

Den Trieben auf der Spur

Seit einigen Jahren ist der Wissenschaft bekannt, dass nicht nur Insekten, sondern auch Wirbeltiere Pheromone produzieren und mit den Wirkmechanismen der Chemie auf molekularer Ebene kommunizieren. Doch noch sind nicht alle Geheimnisse aus dem molekularen Mikrokosmos gelüftet. Die instrumentelle Analytik hilft dabei. Zum Nachweis der gering konzentrierten, flüchtigen chemischen Botenstoffe braucht es die Kapillar-GC, verbunden mit einer effektiven Extraktionstechnik.

Pheromone spielen eine Rolle bei aggressivem Verhalten sowie für den Nestbau- und Sexualtrieb. Forscher der Universität des Saarlandes konnten zeigen, dass der enge Kontakt trächtiger Mäuseweibchen mit fremden Männchen einen Schwangerschaftsabbruch hervorruft (Bruce-Effekt) – ausgelöst durch sogenannte MHC-Peptide. Spezielle Stoffe im Urin von Mäusemännchen fördern die frühe Fortpflanzungsfähigkeit weiblicher Jungtiere (Vandenbergh-Effekt), und Pheromone im Urin weiblicher Mäuse unterdrücken den Brunstzyklus in Gruppen lebender Mäuse (Lee-Boot-Effekt), während dieser durch ein Pheromon im Urin männlicher Tiere bei geschlechtsreifen Mäuseweibchen induziert wird (Whitten-Effekt).

Inwieweit Entwicklung und Verhalten des Menschen ebenfalls durch Pheromone beeinflusst werden, darüber ist sich die Wissenschaft nicht wirklich im Klaren. Noch kratzt man nur an der Oberfläche des Phänomens. Zumindest aber, so viel scheint sicher, spielen chemische Botenstoffe, die in oder auf der Haut gebildet werden, eine nicht unwesentliche Rolle im menschlichen Miteinander.

Laut Dr. Martin Wiesmann, Direktor der Klinik für Neuroradiologie am Universitätsklinikum Aachen, fühlen sich Probanden, die den Angstschweiß anderer Menschen riechen, ängstlicher und verhalten sich vorsichtiger, ohne dies tatsächlich begründen zu können. Andere Versuche hätten gezeigt, dass nicht alle Menschen in gleicher oder ähnlicher Weise auf ein und dasselbe chemische Signal reagieren. U. a. spielen geschlechtsspezifische Faktoren eine Rolle: Während der Angstschweiß eines Mannes seinesgleichen in Alarmbereitschaft versetzt, hat er auf Frauen eine beruhigende Wirkung.

Je mehr die Wissenschaft über Einfluss und Funktion der Pheromone in Erfahrung bringt, desto mehr Fragen wirft sie auf. Allem Anschein nach verhält es sich mit der Pheromonwirkung wie mit dem Eindruck eines Duftes, der stets auf einer komplexen Mischung unterschiedlicher chemischer Verbindungen basiert; Blumen- und

Pheromonen effizient und sensitiv zu Leibe rücken

Kräutergerüche etwa bestehen zum Teil aus hunderten einzelner Duftkomponenten [1]. Die Vermutung liegt nahe: Um Ursache und Wirkung und die Funktionsweise von Pheromonen aufzuklären, braucht es eine der Duftstoffforschung vergleichbare Bestimmung des gesamten Profils mittels einer sensitiven Trenn- bzw. Analysetechnik.

Größe und Flüchtigkeitsgrad der Pheromone erfordern den Einsatz der Kapillar-Gaschroma-

tographie, verbunden mit einer leistungsfähigen Detektion; die geringe Konzentration der Verbindungen in Urin und Gewebe wiederum verlangt eine effiziente Extraktionstechnik. Die heute erreichbare Sensitivität moderner Analysensysteme hilft, Leben zu retten: Um eine für die Charakterisierung hinreichende Menge des Pheromons Bombykol zu erhalten, soll der Biochemiker Adolf Butenandt (1903-1995) noch mehrere hunderttausend Schmetterlingsweibchen als Versuchstiere geopfert haben.

Auf der Suche nach einem leistungsfähigen Extraktionsverfahren für Pheromone in biologischen Matrices überprüften Wissenschaftler um Milos V. Novotny [3] vom Department of Chemistry des Institute for Pheromone Research der Indiana University im US-Bundesstaat Indiana in Kooperation mit dem Research Institute for Chromatography in Belgien die Leistungsfähigkeit der Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) mit dem GERSTEL-PDMS-Twister als Extraktionsmedium auf Wirksamkeit. Das mit Polydimethylsiloxan (PDMS) ummantelte Rührstäbchen für Magnetrührer hat sich bereits für die Bestimmung einer Vielzahl organischer Verbindungen auch in niedrigen Konzentrationen aus wässrigen Medien bewährt, u.a. zur Analyse von Trink-, Oberflächen- und Abwasser, Eis, biologischen Matrices wie Blut, Urin, Körpergewebe und Sperma sowie von Lebensmitteln, Umweltproben und Luft.

Um die SBSE auf ihre Leistungsfähigkeit zu testen, extrahierten Novotny et al. unter anderem Hamster- und Mäuseurin [4, 5]. Die Analyse der mit der SBSE gesammelten leicht- und schwerflüchtigen Analyten erfolgte in immer gleicher, einfachster Manier – ohne Einsatz organischer Lösemittel – durch automatisierte thermische Desorption im ThermalDesorptionSystem (GERSTEL-TDS/TDSA) bezie-



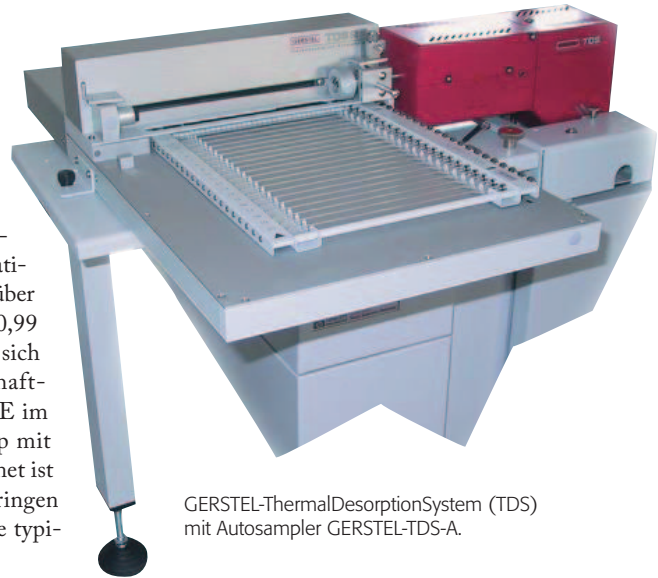
hungsweise in der ThermalDesorptionUnit (TDU), Cryofokussierung der Analyten im KaltAufgabeSystem (GERSTEL-KAS) des Gaschromatographen, temperaturprogrammierte Überführung auf die Trennsäule, anschließende gaschromatische Trennung und quantitative Bestimmung mittels Atomemissionsdetektor (verwendetes Analysensystem: GC 6890 / AED G2350A, Agilent Technologies). Die Identifizierung der Analyten gelang u. a. durch Vergleich mit bekannten Standardsubstanzen mittels masseselektiver Detektion. Dank der Cryofokussierung im GERSTEL-KAS lassen sich alle Analyten diskriminierungsfrei auf das GC-System überführen.

Zufriedenstellende Resultate auf der ganzen Linie

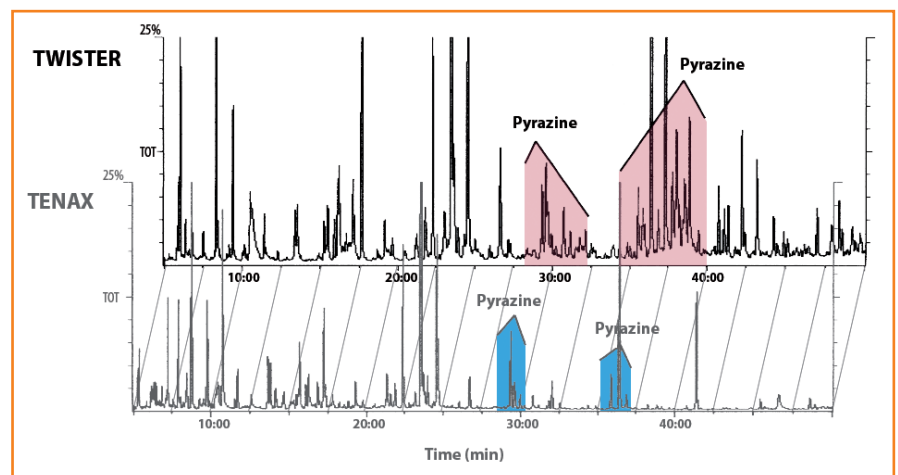
Der Urin eines männlichen Hamsters (*Phodopus campbelli*) enthält charakteristischerweise u. a. eine Anzahl alkylierter Pyrazine, die aufgrund ihrer starken endokrinen Abhängigkeit zu den chemischen Botenstoffen bei dieser Hamsterart zählen dürften. Um nun das Potenzial der SBSE zu ermitteln, stellten die Wissenschaftler der SBSE-Analyse eine Purge-and-Trap-Methode unter Verwendung von Tenax als Adsorbens gegenüber. Hier habe sich gezeigt, „dass die Extraktionsleistung der SBSE-Methode für die sehr flüchtigen Verbindungen etwas niedriger war (5-10 %), während für weniger flüchtige Verbindungen wie insbesondere die alkylierten Pyrazine eine deutlich erhöhte Leistungsfähigkeit (50-100 %) beobachtet wurde“. Dadurch eröffnen sich den Forschern neue Einblicke in diesen bisher wenig bekannten Bereich potenziell relevanter Verbindungen. Die mit der SBSE erreichten relativen Standardabweichungen der Peakflächen für sieben Verbindungen in männlichem Hamsterurin reichten von 1 bis 5 Prozent (N = 4). Der Fall sei vergleichbar mit der Bestimmung chromatographischer Profile anderer Säugtierproben.

Der Vollständigkeit halber: Die Extraktionseffizienz der SBSE mit dem GERSTEL-Twister korreliert mit der Polarität der jeweiligen Verbindungen und lässt sich über den $\log K_{OW}$ -Wert einfach abschätzen. Je hydrophober die Verbindungen seien, berichten Novotny et al., desto höher sei die Extraktionsleistung durch die eher hydrophobe PDMS-Phase. Hydrophobe Verbindungen wie Geraniol mit hohen theoretischen Wiederfindungsraten zeigten keine bessere Reproduzierbarkeit der Extraktion im Vergleich mit stärker hydrophilen Verbindungen wie 2,5-Dimethylpyrazin. Insgesamt gesehen sei die quantitative Reproduzierbarkeit der SBSE-Extraktion flüchtiger Bestandteile aus Hamsterurin relativ konstant über einen großen Bereich hydrophi-

ler und hydrophober Verbindungen. Die Linearität wurde für die Extraktion von Benzaldehyd (Dauer: 60 min) aus wässrigen Lösungen innerhalb des Konzentrationsbereichs von 0,25 bis 4,0 $\mu\text{g/L}$ beispielhaft ermittelt. Der Korrelationskoeffizient ($R^2, N = 4$) habe über den gemessenen Bereich bei $>0,99$ gelegen. Darüber hinaus habe sich gezeigt, geben die Wissenschaftler zum Besten, „dass die SBSE im Gegensatz zu Purge-and-Trap mit Tenax als Adsorbens gut geeignet ist für die Analyse von derart geringen Gehalten Benzaldehyd, wie sie typi-



GERSTEL-ThermalDesorptionSystem (TDS) mit Autosampler GERSTEL-TDS-A.



Vergleich der GC/MS-Messung (Total Ion Chromatogramm, TIC) von VOC in Hamsterurin mittels der SBSE (GERSTEL-Twister) mit der Purge-and-Trap-Methode mit Tenax als Adsorbens. Vor allem für schwerflüchtige Verbindungen zeigt die SBSE eine deutlich bessere Extraktionsleistung. (Grafik: M. V. Novotny/G. Deußing)

scherweise in biologischen Proben gefunden werden.“

Zusammenfassend lasse sich sagen, schlussfolgern Novotny et al., dass sich die SBSE als hochempfindlich, reproduzierbar und linear erweist bei der quantitativen Bestimmung leicht- und mittelflüchtiger Verbindungen im Urin von Säugtieren. Mit dieser Extraktionstechnik ließen sich relativ kleine Probenvolumina effizient verarbeiten. Darüber hinaus sei die SBSE auch geeignet für die Extraktion kleiner

organischer, in Zusammenhang mit Tiergeruch stehender Verbindungen in Luft, sprich als Passivsammler im dynamischen Probennahmemodus, sowie für die Extraktion aus Gewebe [2]. Die SBSE lässt sich ohne apparativen Aufwand parallel durchführen und erhöht den Analysendurchsatz wesentlich. Kurz: Durch den Einsatz der SBSE ließen sich neue Bereiche im komplexen Profil der chemischen Botenstoffe in Maus- und Hamsterurin erschließen, urteilen die Wissenschaftler.

Weiterführende Literatur

- [1] Guido Deußing, „Aromaprofilung mittels Headspace-Technik“, LaborPraxis 01 (2008) 60-63
- [2] Oliver Lerch, Susanne Sperling, „GC/MS-Screening von Gewebe auf Drogen- und Arzneimittlrückstände“, LaborPraxis 11 (2010) 42-44
- [3] Milos V. Novotny et al.: „Stir Bar Sorptive Extraction: A new quantitative and comprehensive sampling technique for determination of chemical signal profiles from biological media“, Journal of Chemical Ecology 31 (2005) 377-392
- [4] Helena A. Soini et al.: „Seasonal Variation in Volatile Compound Profiles of Preen Gland Secretions of the Dark-eyed Junco (Junco hyemalis)“, Journal of Chemical Ecology 33 (2007) 183-198
- [5] Helena A. Soini et al.: „Comparison of Urinary Scents of Two Related Mouse Species, Mus spicilegus and Mus domesticus“, Journal of Chemical Ecology 35 (2009) 580-589