CHIMIA 39 (1985) Nr. 11 (November)

Mikroanalytische Bestimmung von Juvenilhormonen

Heinz Rembold*

Different techniques like bioassay, radioimmuno assay, and gas chromatography combined mass spectrometry are in use for a quantitative estimation of juvenile hormones in biological samples. Microderivatization of the characteristic epoxy group combined with adsorption on and selective desorption from alumina turns out to be sensitive enough for measuring juvenile hormone titers in the picomole range. With this technique, a first titer curve is shown for the developmental period of the fruit fly, Drosophila melanogaster, and for individuals of the desert locust, Locusta migratoria, as examples for the high sensitivity of this new analytical method.

Heinz Rembold: Geboren am 13. März 1928 in Stuttgart. 1946–1948 Biologiestudium in Stuttgart und Tübingen. 1949–1954 Chemiestudium an der Technischen Hochschule (jetzt Universität) Stuttgart. Diplom-Chemiker daselbst 1954. Promotion 1957 bei Prof. Adolf Butenandt. Ab 1957 Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Biochemie und Leiter der Forschungsgruppe Insektenbiochemie. Apl. Professor für Biochemie an der Universität München. Forschungsschwerpunkte: Insektenhormone, Struktur und Wirkung biologisch aktiver Naturstoffe, chemische Grundlagen der Pflanze-Insekt-Wechselwirkung, Mikroanalytik.

* *Korrespondenz:* Prof. Dr. H. Rembold
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz, D-8033 Martinsried bei München
(Bundesrepublik Deutschland)

1. Einleitung

Es gibt unter allen Lebewesen, von den Einzellern bis zu den Wirbeltieren, keinen Artenreichtum, welcher dem der Insekten gleichkommt. Sie umfassen etwa zwei Drittel aller bekannten Tierarten, übertreffen allein den Artenreichtum sämtlicher Pflan-

zen um das Doppelte, den der Säuger sogar um das Zwanzigfache. Hinzu kommt ihre enorme Vermehrungsfähigkeit – eine Eiproduktion von tausend Eiern pro Einzeltier ist keine Seltenheit – und ihre kurze Generationenfolge in Kombination mit einer im Vergleich mit der unseren unvorstellbar langen Evolution. Die ältesten Insektenfunde stammen aus dem Devon und sind somit etwa 350 Millionen Jahre alt. Wen wundert es da, dass die Insekten praktisch jede ökologische Nische auf der Erde besetzt und auch jede biochemisch mögliche Reaktion bis hin zur Schwefelsäuresynthese ausprobiert haben. Ihre Fähigkeit zur raschen Anpassung an veränderte Umweltbedingungen hat einige von ihnen zu Überträgern gefährlicher Krankheiten, andere zu ökonomisch bedeutsamen landwirtschaftlichen Schädlingen gemacht. Obwohl die meisten durch unsere breit wirksamen toxischen Insekticide noch unter Kontrolle gehalten werden können, bereitet eine sich rasch aufbauende Resistenz zusammen mit einer schwer zu kontrollierenden Umweltvergiftung Anlass zur Sorge. Neue Strategien, die eine gezieltere Insektenabwehr bei gleichzeitiger Ungiftigkeit für die anderen Lebewesen ermöglichen sollen, haben deshalb das Interesse auf eine Manipulation des Hormonsystems der Insekten gelenkt. Die Entwicklung einer solchen Strategie ist auch eine enorme Herausforderung für die Grundlagenforschung, solange die Endokrinologie der Insekten noch so wenig bekannt ist, wie wir dies heute konstatieren müssen.

Zwei Klassen von peripheren Hormonen regulieren Wachstum und Fortpflanzung der Insekten: die Häutungshormone (Ecdyson und 20-Hydroxyecdyson) und die Juvenilhormone (JH-0 bis JH-III). Ihre Biosynthese in der Prothoraxdrüse bzw. im *Corpus allatum* wird von Peptidhormonen (Prothoracotropes [PTTH] bzw. Allatotropes [ATH] Hormon) gesteuert. Zur Analyse werden die Ecdysteroide üblicherweise durch schnelle Flüssigchromatographie (HPLC) aus dem biologischen Material abgetrennt und dann durch einen Radioimmuntest (RIA) quantitativ bestimmt[1]. Als Steroide geben sie dem Analytiker keine grösseren Probleme auf als die bei polyklonalen Antikörpern gewöhnlichen, nämlich einer von Serum zu Serum variierenden Kreuzreaktivität, die mit den üblichen Vorsichtsmassnahmen (z. B. Titervergleich nach verschiedener Aufarbeitungstechnik) in den Griff zu bekommen sind. Als Routineanalyse hat sich die RIA-Technik bei den Ecdysteroid-Bestimmungen deshalb weitgehend durchgesetzt. Ganz anders ist die Situation bei den Juvenilhormonen. Hier hat die bei Lipiden weit verbreitete geringe Immunogenität[2] mit einer entsprechend hohen Unspezifität bei biologischen Proben[3] häufig zu sowohl qualitativ als auch quantitativ falschen Titerwerten geführt. Der Aussagewert der vorliegenden RIA-Daten ist deswegen stark eingeengt. Nur wenn in einer biologischen Probe eine einzige Variante der Juvenilhormone existiert und wenn diese, meistens durch HPLC, hoch angereichert wird, sind verlässliche Werte zu erwarten. Ausnahmen, z. B. bei der Analyse von Inkubationsmedien mit konstanter Zusammensetzung[4], bestätigen nur diese Regel. Es ist daher verständlich, warum bisher nur wenige verlässliche Resultate von Juvenilhormon-Bestimmungen veröffentlicht worden sind.

2. Massenspektrometrie der Juvenilhormone

Alle vier, sich formal von der Farnesolstruktur ableitenden Juvenilhormone sind in der Natur gefunden worden (Fig. 1). Als gemeinsame Strukturmerkmale weisen sie am Kopfende des Moleküls eine Methoxycarbonylgruppe und am Schwanzende einen 10,11-Epoxidring auf. Unterschiedliche Strukturelemente sind die Seitenketten, die bei JH-0 ausschliesslich Ethyl-, bei JH-III ausschliesslich Methylgruppen sind. Für eine quantitative Analyse nicht unbedenklich ist die starke Reaktivität des Epoxidrings gegenüber nucleophilen Agentien. Diese Eigenschaft kann umgekehrt durch Addition eines Alkohols an die Epoxidfunktion gezielt zur Gewinnung eines stabilen Analyts genützt werden.

Für die quantitative Bestimmung von Juvenilhormonen im Nanogrammbereich hat sich die direkte Massenspektrometrie, entweder mit Elektronenstoss- oder chemischer Ionisation, bewährt. Diese Technik verwendeten *Trautmann* et al.[5] erstmals dazu, JH-Titer bei verschiedenen Insektenarten zu bestimmen. Voraussetzung hierfür ist eine hohe chromatographische Anreicherung des Hormons mit anschliessender Gas- oder Flüssigchromatographie[6] in direkter Kopplung mit einem Massenspektrometer (GC-MS oder HPLC-MS). Eine solche Technik hat ihre Grenzen wegen des ungünstigen Fragmentierungsverhaltens von JH (Fig. 2) mit einem Maximum der Fragmente im niedrigen Massenbereich. Die bereits erwähnte, der Analyse vorausgehende Derivatisierung mit Alkoholen an der Epoxidfunktion ergibt jedoch einen stabilen Analyt, der durch HPLC hoch angereichert und durch GC-MS bestimmt werden kann.

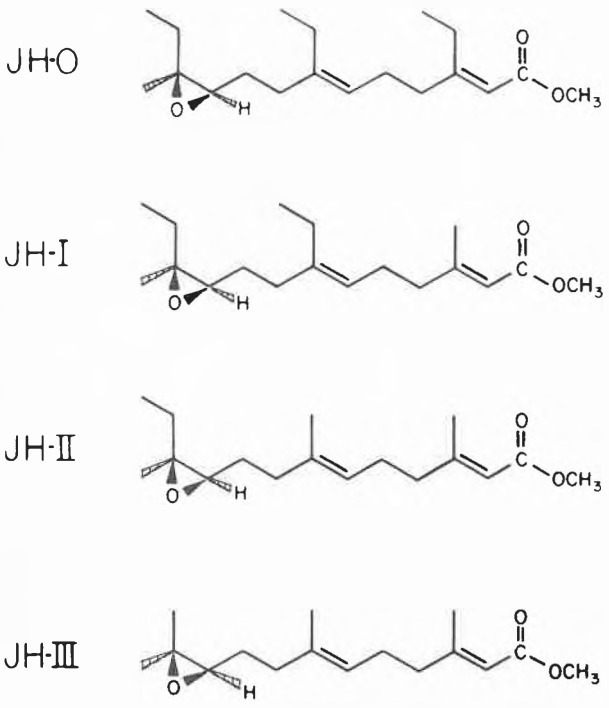

Fig. 1. Die vier natürlich vorkommenden Juvenilhormone.

3. Massenspektrometrie der JH-Halbether

Die nucleophile Addition eines Alkohols führt bei schwacher Protonenkatalyse zur Bildung eines stabilen 10-Hydroxy-11-alkoxy-Derivats, welches bei Elektronenstossionisation unter Spaltung der Bindung C(10)–C(11) in eindeutiger Weise Fragmente liefert, die sich für eine quantitative Analyse anbieten (Fig. 3). Das Schwanzfragment enthält am ursprünglichen C(11)-Atom den Alkoxyrest und kann unter «Single/Multiple Ion Monitoring»-Bedingungen bei gekoppelter Gaschromatographie-Massenspektrometrie quantitativ bestimmt werden. Die zeitliche Auftrennung erfolgt dabei auf der GC-Säule. Das nach Abspaltung des analytisch signifikanten Fragments verbleibende Restmolekül mit C(1) bis C(10) liefert im Prinzip ebenfalls ein analysierbares Fragment, das unter Abspaltung von Methanol weiter zerfällt. Diese Fragmente können gelegentlich herangezogen werden, um die anhand des Schwanzfragments erhaltenen Daten unabhängig zu stützen.

Zwei auf diesem analytischen Prinzip beruhende Verfahren wurden bisher beschrieben[7,8]. Nach dem in Fig. 3 gezeigten Fragmentierungsschema ergibt das in un-

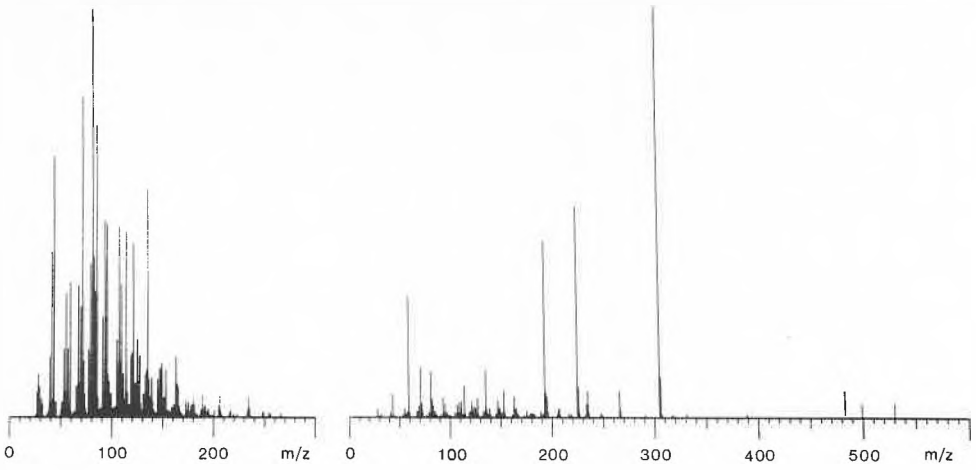

Fig. 2. Vergleich der 70eV-Massenspektren von JH-III ($C_{16}H_{26}O_3$, $M_r = 266$) (links) und von 11-Nonafluorhexyl-JH-III ($C_{22}H_{31}O_4F_9$, $M_r = 530$) (rechts). Oberhalb m/z 400 sind die relativen Intensitäten der Signale um den Faktor 10 verstärkt.

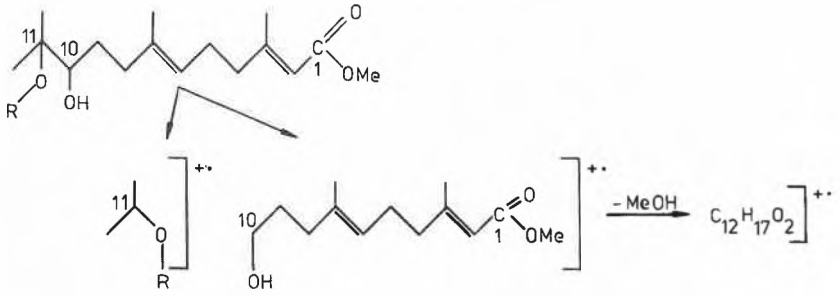

Fig. 3. Fragmentierungsschema bei Elektronenstossionisation des JH-III-Halbethers. R = Methyl oder Nonafluorhexyl, Nonafluoroctyl, Nonafluortridecyl[11].

serem Laboratorium entwickelte Verfahren[7] bei Addition von Nonafluorhexanol die folgende Intensität für die drei betrachteten Signale (vgl. dazu das rechte Spektrum in Fig. 2): *m/z* 305 = 100%, *m/z* 225 = 50%, *m/z* 193 = 40%[9]. Beide Verfahren[7,8] verwenden einen inneren Standard und sind im Picomolbereich, also um etwa drei Zehnerpotenzen empfindlicher als bei der direkten Messung des Juvenilhormons im Massenspektrometer, quantitativ auswertbar. Obwohl sie sich beide zur Erfassung der in der Natur zumeist vorkommenden Konzentrationen von etwa 10^{-8} bis 10^{-9} M JH bewährt haben, stossen sie hierbei aber auch an die Grenze des analytisch Möglichen. Die Gründe dafür seien kurz skizziert.

Bergot et al.[8] verwenden für die Derivatisierung Methanol, welches als einziger Alkohol zu einer nahezu quantitativen Umsetzung mit dem JH-Epoxidring führt. Dieser Vorteil verringert sich aber wegen des ungünstigen Signal/Rausch-Verhältnisses für die Fragmente mit *m/z* 76 (aus dem Halbether von JH-III) bzw. *m/z* 90 (aus den Halbethern von JH-0 bis JH-II). Bei niedrigen Signalen wird das Grundrauschen störend hoch (Fig. 4). Auch die Verwendung von deuteriertem Methanol mit einer Verschiebung der analytischen Masse um 3 Einheiten nach oben bringt hier keine wesentliche Besserung. Unsere Strategie war es von Anfang an, durch Addition eines möglichst schweren Alkohols, beispielsweise von fluorierten Alkoholen[7,9], zu einem Analyt im höheren Massenbereich zu gelangen. So wird mit Nonafluorhexanol für JH-III ein Signal *m/z* 305 erreicht (Fig. 2), für die andern Juvenilhormone eines von *m/z* 319. Das Grundrauschen ist in diesem Bereich, verglichen mit *m/z* 76 bzw. *m/z* 90, minimal (Fig. 4), die analytische Empfindlichkeit entsprechend um mehr als eine Zehnerpotenz grösser. Ein Nachteil dieser Methode ist aber die schlechte Ausbeute von etwa 20% bei der Derivatisierung, die von der geringen Löslichkeit fluorierter Alkohole herrührt. Beide Verfahren erfordern ausserdem eine umständliche Reinigungsprozedur mit mehrfacher HPLC, die extrem reproduzierbar anhand innerer Standards durchgeführt werden muss, um Substanzverluste zu vermeiden. Dennoch liessen sich beide Verfahren mit Erfolg zum qualitativen und quantitativen Nachweis von niedrigen JH-Titern bei verschiedenen Insektenarten verwenden.

4. Massenspektrometrie der JH-Ether

Bald nach dem Bekanntwerden der beiden mikroanalytischen JH-Bestimmungsmethoden[7,8] haben wir damit begonnen, eine Strategie für die Analyse biologischer Proben im Picogrammbereich zu entwikkeln, welche die Vorteile beider Verfahren ausnutzt, ohne sie durch die erwähnten Nachteile wieder zu beeinträchtigen. Dazu waren drei Voraussetzungen zu erfüllen:

1) Hohe Ausbeuten bei der Derivatisierung von Picogramm-Mengen in biologischen Proben;
2) das analytische MS-Fragment muss bei einem niedrigen Pegel des Grundrauschens auftreten;
3) die Probenaufarbeitung muss ohne HPLC oder ähnlich umständliche Reinigungsverfahren auskommen.

Die neue Technik, welche in einem wesentlich vereinfachten Analysenverfahren die Bestimmung von Picomolmengen JH ermöglicht, wurde kürzlich publiziert[10].

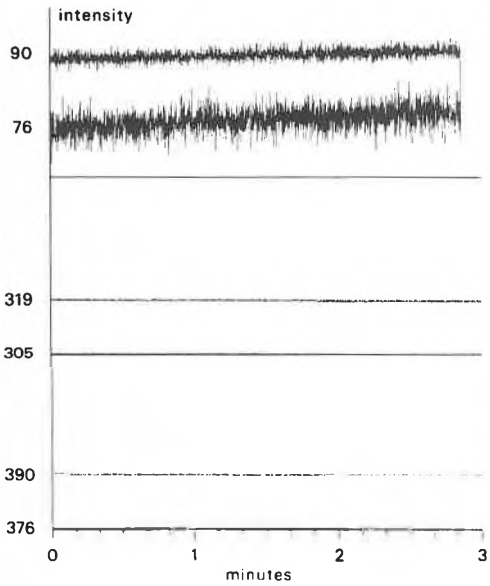

Fig. 4. Grundrauschen des MS-Signals bei verschiedenen analytischen Massen und bei gleicher SEV-Verstärkung.

Die Synthese des Analyts folgt dem in Fig. 5 gezeigten Schema. Das synthetische oder aus dem biologischen Material angereicherte Hormon wird in Anwesenheit einer Spur von Trifluoressigsäure in Methanol während 15 min bei 60°C gehalten, wobei sich das Juvenilhormon quantitativ zum Glykolhalbether umsetzt. Dieser wird durch Adsorption an Aluminiumoxid abgetrennt und mit Dichlormethan wieder desorbiert. Im nächsten Schritt wird der Halbether in Pyridin bei 60°C während 20 min mit Dimethyl(nonafluorhexyl)silylchlorid («NFHDMCS») in fast quantitativer Ausbeute zum vicinal-gemischten Ether umgesetzt. Dieses Derivat liefert bei Elektronenstossionisation zwei prominente Signale (Fig. 6), eines bei *m/z* 76 und vom bereits erörterten C(10)–C(11)-Fragmentierungsschritt (Fig. 3) herrührend, und ein zweites bei *m/z* 376 (für JH-III) bzw. 390 (für die anderen Homologen JH-0 bis JH-II), das im Bereich eines idealen Grundrauschens (Fig. 4) liegt. Damit

steht ein Analyt zur Verfügung, der nach dem in Fig. 7 gezeigten Schema entstehen sollte und der unter Elektronenstossbedingungen mit einer Nachweisgrenze von 100 Femtogramm bestimmt werden kann.

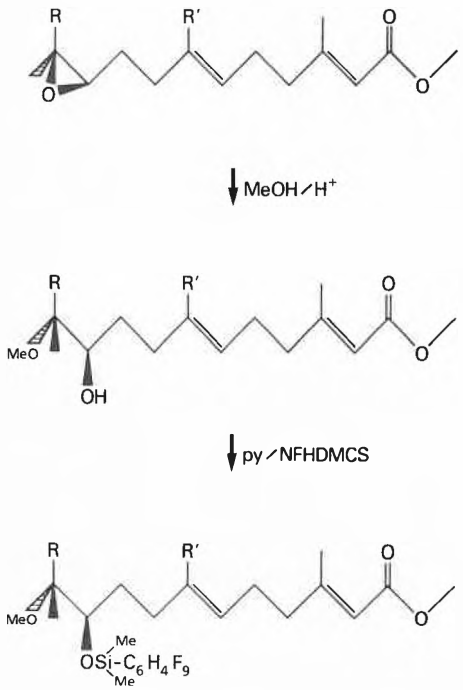

Fig. 5. Syntheseschema für den JH-Ether. NFHDMCS = (3,3,4,4,5,5,6,6,6-Nonafluorhexyl)dimethylchlorsilan. $R = R' = CH_3$ oder C_2H_5.

5. JH-Bestimmung in biologischen Proben

Wenn wir für den Komplex aus Juvenilhormon und seinem Rezeptorprotein einen Wert für die Dissoziationskonstante von $K_D = 10^{-9}$ M annehmen, bedeutet dies für den Analytiker, dass eine Substanzmenge von etwa einem Nanogramm und weniger pro Gramm Tiermaterial derivatisiert und schliesslich sicher quantitativ bestimmt werden muss. Nachdem das mikrochemische Problem der Umsetzung von solchen Substanzmengen mit nahezu 100% Ausbeute gelungen war, bekam die dritte Aufgabe, nämlich eine verlustarme Aufarbeitung mit einfachen Mitteln zu schaffen, besondere Bedeutung.

Juvenilhormon löst sich leicht in Methanol und lässt sich mit Lipiden zusammen bei erschöpfender Extraktion quantitativ aus der biologischen Probe extrahieren. Diesem Gesamtextrakt setzen wir sofort eine bekannte Menge der dem JH-I und JH-III entsprechenden Ethylester als innere Standards zu. Während der gesamten weiteren Aufarbeitung findet keine Umesterung des Standards zum Methylester statt, und seine Reaktivität ist mit der des natürlichen Hormons identisch. Dies gilt selbst bei so extrem lipidreichen Proben wie den Larven von *Drosophila hydei*[11], bei denen JH-III in Picogramm-Mengen aus Gramm-Mengen Fett isoliert werden muss. Für die Aufarbeitung wird der Methanolextrakt mit dem gleichen Volumen

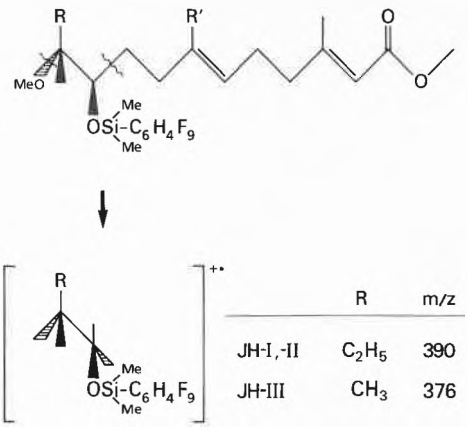

Fig. 7. Fragmentierungsschema für den JH-Ether. $R' = C_2H_5$ für JH-I und CH_3 für JH-II.

zweiprozentiger wässriger Kochsalzlösung verdünnt und – bei einem Gesamtvolumen von 60 mL pro Gramm biologisches Material – über ein mit 0.75 g LiChroprep RP-8 (Merck) gefülltes Säulchen filtriert. Nachwaschen mit dem gleichen Lösungsmittel entfernt vollends den Hauptteil der Lipide (einschliesslich der Ecdysteroide). Schliesslich wird die JH-Fraktion mit 3 mL Methanol isoliert. Nach Verdünnen mit dem gleichen Volumen Kochsalzlösung wird gründlich mit Isooctan ausgeschüttelt. Nun folgt eine Sequenz von Adsorptions- und Desorptionsschritten, bei denen der

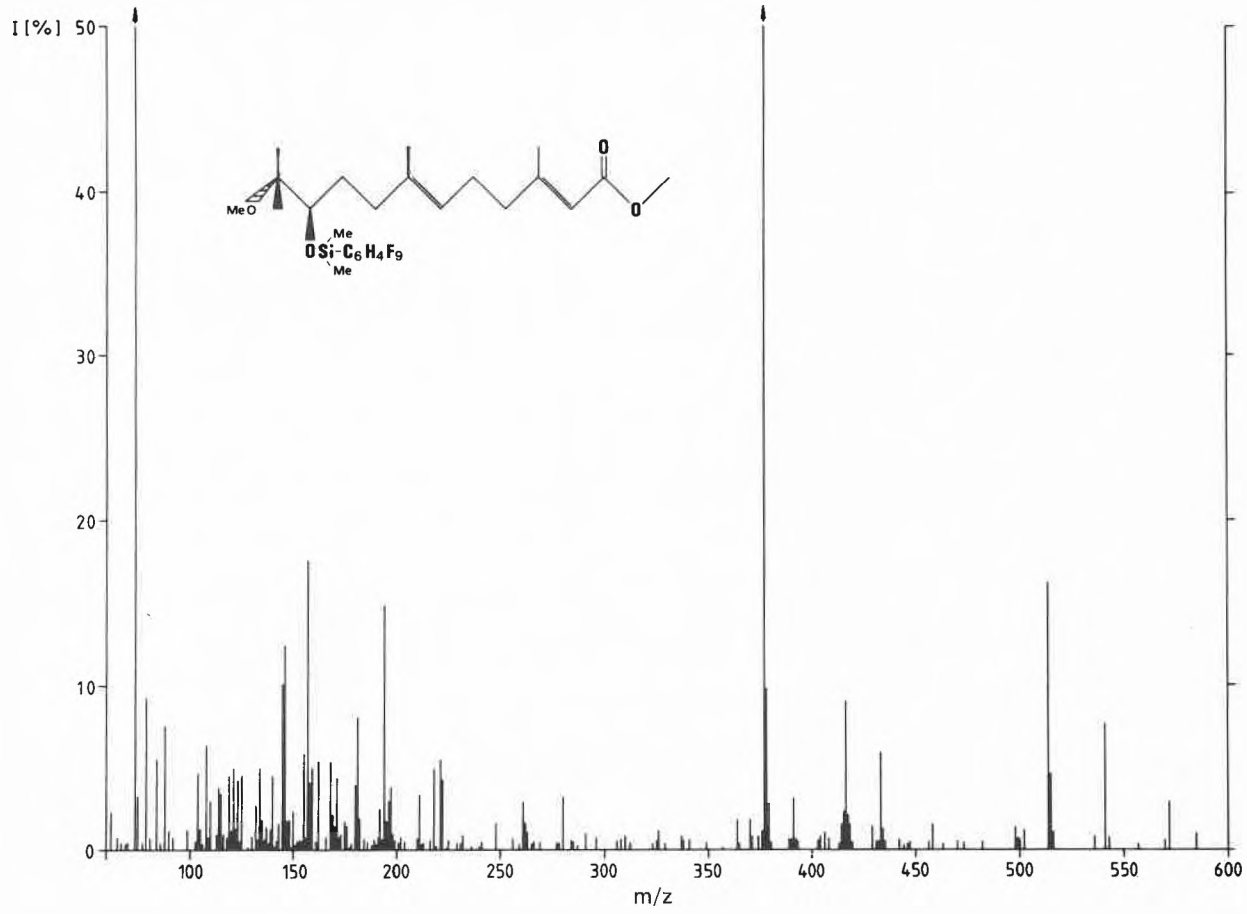

Fig. 6. Elektronenstoss-Massenspektrum des als Analyt fungierenden, durch zweistufige Derivatisierung hergestellten gemischt-vicinalen Diethers von JH-III.

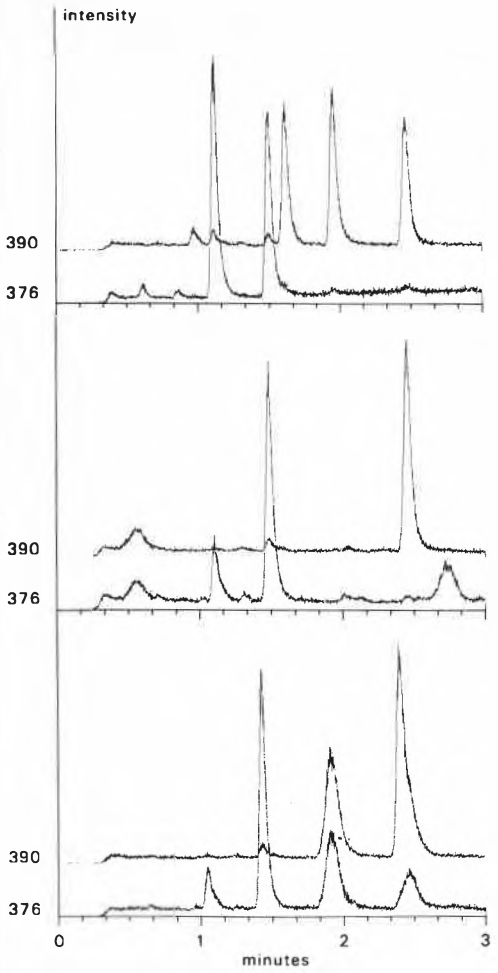

Fig. 8. MIS-Kurven für die JH-Halbether. Oben: Gemisch von JH-III und seinem Ethylester (m/z 376, von links nach rechts), JH-II, JH-I und JH-I-Ethylester. Mitte und unten: zwei Proben entsprechend 30 mg Drosophila melanogaster.

JH-Charakter durch die Umwandlung in einen Halb- und dann in einen Vollether (Mono- bzw. Diether) so stark verändert wird, dass sich das Adsorptionsverhalten auf Aluminiumoxid (1.3 g Al_2O_3 in einer Pasteur-Pipette) mit jedem Schritt grundlegend verändert. So wird das Juvenilhormon mit 2 mL Dichlormethan, der Halbether mit dem gleichen Volumen Essigester/Pentan (1:1) und der Methyl-(NFHDMS)ether mit Dichlormethan/Pentan (2:3) desorbiert. Nur solche Spezies, die sich bei insgesamt vier Desorptionsschritten gleich dem Juvenilhormon und seinem inneren Standard verhalten, können am Ende noch in der analytischen Probe enthalten sein. Die Gesamtbeute bei diesem Verfahren beträgt ca. 80%.

Wie erfolgreich diese ohne Chromatographie auskommende mikroanalytische Technik ist, sei mit dem folgenden Beispiel angedeutet. Um sicherzugehen, dass die fast nur aus Fett bestehenden, 156–168 Stunden alten Wanderlarven von *Drosophila hydei* nur in Spuren Juvenilhormon enthalten, haben wir 3 g solcher Larven aufgearbeitet und das gesamte Endprodukt auf einer 30 m langen Kapillarsäule (Durchmesser 0.32 mm, fused silica, stationäre Phase DB 1, Schichtdicke 0.25 µm, J and W) nach Injektion mit einem Falling-Needle-Injector (LKB-Clinicon) aufgetrennt. Das Chromatogramm zeigte das unverzerrte Verhalten einer für die beschriebene Derivatisierung üblichen Analyse[11].

In Fig. 8 sind Diagramme verschiedener Analysen unter MIS-Bedingungen (MIS = multiple ion selection; bei diesem Verfahren können praktisch gleichzeitig verschiedene Fragmente gemessen werden) gezeigt, wie sie heutzutage bereits mit einem einfachen Massenspektrometer aufgenommen werden können. Die beiden analytischen Massen *m/z* 376 und *m/z* 390 liefern scharfe Signale nicht nur im Falle synthetischer Hormone, sondern auch bei einem solch kritischen biologischen Material wie dem aus der Taufliege, *Drosophila melanogaster*. Den beiden Beispielen sind folgende Informationen zu entnehmen: In den Proben liegt nur JH-III vor, an der für JH-II und JH-I zu erwartenden Stelle erscheint kein Signal; die inneren Standards treten bei ca. 1 min 30 s (*m/z* 376 für JH-III-Ethylester) und 2 min 30 s (*m/z* 390 für JH-I-Ethylester) auf; das im untersten Diagramm bei 1 min 50 s erscheinende Signal liegt auf beiden Spuren, rührt also von keinem JH her. Eventuelle Unsicherheiten in der analytischen Aussage lassen sich nicht nur durch Vergleich mit den Signalen *m/z* 76 und *m/z* 90 oder nach Verwendung von [$^2H_3$]Methanol mit den Signalen *m/z* 79 und *m/z* 93 unter den erwähnten Vorbehalten prüfen, sondern auch durch geringe Änderungen im GC-Temperaturprogramm. Bei vielen hundert Analysen blieb ein solches Problem nie ungelöst.

6. Anwendung auf biologische Probleme

Bis vor wenigen Jahren war ungeklärt, ob die Larven und Puppen der Taufliege überhaupt Juvenilhormon enthalten. Wenn überhaupt, dann konnten es nur winzige Mengen unterhalb der (dazumal gültigen) Nachweisgrenze sein – ein Problem, das eine Untersuchung mit unserer neuen Technik geradezu herausforderte. Nachdem wir in Zusammenarbeit mit *H. Emmerich* in den Larven Titerwerte von maximal 0.29 pmol/g Frischgewicht gemessen hatten, die bei den erwachsenen Fliegen auf etwa 0.7 pmol/g ansteigen[11], führten wir eine ähnliche Titerbestimmung an genau datierten Stadien von *Drosophila melanogaster* durch (Fig. 9)[12]. Auch hier enthalten wie bei *Drosophila hydei* (vgl. Abschnitt 5) alle Stadien nur JH-III mit einem maximalen Titer von 1.3 pmol/g in

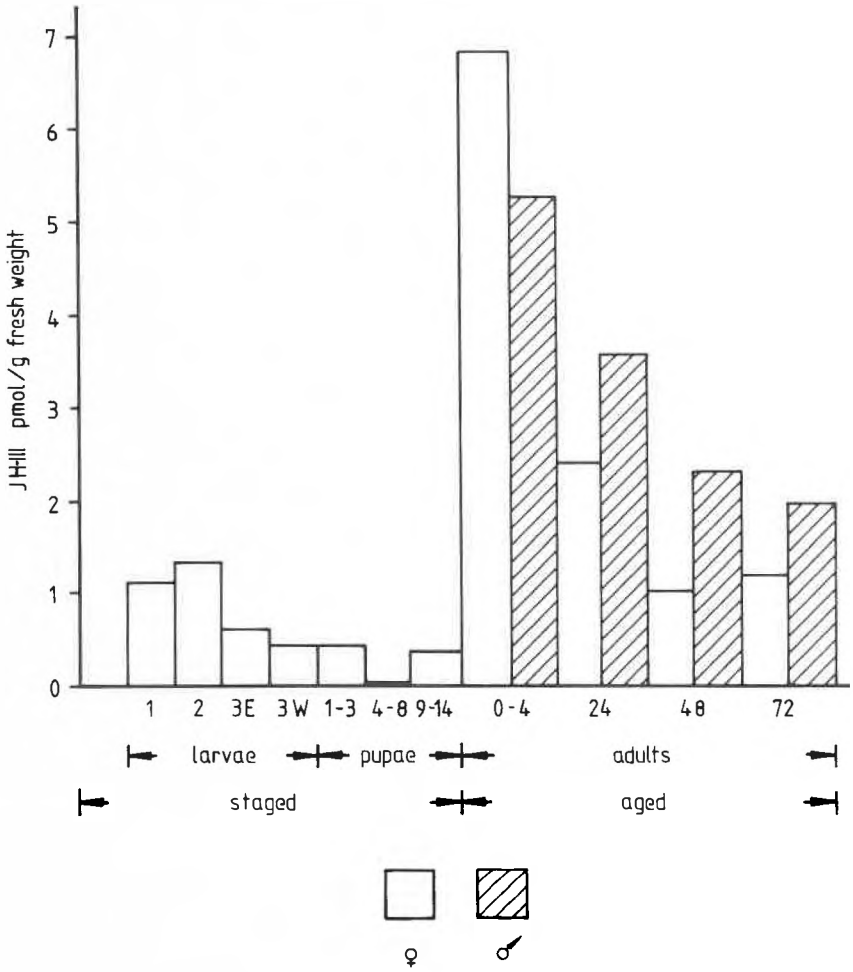

Fig. 9. Titerkurve für JH-III während der Imaginalentwicklung von Drosophila melanogaster. Für Larven und Puppen ist die Entwicklungsdauer in Tagen, für die Adulten in Stunden nach dem Schlüpfen angegeben. Nach [12].

der zweitägigen Larve, einem Minimum von weniger als 0.01 pmol/g im Puppenstadium und einem rasch wieder abschwellenden Maximum von 6.8 pmol/g in den frisch geschlüpften Weibchen und 5.3 pmol/g in den Männchen. Bei allen Messungen wurden 0.1 bis 1 g Tiermaterial verwendet; Doppel- und Dreifachbestimmungen ergaben Werte, die im Bereich der biologischen Streuung lagen.

Für Messungen an einzelnen Insekten ist eine Empfindlichkeit erforderlich, wie sie bisher nur der Ecdysteroid-RIA bot. Mit der jetzt verfügbaren analytischen Methode gelang es zum ersten Mal, an einzelnen *Locusta*-Weibchen den Titerverlauf von Ecdyson und Juvenilhormon im Blut zu verfolgen[13]. Vor dem Beginn der Vitellogenin-(Dotterprotein-)Synthese, um den fünften Tag nach der letzten Häutung, und über den Zeitpunkt der Eiablage hinweg wurde den Weibchen täglich 10 µL Hämolymphe entnommen. In Fig. 10 sind die Titerkurven für vier Heuschrecken während des ersten Eireifungszyklus dargestellt. Die Kurven beider Hormone weisen kurz vor der Eiablage ein Minimum auf und zeigen einen synchronen sowie gleichsinnigen Titerverlauf. Diese Befunde sind bemerkenswert, weil sie die enge synergistische Kopplung beider Hormone bei der Oogenese verdeutlichen, ganz im Gegensatz zum Entwicklungsgeschehen, wo die beiden Hormone antagonistisch wirken. Bemerkenswert ist auch, wie individuell verschieden die Maxima der Titerkurven sind.

7. Ausblick

Die in diesem kurzen Fortschrittsbericht beschriebene mikroanalytische Bestimmung von Juvenilhormonen ist in ihrer Technik einfach. Der Analyt, nämlich das Methyl[dimethyl(nonafluorhexyl)-silyl]-Derivat, lässt sich auch bei sehr niedrigen Titern in einer Ausbeute von 80% herstellen. Da nur einfache Verfahren wie Absaugen und Filtrieren nötig sind, ist die Probengewinnung auch nicht teuer. Die quantitative Analyse durch GC-MS-MIS ist heute in den meisten Forschungszentren ohne besondere Probleme möglich.

Im Prinzip eignet sich die Methode auch für die Mikroanalyse anderer in Spuren vorkommender Epoxide. Hierbei kommt es in erster Linie auf eine Anpassung des Reinigungsverfahrens an. Zur Silylierung sind natürlich auch einfachere Reagentien wie Trimethylchlorsilan verwendbar, allerdings auf Kosten eines analysenrelevanten Signals bei hohen Massenwerten. Eine Steigerung der Empfindlichkeit ist natürlich auch mit jeder Verbesserung in der massenspektrometrischen Analytik zu erwarten. Dieser Aspekt wird wichtig, wenn man von statistischen Aussagen wegzukommen versucht und das hormonelle Geschehen im Einzeltier erforschen möchte.

Dank: Eine Reihe begeisterungsfähiger Mitarbeiter war an der Entwicklung der Mikroanalyse von Juvenilhormonen in meinem Laboratorium beteiligt. Den Anfang machten Dr. Hartwig Hagenguth und Jakob Ra-

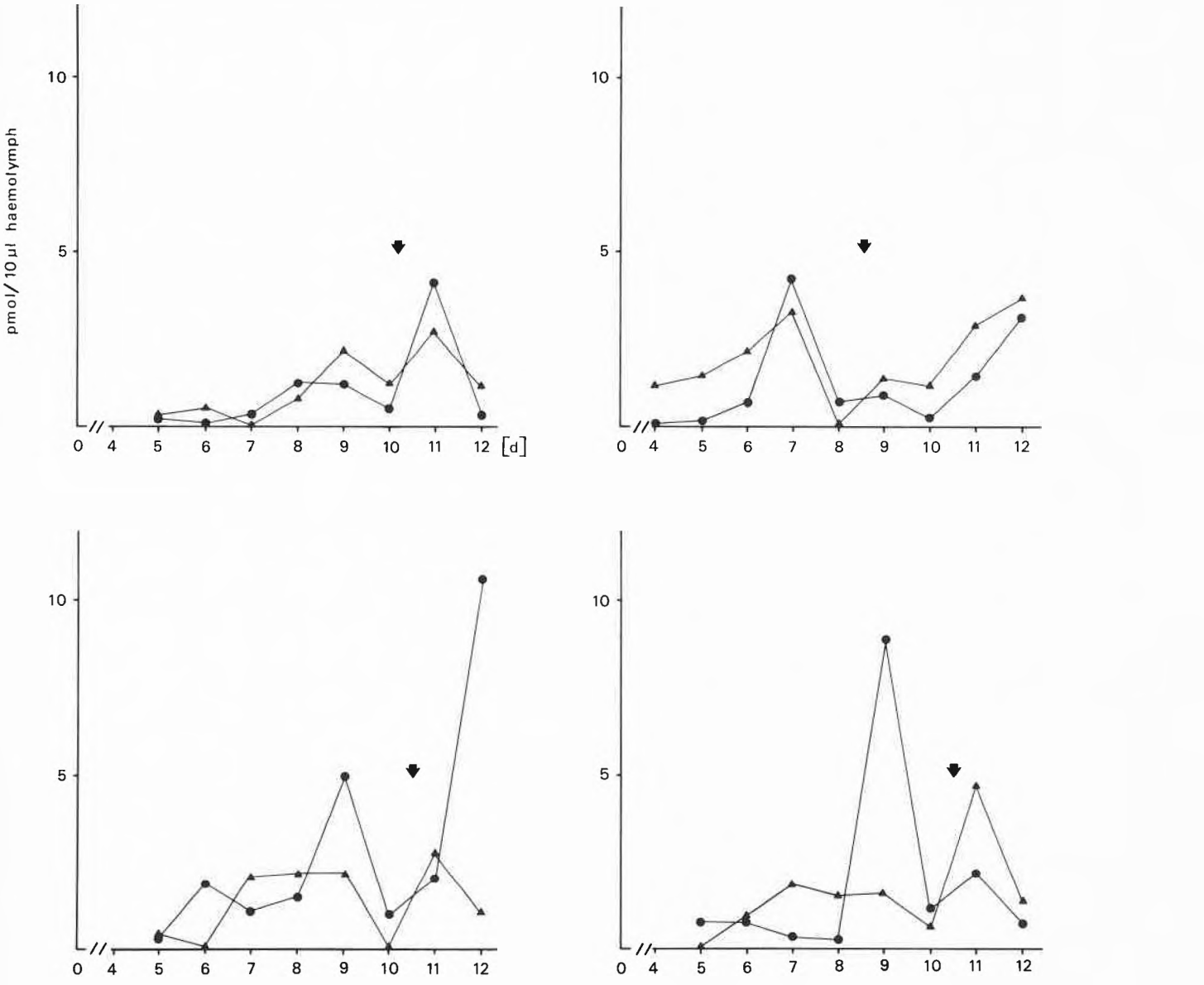

Fig. 10. Hämolymphtiter (pmol/10 µL) für Ecdyson (●) und JH-III (▲) bei vier einzelnen Weibchen von Locusta migratoria. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Eiablage an.

scher; sie entwickelten die Technik der Derivatisierung mit fluorierten Alkoholen. Besondere Anerkennung gebührt Bernt Lackner, der geduldig half, ein Verfahren anwendungsreif auszuarbeiten, welches trotz seiner Empfindlichkeit für die Herstellung des Analyts keinerlei teure Technik benötigt. Die noch unveröffentlichten Ergebnisse sind Beiträge von Marlene Grüne, Klaus Kreuzmann und Marianne Uhl. Das Bundesministerium für Forschung und Technologie finanzierte die Anschaffung eines Massenspektrometers CH7A (Varian MAT) und schuf dadurch die Voraussetzung für die Entwicklung des hier beschriebenen Verfahrens.

Eingegangen am 8. November 1985 [FR 19]

[1] K. D. Spindler, C. Beckers, U. Gröschel-Stewart, H. Emmerich, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359* (1978) 1269.
[2] M. M. Rapport, L. Graf, *Prog. Allergy 13* (1969) 273.
[3] N. A. Granger, W. G. Goodman, *Insect Biochem. 13* (1983) 333.
[4] N. A. Granger, S. M. Niemiec, L. I. Gilbert, W. E. Bollenbacher, *J. Insect Physiol. 28* (1982) 385.
[5] K. H. Trautmann, P. Masner, A. Schuler, M. Suchy, H. K. Wipf, *Z. Naturforsch. C29* (1974) 757.
[6] B. Mauchamp, R. Lafont, P. Krien, in G. E. Pratt, G. T. Brooks: *Juvenile Hormone Biochemistry*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1981), p. 21.
[7] H. Rembold, H. Hagenguth, J. Rascher, *Anal. Biochem. 101* (1980) 356.
[8] B. J. Bergot, M. Ratcliff, D. A. Schooley, *J. Chromatogr. 204* (1981) 231.
[9] H. Rembold, in G. E. Pratt, G. T. Brooks: *Juvenile Hormone Biochemistry*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1981), p. 11.
[10] H. Rembold, B. Lackner, *J. Cromatogr. 323* (1985) 355.
[11] U. Bührlen, H. Emmerich, H. Rembold, *Z. Naturforsch. C39* (1984) 1150.
[12] M. Bownes, H. Rembold, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, zur Veröffentlichung eingereicht (August 1985).
[13] H. Rembold, M. Uhl, noch unveröffentlicht.