

III. Bestimmung der Doppelbindungsisomere von Alkenen der Bienenwachse

III.1. Einleitung

Bei der Art *Apis mellifera* lassen sich nach Angaben von Carlson et al. (1989) europäische und afrikanische Rassen durch verschiedene Doppelbindungsisomere des Triacontens der Kutikulawachse diskriminieren. Nachdem bei der hier durchgeführten Analyse der Wachse im Gaschromatographen die Alkene nur als Gesamtheit verschiedener Doppelbindungsisomere bestimmt werden konnten, war die Frage nach den Positionen der Doppelbindungen von entscheidender Bedeutung, um Unterschiede zwischen den hier untersuchten Wachsen, die bis dahin nicht detektiert wurden, nicht zu übergehen. Lange war die Bestimmung der Doppelbindungen von Alkenen ein Problem in der Analytik kutikulärer Kohlenwasserstoffe. Die Methode der Wahl ist inzwischen die Dimethyldisulfid-Addition (Howard 1993). Mit Hilfe einer iod-katalysierten Addition von Dimethyldisulfid an lineare Alkene können für die Gaschromatographie stabile Derivate erhalten werden, die im Massenspektrum ganz charakteristische Fragmente aufweisen. Anhand dieser Fragmente kann die Position der Doppelbindung recht einfach bestimmt werden (Francis und Veland 1981). Diese Derivatisierung kann auch mit Mischungen von langkettigen Kohlenwasserstoffen durchgeführt werden (Carlson et al. 1989), wie sie im Bienenwachs natürlicherweise vorkommen.

III.2. Material und Methoden

III.2.1. Methodenetablierung. Die Bestimmung der Doppelbindungen in den Alkenen der Bienenwachse erfolgte nach einer Methode von Carlson et al. (1989), die leicht modifiziert wurde. Um diese Methode zu überprüfen, wurde ein Standard (1-Eicosen, Sigma, Deisenhofen) mit einer Konzentration von 50 µg/ml in Hexan gelöst. 1 ml dieser Lösung wurden mit 1 ml Dimethyldisulfid (DMDS, Reinheit >99%, Merck, Darmstadt) und 0,5 ml 60%ige Jodlösung in Diethylether (Jod: Reinheit >99,8%, Fluka, Deisenhofen) bei 40 °C für 2 h bzw. 12 h gerührt. Danach wurde die abgekühlte Lösung mit 2 ml Hexan aufgefüllt, um die organische Phase zu vergrößern. Das Jod wurde durch Waschen mit einmal 5 ml und einmal 2 ml 5%iger Natriumthiosulfatlösung (Natriumthiosulfat*5H₂O: Reinheit >99,5%, Fluka, Deisenhofen) reduziert. Nach Abtrennen der wässrigen Phase wurde die organische Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Die Lösung wurde filtriert, mit Stickstoff trockengeblasen, um das restliche DMDS zu entfernen, mit 1 ml Hexan versetzt und

gaschromatographisch und massenspektrometrisch analysiert. Die Analysebedingungen entsprachen den Bedingungen der Wachsenanalyse (siehe Kapitel II.2.7.).

III.2.2. Wabenwaxse. Die Kohlenwasserstoffe der Wabenwaxse wurden gewonnen, indem mit 1 ml einer Waxslösung von 2 mg/ml eine Festphasenextraktion durchgeführt wurde (siehe Kapitel II.2.5.). Nach Elution mit 8 ml Hexan wurde die Fraktion unter einem leichten Stickstoffstrom auf 1 ml reduziert. Zu dieser Lösung (entsprach ca. 50 µg Alkene/ml) wurde 1 ml DMDS und 0,5 ml 60%ige Jodlösung gegeben und bei 40 °C für mindestens 12 Stunden gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurden 2,5 ml Hexan zugegeben und mit 2,5 ml 5%iger Natriumthiosulfatlösung zweimal gewaschen. Die wäßrige Phase wurde verworfen und die organische Phase über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und danach filtriert. Die Probe wurde unter einem leichten Stickstoffstrom bis zur Trockne abgeblasen und für 2-3 h im Heizschrank bei 40 °C getrocknet, um das überschüssige DMDS zu entfernen. Danach wurden die Reaktionsprodukte in 1 ml Hexan aufgenommen und mit Hilfe von Gaschromatographie mit massenspektrometrischem Detektor analysiert. Die Analysebedingungen entsprachen den Bedingungen der Wachsenanalyse (siehe Kapitel II.2.7.).

III.2.3. Kutikulawaxse. Für die Bestimmung der Doppelbindungen der Alkene in den Kutikulawachsen wurden die Hexanfraktionen der Arbeiterinnen, Drohnen und Königinnen herangezogen, die auch für die chemische Analyse verwendet wurden (Kapitel II.2.3.). Die Hexanfraktionen wurden auf eine Konzentration von ungefähr 50 µg Alkene/ml Hexan eingestellt. Danach wurden die Alkene wie bei den Wabenwachsen derivatisiert. Im Unterschied zu den Wabenwachsen wurde mit geringeren Mengen gearbeitet: 200 µl Waxslösung wurden mit 200 µl DMDS und 100 µl 60%ige Jodlösung versetzt. Nach der Reaktion wurde mit 500 µl Hexan aufgefüllt und zweimal mit 500 µl 5%iger Natriumthiosulfatlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Filtrieren wurde das überschüssige DMDS im Heizschrank entfernt und die Reaktionsprodukte in 100 µl Hexan gelöst. Danach erfolgte die Analyse im Gaschromatograph mit massenspektrometrischem Detektor. Die Analysebedingungen entsprachen den Bedingungen der Wachsenanalyse (siehe Kapitel II.2.7.).

III.2.4. Auswertung. Durch die Addition von Dimethyldisulfid an die Doppelbindungen der Alkene werden Di(methylthio)alkane gebildet. Dies führt bei der Reaktion des Standards 1-Eicosen zu einem 1,2-Di(methylthio)eicosan. Bei der Ionisierung im Massenspektrometer brechen die Moleküle bevorzugt an der Stelle der ehemaligen Doppelbindung, d.h. zwischen den beiden Thiomethylgruppen. (Abb. III.1). So wurde z. B. für Hentriaconten durch die

Anhand der Intensitäten der einzelnen Fragmente im Massenspektrum wurden die Anteile der jeweiligen Doppelbindungsisomere an der Gesamtmenge der C₂₉, C₃₁ und C₃₃ - Alkene abgeschätzt. Dabei wurden die Intensitäten der kleineren Fragmente zur quantitativen Auswertung herangezogen. Doppelbindungsisomere mit einem Anteil < 1% wurden bei der Abschätzung nicht berücksichtigt.

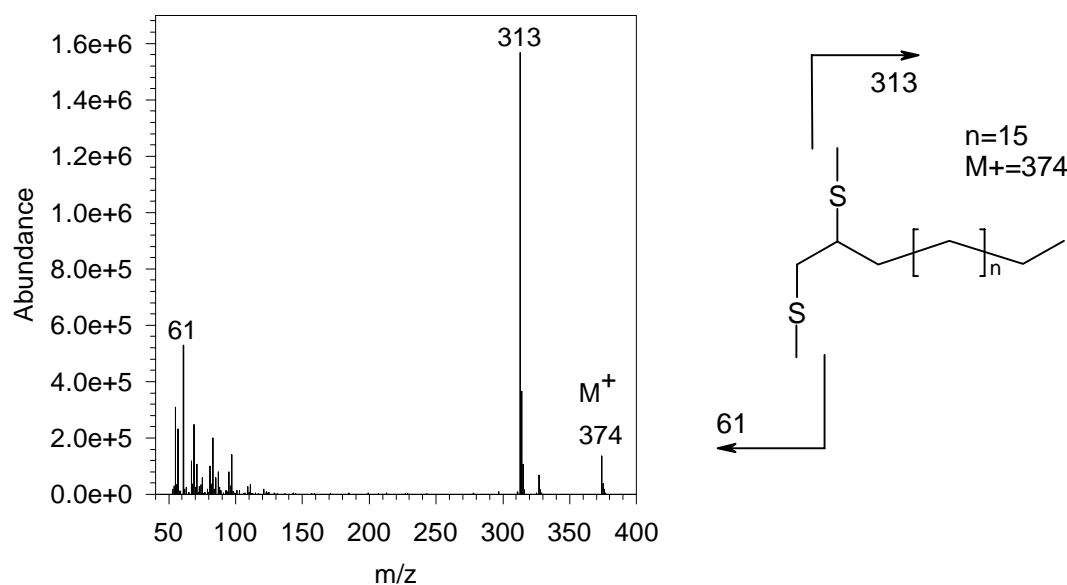


Abbildung III.1: 1,2-Di(methylthio)eicosan: Massenspektrum und Strukturformel mit charakteristischen Fragmenten, (m/z = Ionenmasse).

III.3. Ergebnisse

Im Vorversuch war nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden 1-Eicosen vollständig in das entsprechende Di(methylthio)eicosan überführt. Allerdings war das Produkt nicht komplett frei von DMDS, wodurch die Analyse am Gaschromatograph sich als schwierig gestaltete, denn das überschüssige DMDS lagerte sich an das Säulenmaterial der DB1 Säule an. Um dies bei den weiteren Analysen zu vermeiden, wurden die Produkte nach der Derivatisierung zum Trocknen in den Heizschrank gestellt. Damit konnte das überschüssige DMDS entfernt werden.

Sowohl bei den Wabenwachsen (Tab. III.1), als auch bei den Kutikulawachsen (Tab. III.2) gab es keine erheblichen Unterschiede in der Zusammensetzung der Alkene. Bei allen Wachsen konnten pro Alken mehrere Doppelbindungsisomere (bis zu 8 Isomere bei Nonacosen der Wabenwachse) nachgewiesen werden.

Im Wabenwachs waren die Doppelbindungen bei Nonacosen hauptsächlich an den Positionen C₈ (61,0 - 66,5 %), C₉ (8,9 - 22,6 %) und C₁₀ (5,5 - 8,7 %). Bei Hentriaconten wurde der Großteil der Alkene von den 8- und 9-Isomeren zu ungefähr gleichen Teilen gebildet (42,7 - 53,7 %). Bei Tritriaconten war das 10-Isomer mit über 80 % (84,1 - 86,6 %) Hauptbestandteil. (Tabelle III.1)

Tabelle III.1: Doppelbindungsisomere der Alkene bei jungem und altem Wabenwachs von *Apis mellifera carnica* Pollm. Anteil der Isomere in % nach einer Abschätzung der Fragmente im Massenspektrum.

	Junges Wachs (n=3-5)	Altes Wachs (n=5-6)
C ₂₉	8 - Nonacosen (66,5 %)	8 - Nonacosen (61,0 %)
	9 - Nonacosen (8,9 %)	9 - Nonacosen (22,6 %)
	10 - Nonacosen (8,7 %)	10 - Nonacosen (5,5 %)
	5 - Nonacosen (4,0 %)	7 - Nonacosen (3,0 %)
	3 - Nonacosen (3,3 %)	3 - Nonacosen (2,2 %)
	7 - Nonacosen (3,2 %)	5 - Nonacosen (1,6 %)
	13 - Nonacosen (2,2 %)	11 - Nonacosen (1,4 %)
	11 - Nonacosen (1,9 %)	12 - Nonacosen (1,1 %)
C ₃₁	8 - Hentriaconten (53,7 %)	10 - Hentriaconten (49,2 %)
	10 - Hentriaconten (42,7 %)	8 - Hentriaconten (44,9 %)
	9 - Hentriaconten (1,1 %)	9 - Hentriaconten (2,7 %)
		12 - Hentriaconten (1,1 %)
C ₃₃	10 - Tritriaconten (86,6 %)	10 - Tritriaconten (84,1 %)
	12 - Tritriaconten (7,3 %)	12 - Tritriaconten (8,3 %)
	8 - Tritriaconten (4,1 %)	8 - Tritriaconten (4,8 %)
		9 - Tritriaconten (1,1 %)

Bei den Kutikulawachsen von Arbeiterinnen, Drohnen und Königinnen ergab sich ein sehr ähnliches Muster der Doppelbindungsisomere. Bei Nonacosen fanden sich bei Arbeiterinnen

mit 31,0 bis 37,0 %. Da der Anteil der Alkene am Wachs bei den Königinnen am geringsten war (Kap. II.3.3., Tab. II.6), konnte im Kutikulawachs der Königinnen Nonacosen nach der Derivatisierung nicht mehr nachgewiesen werden. Hentriaconten war dominiert von den 8- und 10-Isomeren mit 38,8 bis 52,6 %. Bei Tritriaconten waren die Doppelbindungen zu 80 % (79,3 - 86,6 %) an der Position C₁₀ zu finden (Tab. III.2 und Abb. III.2).

Tabelle III.2: Doppelbindungsisomere der Alkene bei Kutikulawachs von Arbeiterinnen, Drohnen und Königinnen von *Apis mellifera carnica* Pollm. Anteil der Isomere in % nach einer Abschätzung der Fragmente im Massenspektrum.

	Arbeiterinnen (n=5-6)	Drohnen (n=5)	Königinnen (n=4-6)
C ₂₉	8 - Nonacosen (51,1 %)	8 - Nonacosen (58,9 %)	n.d.
	9 - Nonacosen (37,0 %)	9 - Nonacosen (31,0 %)	
	10 - Nonacosen (6,3 %)	10 - Nonacosen (5,4 %)	
	7 - Nonacosen (2,5 %)	7 - Nonacosen (2,9 %)	
C ₃₁	10 - Hentriaconten (49,8 %)	10 - Hentriaconten (52,6 %)	10 - Hentriaconten (45,5 %)
	8 - Hentriaconten (44,8 %)	8 - Hentriaconten (38,8 %)	8 - Hentriaconten (41,0 %)
	9 - Hentriaconten (2,4 %)	9 - Hentriaconten (5,7 %)	9 - Hentriaconten (5,6 %)
		12 - Hentriaconten (1,1 %)	15 - Hentriaconten (3,9 %)
C ₃₃	10 - Tritriaconten (85,5 %)	10 - Tritriaconten (86,6 %)	10 - Tritriaconten (79,3 %)
	12 - Tritriaconten (9,1 %)	12 - Tritriaconten (7,9 %)	12 - Tritriaconten (7,2 %)
	8 - Tritriaconten (2,7 %)	8 - Tritriaconten (2,8 %)	15 - Tritriaconten (5,3 %)
			8 - Tritriaconten (2,3 %)
			9 - Tritriaconten (1,4 %)
			7 - Tritriaconten (1,3 %)
			11 - Tritriaconten (1,2 %)

n.d. = nicht detektiert

Die Anteile der geradzahligen Doppelbindungsisomere nehmen mit zunehmender Kettenlänge der Alkene zu (Tab. III.1 und Tab. III.2). So wies das 9-Isomer bei jungem Wachs einen Anteil von 8,9 % bei Nonacosen, und 1,1 % bei Hentriaconten auf. Bei Tritriaconten fiel es unter die <1 %, die bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurden. Im alten Wachs und in den Kutikulawachsen war dieser Trend zum Teil sogar noch deutlicher zu beobachten.

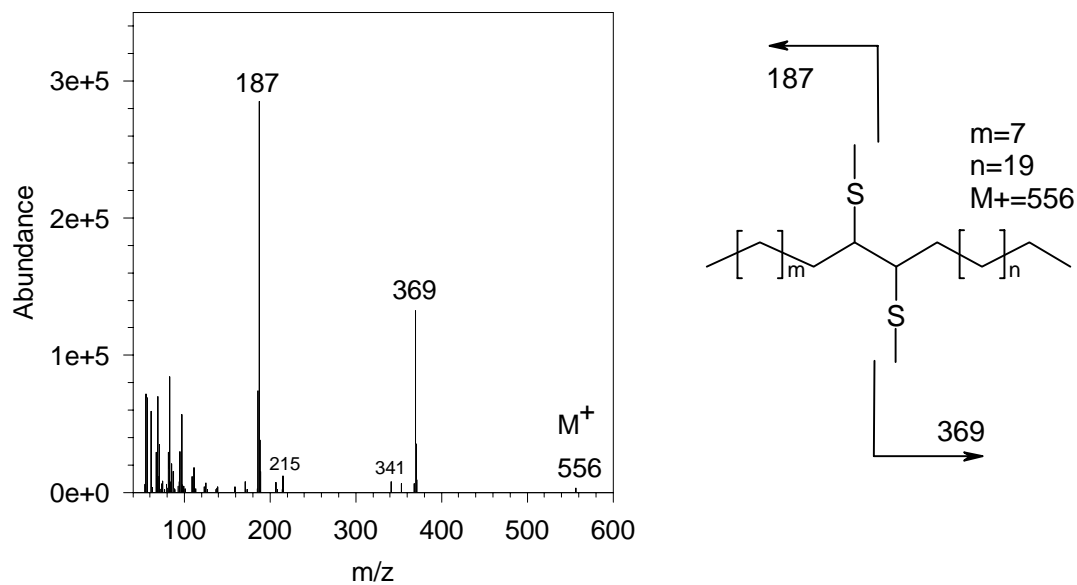


Abbildung III.2: Spektrum von Di(methylthio)tritriacontan des Drohnen-Kutikulawaxes und Strukturformel für 10,11- Di(methylthio)tritriacontan mit den charakteristischen Fragmenten des Massenspektrums, (m/z = Ionenmasse).

III.4. Diskussion

Anhand der Ergebnisse des Vorversuchs mit 1-Eicosen konnte gezeigt werden, daß die Methode der Methylthiolierung auch bei kleinen Mengen durchführbar ist. Es erfolgt nach genügend langer Reaktionszeit eine 100 %ige Derivatisierung der Alkene. Die Methylthiolierung ist somit eine einfache Methode, die Position von Doppelbindungen bei Alkenen eines Kohlenwasserstoff-Gemisches zu bestimmen, wobei nur ein Reaktionsschritt dazu notwendig ist, stabile Derivate für die Gaschromatographie zu erhalten.

Carlson et al. (1989) fanden ebenso die Zunahme der geradzahligen Isomere mit zunehmender Kettenlänge der Alkene. Dies könnte mit Hilfe der Biosynthese der Alkene erklärt werden. Bei der Biosynthese von Alkenen des Bienenwaxes werden die C₂₃ - und C₂₅ - Alkene bevorzugt aus Säuren gebildet, die zuvor zu (Z)-9- Säuren desaturiert wurden. Die C₃₁ - und C₃₃ - Alkene werden aus den Vorstufen (Z)-8- Säuren und (Z)-10- Säuren synthetisiert (Blomquist et al. 1980). Dieser Biosyntheseweg spiegelt sich in der Zusammensetzung der C₃₁ - und C₃₃ - Alkene aller Wachse wider.

In einer früheren Arbeit wurde Nonacosen und Hentriaconten von Arbeiterinnen-Kutikulawachs als Mischung von (Z)-8-, (Z)-9- und (Z)-10-Isomeren identifiziert, Tritriaconten war dominiert von (Z)-10-Isomeren (McDaniel et al. 1984). In der Studie von Carlson et al. (1989) hatte das Wabenwachs von europäischen Honigbienen einen Anteil von 45 % 8-Hentriaconten, 55% 10-Hentriaconten, 91 % 10-Tritriaconten und 9 % 12-Tritriaconten. Dies entspricht recht genau den hier geschätzten Werten für die Wabenwachse. Auch für die Alkene im Kutikulawachs der Arbeiterinnen stimmen deren Ergebnisse mit den hier gezeigten recht gut überein. Somit kann mit einer einfachen Abschätzung der Intensität der Fragmente eines Di(methylthio)alkan-Massenspektrums eine gute Bestimmung der quantitativen Anteile der Doppelbindungsisomere des zugehörigen Alkens erreicht werden. Da diese Ergebnisse nur auf einer Abschätzung beruhen und nur eine kleine Stichprobenanzahl vorliegt, wurde keine statistische Analyse bezüglich signifikanter Unterschiede in den Alkenen durchgeführt. Es scheint allerdings kein Unterschied zwischen den Positionen der Doppelbindungen in den Alkenen der jeweiligen Wachse zu bestehen.