:10:0.15
9	<i>n</i> -Hexan-Diisopropyläther-Methyläthylketon	40:40:20
10	Petroläther-Diisopropyläther	90:10
11	Diisobutylketon	
12	Methyläthylketon	
13	Methyläthylketon- <i>n</i> -Hexan	60:40
14	Diisopropyläther	
15	Diisopropyläther-Methanol	100:1
16	1,2-Dichloräthan	
17	1,2-Dichloräthan-Methanol	100:2
18	Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff-Äthanol	50:50:1
19	<i>n</i> -Butanol mit 12.5%igem NH ₃ gesättigt	
20	Acetonitril-Wasser-Eisessig	70:25:10
21	Eisessig-Wasser	100:0.5
22	Eisessig-Wasser	90:10
23	Eisessig-Wasser	85:15
24	Eisessig-Wasser	75:25
25	Eisessig-Wasser	60:20
26	Eisessig-Ameisensäure-Wasser	40:40:20
27	Eisessig-Acetonitril-Wasser	40:30:30
28	Dioxan-Wasser-Ameisensäure	70:30:5
29	Tetrahydrofuran-Wasser-Ameisensäure	60:35:5
30	Methanol-Wasser-Ameisensäure	60:35:5
31	Äthylenglykolmonoäthyläther-Wasser-Ameisensäure	70:35:5

Aufbewahrung der Substanzen

Hochgereinigtes [^3H]Bombykol konnte stark verdünnt (10 ppm), luft- und lichtgeschützt monatelang bei -20° in unpolaren Lösungsmitteln wie z.B. *n*-Heptan unzersetzt aufbewahrt werden⁸. Als sehr zweckmässig erwies sich eine Sättigung der Lösungsmittel mit Stickstoff kurz vor ihrer Verwendung. Das gilt auch für das Lösen und Aufbewahren von ^3H -markierten Metaboliten und Test- bzw. Vergleichssubstanzen in reinen Lösungsmitteln.

Reinheitsprüfung der Ausgangs- und Vergleichssubstanzen

Die Reinheitskontrolle der flüssigen Test- und Vergleichssubstanzen liess sich verhältnismässig schnell mit chromatographischen und refraktometrischen Methoden durchführen. Vor jedem biologischen Test wurde auch das radioaktive Material, [^3H]Bombykol, UV-photometrisch (DK-2; Beckman, Fullerton, Calif., U.S.A.) auf Reinheit geprüft. Die Reinheitskontrolle erfolgte gaschromatographisch mit einem Varian Aerograph 1200 (FID) (Varian, Palo Alto, Calif., U.S.A.) und radiogaschromatographisch mit demselben Gerät in Kombination mit einem Perkin-Elmer-Durchflussreaktor (RGC 170) (Perkin-Elmer, Überlingen/See, B.R.D.) und einem Methan-gas-Proportional-Zählrohr (Berthold/Frieseke, Karlsruhe, B.R.D.)⁸. Dünnschicht-chromatographisch prüften wir die Substanzen bei mehr als 10^4 dpm mit einem voll-automatisch registrierenden Dünnschichtscanner LB 2721 (Berthold/Frieseke) direkt auf der Platte. Zur Registrierung geringerer ^3H -Aktivität auf Dünnschichten wurde von uns ein halbautomatisch arbeitender Scraper^{14,15} entwickelt, mit dem in kurzer Zeit von einem Dünnschichtchromatogramm (Fig. 1) bis zu 60 Fraktionen abge-schabt und deren ^3H -Aktivitäten mit einem Flüssig-Szintillationsspektrometer Tri-Carb 3380 (Packard, Downers Grove, Ill., U.S.A.) exakt bestimmt werden konnten (Fig. 2). Zur quantitativen Erfassung der radioaktiven Metaboliten benutzten wir aus-schliesslich diese Technik.

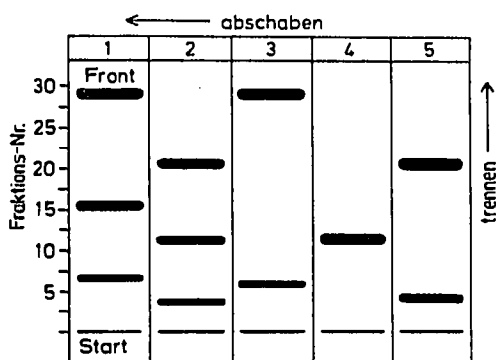


Fig. 1. Schematische Darstellung des Trenn- und Abschabvorganges. Nach chromatographischer Trennung werden die Bahnen 1–5 nacheinander zu je 30 Fraktionen mit einem Dünnschichtscraper (Desaga) abgeschabt. Klingenbreite: 5 mm. Plattenformat: 200 × 200 mm.

Nachweis mit Sprühreagenzien

Nach der chromatographischen Trennung wurden die radioinaktiven Test- bzw. Vergleichssubstanzen mit Sprühreagenzien sichtbar gemacht¹⁶. Geeignet waren für alle Lipide: H_2SO_4 (95–97%ig bzw. 50%ig; Merck) oder Chromschwefelsäure. Zum Anfärben ungesättigter Lipide bedienten wir uns auch einer 5%igen alkoholischen Phosphormolybdänsäurelösung (Merck). Für rein analytische Zwecke wurden die getrennten Substanzen auf den getrockneten Trennschichten mit den genannten Reagenzien gleichmässig besprüht und danach 10–20 min in einem Ofen gleichmässig auf 110–150° erwärmt. Bei präparativen Arbeiten, z.B. der Weiterverarbeitung einmal getrennter Substanzen (^3H -Metaboliten) wurden die zum Vergleich auf derselben Platte chromatographierten radioinaktiven Substanzen bei Raumtemperatur mit

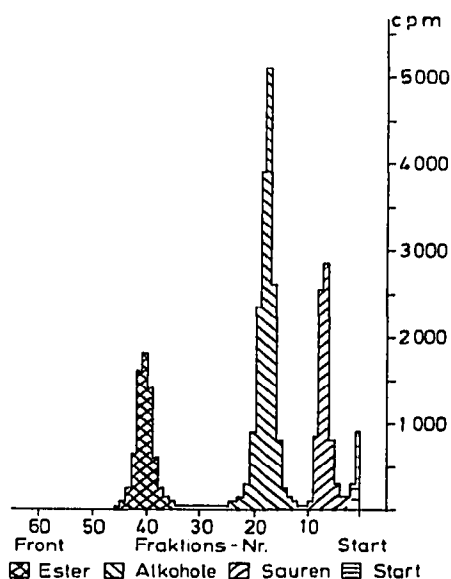


Fig. 2. Radiochromatogramm eines ^3H -markierten Metabolitengemisches von $[\text{}^3\text{H}]$ Bombykol. Fließmittel: *n*-Hexan–Diisopropyläther–Methanol mit konz. NH_3 gesättigt (100:20:15). Scraping: Dünnschichtscraper (Desaga). Klingenbreite: 2.5 mm. Registrierung der ^3H -Aktivität: Flüssig-Scintillationsspektrometer Tri-Carb 3380 (Packard). Trennschicht: Kieselgel H (Merck), 250 μm dick.

einer 5–10%igen Lösung von Jod in Tetrachlorkohlenstoff angesprüht und nach Verdampfen des Lösungsmittels mit einer 1%igen Stärkelösung sichtbar gemacht. Für den Nachweis ungesättigter Verbindungen genügte in vielen Fällen das Bedampfen mit Jod.

Herstellung der Trennschichten

Das Material der Dünnschichten bestand entweder aus Kieselgel G oder H (Merck), mit oder ohne Fluoreszenzzusatz. Während für analytische Zwecke vorwiegend Fertigplatten (Merck) mit einer Schichtdicke von 250 μm verwendet wurden, stellten wir für die präparative, die Verteilungschromatographie mit umgekehrten Phasen (reversed-phase partition) und für die Argentationschromatographie die Trennschichten mit einem versilberten Auftraggerät (Desaga, Heidelberg, B.R.D.) selber her¹⁷. In einzelnen Fällen, speziell bei der Verteilungschromatographie gelangten auch Kieselgur G (Merck), Kieselgur N (Macherey, Nagel und Co., Düren, B.R.D.) und Kieselgel silanisiert (Merck) zur Anwendung. Die Imprägnierung mit den Siliconölen AK 10–100 (Wacker, München, B.R.D.) erfolgte aufsteigend wie beim Chromatographieren oder durch Eintauchen der Dünnschichtplatten in eine 7%ige Lösung von Siliconöl in Petroläther¹⁸. Die silberhaltigen Schichten wurden mit einer Kieselgelsuspension hergestellt, die auf die trockne Kieselgelmenge berechnet 5–10 % AgNO_3 (Merck) enthielt¹⁹.

Probenauftrag auf Trennschichten

Da erfahrungsgemäss in Form dünner Striche aufgetragene Substanzlösungen bessere Trennergebnisse²⁰ liefern, benutzten wir vorwiegend die eindimensionale

Technik. Um möglichst gleichmässige und sehr dünne Striche auftragen zu können, entwickelten wir für radioaktive und radioinaktive Substanzlösungen ein vollautomatisch arbeitendes Probenauftragegerät²¹. Dieses Gerät ist sowohl für die Applikation kleiner und relativ grosser Volumina ($10\ \mu\text{l}$ –4 ml) als auch für schwer flüchtige Lösungsmittel geeignet.

Der Probenauftrag erfolgte im allgemeinen mit oder ohne Schablone (Desaga) 1–2 cm oberhalb einer Kante oder Ecke der Dünnschichtplatte, ohne die Trennschicht zu verletzen. Bei der eindimensionalen Technik wurden je nach Format der Dünnschichtplatte ($200 \times 200\text{ mm}$, $100 \times 200\text{ mm}$, $50 \times 200\text{ mm}$) mehr oder weniger viele Substanzproben in Form 1 bis 2 cm langer Striche (Fig. 1) aufgetragen. Um unerwünschte Randeefekte auszuschalten, applizierten wir die Substanzlösungen mit einem Abstand von mindestens 0.5 cm zum Rand auf die Dünnschichtplatte. Bei der zweidimensionalen Technik wurde stets das zu analysierende Substanzgemisch punktförmig 1–2 cm von den Rändern der Dünnschicht entfernt in einer Ecke einer quadratischen Dünnschichtplatte aufgetragen (Fig. 3). Die Applikation der Vergleichssubstanzen (10 – $100\ \mu\text{g}$) erfolgte ebenfalls punktförmig auf derselben Platte in den beiden anderen sich diagonal gegenüberliegenden Ecken (Fig. 3–8).

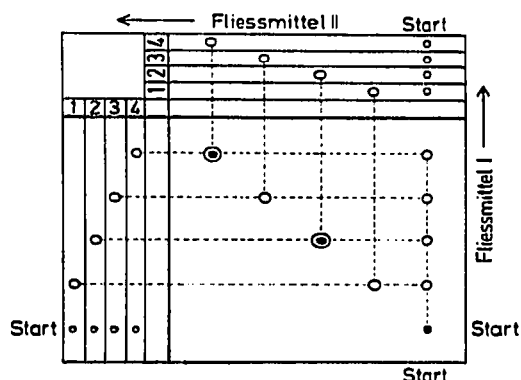


Fig. 3. Zweidimensionales Radiochromatogramm eines punktförmig aufgetragenen Substanzgemisches (schematisiert). Identifizierung eines aus zwei radioaktiven Verbindungen bestehenden Substanzgemisches (●) mit vier radioinaktiven Vergleichssubstanzen (○). Format der Dünnschichtplatte: $200 \times 200\text{ mm}$. Registrierung der Radioaktivität mit einem Dünnschichtscanner oder Dünnschichtscrapper + Flüssig-Szintillationsspektrometer nach dem zweiten Chromatographievorgang.

Dünnschichtchromatographische Trennungs- und Identifizierungsmethoden

Vor Beginn des Chromatographierens wurde Sorge getragen, dass in den Trennkammern (Desaga) Kammersättigung herrschte²². Diesen Sättigungszustand erreichte man im allgemeinen schnell durch Einbringen eines mit dem Fließmittel getränkten Filtrierpapiers. Sowohl bei der eindimensionalen als auch bei der zweidimensionalen Chromatographie wurde immer aufsteigend chromatographiert. Bei der Chromatographie luftempfindlicher Substanzen wurde in der Trennkammer mittels einer Begasungsapparatur (Desaga) eine Stickstoffatmosphäre geschaffen, bei der Chromatographie lichtempfindlicher Substanzen ist die Trennkammer mit einer reflektierenden Metallfolie überzogen worden.

Eindimensionale Chromatographie. In der Regel betrug die Laufstrecke 15 cm. Meistens chromatographierten wir mit einem einzigen Fließmittel, in speziellen

Fällen bewährte sich auch eine Mehrfachchromatographie oder eine unterbrochene Chromatographie²³ mit zwei oder drei verschiedenen Fliessmitteln.

Bei der Verteilungschromatographie²⁴ wurden den Fliessmitteln dieselben Imprägnierungsmittel, die man bei der Imprägnierung der Trennschichten verwendete, in geringer Konzentration zugesetzt.

Zum Nachweis der radioinaktiven Test- oder Vergleichssubstanzen wurden, wie oben beschrieben, die Chromatogramme vorwiegend mit spezifischen oder unspezifischen Reagenzien angesprüht und durch Erhitzen sichtbar gemacht. Bei der Verwendung fluoreszenzhaltiger Materialien in den Dünnschichten gelang es in vielen Fällen, insbesondere bei mehrfach ungesättigten Substanzen, letztere durch Fluoreszenzlösung nachzuweisen.

Zum Nachweis der radioaktiven Substanzen auf den Dünnschichtplatten bedienten wir uns der β -Strahlung. Mit Hilfe der bereits erwähnten "Scanning-Technik" konnten die strahlenden Substanzen auf den Dünnschichtplatten lokalisiert werden. Zum Nachweis geringer Radioaktivität und zur quantitativen Bestimmung der strahlenden Substanzen wurden diese wie beschrieben mit dem Dünnschichtscraper^{14,15} abgeschabt (Fig. 1) und in einem Flüssig-Szintillationsspektrometer gemessen (Fig. 2). Die bei der Verteilungs- und Argentationschromatographie²⁵ verwendeten Imprägnierungsmittel störten die Szintillationsspektrometrie nicht.

Zweidimensionale Chromatographie. Die Identifizierung radioaktiver Substanzen war auch mit Vergleichssubstanzen auf zweidimensionalen Chromatogrammen möglich (Fig. 4–6). Die Lokalisierung der Radioaktivität erfolgte routinemässig bisher mit einem zweidimensional arbeitenden Dünnschichtscanner (Berthold/Frieske). Es wurde auch die "Scanning-Szintillationstechnik" angewendet; sie ist jedoch noch nicht routinemässig zum Einsatz gekommen (Fig. 7–8).

Präparative Chromatographie

Die dünnschichtchromatographische Reinigung der Ausgangsprodukte — [³H]-Bombykol — erfolgte überwiegend durch Verteilungschromatographie⁸. Mittels geeigneter Fliessmittel (z.B. *n*-Butanol mit NH₃ gesättigt) gelang es, die aus den Antennen nach Inkubation mit [³H]Bombykol gewonnenen ³H-markierten Metaboliten quantitativ in saure (freie Fettsäuren) und neutrale (Fettsäureester + Fettalkohole) Bestandteile aufzutrennen und präparativ zu isolieren. Die neutralen Bestandteile konnten mit anderen Fliessmitteln (z.B. *n*-Hexan–Diisopropyläther–Methanol–12.5%iges NH₃ (100:20:10:0.15)) getrennt werden. Zur Gruppentrennung oder weiteren Subfraktionierung wurden die vorgetrennten ³H-markierten Metaboliten zusammen mit dem Trägermaterial in pulverisierter Form mittels eines Dünnschichtscrapers (Desaga) abgeschabt, getrennt in Glasfläschchen aufgefangen und mit geeigneten Lösungsmitteln — Chloroform–Äthanol (99:1) oder Chloroform–Methanol (2:1) — aus dem Trägermaterial eluiert. Die auf diesem Wege erhaltenen ³H-markierten Metaboliten wurden durch Verteilungs- und Argentationschromatographie weiter aufgetrennt und identifiziert.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Nach der Applikation des [³H]Bombykols auf 500 ♂ Antennen des Seidenspinners *Bombyx mori* (10¹¹ Moleküle pro Antenne in strömender Luft), wurde 30 min

TABELLE II

KLASSENTRENNUNG DURCH DÜNNSCICHT- UND VERTEILUNGSCROMATOGRAPHIE AUF KIESELGEL H UND KIESELGUR

Vergleichssubstanz	$R_F \times 100$														Verteilungs- chroma- tographie§§§	
	Dünnschichtchromatographie															
	5*	6	16	17	8	7	9	14	13	11	12	19	24	22		
<i>n</i> -Hexadecan**	55	86		85												
<i>n</i> -Octadecan**	53	87		85												
Squalen***	58	82		80										0		
Squalan***	54	86	61	80				77		100	81					
Caprylsäuretriglycerid***		32		80				80								
Stearinsäuretriglycerid***		36	43	85				83						0		
Ölsäuretriglycerid***					85	78	60		77							
<i>n</i> -Pentadecansäureäthylester***	15	63	51	78				69		94	76			0		
Palmitinsäuremethylester§	16	60	48					68								
Linolsäuremethylester***	17				80	67	57		70							
Ölsäuredecylester***					88	72	58		70							
<i>n</i> -Tridecanal§		55	49	73		52	52	50	70							
Isolaurylalkohol§					53	40										
Cetylalkohol***				40	44	41	24		62			82		6		
Bombykol§§	0	8	27	40	36	34	24	37	60	50	62	78	21	83		
Pentadecadien (8c,10c)diol (1,12)§§								16		36	62		41	96		
Heptadecadien(8c,10c)diol (1,13)§§			6		10	8	9	18	53	22	68	81	41			
Nonamethylenglykol§										0	47	75	70	98		
Undecantriol(1,10,11)§§			2					4		0		85	62			
Palmitinsäure***			8					27			54	44				
Palmitoleinsäure***								33		40	46	44		70		
<i>n</i> -Heptadecadien(10c,12c) säure§§	0		4	30		10	24	18	42	26	46	48	18	74		
Stearinsäure***				27								44	13			
Vaccensäure***				30										67		
Linolsäure***					0	10	30		50					70		
2-Hydroxypalmitinsäure§			2	0				4		0	2	42	20			
Aleuritinsäure§			2	0				4				38	79			
<i>n</i> -Hexadecylamin***			2	0				2				68		95		
³ H-markierter Metabolit A	0	5	6	27	0	6	20	17	45	26	46	50	20	74		
³ H-markierter Metabolit B	0	5	28	50	32	31	24	32	62	50	62	80	20	80		
³ H-markierter Metabolit C	25	70	56	73	73	66	60	65	70	96	70	80	0	10		
³ H-markierter Metabolit D	—	44	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		

* Fließmittel-Nr. der Tabelle I.

** Merck.

*** Roth.

§ Fluka.

§§ Kasang *et al.* 8, 13, 29, 30.

§§§ Imprägnierung mit Siliconöl AK 10–100. Fließmittel Nr. 22 mit Kieselgur, Fließmittel Nr. 24 mit Kieselgel H.

inkubiert und danach innerhalb von 15 min mit einem Lösungsmittelgemisch, bestehend aus Chloroform und Methanol (2:1), eluiert. Mittels einer einfachen DC konnten sofort zwei radioaktive ^3H -markierte Metaboliten nachgewiesen werden (Fig. 2).

Klassentrennung der ^3H -markierten Metaboliten

Eindimensionale DC. Die Ergebnisse der eindimensionalen DC mit 14 verschiedenen Fliessmitteln und 28 Vergleichssubstanzen veranschaulicht die Tabelle II. Bei der Adsorptions-DC wandern entsprechend der Elutionswirkung der Fliessmittel (eluotrope Reihe) die unpolaren Substanzen (Kohlenwasserstoffe) in der Nähe der Front, die stark polaren Verbindungen (Diole, Triole, Hydroxysäuren, Amine etc.) verbleiben am Start. Die Vielzahl aller anderen Verbindungen liegt zwischen diesen beiden Extremen.

Ein Vergleich der R_F -Werte der Radioaktivitätspeaks mit den Flecken der Vergleichssubstanzen zeigt, dass es sich bei den eluierten radioaktiven Metaboliten nicht um langkettige Kohlenwasserstoffe, Triglyceride, Amine oder andere sehr polare Lipide handeln kann. Einige Ergebnisse sprechen auch gegen die Anwesenheit radioaktiver Diole, mit Sicherheit kann man auf Grund dieser Daten nur die Triole und Polyhydroxyverbindungen ausschliessen. Da sich langkettige Fettaldehyde dünn-schichtchromatographisch z.T. wie Fettsäureester verhalten, war eine Zuordnung zunächst schwierig. Mit den Fliessmitteln Nr. 6, 7, 9, 14 und 16 gelang dann eine Trennung der Aldehyde von den Estern. Nach diesen Ergebnissen (Tabelle II) ist es wahrscheinlich, dass in den Gemischen der ^3H -markierten Metaboliten keine radioaktiven Aldehyde vorkamen. Bis auf eine Ausnahme, nämlich bei der Anwendung des Fliessmittels Nr. 6, wurden durch eindimensionale Chromatographie alle Substanzgruppen in Fettsäuren, Fettalkohole und Fettsäureester aufgetrennt (Fig. 2). Durch Chromatographie der Metaboliten mit dem Fliessmittel Nr. 6 war es möglich, den Esterpeak in zwei weitere Peaks aufzuspalten.

Zweidimensionale DC. Interessant sind die zweidimensionalen Chromatogramme, insbesondere für die Abtrennung und den Nachweis der Diole. Die Anwendung der Fliessmittel Nr. 15 und 19 bestätigt das bisher beobachtete ^3H -Verteilungsmuster (Fig. 4). Die mit den Fliessmitteln Nr. 16 und 19 sowie 11 und 19 erhaltenen Chromatogramme (Fig. 5 und 6) beweisen ebenfalls die Abwesenheit radioaktiver Kohlenwasserstoffe, Hydroxysäuren sowie anderer polarer Lipide. Mit dieser zweidimensionalen Methode erzielte man eine Trennung einwertiger von zwei- oder mehrwertigen Alkoholen. Die ^3H -Aktivitätsflecken decken sich mit einigen Fettsäureflecken, ganz besonders mit denen doppelt ungesättigter Fettsäuren sowie einiger Fettsäureester und Fettalkohole.

Gruppentrennung der ^3H -markierten Metaboliten

Zur weiteren Auftrennung der Substanzen in Gruppen wurden die ^3H -markierten Metaboliten zunächst präparativ nach Klassen aufgetrennt und isoliert.

Alkohole. Die Trennung in gesättigte und ungesättigte Fettalkohole verlief mit der Verteilungschromatographie besser als mit der Argentationschromatographie (Tabelle III). Bereits die ein- und zweidimensionalen Chromatogramme (Tabelle II und Fig. 4–6) ergaben, dass die Fettalkoholfraktion nur aus einer einzigen Komponente, einem ungesättigten Fettalkohol, besteht. Die Chromatographie mit den im-

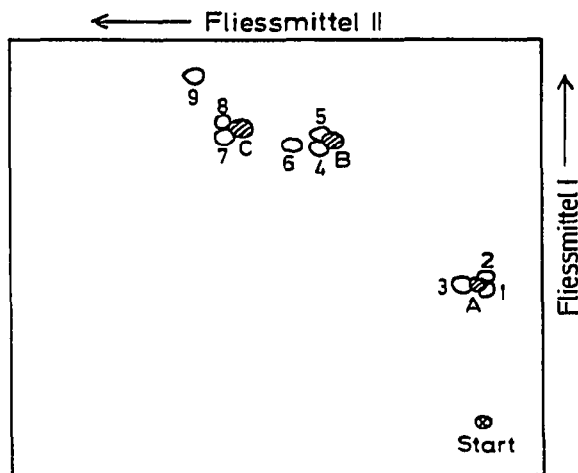


Fig. 4. Zweidimensionales Radiochromatogramm eines ^3H -markierten Metabolitengemisches von $[\text{}^3\text{H}]$ Bombykol. Trennschicht: Kieselgel H (Merck), 250 μm dick. Fließmittel: (I) *n*-Butanol mit 12.5-%igem NH_3 gesättigt; (II) Diisopropyläther-Methanol (100:1). Registrierung der ^3H -Aktivität (A, B, C): Dünnschichtscanner LB 2721 (Berthold/Frieseke). Vergleichssubstanzen (Hersteller, siehe Tabellen II–VI): (1) 2-Hydroxypalmitinsäure; (2) *n*-Heptadecadien-(10-*cis*,12-*cis*)-säure; (3) Palmitoleinsäure; (4) Pentadecadien-(8-*cis*,10-*cis*)-diol-(1,12); (5) Bombykol; (6) Cetylalkohol; (7) Palmitinsäuremethylester; (8) *n*-Pentadecansäureäthylester; (9) Squalan.

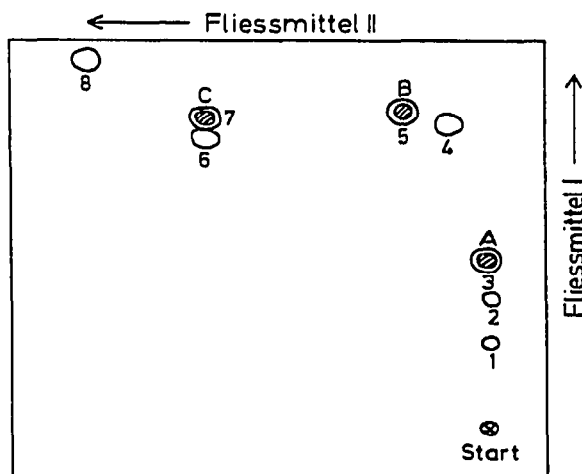


Fig. 5. Zweidimensionales Radiochromatogramm eines ^3H -markierten Metabolitengemisches von $[\text{}^3\text{H}]$ Bombykol. Trennschicht: Kieselgel H (Merck), 250 μm dick. Fließmittel: (I) *n*-Butanol-konz. NH_3 (98:2); (II) 1,2-Dichloräthan. Registrierung der ^3H -Aktivität (A, B, C): Dünnschichtscanner LB 2721 (Berthold/Frieseke). Vergleichssubstanzen (Hersteller, siehe Tabellen II–VI): (1) 2-Hydroxypalmitinsäure; (2) Palmitoleinsäure; (3) *n*-Heptadecadien-(10-*cis*,12-*cis*)-säure; (4) Heptadecadien-(8-*cis*,10-*cis*)-diol-(1,13); (5) Bombykol; (6) Palmitoleinsäuremethylester; (7) *n*-Pentadecansäureäthylester; (8) Squalan.

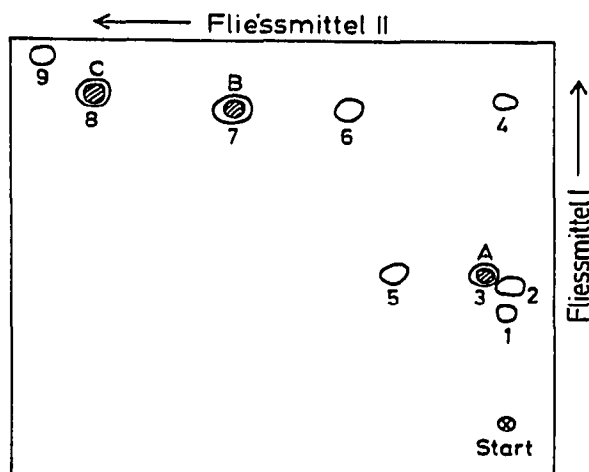


Fig. 6. Zweidimensionales Radiochromatogramm eines ^3H -markierten Metabolitengemisches von [^3H]Bombykol. Trennschicht: Kieselgel H (Merck), 250 μm dick. Fließmittel: (I) *n*-Butanol mit 12.5 %igem NH_3 gesättigt; (II) Diisobutylketon. Registrierung der ^3H -Aktivität (A, B, C): Dünnschichtscanner LB 2721 (Berthold/Frieske). Vergleichssubstanzen (Hersteller, siehe Tabellen II–VI): (1) 2-Hydroxypalmitinsäure; (2) Hexadecylamin; (3) *n*-Heptadecadien-(10-*cis*,12-*cis*)-säure; (4) Nonamethylenglykol; (5) Palmitoleinsäure; (6) Pentadecadien-(8-*cis*,10-*cis*)-diol-(1,12); (7) Bombykol; (8) *n*-Pentadecansäuremethylester; (9) Squalan.

TABELLE III

TRENNUNG VON FETTALKOHOLEN DURCH VERTEILUNGS- UND ARGENTATIONS-CHROMATOGRAPHIE AUF KIESELGUR H UND G

Vergleichssubstanz	$R_F \times 100$				
	Verteilungschromatographie			Argentationschromatographie	
	23*	24	20	4	18
<i>n</i> -Decanol**	38		44		
Geraniol**	43		74		
<i>n</i> -Undecanol**	31	33		43	
<i>n</i> -Undecen(10)ol**		47	37	33	
Laurylalkohol**	24		38		
Myristylalkohol**	19		32		
Farnesol***	31		41		
12,13-Dihydrobombykol‡		13			25
12,13-Dehydrobombykol‡	27		44		
Bombykol‡	25	21	38	40	5
Cetylalkohol**	3	6		47	40
Linolenylalkohol***		17		13	
Stearylalkohol**	1		1		43
<i>n</i> -Eicosanol***		0		47	
^3H -markierter Metabolit B	26	20	37	40	5

* Fließmittel-Nr. der Tabelle I.

** Fluka.

*** Roth.

‡ Kasang *et al.* ^{8,9}.

prägnierten Trennschichten bestätigte diese Befunde und zeigte überdies, dass die ^3H -Aktivitätspeaks mit den Banden des radioinaktiven Bombykols gut übereinstimmen. Die Wahrscheinlichkeit ist sehr gross, dass der von den Antennen wiedergewonnene Alkohol nur aus Bombykol oder seinen Stereoisomeren besteht.

Säuren. Mittels Verteilungs-DC liessen sich schon anfangs (Tabelle IVa) in der

TABELLE IVA

TRENNUNG DER FETTSÄUREN DURCH VERTEILUNGSSCHROMATOGRAPHIE AUF SILICONISIERTEM KIESELGEL H

Fliessmittel: Eisessig-Wasser (85:15).

Vergleichssubstanz, gesättigt	$R_F \times 100$	Vergleichssubstanz, ungesättigt	$R_F \times 100$
Caprylsäure*	78	<i>n</i> -Hepten(2)säure**	80
Pelargonsäure*	74	<i>n</i> -Octen(2)säure**	84
Caprinsäure*	63	<i>n</i> -Undecen(10)säure***	76
<i>n</i> -Undecansäure*	57	<i>n</i> -Dodecen(2)säure‡	67
Laurinsäure**	52	Myristoleinsäure**	63
<i>n</i> -Tridecansäure**	46	Palmitoleinsäure**	46
Myristinsäure**	38	Palmitelaidinsäure‡‡	46
<i>n</i> -Pentadecansäure**	30	Ölsäure**	33
Palmitinsäure**	28	Elaidinsäure**	31
<i>n</i> -Heptadecansäure**	24	Petroselinsäure**	30
Stearinsäure**	20	Vaccensäure**	28
<i>n</i> -Nonadecansäure**	16	Erucasäure**	15
Arachinsäure**	10	Brassidinsäure**	14
^3H -markierter Metabolit A1	50	^3H -markierter Metabolit A1	60 (90%)
		^3H -markierter Metabolit A2	74 (10%)

* Fluka.

** Roth.

*** Merck.

‡ Schuchardt.

‡‡ Serva.

TABELLE IVB

TRENNUNG DER FETTSÄUREN DURCH VERTEILUNGSSCHROMATOGRAPHIE AUF SILANISIERTEM KIESELGEL H

Vergleichssubstanz, ungesättigt	$R_F \times 100$				
	25*	28	29	30	31
<i>n</i> -Eicosadien(11,14)säure**	15	27	35	2	22
Linolelaidinsäure**	23	35	41	5	31
Linolsäure***	31	41	45	9	39
[^{14}C]Palmitlinolsäure**	42	48	48	15	45
<i>n</i> -Hexadecadien(10 <i>tr</i> ,12 <i>c</i>)säure‡	41	48	48	15	46
<i>n</i> -Decadien(2 <i>tr</i> ,4 <i>tr</i>)säure‡‡	63	65	61	47	71
^3H -markierter Metabolit A1	41	48	48	15	45

* Fliessmittel-Nr. der Tabelle I.

** Serva.

*** Roth.

‡ Helmlinger *et al.* ²⁶.

‡‡ Jacobson¹.

sauren Fraktion zwei Komponenten nachweisen. Mit dem Fliessmittel Nr. 23 wurden diese Substanzen an siliconisiertem Kieselgel H in einen Hauptpeak A1 (>90 %) und einen Nebenpeak A2 (<10 %) aufgespalten. Die aus der Tabelle IVa ersichtliche Übereinstimmung der R_F -Werte von Laurinsäure und Myristoleinsäure mit dem R_F -Wert der radioaktiven, sauren Hauptkomponente A1 ist zufällig (kritische Partner). Obwohl die Myristoleinsäure und Palmitoleinsäure (Tabelle II und Fig. 4) dünn-schicht-chromatographisch der Hauptkomponente A1 sehr ähneln, besteht z.B. mit der Heptadecadien-(10-*cis*,12-*cis*)-säure mehr Übereinstimmung als mit anderen einfach ungesättigten Fettsäuren (Tabelle V und Fig. 5 und 6).

TABELLE V

TRENNUNG DER FETTSÄUREN DURCH VERTEILUNGSCROMATOGRAPHIE AUF SILICONISIERTEM KIESELGEL G UND H

Vergleichssubstanz	$R_F \times 100$				
	26*	23	25	26	23
Palmitinsäure**		71			12
<i>n</i> -Heptadecansäure**		65	0	0	
Stearinsäure**	0	70	0	0	5
<i>n</i> -Octen(2)säure**			42	42	60
<i>n</i> -Undecen(10)säure***			31	25	49
Palmitoleinsäure**		75	10	9	23
Elaidinsäure**				0	7
Ölsäure**	4	73			
Vaccensäure**			0	0	
Brassidinsäure**			0	0	
Heptadecadien(10 <i>c</i> ,12 <i>c</i>)säure‡			10	10	21
Linolsäure**	9	81	8	9	16
Linolensäure**	15	83	10	10	19
β -Elaeostearinsäure**					
Arachidonsäure§§	14	84			
³ H-markierter Metabolit A1	16	85	10	10	23 (90%)
³ H-markierter Metabolit A2	53	65	50	66	60 (10%)

* Fliessmittel-Nr. der Tabelle I.

** Roth.

*** Merck.

‡ Riemschneider und Kasang²⁹.

§§ Schuchardt.

Nach der Synthese²⁶ der Hexadecadien-(10-*trans*,12-*cis*)-säure-(1) gelang schliesslich die Identifizierung der Hauptkomponente A1. Durch Verteilungschromatographie mit verschiedenen Fliessmitteln an silanisiertem Kieselgel H (Merck) konnten wir zeigen, dass die radioaktive Hauptkomponente A1 in allen eindimensionalen Chromatogrammen genau mit der Vergleichssubstanz Hexadecadien-(10-*trans*,12-*cis*)-säure-(1) übereinstimmt (Tabelle IVb). Eine sehr gute Übereinstimmung erhielten wir auch mit Radiochromatogrammen, die zum ersten Male mit der zweidimensionalen Scanning-Scintillationstechnik^{14,15} gewonnen wurden (Fig. 7 und 8).

An Hand dieser Ergebnisse können wir annehmen, dass der Hauptbestandteil A1 der sauren Fraktion die dem Bombykol analoge Hexadecadien-(10-*trans*-12-*cis*)-

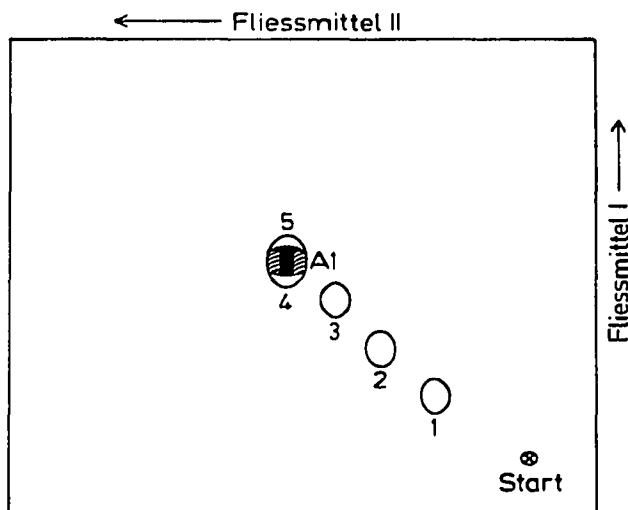


Fig. 7. Zweidimensionales Radiochromatogramm (Verteilungs-DC) des ^3H -markierten Säuremetaboliten A1 von $[^3\text{H}]$ Bombykol. ^3H -Aktivität: 300 dpm ($= 3 \times 10^9$ Moleküle). Trennschicht: Silanisiertes Kieselgel H (Merck), Plattenformat: 200×200 mm, $250 \mu\text{m}$ dick. Fließmittel: (I) Eisessig-Acetonitril-Wasser (40:30:30); (II) Eisessig-Ameisensäure-Wasser (40:40:20). Scraping: Dünnschichtscraper (Desaga). Klingenbreite: 5 mm. Registrierung der ^3H -Aktivität (A1) und ^{14}C -Aktivität: Flüssig-Szintillationsspektrometer Tri-Carb 3380 (Packard). Vergleichssubstanzen (Hersteller, siehe Tabellen II–VI): (1) *n*-Eicosadien-(11,14)-säure; (2) Linolelaidinsäure; (3) Linolsäure; (4) *n*-Hexadecadien-(10-*trans*,12-*cis*)-säure; (5) $[^{14}\text{C}]$ Palmitlinolsäure.

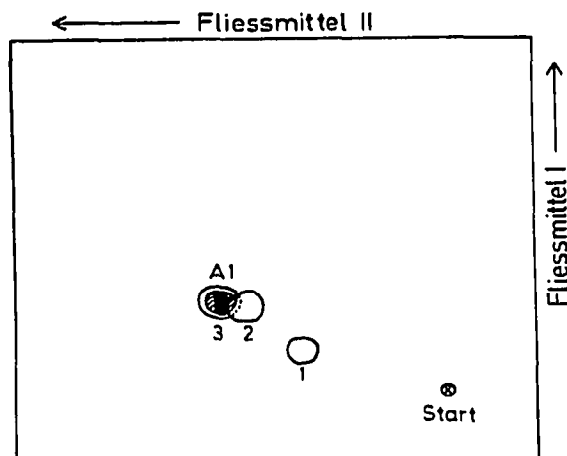


Fig. 8. Zweidimensionales Radiochromatogramm (Verteilungs-DC) des ^3H -markierten Säuremetaboliten A1 von $[^3\text{H}]$ Bombykol. ^3H -Aktivität: 2000 dpm ($= 2 \times 10^{10}$ Moleküle). Trennschicht: Silanisiertes Kieselgel H (Merck). Plattenformat: 100×100 mm, $250 \mu\text{m}$ dick. Fließmittel: (I) Dioxan-Wasser-Ameisensäure (60:35:5); (II) Eisessig-Wasser (60:20). Scraping: Dünnschichtscraper (Desaga). Klingenbreite: 5 mm, 400 Proben. Registrierung der ^3H -Aktivität (A1): Flüssig-Szintillationsspektrometer Tri-Carb 3380 (Packard). Vergleichssubstanzen (Hersteller, siehe Tabellen II–VI): (1) Linolelaidinsäure; (2) *n*-Heptadecadien-(10-*cis*,12-*cis*)-säure; (3) *n*-Hexadecadien-(10-*trans*,12-*cis*)-säure.

säure ist. Andere Untersuchungen^{27,28} über den Stoffwechsel von ³H- und ¹⁴C-markiertem Hexadecanol zeigten, dass diese Substanzen ebenfalls auf Bombyx und anderen Schmetterlingen zu einwertigen Fettsäuren oxydiert werden. Somit besteht kein Zweifel mehr, dass die Oxydation vorwiegend an der primären Hydroxylgruppe des Bombykols erfolgt.

Die zweite saure Komponente ist mit einem Anteil von weniger als 10% eine kurzkettige, gesättigte oder ungesättigte Fettsäure, die bisher noch nicht identifiziert werden konnte.

Ester. Die Fraktion der radioaktiven Fettsäureester enthält nicht nur zwei Komponenten, wie anfangs angenommen wurde (Tabelle II). Die Verteilungs-DC an siliconisiertem Kieselgel und Kieselgur mit den polaren Fließmitteln Nr. 21 und 23 ergab, dass es sich bei allen Fettsäureestern um langkettige Verbindungen mit etwa gleich grossem Molekulargewicht handelt. In ihrem verteilungschromatographischen Verhalten ähneln diese Ester langkettigen Wachsesteren oder langkettigen Triglyceriden (Tabelle VI). An den unpolaren gesättigten und ungesättigten Fettsäureestern erwies sich die Leistungsfähigkeit der Argentationschromatographie (Tabelle VI). Mit dieser Methode liess sich das ³H-markierte Fettsäureestergemisch in mindestens sechs Peaks aufspalten (Fig. 9) (Fließmittel Nr. 1, 2, 3 und 10). Durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit radioinaktiven gesättigten und ungesättigten Fettsäure-

TABELLE VI

TRENNUNG DER FETTSÄUREESTER DURCH VERTEILUNGS- UND ARGENTATIONS-CHROMATOGRAPHIE AUF KIESELGEL G UND H UND KIESELGUR G

Vergleichssubstanz	$R_F \times 100$					
	Verteilungschromatographie		Argentationschromatographie			
	21*	23	10	2	3	1
Laurinsäuremethylester**		43	41	65	68	
n-Pentadecansäuremethylester**		25	42	65	67	
Palmitinsäureäthylester***		23	47	71	72	
Stearinsäuredecylester***	34	0	61	80	78	75
Ölsäuredecylester***	30	0	51	75	76	69
n-Nonen(2)säuremethylester**	74					23
n-Decadien(2 <i>tr</i> ,4 <i>tr</i>)säuremethylester‡		65	36	57	60	
Linolsäureäthylester***	77					49
Linolensäureäthylester***	81	82	0	17	29	
β-Elaeostearinsäuremethylester***		85	0	0	0	
³ H-markierter Metabolit C1	62	0	3	0	9	7
³ H-markierter Metabolit C2			28	33	33	17
³ H-markierter Metabolit C3			60	56	53	32
³ H-markierter Metabolit C4				80	65	47
³ H-markierter Metabolit C5					78	67
³ H-markierter Metabolit C6						80

* Fließmittel-Nr. der Tabelle I.

** Fluka.

*** Roth.

‡ Jacobson¹.

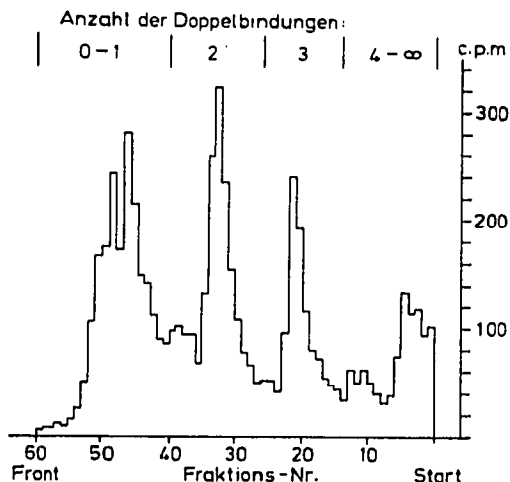


Fig. 9. Radiochromatogramm (Argentations-DC) eines ^3H -markierten Metabolitengemisches (^3H -markierte Fettsäureester) von [^3H]Bombykol. Trennschicht: Kieselgel H (Merck), 250 μm dick, imprägniert mit 5% AgNO_3 . Fließmittel: *n*-Hexan-Diäthyläther (50:50). Scraping: Dünnschichtscraper (Desaga). Klingenbreite: 2.5 mm. Registrierung der ^3H -Aktivität: Flüssig-Szintillationspektrometer Tri-Carb 3380 (Packard).

estern kann man folgern, dass dieses ^3H -markierte Metabolitengemisch aus sehr verschiedenen gesättigten und ungesättigten Estern besteht. Es handelt sich um aliphatische und olefinische Ester mit einer und mehreren Doppelbindungen (Fig. 9). Über die Konstitution der einzelnen Ester kann bis heute noch nichts gesagt werden. Wegen der geringen Substanzmengen gelang weder spektroskopisch noch chromatographisch eine Identifizierung. Verseifungsexperimente²⁷ und anschließende Chromatographie zeigten, dass die Fettsäureester überwiegend aus langkettigen Substanzen mit mindestens 30 Kohlenstoffatomen bestehen.

DANK

Zur Durchführung dieser Arbeit wurden uns von Dr. M. Jacobson (Beltsville, Md., U.S.A.), Dr. P. Schudel (Givaudan-Esrolko-AG, Dübendorf, Schweiz) und der Wacker-Chemie (München, B.R.D.) wichtige Substanzen zur Verfügung gestellt. Ihnen sei herzlich gedankt. Für technische Assistenz danken wir ebenso Fräulein I. Biedermann, Fräulein A. Wicke, Fräulein I. Brachmann, Fräulein B. Knauer und Herrn J. Paland.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Tritium hochmarkierter Sexuallockstoff [^3H]Bombykol wird auf den Antennen des Seidenspinners *Bombyx mori* weitgehend in freie Fettsäuren und Fettsäureester umgewandelt. Die Metaboliten der Säurefraktion bestehen zu etwa 90% aus einer langkettigen, ungesättigten Fettsäure vom Typ der Hexadecadien-(10-*trans*,12-*cis*)-säure und zu etwa 10% aus einer kurzkettigen, bisher noch nicht identifizierten Fettsäure. Die neutrale Fraktion enthält neben unverändertem [^3H]Bombykol mindestens sechs langkettige ^3H -markierte Fettsäureester.

LITERATUR

- 1 M. Jacobson, *Insect Sex Pheromones*, Academic Press, New York, 1972.
- 2 E. Priesner, *Fortschr. Zool.*, 22 (1973) 49.
- 3 M. Grosser, *Zoecon Ann. Rep.*, (1971) 9.
- 4 P. Karlson und D. Schneider, *Naturwissenschaften*, 60 (1973) 113.
- 5 K.-E. Kaissling, in L. M. Beidler (Herausgeber), *Chemical Senses* (Vol. IV, Nr. 1 von *Handbook of Sensory Physiology*, herausgegeben von H. Autrum *et al.*), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1972, S. 351.
- 6 A. Butenandt, R. Beckmann und D. Stamm, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 324 (1961) 84.
- 7 G. Kasang, *Naturwissenschaften*, 60 (1973) 95.
- 8 G. Kasang, *Z. Naturforsch.*, 23 b (1968) 1331.
- 9 D. Schneider, G. Kasang und K.-E. Kaissling, *Naturwissenschaften*, 55 (1968) 395.
- 10 R. A. Steinbrecht und G. Kasang, in D. Schneider (Herausgeber), *Olfaction and Taste*, Vol. IV, Wiss. Verl. Ges., Stuttgart, 1972, S. 193.
- 11 G. Kasang, in G. Ohloff und A. F. Thomas (Herausgeber), *Gustation and Olfaction*, Academic Press, New York, London, 1971, S. 245.
- 12 G. Kasang und K.-E. Kaissling in D. Schneider (Herausgeber), *Olfaction and Taste*, Vol. IV, Wiss. Verl. Ges., Stuttgart, 1972, S. 200.
- 13 G. Kasang, unveröffentlicht.
- 14 G. Kasang, G. Göldner und N. Weiss, *J. Chromatogr.*, 59 (1971) 393.
- 15 Desaga (Heidelberg), *Informationsschrift*, 179/72 (1972).
- 16 H. K. Mangold, in E. Stahl (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie—ein Laboratoriumshandbuch*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 1967, S. 365.
- 17 E. Stahl, in E. Stahl (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie—ein Laboratoriumshandbuch*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 1967, S. 55.
- 18 E. Stahl, in E. Stahl (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie—ein Laboratoriumshandbuch*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 1967, S. 49.
- 19 L. J. Morris, in A. T. James und L. J. Morris (Herausgeber), *New Biochemical Separations*, Van Nostrand, London, 1964, S. 297.
- 20 W. Wässle und K. Sandhoff, *J. Chromatogr.*, 34 (1968) 357.
- 21 G. Kasang und H. Rembold, *J. Chromatogr.*, 71 (1972) 101.
- 22 E. Stahl, in E. Stahl (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie—ein Laboratoriumshandbuch*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 1967, S. 67.
- 23 E. Stahl, in E. Stahl (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie—ein Laboratoriumshandbuch*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 1967, S. 87.
- 24 H. K. Mangold, in E. Stahl (Herausgeber), *Dünnschicht-Chromatographie—ein Laboratoriumshandbuch*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 1967, S. 394.
- 25 L. J. Morris, *J. Lipid Res.*, 7 (1966) 717.
- 26 D. Helmlinger, P. Naegeli und P. Schudel, unveröffentlicht.
- 27 G. Kasang, unveröffentlicht.
- 28 E. N. Lambremont, *Insect Biochem.*, 2 (1972) 197.
- 29 R. Riemschneider und G. Kasang, *Z. Naturforsch.*, 186 (1963) 646.
- 30 R. Riemschneider, G. Kasang und C. Böhme, *Monatsh. Chem.*, 96 (1965) 1766.