

**Isolierung und Identifizierung von Pheromonen
und mit Pheromonen interferierenden Substanzen
bei *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta)**

Dem Fachbereich Chemie
der Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

angenommene Dissertation

von

Frank Michael Priesnitz

geboren am 18.10 1966 in Oldenburg/Niedersachsen

Erstreferent : Prof. Dr. E. Zeeck

Korreferent : Prof. Dr. W. Butte

Drittgutachter : Prof. Dr. P. Köll

Tag der Disputation : 21.01.2000

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Erich Zeeck an der Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg erstellt.

Herrn Prof. Dr. Zeeck danke ich für die höchst interessante und abwechslungsreiche Aufgabenstellung und die uneingeschränkte Förderung und Unterstützung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Werner Butte danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Mitgliedern des Arbeitskreises für das ausgesprochen freundliche und freundschaftliche Arbeitsklima und der großen Hilfsbereitschaft. Besonders erwähnt seien hier der ehemalige Mitarbeiter meines Arbeitskreises, Dr. Manfred Beckmann, sowie Ingo Röhl, die immer Zeit für interessante Diskussionen hatten und die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Große Anerkennung gilt Frau Anke Brakenhoff, der auch mein Dank für die Zucht und Pflege der Laborkultur von *Platynereis dumerilii* gebührt.

Nicht vergessen werden sollen die vielen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeiter dieser Universität, die mir im Laufe meiner Arbeit bei einzelnen Problemen hilfreich zur Seite gestanden haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Chemische Botenstoffe	2
1.2	Pheromone bei marinen Organismen	5
1.2.1	Algen	5
1.2.2	Crustaceen	6
1.2.3	Nereiden	7
1.3	Entwicklung und Fortpflanzung bei <i>Platynereis dumerilii</i>	9
1.3.1	Entwicklung zur Geschlechtsreife bei <i>Platynereis dumerilii</i> und <i>Nereis succinea</i>	9
1.3.2	Durch Sexualpheromone synchronisierte Fortpflanzung	11
1.4	Bedeutung der Sexualpheromone für <i>Platynereis dumerilii</i>	12
1.5	Pheromon mimikrierende Substanzen in Rohölen?	16
1.6	Nereiden als Bioindikatoren	17
1.7	Biotestverfahren	19
1.8	Zielsetzung	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Herkunft der Tiere	21
2.2	Biotest	22
2.2.1	Verhaltensbiologische Tests	22
2.2.1.1	<i>Platynereis dumerilii</i> -Männchen	22
2.2.1.2	<i>Platynereis dumerilii</i> -Weibchen	23
2.2.2	Elektrophysiologischer Test	24
2.2.2.1	Präparation	24
2.2.2.2	Ableitsystem und Reizgebung (Setup)	25
2.3	Probengewinnung	27
2.3.1	Komponenten aus Rohöl	27
2.3.2	Proben aus geschlechtsreifen Tieren	28
2.3.3	Proben aus Schwärnwasser	28
2.3.4	Proben aus dem Coelom der Weibchen	28

2.3.5	Extraktion von coelomfreien Weibchen	29
2.3.6	Proben aus frischem Sperma	29
2.3.7	Synthetische Proben	30
2.4	Trennmethoden	31
2.4.1	Destillation und Rektifikation	31
2.4.1.1	Materialien der Grobdestillation	31
2.4.1.2	Materialien der Feinfraktionierung	31
2.4.2	Säulenchromatographische Trennung der Ölfractionen	32
2.4.2.1	Silanisierung der Säule	33
2.4.2.2	Vorbereitung der Trennsäule	34
2.4.2.3	Durchführung der Chromatographie	35
2.4.3	Gaschromatographie (GC)	36
2.4.4	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	38
2.4.5	Zentrifugieren	40
2.4.6	Ultrafiltration	40
2.5	Anreicherungsmethoden	41
2.5.1	Festphasen Extraktion (SPE)	41
2.5.2	Grob/Hersch-Closed-Loop-Stripping	43
2.5.3	Peak-Trapping	44
2.5.4	Vakuumaufkonzentration	46
2.5.4.1	Rotationsverdampfer	46
2.5.4.2	SpeedVac-Konzentrator	46
2.5.5	Volumenreduzierung/Lösungsmittelaustausch	46
2.6	Probencharakterisierung	47
2.7	Bestimmung der Wiederfindungsrate	48
2.8	Synthesen physiologisch aktiver Verbindungen	49
2.8.1	Verwendete Lösungsmittel und Chemikalien	49
2.8.1.1	Lösungsmittel	49
2.8.1.2	Substrate	49
2.8.1.3	Verwendete Edukte	49
2.8.1.4	Strukturbeweis der synthetisierten Verbindungen	50
2.8.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Grignard-Verbindungen	50
2.8.2.1	Darstellung der Ausgangsverbindung Propylmagnesiumbromid	50

2.8.2.2	Darstellung von Phenylalkanen aus Grignard-Verbindungen	51
2.8.3	Darstellung von 1.1-Dimethylpropylbenzol nach der Friedel-Crafts-Alkylierung	52
3.	ERGEBNIS	53
3.1	Verhaltensmodifizierende Fraktionen und Komponenten in Rohöl	53
3.1.1	Ergebnisse der Diplomarbeit	53
3.1.2	Charakterisierung bioaktiver Kondensatproben	56
3.1.3	Pentylbenzolisomere im EKO-FISK Rohöl	60
3.1.4	Zusammensetzung der aktiven Trap-Proben	63
3.1.5	<i>n</i> -Hexaneluate der Destillatfraktion Nr. 17	64
3.1.6	Trap-Proben der Eluate Nr. 17 und Nr. 14	66
3.1.6.1	Verhaltensphysiologische Tests mit Trap-Proben	66
3.1.6.2	Komponentenzusammensetzung der Trap-Proben	69
3.1.6.3	Identifizierung bioaktiver Komponenten in den Trap-Proben	71
3.1.7	Synthetische Proben zur Identifizierung Spermaabgabe induzierender Verbindungen	73
3.1.7.1	Ergebnis der Synthesen einiger ausgewählter Pentylbenzol-isomere	73
3.1.7.2	Verhaltensphysiologische Tests mit synthetischen C ₅ -Alkylbenzolen	74
3.1.8	Zusammenfassung der Ergebnisse von Spermaabgabe induzierender Verbindungen aus dem Siedebereich zwischen Undecan und Dodecan des EKO-FISK Rohöl:	76
3.1.9	Effekte von Destillaten höherer Siedebereiche auf <i>P. dumerilii</i>	78
3.1.9.1	Verhaltensbiologische Tests mit Destillaten höherer Siedebereiche	79
3.1.10	Verhaltensphysiologische Tests mit aromatenhaltigen Eluatfraktionen höherer Destillatfraktionen	81
3.1.10.1	Verhaltensphysiologische Biotests mit aromatenhaltigen Fraktionen der säulenchromatographischen Trennung	81
3.1.10.2	Charakterisierung der aromatenhaltigen Eluate	83
3.1.11	Verhaltensphysiologische Tests mit Naphthalinderivaten	85

3.1.12	Zusammenfassung der Ergebnisse von verhaltensphysiologisch aktiven Verbindungen aus dem Siedebereich zwischen Dodecan und Heptadecan des EKO-FISK Rohöls	87
3.2	Verhaltensphysiologisch aktive Proben aus biologischem Material	89
3.2.1	Biotests mit Wasser von schwärmenden <i>P. dumerilii</i> -Weibchen und - Männchen	89
3.2.2	Untersuchung von Weibchenschwärmwasser	90
3.2.2.1	Versuch der Anreicherung durch Festphasenextraktion	90
3.2.2.2	Ergebnis der Festphasenextraktion	91
3.2.2.3	Vorüberlegungen für weitere Arbeitsschritte	93
3.2.3	Bestimmung der Wiederfindungsrate von 5-Methyl-3-heptanon an je 100 mg Sorbens der Phasen C18; C8; CN und NH ₂	94
3.2.4	Probengewinnung aus Homogenaten	96
3.2.4.1	Probengewinnung	96
3.2.4.2	Ergebnisse der Analyse von Eluaten aus der Festphasenextraktion mit Homogenaten	97
3.2.4.3	Ergebnisse der Biotests mit Eluaten der Festphasenextraktion	97
3.2.4.4	Adsorptionsvermögen von Harnsäure an einer Bond Elut C8-Phase	98
3.2.5	Anwesenheit von 5-Methyl-3-heptanon bei <i>P. dumerilii</i> ?	99
3.2.5.1	Analyse einer Coelomprobe von 57 Männchen	99
3.2.5.2	Homogenat von 129 Männchen	100
3.2.5.3	Homogenat von 25 Weibchen nach der G/H-CLS Methode	101
3.2.5.4	Homogenat von 62 Weibchen nach der G/H-CLS Methode	101
3.2.5.5	Biotests mit dem synthetischen Keton 5-Methyl-3-heptanon	102
3.2.6	Zusammenfassung der Teilergebnisse	103
3.2.7	Überlegungen zu den vorangegangenen Ergebnissen	104
3.3	Verhaltensphysiologisch aktive Komponente aus weiblichem Coelom	105
3.3.1	Aktive Komponenten im Coelom	105
3.3.1.1	Analyse des Coeloms	105
3.3.1.2	Biotests mit Harnsäure freiem Coelom	107
3.3.2	Aktive Komponenten außerhalb des Coeloms	107

3.3.3	Harnsäure im Schwärmwasser von <i>Platynereis dumerilii</i> -Weibchen	109
3.3.4	Zusammenfassung der Teilergebnisse	109
3.4	Elektrophysiologische Tests	111
3.4.1	Elektrophysiologische Ableitungen am Prostomium	111
3.4.2	Elektrophysiologische Ableitungen am Oberschlundganglion	113
4.	Diskussion	115
4.1	Verhaltensphysiologisch aktive Komponenten in Rohöl	115
4.2	Funktion von 5-Methyl-3-heptanon	124
4.3	Verhaltensbiologisch aktive Verbindungen bei <i>P. dumerilii</i> -Weibchen	128
5.	Zusammenfassung	134
6.	Literatur	136
A.	Chromatogramme	144

Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Chemische Botenstoffe	4
1.2	(10E, 12Z)-Hexadecadienol (Bombykol)	5
1.3	Heteronereis, epitokes Stadium	10
1.4	Funktion von Sexualpheromonen bei <i>P. dumerilii</i>	14
1.5	Erkennungspheromon <i>P. dumerilii</i> und <i>N. succinea</i>	15
1.6	Gaschromatogramm des Vakuumdestillates aus dem EKO-FISK Rohöl	17

2. Material und Methoden

2.1	Blick durch das Binokular	25
2.2	Elektrophysiologisches Setup	26
2.3	Fischer-Spaltrohr System HMS 300	32
2.4	Schematischer Aufbau der Säulenchromatographie	36
2.5	SPE-Apparatur	41
2.6	Schematischer Aufbau zur Peak-Trapping Technik	45

3. Ergebnis

3.1	Potentiell aktive Aromaten	53
3.2	Schematischer Probengewinnungsgang	54
3.3	Gaschromatogramm der Trap-Probe T3	56
3.4	Gaschromatogramm der Trap-Probe T4	57
3.5	Aceton-Trap	64
3.6	Gaschromatogramm von Eluat Nr. 17	66
3.7	Chromatogramm mit Einzelionenbetrachtung einer Trap-Probe am Beispiel von Trap Nr. 6	70
3.8	Gaschromatogramm von para <i>n</i> -Butyl-methylbenzol	74
3.9	Gaschromatogramm von Eluat Nr. 2208 mit Einzelionenbetrachtung der Fragmente $m/z = 160; 146$ und 142	84
3.10	Gaschromatogramm von Eluat Nr. 2208 mit Einzelionenbetrachtung der Fragmente $m/z = (170, 155)$ und $(156, 141)$	84
3.11	Gaschromatogramm des 4. Eluats einer NH ₂ -Phase von einer Schwärmwasserprobe	91
3.12	Gaschromatogramm (3. Eluat C8-Phase) einer Schwärmwasserprobe	92

3.13	Gaschromatogramm eine 5-M-3-H Standards	93
3.14	Schematischer Probengewinnungsgang aus Homogenaten	96
3.15	Gaschromatogramm von Eluat Nr. 2 von C8-Phase	100
3.16	Gaschromatogramm des 2. Eluates der G/H-CLS	101
3.17	Chromatogramm einer Coelomprobe auf einer RP18 _{ec} -Phase	106
3.18	Chromatogramm eines Körperhüllenextraktes; auf einer RP18 _{ec} -Phase	107
3.19	Chromatogramm eines Körperhüllenextraktes; auf einer RP18 _{ec} -Phase	108
3.20	Schematischer Probengewinnungsgang	110
3.21	Schlundkopf einer atoken <i>Platynereis</i>	111
3.22	Ableitung nach Zugabe von Eluat Nr. 17	112
3.23	Ableitung nach Zugabe von 5M3H	112
3.24	Ableitung nach Zugabe von Harnsäure	112
3.25	Ableitung am Oberschlundganglion nach Zugabe von Eluat Nr. 17	113
3.26	Ableitung am Oberschlundganglion nach Zugabe von 5M3H	113
3.27	Ableitung am Oberschlundganglion nach Zugabe von Harnsäure	114
3.28	Ableitung am Oberschlundganglion auf Zugabe von Eluat Nr. 17	114
4. Diskussion		
4.1	Strukturvergleich der Spermaabgabe auslösenden Verbindungen	118
4.2	Struktureller Vergleich zwischen Catecholaminen und bioaktiven C ₅ -Alkylbenzolen	122
4.3	Strukturvergleich zwischen Neurotransmittern und 5-M-3-H	128
4.4	Chromatogramme vom Coelomfiltrat mit und ohne Harnsäuredotierung (10 ng in der Probe)	132
A. Chromatogramme		
A.1	Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 1	144
A.2	Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 2	144
A.3	Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 3	145
A.4	Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 4	145
A.5	Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 5	146
A.6	Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 6	146
A.7	Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 7	147

A.8	Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 8	147
A.9	Chromatogramm mit Massenspektrum von (1.1-Dimethylpropyl)-benzol	148
A.10	Chromatogramm mit Massenspektrum von Ethyl-2-isopropyl-benzol	148
A.11	Chromatogramm mit Massenspektrum von Ethyl-4-isopropyl-benzol	148
A.12	Chromatogramm von <i>n</i> -Butyl-3-methylbenzol-Trap	149
A.13	Chromatogramm von <i>n</i> -Butyl-4-methylbenzol-Trap	149
A.14	Chromatogramm von <i>n</i> -Butyl-2-methylbenzol-Trap	150
A.15	Chromatogramm von Weibchenschwärmwasser über C8- Kartusche (SPE)	150
A.16	Chromatogramm von ungereinigtem Seewasser über C8- Kartusche (SPE)	151
A.17	Chromatogramm von Eluat Nr. 3, gereinigte Seewasserprobe über C8-Kartusche (SPE)	151
A.18	Chromatogramm mit SIM von Weibchenhomogenat über C8- Kartusche (SPE)	152
A.19	Chromatogramm mit SIM von Männchenhomogenat über C8- Kartusche (SPE)	152

Tabellenverzeichnis

2. Material und Methoden

2.1	Elektrophysiologisches Setup	25
2.2	Synthetisierte Alkylbenzole	30
2.3	Gaschromatographiesystem Nr. I	37
2.4	Gaschromatographiesystem Nr. II	37
2.5	Gaschromatographiesystem Nr. III	38
2.6	HPLC System	39
2.7	Ausgewählte Adsorptionsphasen der SPE	42
2.8	Arbeitsschritte der SPE	42
2.9	Verwendete Edukte	50
2.10	Synthesenübersicht	52

3. Ergebnis

3.1	Verhaltenstests mit 10 µl Probevolumen	55
3.2	Verhaltenstests mit 5 µl Probevolumen	55
3.3	Probencharakterisierung bioaktiver Acetonkondensate	57
3.4	Isomere des <i>n</i> -Pentylbenzols	58f
3.5	Pentylbenzolisomere im EKO-FISK-Öl	60
3.6	Retentionsreihenfolge identifizierter Pentylbenzolisomere	61f
3.7	Charakterisierung bioaktiver Acetonkondensate	63
3.8	Biotestergebnisse mit 2.5 µl <i>n</i> -Hexaneluaten	65
3.9	Biotests mit Aromateneluaten der Fraktion Nr. 17	65
3.10	Biotests mit 5 µl Trap-Proben der Eluate Nr. 14 und 17	67
3.11	Biotests mit Trap-Proben (variables Volumen)	68
3.12	Zusammensetzung der Trap-Proben Nr. 1 - 8	69
3.13	Vergleich der Probenzusammensetzung der aktiven Trap-Proben aus der Diplomarbeit und aktuellen Trap-Proben	71
3.14	Potentiell aktive Komponenten	72
3.15	Biotestergebnisse mit variabler Probenkonzentration	74
3.16	Ergebnisse der Biotests mit synthetischen Proben	75
3.17	Biotests mit 2.5 µl synthetischen Trap-Proben	75
3.18	Konzentrationen der synthetischen Trap-Proben	76
3.19	Retentionsbereiche weiterer Destillatfraktionen	78
3.20	Ergebnisse von Biotests mit Destillaten höherer Siedebereiche	80

3.21	Verhaltensphysiologische Tests mit Eluaten aus verschiedenen Retentionsbereichen	82
3.22	Biotestsergebnisse mit Naphthalinderivaten	86
3.23	Einfluß ausgewählter Naphthalinderivate auf das Schmärmverhalten von <i>P. dumerilii</i> -Männchen	87
3.24	Ergebnisse zur Bestimmung der Wiederfindungsrate	95
3.25	Biotestsergebnisse mit aktiven Eluat Nr. 4 von C8-SPE	98
4. Diskussion		
4.1	Zunahme der Isomere mit steigender Kohlenstoffanzahl	118

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AD	Außendurchmesser
BMB	<i>n</i> -Butyl-methylbenzol
bp	Boiling Point (Siedepunkt)
ERP	Egg release pheromone
FID	Flammenionisationsdetektor
GABA	γ -Aminobuttersäure
GC	Gaschromatographie
GC-MS	gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie
G/H-CLS	Grob/Hersch-Closed-Loop-Stripping
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
ID	Innendurchmesser
ITD	Ion Trap Detector
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
5-M-3-H	5-Methyl-3-heptanon
<i>N.</i>	<i>Nereis</i>
NSO	heteroatomhaltige (stickstoff-, schwefel- und sauerstoffhaltige Fraktion)
<i>P.</i>	<i>Platynereis</i>
p.a.	Pro Analysis
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PDA	Photodiode Array Detector
rac.	racemisch
RP-HPLC	Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography
SPE	Solid-Phase-Extraction (Festphasenextraktion)
SIM	Single Ion Monitoring (Einzelionenbetrachtung)
SRP	Sperm release pheromone

Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Chemische Botenstoffe	4
1.2	(10E, 12Z)-Hexadecadienol (Bombykol)	5
1.3	Heteronereis, epitokes Stadium	10
1.4	Funktion von Sexualpheromonen bei <i>P. dumerilii</i>	14
1.5	Erkennungspheromon <i>P. dumerilii</i> und <i>N. succinea</i>	15
1.6	Gaschromatogramm des Vakuumdestillates aus dem EKO-FISK Rohöl	17

2. Material und Methoden

2.1	Blick durch das Binokkular	25
2.2	Elektrophysiologisches Setup	26
2.3	Fischer-Spaltrohr System HMS 300	32
2.4	Schematischer Aufbau der Säulenchromatographie	36
2.5	SPE-Apparatur	41
2.6	Schematischer Aufbau zur Peak-Trapping Technik	45

3. Ergebnis

3.1	Potentiell aktive Aromaten	53
3.2	Schematischer Probengewinnungsgang	54
3.3	Gaschromatogramm der Trap-Probe T3	56
3.4	Gaschromatogramm der Trap-Probe T4	57
3.5	Aceton-Trap	64
3.6	Gaschromatogramm von Eluat Nr. 17	66
3.7	Chromatogramm mit Einzelionenbetrachtung einer Trap-Probe am Beispiel von Trap Nr. 6	70
3.8	Gaschromatogramm von para <i>n</i> -Butyl-methylbenzol	74
3.9	Gaschromatogramm von Eluat Nr. 2208 mit Einzelionenbetrachtung der Fragmente $m/z = 160; 146$ und 142	84
3.10	Gaschromatogramm von Eluat Nr. 2208 mit Einzelionenbetrachtung der Fragmente $m/z = (170, 155)$ und $(156, 141)$	84
3.11	Gaschromatogramm des 4. Eluats einer NH ₂ -Phase von einer Schwärmwasserprobe	91
3.12	Gaschromatogramm (3. Eluat C8-Phase) einer Schwärmwasserprobe	92

3.13	Gaschromatogramm eine 5-M-3-H Standards	93
3.14	Schematischer Probengewinnungsgang aus Homogenaten	96
3.15	Gaschromatogramm von Eluat Nr. 2 von C8-Phase	100
3.16	Gaschromatogramm des 2. Eluates der G/H-CLS	101
3.17	Chromatogramm einer Coelomprobe auf einer RP18 _{ec} -Phase	106
3.18	Chromatogramm eines Körperhüllenextraktes; auf einer RP18 _{ec} -Phase	107
3.19	Chromatogramm eines Körperhüllenextraktes; auf einer RP18 _{ec} -Phase	108
3.20	Schematischer Probengewinnungsgang	110
3.21	Schlundkopf einer atoken <i>Platynereis</i>	111
3.22	Ableitung nach Zugabe von Eluat Nr. 17	112
3.23	Ableitung nach Zugabe von 5M3H	112
3.24	Ableitung nach Zugabe von Harnsäure	112
3.25	Ableitung am Oberschlundganglion nach Zugabe von Eluat Nr. 17	113
3.26	Ableitung am Oberschlundganglion nach Zugabe von 5M3H	113
3.27	Ableitung am Oberschlundganglion nach Zugabe von Harnsäure	114
3.28	Ableitung am Oberschlundganglion auf Zugabe von Eluat Nr. 17	114
4. Diskussion		
4.1	Strukturvergleich der Spermaabgabe auslösenden Verbindungen	118
4.2	Struktureller Vergleich zwischen Catecholaminen und bioaktiven C ₅ -Alkylbenzolen	122
4.3	Strukturvergleich zwischen Neurotransmittern und 5-M-3-H	128
4.4	Chromatogramme vom Coelomfiltrat mit und ohne Harnsäuredotierung (10 ng in der Probe)	132
A. Chromatogramme		
A.1	Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 1	144
A.2	Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 2	144
A.3	Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 3	145
A.4	Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 4	145
A.5	Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 5	146
A.6	Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 6	146
A.7	Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 7	147

A.8	Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 8	147
A.9	Chromatogramm mit Massenspektrum von (1.1-Dimethylpropyl)-benzol	148
A.10	Chromatogramm mit Massenspektrum von Ethyl-2-isopropyl-benzol	148
A.11	Chromatogramm mit Massenspektrum von Ethyl-4-isopropyl-benzol	148
A.12	Chromatogramm von <i>n</i> -Butyl-3-methylbenzol-Trap	149
A.13	Chromatogramm von <i>n</i> -Butyl-4-methylbenzol-Trap	149
A.14	Chromatogramm von <i>n</i> -Butyl-2-methylbenzol-Trap	150
A.15	Chromatogramm von Weibchenschwärmwasser über C8- Kartusche (SPE)	150
A.16	Chromatogramm von ungereinigtem Seewasser über C8- Kartusche (SPE)	151
A.17	Chromatogramm von Eluat Nr. 3, gereinigte Seewasserprobe über C8-Kartusche (SPE)	151
A.18	Chromatogramm mit SIM von Weibchenhomogenat über C8- Kartusche (SPE)	152
A.19	Chromatogramm mit SIM von Männchenhomogenat über C8- Kartusche (SPE)	152

Tabellenverzeichnis

2. Material und Methoden

2.1	Elektrophysiologisches Setup	25
2.2	Synthetisierte Alkylbenzole	30
2.3	Gaschromatographiesystem Nr. I	37
2.4	Gaschromatographiesystem Nr. II	37
2.5	Gaschromatographiesystem Nr. III	38
2.6	HPLC System	39
2.7	Ausgewählte Adsorptionsphasen der SPE	42
2.8	Arbeitsschritte der SPE	42
2.9	Verwendete Edukte	50
2.10	Synthesenübersicht	52

3. Ergebnis

3.1	Verhaltenstests mit 10 µl Probevolumen	55
3.2	Verhaltenstests mit 5 µl Probevolumen	55
3.3	Probencharakterisierung bioaktiver Acetonkondensate	57
3.4	Isomere des <i>n</i> -Pentylbenzols	58f
3.5	Pentylbenzolisomere im EKO-FISK-Öl	60
3.6	Retentionsreihenfolge identifizierter Pentylbenzolisomere	61f
3.7	Charakterisierung bioaktiver Acetonkondensate	63
3.8	Biotestergebnisse mit 2.5 µl <i>n</i> -Hexaneluaten	65
3.9	Biotests mit Aromateneluaten der Fraktion Nr. 17	65
3.10	Biotests mit 5 µl Trap-Proben der Eluate Nr. 14 und 17	67
3.11	Biotests mit Trap-Proben (variables Volumen)	68
3.12	Zusammensetzung der Trap-Proben Nr. 1 - 8	69
3.13	Vergleich der Probenzusammensetzung der aktiven Trap-Proben aus der Diplomarbeit und aktuellen Trap-Proben	71
3.14	Potentiell aktive Komponenten	72
3.15	Biotestergebnisse mit variabler Probenkonzentration	74
3.16	Ergebnisse der Biotests mit synthetischen Proben	75
3.17	Biotests mit 2.5 µl synthetischen Trap-Proben	75
3.18	Konzentrationen der synthetischen Trap-Proben	76
3.19	Retentionsbereiche weiterer Destillatfraktionen	78
3.20	Ergebnisse von Biotests mit Destillaten höherer Siedebereiche	80

3.21	Verhaltensphysiologische Tests mit Eluaten aus verschiedenen Retentionsbereichen	82
3.22	Biotestsergebnisse mit Naphthalinderivaten	86
3.23	Einfluß ausgewählter Naphthalinderivate auf das Schmärmverhalten von <i>P. dumerilii</i> -Männchen	87
3.24	Ergebnisse zur Bestimmung der Wiederfindungsrate	95
3.25	Biotestsergebnisse mit aktiven Eluat Nr. 4 von C8-SPE	98
4. Diskussion		
4.1	Zunahme der Isomere mit steigender Kohlenstoffanzahl	118

1. Einleitung

Neben dem Sehen, Hören und Fühlen existiert noch eine weitere Möglichkeit des Reizaustausches: Die große Welt der Düfte, der sich zahlreiche Arten aus dem Tier- und Pflanzenreich zur Verständigung, der chemischen Kommunikation, bedienen. Die Untersuchung dieser „chemischen Sprache“ wird dem interdisziplinären Forschungsbereich der „Chemischen Ökologie“ zugeschrieben. Die *International Society of Chemical Ecology* definierte das Forschungsfeld auf ihrer Internet-Homepage wie folgt:

Chemical ecology came to be recognised as a distinct interdisciplinary research area about three decades ago. It deals with the intriguing chemical mechanisms which help to control intra- and interspecific interactions among living beings. All organisms use chemical signals to transmit information; chemical languages are the oldest forms of communication. Research in the field of chemical ecology is concerned with the identification and synthesis of substances which carry information, with the elucidation of receptor and transduction systems which recognise and pass on these „semiochemicals“, and with the developmental, behavioural, and ecological consequences of chemical signals“.

„International Society of Chemical Ecology“ (Internet-Homepage)

Ein Aspekt der chemischen Ökologie ist die Erforschung der chemischen Kommunikation zwischen Individuen derselben und artfremden Spezies. Voraussetzung dafür ist die interdisziplinäre Zusammenarbeit von Forschern verschiedener Fachrichtungen. Der Zooökologie obliegt dabei die Beantwortung der Frage nach einer Präsenz von chemischen Botenstoffen durch Beobachtungen bei Verhaltensstudien (Biotests), die Beschreibung von verhaltensphysiologischen Änderungen als Folge von Botenstoffen sowie u.U. das Kreieren aussagekräftiger Biotests unter Laborbedingungen. Der Analytiker zeichnet für die biotestorientierte Isolierung und Identifizierung eines oder mehrerer Botenstoffe verantwortlich. Er profitiert von Verhaltenstests im Labormaßstab und ist in der Lage aus komplexer Probenmatrix physiologisch aktive Komponenten zu isolieren und Verhaltenskorrelate dazu herzustellen. Die Beweisführung über die Struktur des identifizierten Signalstoffes wird ab-

schließlich von Retrosynthetikern angetreten. Ihre Aufgabe ist die Totalsynthese des isolierten Botenstoffes, der als Syntheseprodukt dieselben physiologischen Eigenschaften wie das natürliche isolierte Pheromon besitzen soll und damit den Kreis der Untersuchungen des Forschers nach einem chemischen Botenstoff abschließt.

Ein weiterer Aspekt der chemischen Ökologie ist die Erforschung der Einflüsse durch Chemikalien, wie z.B. Kohlenwasserstoffe, Insektizide Pestizide oder aber industrielle und städtische Abwässer und der daraus resultierenden Auswirkungen auf das Ökosystem. Auch hier ist die enge Zusammenarbeit zwischen Biologie und Chemie die Grundlage für eine erfolgreiche Forschung. Dabei liefert die Biologie Einsichten über die Verhaltensänderungen, Sterblichkeitsraten, Letalkonzentrationen, Mutagenität oder Besiedlungsraten und kann somit einen kausalen Zusammenhang zwischen Substanzen und ihren physiologischen Effekten aufzeigen. Die Aufgabe der Chemie besteht in der Suche nach diesen Verbindungen im Ökosystem und ihrer Identifikation oder dem Nachweis über die Akkumulation von „Ökotoxinen“ in den Individuen.

1.1 Chemische Botenstoffe

Sowohl Invertebraten als auch Vertebraten besitzen spezielle Gewebe, die Regulatormoleküle an das Blut abgeben. Diese Regulatormoleküle wirken ganz gezielt auf Zellen innerhalb desselben Organismus. Die Gewebe stellen die verschiedenen endocrinen Drüsen dar. Die von ihnen abgegebenen Botenmoleküle werden Hormone genannt. Der Begriff des Hormons wurde 1905 von E. H. Starling eingeführt; er stammt aus dem Griechischen und bedeutet „ich wecke auf“. In einer, aus zwei oder mehreren aufeinanderfolgenden Botenstoffen bestehenden Reihe wirken viele Hormone als primäre Botenstoffe, die in einem Zielorgan eine spezifische Antwort hervorrufen und werden ihrer chemischen Struktur nach in drei Gruppen unterschieden:

1. Peptidhormone und Glykoproteinhormone,
2. Steroidhormone und
3. Hormone als Abkömmlinge des Tyrosins.

Durch intrazelluläre Überträgerstoffe („second messenger“) wird das Hormonsignal in der Zelle umgesetzt. Zu diesen Botenstoffen gehören z.B. die Stoff-

wechselmetaboliten CO_2 ; H^+ ; O_2 und Ca^{+} , aber auch solche komplexe Moleküle wie das cAMP, die speziell als Regulatorstoffe gebildet werden.

Chemische Botenstoffe wirken auf allen Ebenen der biologischen Organisation, vom subzellulären bis zum interorganismischen Niveau. Dienen chemische Botenstoffe zur Kommunikation zwischen Individuen einer Spezies, indem sie entweder zu speziellen morphogenetischen Effekten führen („queen substance“; Unterdrückung der Ovarienentwicklung bei Bienenarbeiterinnen (Butler, 1957)) oder ein bestimmtes Verhalten auslösen, werden sie nach Karlson und Lüscher (1959) Pheromone genannt. Der Name leitet sich aus dem Griechischen pherein = übertragen und hormon = aufwecken; anregen ab.

Als oftmals leichtflüchtige Botenstoffe lösen diese spezifische Verhaltensänderungen aus. Die Signalstoffe können zwischen Individuen derselben Spezies (intraspezifisch) oder verschiedener Spezies (interspezifisch) wirken (Thiele, 1979).

Interspezifisch, also zwischen artverschiedenen Individuen wirkende Informationsträger werden in *Allomone* und *Kairomone* unterteilt (Brown et al., 1970), wobei Allomone Vorteile für das emittierende Individuum bewirken (Wehrstoffe, Warnstoffe, Blütendüfte), dagegen Kairomone den Empfänger begünstigen (Wirtsdüfte, Beutedüfte).

Pheromone lassen sich anhand der ausgelösten Verhaltensantwort weiter in Primer- und Releaserpheromone unterteilen (Wilson, 1965):

- ◆ Unmittelbar eintretende Verhaltensänderungen werden durch Releaserpheromone ausgelöst, z.B. Sexual-, Alarm- oder Aggregationspheromone.
- ◆ Primerpheromone führen dagegen zu einer physiologischen Veränderung im endokrinen System des Empfängertiers und erhöhen die Bereitschaft zum Empfang weiterer Signale.

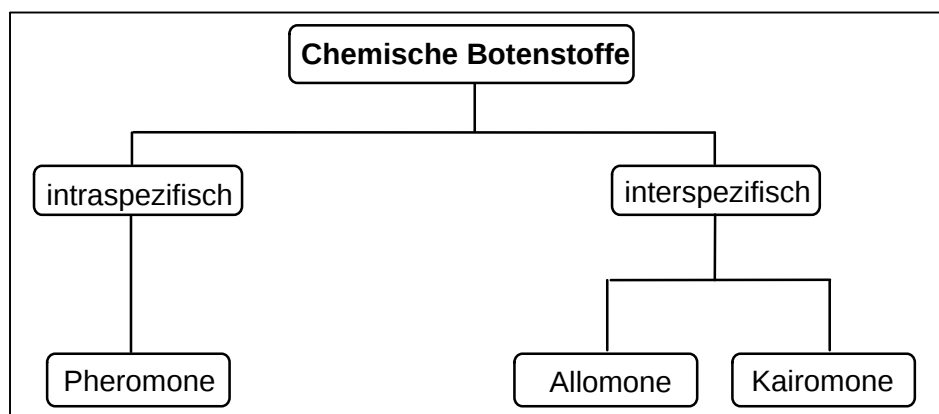


Abb. 1.1: Chemische Botenstoffe

Eine hohe Artspezifität der Pheromone wird aber in den seltensten Fällen durch die Verwendung von de novo biochemischen synthetisierten Metaboliten hervorgerufen. Der energetische Aufwand für solche selektiven Biosynthesen ist nach Thiessen (1977) zu hoch. Die Verwendung von Mehrkomponentensystemen, sogenannten Pheromonbouquets, die aus verschiedenen, strukturell unterschiedlichen Verbindungen bestehen, führt zu einer extrem hohen Artspezifität. Allein die Summe der beteiligten Komponenten und ihr bestimmtes Mengenverhältnis untereinander kann dabei einen hochspezifischen Reiz bei dem Empfänger induzieren. Auch kann die Variation der Konzentrationsverhältnisse, die praktisch eine unendliche Anzahl an Kombinationsmöglichkeiten bietet, zur Übermittlung verschiedener Nachrichten genutzt werden.

Ebenfalls sind chemische Substanzen bekannt, die zu einer "Maskierung" des Lockstoffes führen und somit eine Orientierung verhindern:

- ◆ Inhibitoren verhindern die Registrierung von einem gleichzeitig ausgebrachten Pheromon.
- ◆ Repellentien (Antilockstoffe) unterbinden die Reaktion auf einen gleichzeitig registrierten Pheromonreiz.

Intensive Untersuchungen auf dem Gebiet der Pheromonforschung begannen mit den Arbeiten Adolf Butenandts (1959) über die Isolierung des Sexuallockstoffes Bombykol der weiblichen Seidenspinner (*Bombyx mori*). Es dauerte 17 Jahre, bis die Struktur des Stoffes, der aus 500000 Tieren isoliert wurde, als (10E, 12Z)-Hexadecadienol aufgeklärt war. Die Substanz wird mit dem korrespondierenden Aldehyd Bombikal aus der Hinterleibsdrüse der weiblichen Tiere in die Luft abgegeben und löst bei den Männchen im Zentralnervensystem einen spezifischen Reiz aus (Kasang 1978; Kaißling 1978; Bestmann & Vostrowsky, 1993).

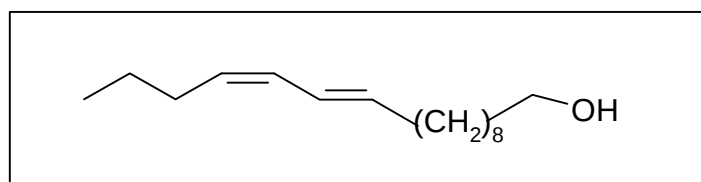


Abb. 1.2: (10E, 12Z)-Hexadecadienol (Bombykol)

1.2 Pheromone bei marinen Organismen

Im Bereich der chemischen Kommunikation bei Insekten sind weitere zahlreiche Verbindungen durch Isolierung und Identifikation bekannt. Allein bei den Schmetterlingen (*Lepidoptera*) sind über 200 Sexuallockstoffe identifiziert worden.

Zu der Vielzahl an bereits bekannten Substanzen werden ständig neue Botenstoffe identifiziert. Auch liegt ein Hauptaugenmerk der aktuellen Forschung auf der Aufklärung des Baus und der Funktionsweise von Chemo- bzw. Pheromonrezeptoren, sowie die Signaltransduktion zwischen dem Rezeptor und dem zuständigen Zentralnervensystem (ZNS).

Im marinen Bereich sind im Vergleich zum terrestrischen Bereich nur wenige Pheromone strukturaufgeklärt. Dies mag einerseits mit analytischen und experimentellen Schwierigkeiten bei der Anreicherung, Isolierung und Identifizierung von Substanzen aus dem aquatischen Milieu zusammenhängen, andererseits aber auch an der geringen wirtschaftlichen Bedeutung von Botenstoffen aus marinen Organismen liegen.

1.2.1 Algen

Neben den zahlreichen Strukturaufklärungen bei Insektenpheromonen konnten ebenfalls einige volatile Substanzen aus dem marinen Bereich eindeutig identifiziert werden. Gut erforscht und strukturaufgeklärt sind hierbei die Gametenlockstoffe der Braunalgen, die zumeist als Mehrkomponentengemisch, sogenannten Pheromonbouquets, emittiert werden (Jaenicke 1977; Jaenicke & Boland 1982; Müller et al., 1982a, b). Dabei locken die Gameten der weiblichen Braunalgen durch Abgabe flüchtiger Komponenten die männlichen Geschlechtspartner an. Bei der Großzahl dieser Verbindungen handelt es sich um ungesättigte, azyklische und/oder alizyklische C₁₁-Kohlenwasserstoffe, die als Mischungen sowohl aus Isomeren verschiedener Konfiguration als auch aus deren Enantiomeren zusammengesetzt sein können (insgesamt 11 C₁₁-Kohlenwasserstoffe und 50 Stereoisomere). Die Konzentration dieser Lockstoffe erstreckt sich sowohl für die Ausschüttung als auch für die Detektion durch den Sexualpartner auf einen Bereich zwischen 1 - 1000 ppm (Boland, 1995). Die Sekretion von Pheromobouquets innerhalb der Algenkommunikati-

on interpretiert Boland (1983) als "chemische Kriegführung", um eine interspezifische Reaktion der in demselben Habitat vertretenen Algen zu unterdrücken (Artabgrenzung). Dabei sollen die Gameten der eigenen Art angelockt, die einer artfremden irritiert werden.

Ein weiteres Pheromon konnte aus der Grünalge *Volvox carteri* isoliert werden. Dabei handelt es sich um ein hocheffizientes Glycoprotein, das in einer Konzentration von $< 10^{-16} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ die Umwandlung von geschlechtslosen zu geschlechtlichen Individuen und damit die Bildung von geschlechtlichen Organismen der nächsten Generation initiiert (Amon, 1998).

1.2.2 Crustaceen

Seit 1966 ist durch die Arbeit von Ryan (1966) die Wirkung von Sexualpheromonen auf einen marinen Organismus, die Krabbe *Potunus sanguinolentus*, nachgewiesen, wobei aber eine Strukturaufklärung nicht möglich war. Aus zahlreichen weiteren Beobachtungen und Biotests mit Crustaceen ist die chemische Kommunikation zum Zweck der Geschlechtererkennung bekannt. Den Beweis der Präsenz von Pheromonen bei Krebsen konnten Ameyaw-Akumfi und Hazlett (1975) erbringen. Nach dem Umsetzen eines Männchens der Spezies *Procambarus clarkii* in das Wasser seiner Geschlechtsgenossen zeigte es ein aggressives Verhalten. Nach dem Umsetzen in das Hälterungswasser von Weibchen, zeigte das Männchen Unterwürfigkeit oder Freiverhalten. Eine genaue Identifikation blieb aus, jedoch wurden Kohlenhydrate als mögliche Pheromone vorgeschlagen.

Bei den Hummern *Homarus americanus* konnten bereits Verhaltensänderungen durch den Einfluß von Pheromonen eindeutig bewiesen und der Urin als die Pheromonquelle lokalisiert werden (Breithaupt et al., 1999; Atema und Cowan, 1986; Atema und Engstrom, 1971). Dazu wurden den Hummern Katheder an die Harnöffnungen angelegt und der Urin gesammelt. In anschließenden Biotests besaß das Hälterungswasser des kathederisierten Tieres keine verhaltensphysiologische Wirkung. Von der Isolierung oder der Identifizierung eines Pheromons wurde aber bislang nicht berichtet.

Snell et al. (1995) isolierten und charakterisierten das erste Sexualpheromon von marinen Rotifer (Rädertierchen) *Brachionus plicatilis*. Bei diesem Kontakt-

und Paarungspheromon handelt es sich um ein 29 kDa großes Glycoprotein, an das glycosidisch Oligosaccharide, bestehend aus N-Acetylglucosamin, Mannose und Fucosereste gebunden sind. Dabei übt das Oligosaccharid die pheromonale Wirkung aus, die in der Erkennung des Weibchens durch das Männchen besteht.

1.2.3 Nereiden

In Bezug auf ihre chemische Kommunikation gehören Nereiden (Annelida, Polychaeta) zu den im marinen Bereich am besten untersuchten Invertebraten. Innerhalb der letzten Dekade nahm die Anzahl an Publikationen über identifizierte und charakterisierte Sexualpheromone erheblich zu. Zumeist wurden flüchtige Verbindungen aus dem Coelom von Nereiden isoliert. Zeeck und Hardege (1990a) konnten aus dem Coelom geschlechtsreifer *Nereis virens* einen Pheromonkomplex mit Hilfe der Grob/Hersch closed-loop-stripping-Methode (G/H-CLS) isolieren und darin eine größere Anzahl an flüchtigen Komponenten identifizieren. Darunter befanden sich unter anderem aus der Gruppe der Ketone die Enantiomere des 5-Methyl-3-heptanons, aus der Gruppe der Alkenone die zwei Isomere E,E- und E,Z-3.5-Octadien-2-on sowie einige Aldehyde, die sich aber auch aus dem Seewasser anreichern ließen.

Hardege konnte ebenfalls mit der G/H-CLS aus dem Coelom von *Nereis succinea* ein Sexualpheromon isolieren, das in einer Konzentration von $1.5 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ bei Männchen zu einer Steigerung des Schwärmverhaltens und zu der Abgabe einer kleinen Menge Sperma führte (Hardege, 1991; Zeeck et al., 1990b; Hardege et al., 1991). Eine Komponente konnte aus dem Coelom von *Nereis japonica*-Weibchen mit der G/H-CLS-Technik isoliert und ebenfalls als 3.5-Octadien-2-on identifiziert werden (Bartels-Hardege et al., 1996). In elektrophysiologischen Tests konnte mit dieser Verbindung eine deutliche Erhöhung des Ruhepotentials hervorgerufen werden und in verhaltensphysiologischen Tests führte 3.5-Octadien-2-on zu einer drei- bis vierfachen Steigerung der Schwimmgeschwindigkeit. Eine nachfolgende Gametenabgabe konnte in keinem Fall beobachtet werden.

Eine neues, spezifisches Sexualpheromon konnte mit der G/H-CLS bei der Polychaetenspezies *Arenicola marina* isoliert werden (Hardege et al., 1996).

Sowohl in Männchen als auch in Weibchen konnte dabei 2-Ethyl-1-hexanol identifiziert werden, das bei geschlechtsreifen Weibchen, die sich in ihren Wohnröhren befanden, zu einer Pumpbewegung führte. Diese Pumpbewegung soll den Befruchtungserfolg der Eier erhöhen, indem die im Wasser enthaltenen Spermatozoen in die Röhren gepumpt und somit direkt zum Weibchen transportiert werden.

Als Bestandteile des ersten Pheromonkomplexes bei Nereiden, der die Eiabgabe bei den Polychaeten *N. succinea* induziert, wurden aus dem Coelom Inosin, L-Glutaminsäure und L-Glutamin isoliert und identifiziert (Zeeck et al., 1998b). Ebenfalls in demselben Jahr gelang die Isolierung und Identifizierung des Spermaabgabe induzierenden Pheromons aus dem Coelom von *N. succinea*-Weibchen (Zeeck et al., 1998c). Durch die Hochdruckflüssigchromatographie über eine RP18-Phase (RP-HPLC) konnte eine bioaktive Fraktion, bestehend aus einer Komponente, abgetrennt werden. Die kernmagnetischen Resonanzspektroskopieuntersuchungen ergaben für das Pheromon L-Cystein-Glutathion-Disulfid. In Biotests konnte mit einem Volumen von 0.4 µL einer 10^{-5} molaren Lösung bei schwärmenden Männchen eine Spermaabgabe induziert werden und die Reizschwelle wurde mit $0.6 \cdot 10^{-7}$ Mol bestimmt.

1.3 Entwicklung und Fortpflanzung bei *Platynereis dumerilii*

Aufgrund ihres charakteristischen Reproduktionsverhaltens sind Nereiden ein hervorragend geeigneter Untersuchungsorganismus zur Erforschung, von durch Sexualpheromone synchronisierte Fortpflanzungsprozesse (Fong, 1993). Dabei liegt das Hauptaugenmerk der chemischen Ökologie der Universität Oldenburg auf den beiden Polychaetenarten *Platynereis dumerilii* (Audouin und Milne-Edwards, 1833) und *Nereis succinea* (Frey und Leuckart, 1847).

1.3.1. Entwicklung zur Geschlechtsreife bei *Platynereis dumerilii* und *Nereis succinea* (Hauenschild, 1969)

Die zunächst am Meeresboden in Gespinnströhren benthisch lebenden atoken Würmer machen im Alter von 6 bis 8 Monaten eine Metamorphose durch. Innerhalb von ein bis zwei Wochen setzt dann die epitoke Entwicklung ein, die zur Ausbildung des geschlechtsreifen Heteronereis-Stadiums führt und auf diese Weise die atoke Lebensphase beendet (Abbildung 1.3 zeigt das epitoke Stadium eines *P. dumerilii*). Als Epitokie wird die im Zusammenhang mit der Geschlechtsreife auftretende Veränderung des äußeren Erscheinungsbildes bezeichnet.

Diese Metamorphose wird damit eingeleitet, daß die Tiere ihre Gespinnströhren nicht mehr verlassen und vollständig zu fressen aufhören. Das Coelom dehnt sich in Folge der Zunahme an Keimzellen und Elaeocytenmasse permanent aus. Der Farbeindruck der Würmer wird im steigenden Maße von den Keimzellen bestimmt. Die Weibchen nehmen die gelbliche Tönung der reifen Eier an, die Männchen in der vorderen Hälfte die grünlich, weiße Färbung des Spermas. Dies ermöglicht eine leichte Unterscheidung zur Trennung der Tiere vor dem Schwärmstadium.

Schließlich bilden sich die Parapodien der hinteren epitoken Körperhälfte zu Ruderorganen um, die die Heteronereiden zu schnellerem Schwimmen befähigen. Außerdem wachsen dem Männchen an den Dorsalzirren der ruderähnlichen, hinteren Parapodien zahlreiche Papillen, die zu einem kammartigen

Aussehen des Zirrus führen. Boilly-Marer (1974) identifizierte diese Parapodialzirren als chemosensitive Rezeptoren für Pheromone.

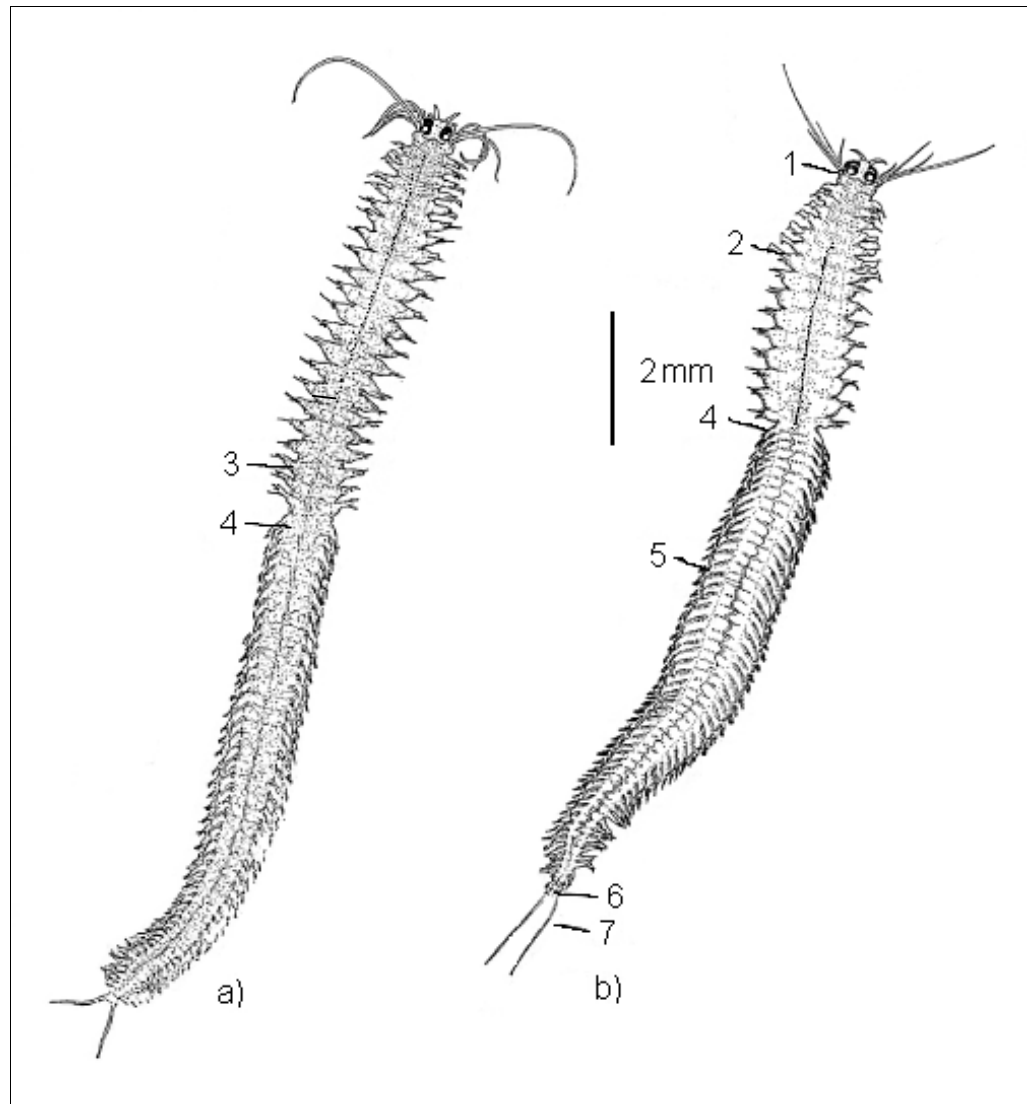


Abb. 1.3: Heteronereis, epitokes Stadium

a) = <i>P. dumerilii</i> Weibchen	b) = <i>P. dumerilii</i> Männchen
1 = Augen	2 = Dorsalzirren
3 = durchscheinende Eier	4 = erstes Parapodium
5 = Dorsalgefäß	6 = Pygidium
7 = Uriten	

Ferner entwickelt sich ein Teil der hohlen Papillen am Pygidium weiter, aus denen später das Sperma ausgestoßen wird. Ein Kranz von Muskelfasern zwischen Darm und Körperwand vermag wie ein Diaphragma das Pygidium gegen die übrige Leibeshöhle abzudichten. Dadurch wird dem Männchen ermöglicht, die Spermaabgabe in rhythmischen Abständen zu unterbrechen.

Die Reifung der Geschlechtsprodukte und die Epitokie sind voneinander unabhängige Prozesse. Beide Vorgänge werden durch abnehmende Ausschüttung von Hormonen zeitgleich in Gang gesetzt; der Verlauf der endokrinen Aktivität des ZNS bestimmt den Fortpflanzungstermin.

Diese Hormonbildung unterliegt einem quasi-lunaren, endogenen Rhythmus, der durch photoperiodische Einflüsse (Mondlicht, durch Zeitschaltuhr gesteuertes Licht bei Hälterung) in allen Tieren einer Population, wie z.B. bei *P. dumerilii* und *N. succinea* (Fong, 1991), synchronisiert wird.

Somit ist das periodisch gehäufte Auftreten reifer Heteronereiden (Bruttschwärme) mit den Mondphasen korreliert.

1.3.2 Durch Sexualpheromone synchronisierte Fortpflanzung

(Hauenschild und Fischer, 1969; Boilly-Marer; 1981; Boilly-Marer und Lassale, 1978)

Die Fortpflanzung von *P. dumerilii* erfolgt bei Wassertemperaturen oberhalb von 12°C. Zu diesem Zweck verlassen die Tiere nach Einbruch der Dunkelheit ihre Wohnröhren. An der Wasseroberfläche schwimmend, vereinigen sie sich dort zu großen Bruttschwärmen. Finden sich die Geschlechter, ändert sich ihr Schwimmverhalten in der Weise, daß sich viele Männchen schnell in engen Kreisen um ein langsamer schwimmendes Weibchen bewegen (Hochzeits-tanz). Durch ein Pheromon des Weibchens stimuliert, gibt das Männchen eine kleine Menge Sperma in den Wasserkörper ab. Ein darin enthaltenes Pheromon veranlaßt das Weibchen zum vollständigen Ablaichen. Ein mit den Eiern abgegebenes Pheromon führt wiederum zu einem verstärkten Reiz auf die Männchen, die nun ihrerseits mit rhythmischen Unterbrechungen größere Spermamengen zur Befruchtung der Eier abgeben. Eine photo- und lunarperiodisch synchronisierte Reifung der Keimzellen ist ebenso notwendig für eine erfolgreiche Fortpflanzung, wie eine streng durch Pheromone gesteuerte Synchronisation des Reproduktionsverhaltens, da die reifen Geschlechtsprodukte innerhalb des Coeloms nur mehrere Stunden und im Wasser nur einige Minuten befruchtungsfähig bleiben.

Beckmann (1996) beschrieb zur Beurteilung und zur Durchführung von verhaltensphysiologischen Tests einige Unterschiede im Fortpflanzungsverhalten der beiden Polychaetenarten: So konnte er beobachten, daß das Schwärm-

und Fortpflanzungsmaximum bei *P. dumerilii* in nur einer Nacht liegt. Die Tiere verendeten unabhängig vom Geschlecht am darauffolgenden Tag. Jedoch ließen sich einzelne Individuen für einen weiteren Tag im Kühlschrank bei 8°C für Biotestzwecke aufbewahren. Beide Geschlechter von *N. succinea* hingegen sind in Abhängigkeit von Witterungs- und Temperaturverhältnissen in der Lage ihre Reproduktion zu unterbinden. Auch war es möglich, einzelne Tiere zu Biotestzwecken für mehr als zwei Wochen im Kühlschrank bei 8°C zwischenzulagern.

1.4 Bedeutung der Sexualpheromone für *Platynereis dumerilii*

Durch Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe von Boilly-Marer (1981, 1986) wurde die Präsenz von Pheromonen bei der Fortpflanzung von *Platynereis dumerilii* eindeutig nachgewiesen. Sie sind im Coelom lokalisiert und sollen zusammen mit den Gameten in die Wassersäule abgegeben werden. Durch Extraktion und Aufarbeitung durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) aus einem Homogenat von 800000 Männchen erhielt man eine Fraktion mit einer beim Weibchen die Gametenabgabe auslösenden Substanz. Der Versuch der Strukturermittlung wies auf das Steroid Gorgosterol, einem Cholesterol-Derivat, hin. Jedoch konnte die pheromonale Wirkung von Gorgosterol oder anderer im Coelom befindlicher Steroide in den Arbeiten von Zeeck et al. (1990) nicht bestätigt werden.

Die Beobachtungen aus dem Fortpflanzungsverhalten legen den Schluß nahe, daß die in mehrere Phasen unterteilte Reproduktion an mehrere wirkungsspezifische Pheromone gekoppelt ist.

1. Die Heteronereiden verlassen am späten Abend ihre Wohnröhren und schwimmen an die Wasseroberfläche. Die Männchen schwimmen dabei ungerichtet mit relativ hoher Geschwindigkeit durch das Wasser auf der Suche nach dem Sexualpartner. Die Weibchen dagegen schwimmen langsamer in Kreisen in einem lokal begrenzten Bereich.
2. Haben sich die Geschlechter getroffen, wobei immer das Männchen das Weibchen findet, und im Regelfall mehrere Männchen sich bei einem

Weibchen befinden, schwimmen alle Beteiligten in einem etwa faustgroßen Raum mit hoher Geschwindigkeit in engen Kreisen umeinander, dem sogenannte Hochzeitstanz (*danse nuptial*; Boilly-Marer, 1974). Das Weibchen stimuliert dabei die anwesenden Männchen mit einem Pheromon (Partnererkennungspheomon; MRP = *mate recognition pheromone*) zur Abgabe einer kleinen Portion Sperma.

3. Ein mit der kleinen Menge Sperma in das Wasser gelangte Pheromon (Eiabgabe-Pheromon; ERP = *egg release pheromone*) veranlaßt das Weibchen spontan das Coelom und damit die Eier vollständig abzulaichen. Danach sinkt das Weibchen als „leere Hülle“ zu Boden, verendet oder dient den Fraßfeinden als Nahrung.
4. Die abgegebene Coelomflüssigkeit enthält neben den Eiern ein weiteres Pheromon (Spermaabgabe-Pheromon; SRP = *sperm release pheromone*), nach dessen Detektion die Männchen ihr Sperma zur Befruchtung der Eier in das Wasser abgeben. Das weitere Schicksal der Männchen ist abhängig von der abgegebenen Spermamenge: Gibt das Tier nur eine kleine Menge Sperma ab, schwimmt es anschließend auf der Suche nach einer neuem Sexualpartner weiter (häufiger bei *N. succinea* zu beobachten). Führt dagegen der Pheromonreiz zur Abgabe der kompletten Spermamenge, sinkt das Männchen ebenfalls zu Boden und verendet (stets im Labor bei *Platynereis dumerilii* zu beobachten).

Diese Sexualpheromone gelangen aus der Coelomflüssigkeit zusammen mit den Gameten in den Wasserkörper oder werden aus exokrinen Drüsen dort hinein abgegeben.

An der Universität Oldenburg gelang es der Arbeitsgruppe "Chemische Ökologie" (Zeeck, 1988) durch Anreicherung nach der G/H-CLS-Technik eine verhaltensphysiologisch aktive Komponente aus der Coelomflüssigkeit von *P. dumerilii* zu isolieren und mit Hilfe der gekoppelten Gaschromatographie-Massenspektrometrie zu identifizierten. Bei dieser isolierten Substanz handelte es sich um das chirale Keton 5-Methyl-3-heptanon (Abbildung 1.5). Sowohl in elektrophysiologischen als auch verhaltensphysiologischen Experimenten konnte eine enantioselektive Spezifität dieser chiralen Substanz nachgewiesen werden: Das S(+)-Enantiomer fand sich nur in der Coelomflüssigkeit von Männchen und induzierte bei den schwärmenden Weibchen das schnelle Schwimmen in engen Kreisen. Umgekehrt induzierte das R(-)-Enantiomer die Abgabe einer sehr kleinen Portion Sperma in das Wasser und

ließ sich nur bei *P. dumerilii*-Weibchen nachweisen. Abbildung 1.4 gibt die Funktionsweise der Sexualpheromone zwischen Weibchen und Männchen wieder (Hardege, 1997)

Die Männchen von *N. succinea* und *P. dumerilii* geben auf Zugabe von R(-)-5-Methyl-3-heptanon jeweils eine kleine Menge Sperma ab und leiten somit den Hochzeitstanz ein. Zwischen den Spezies zeigt sich aber ein deutlicher Unterschied in der Höhe der Detektionsschwellengrenze. *P. dumerilii* reagierte bereits bei einer Konzentration von $1.5 \cdot 10^{-12} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, wohingegen bei *N. succinea* erst eine Reizantwort bei einer Konzentration von $1.5 \cdot 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ erhalten wurde. Die unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Spezies gegenüber R(-)-5-Methyl-3-heptanon wurde dabei als „Artabgrenzung“ der in demselben Habitat (Isefjord, Dänemark) und fast gleichzeitig schwärmenden Nereiden interpretiert.

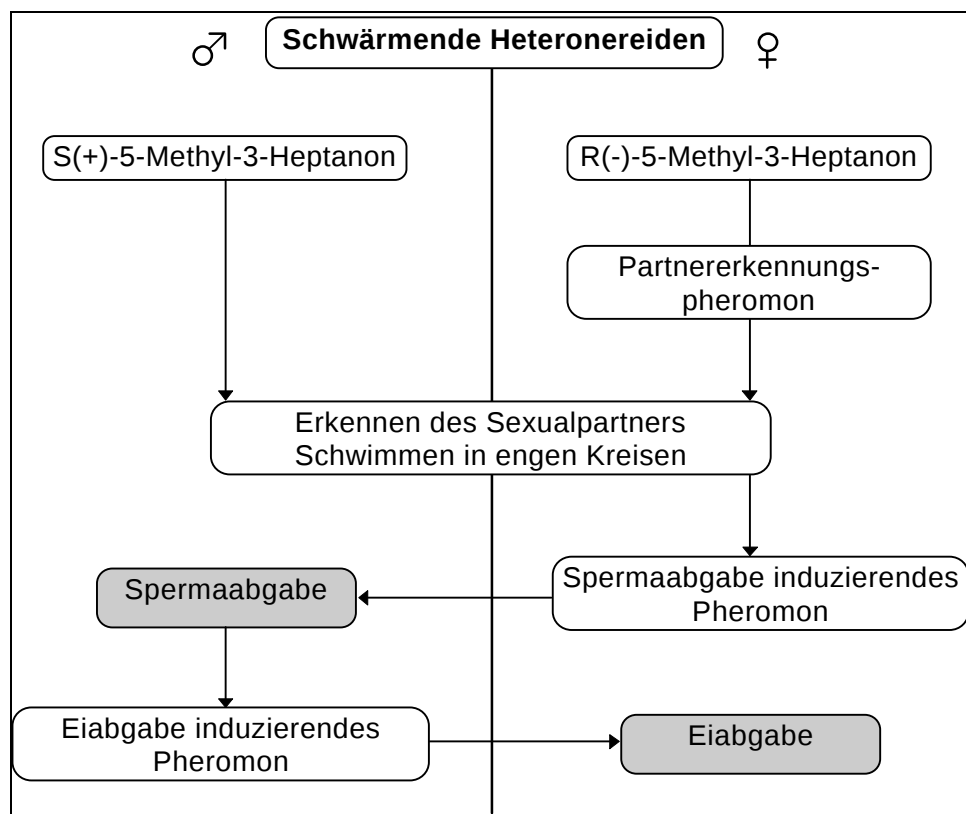


Abb. 1.4: Funktion von Sexualpheromonen bei *P. dumerilii*

Eine komplette Abgabe der Gameten konnte allerdings in keinem der untersuchten Fälle beobachtet werden. Dies ist allein durch frisches Coelom des anderen Geschlechts möglich.

Elektrophysiologische und verhaltensphysiologische Tests zeigten eine enantiomerenabhängige geschlechtsspezifische Wirkung auf *P. dumerilii*. Wie die Verhaltenstests eindeutig belegten, wirkte auf die Weibchen nur S(+)-5-Methyl-3-heptanon als Pheromon, auf Männchen dagegen nur das R(-)-Enantiomer.

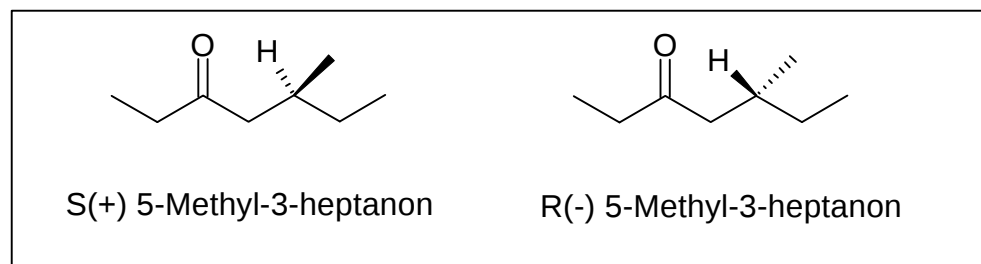


Abb. 1.5: Erkennungspheromon bei *P. dumerilii* und *N. succinea*

Ebenfalls mit Hilfe der Anreicherungsmethode nach G/H-CLS konnten aus der Körperflüssigkeit von *P. dumerilii* 5-Methyldecan und 3.5-Octadien-2-on isoliert und identifiziert werden (Zeeck et al., 1991; Hardege, 1991).

Dabei reagierte ein Teil der im Experiment untersuchten Weibchen, die schon seit längerer Zeit ohne *P. dumerilii*-Männchen geschwärmt hatten, im verhaltensphysiologischen Biotest auf 3.5-Octadien-2-on mit einer Eiabgabe. Die isolierten E,E- und E,Z-Isomere unterschieden sich nicht in ihrer Wirkung und stellen in keinem Fall das natürliche, die Eiabgabe induzierende Pheromon dieser Spezies dar.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen mit dem aus dem Coelom isolierten 5-Methyldecan an *P. dumerilii*-Männchen führten stets zu einer Potentialänderung im Vergleich zum Ruhepotential. Bei Weibchen konnte dagegen mit 4-Methyldecan ein Reiz in elektrophysiologischen Experimenten beobachtet werden. In verhaltensphysiologischen Tests konnte weder mit 4-Methyldecan noch mit 5-Methyldecan eine Reaktion bei den Geschlechtern registriert werden.

Da sich in keinem Fall die komplette Aktivität in der flüchtigen Phase des untersuchten Coeloms befand, wurden weitere Pheromone als lösliche Komponenten des Coeloms vermutet.

Im Jahr 1996 gelang die Isolierung und Identifizierung des ersten Sexualpheromons bei *P. dumerilii* (Harder, 1996; Zeeck et al., 1996, 1998a). Ausgehend von dem Homogenat weiblicher Heteronereiden konnte über eine mehrstufige Fraktionierung mit der RP-HPLC das die Spermaabgabe induzierende Pheromon isoliert und als Harnsäure identifiziert werden. Die Schwellenkonzentration, bei der die Männchen gerade noch mit der Spermaabgabe reagieren, wurde mit 0.6 μM bestimmt.

In diesem Jahr gelang Röhl (pers. Mitteilung; noch unveröffentlichte Ergebnisse) ebenfalls durch mehrstufige Fraktionierung mit der RP-HPLC die Isolierung und Identifizierung des die Eiabgabe induzierenden Pheromons aus dem Coelom geschlechtsreifer *P. dumerilii*-Männchen.

1.5 Pheromon mimikrierende Substanzen in Rohölen?

Einen Effekt von Rohölfraktionen konnte Atema (1977) zeigen. Hummer ließen sich von geringen Konzentrationen ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) Kerosin anlocken. Helgoländer Hummerfischer nutzen ölgetränkte Lappen um die Tiere in die ausgelegten Reusen zu locken.

Beckmann (1995) gelang die Isolierung einer niedrigsiedenden Fraktion aus Rohöl im Siedebereich zwischen *n*-Nonan und *n*-Dodecan, die insbesondere bei männlichen *N. succinea* aber auch bei *P. dumerilii*-Männchen zur Gametenabgabe führte. In verhaltensphysiologischen Tests lösten bereits 0.3 ppm der Rohölfraktion das charakteristische Schwimmen in engen Kreis sowie eine Spermaabgabe aus.

Weitere Arbeiten von Beckmann (1996) zeigten, daß 1-Methyl-2-propylbenzol in einer Konzentration von $5.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ im Seewasser bei *N. succinea*-Männchen zu einer Spermaabgabe führte.

Die eigenen Arbeiten (Diplomarbeit 1994) zum Thema: *Identifikation und quantitative Erfassung von mit Sexualpheromonen von Nereiden interferierenden Substanzen in niedrig siedenden Fraktionen des "EKO-FISK"-Rohöls* ergaben für C_5 -alkylierte Benzolderivate im Siedebereich von Undecan und Dodecan einen Gametenabgabe auslösenden Effekt. Abbildung 1.6 zeigt den Retentionsbereich der bioaktiven Komponenten.

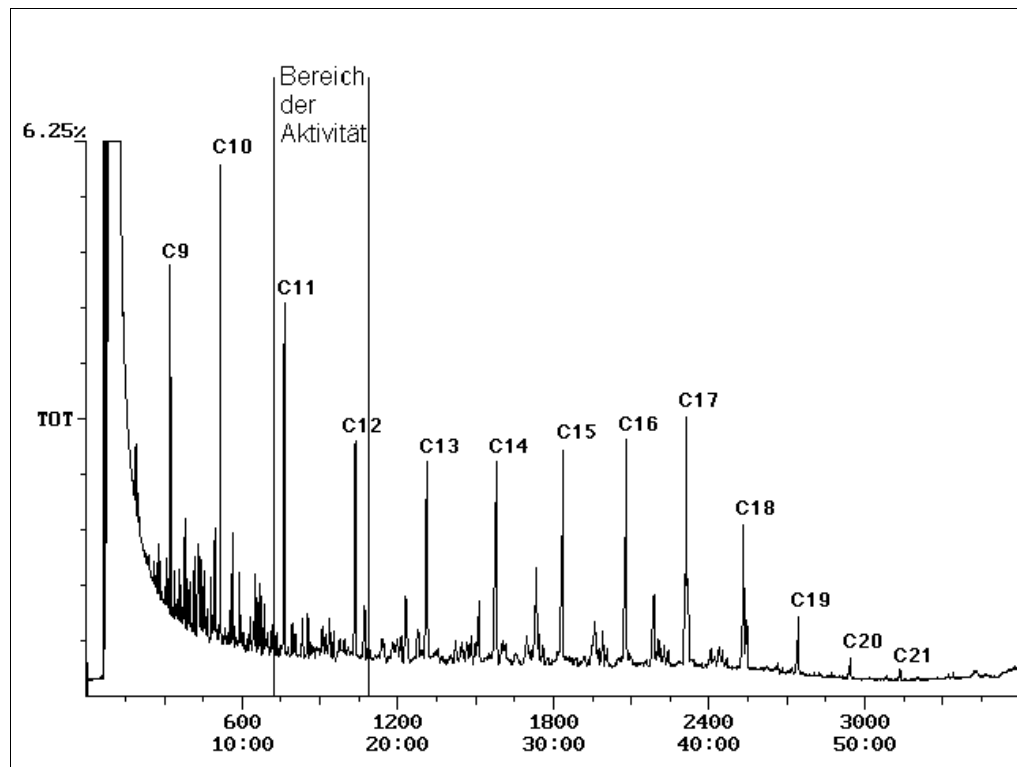


Abb. 1.6: Gaschromatogramm des Vakuumdestillates aus dem EKO-FISK Rohöl; (GC-MS; [EI]); Trägergas: Helium (5.0); Säule: 30 m x 0.25 mm DB5, Film: 0.25 µm; Temperaturprogramm: 50°C Starttemperatur, 3° pro Minute lineare Aufheizrate).

Mit Hilfe der "Peak-Trapping"-Methode konnten einzelne, in Aceton rekon-
densierte Komponenten isoliert werden. Eine umfassende Identifikation war
nicht möglich, aber massenspektrometrische Untersuchungen gaben Hinwei-
se auf die Isomere (1.1-Dimethylpropyl)-benzol, 1-Methyl-4-(2-methylpropyl)-
benzol und 2.4-Diethyl-1-methylbenzol.

1.6 Nereiden als Bioindikatoren

Aufgrund ihres charakteristischen Fortpflanzungsverhaltens, ihrer Verbrei-
tung, ihrer Größe, ihres Nahrungsbedarfs, ihrer kurzen Reproduktionszyklen
und der leichten Hälterung spielen die Nereiden, wie z.B. *P. dumerilii*, *N.*
succinea und *Nereis diversicolor* (O. F. Müller) nicht nur in der Pheromonfor-

schung sondern auch in der Ökotoxikologie eine wesentliche Rolle (Hutchinson, 1995, 1998; Boilly-Marer, 1974).

In den 70'er und frühen 80'er Jahren untersuchten Wissenschaftler infolge von Tankerunglücken und der damit verbundenen Zunahme an Ölverschmutzungen der Meere und der Küstenbereiche intensiv die Auswirkung von Rohölen auf marine Organismen. Dabei standen zumeist die wasserlöslichen Komponenten der Rohöle (WSF = Water-Soluble-Fraction) und die Bestimmung von Sterblichkeitsraten und Letalkonzentrationen im Vordergrund (Takahashi & Kittredge, 1973; Neff & Anderson, 1981; Atema et al., 1977, 1982). Rossi und Anderson (1976, 1978, 1997) untersuchten den Effekt von wasserlöslichen Fraktionen auf das Wachstum und das Fortpflanzungsverhalten der Polychaetenspezies *Neanthes arenaceodentata*. An derselben Spezies wurden von Emery und Dillon (1996) die chronisch subletalen Effekte von polyzyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH = polycyclic aromatic hydrocarbons) untersucht. Neben den oben genannten Vorzügen von Polychaeten, bot sich *P. dumerilii* als repräsentativer Vertreter einer ökologisch wichtigen Gruppe von marinen Invertebraten auch aus folgenden Gründen als Untersuchungsobjekt für weitere Fragestellungen an: Zum einen akkumulieren die Makrobenthos aufgrund ihrer Bioturbation anthropogene Schadstoffe aus dem Sediment und werden deshalb im Freiland als Bioindikatoren für Verschmutzungen mit organischen Verbindungen von Stränden herangezogen (Amaral et al., 1998), oder es werden Schadstofftransporte innerhalb des Sediments in Abhängigkeit der Populationsdichte untersucht (Alyomov, 1997). Als Indikator für die Belastung mit Bioziden (Ventocil, Bioban und 3,5-Dichlorphenol) untersuchte Hutchinson (1995) die Letaldosis, die Befruchtungsrate während der Reproduktion, die Larvalentwicklung und die Larvalsterblichkeit von *P. dumerilii*. Zum anderen lassen sich aufgrund des stabilen Karyotyps (14 Chromosomenpaare) und des schnellen Wachstums (6 - 8 Monate bis zur Geschlechtsreife) von *P. dumerilii* die Genotoxizität anhand der Chromosomalschäden und des Chromatidaustausches (Jha, 1996), sowie die zytotoxischen und genotoxischen Effekte von industriellen und städtischen Abwässern auf das Wachstum der Polychaetenlarven von *P. dumerilii* untersuchen (Jha, 1997).

1.7 Biotestverfahren

Die Entwicklung geeigneter Biotestverfahren ist erforderlich, um die Präsenz von Pheromonen nachzuweisen und ihre Wirkungsweise zu beschreiben. Den Begriff des Biotests definierte Shorey (1970) als einen Test für die Anwesenheit einer biologisch aktiven Substanz. Young & Silverstein (1975) erweiterten den Begriff des verhaltensphysiologischen Biotests:

Im Idealfall wird eine Reizantwort unter natürlichen Bedingungen erhalten, wobei lediglich das Pheromon emittierende Tier durch die Zugabe einer biologisch aktiven Substanz ersetzt wird.

Um diesem Idealfall eines Biotests möglichst nahe zu kommen, müssen für dessen Aufbau und Ablauf äußere Bedingungen, wie Licht, Temperatur, Umgebung, Mondphasen und tageszeitliche Zyklen, sowie Zeitpunkt des Biotests beachtet werden. Außerdem ist auszuschließen, daß fremde Substanzen, wie z.B. Verunreinigungen oder Lösungsmittel, störende Einflüsse ausüben.

Eine weitere Detektionsmöglichkeit von Pheromonen besteht in der Verwendung von elektrophysiologischen Biotestverfahren. Diese, in der Pheromonforschung bei Insekten als Antennographie weit verbreiteten Verfahren, basieren auf den Arbeiten von Schneider und Hecker (1956), sowie Schneider (1957) an dem Seidenspinner *Bombyx mori*. Dabei werden die Nerven- bzw. Zellpotentiale spezifischer Pheromonrezeptoren an den Antennen von Insekten bei der Reizung durch Sexuallockstoffe gemessen. Diese Meßgrößen werden mit dem beobachteten Verhalten im verhaltensphysiologischen Biotest verknüpft. Beim Vorliegen von spezifischen Rezeptoren, deren Potential über eine Einzelzelleitung gemessen wird, läßt sich das elektrophysiologische Signal eindeutig mit dem Verhalten verbinden. Nur in diesem Fall ist die alleinige Durchführung des elektrophysiologischen Biotests für den Nachweis eines Pheromons ausreichend.

Im für *P. dumerillii* von Boilly-Marer & Lassalle (1978, 1980) ausgearbeiteten, elektrophysiologischen Biotestverfahren wird das Summenpotential des Bauchnervenstranges gemessen. Dort auftretende Signale erlauben nicht, wie oben geschildert, eine ausschließliche Zuordnung zu Pheromonen als Auslöser eines spezifischen Reizes. Die für die vorliegende Arbeit notwendigen Aussagen zur Spermaabgabe auslösende Wirkung konnten deswegen nur über die verhaltensphysiologischen Biotests gefunden werden.

1.8 Zielsetzung

- I. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung zur Wirkung von Rohölkomponenten aus dem "EKO-FISK"-Rohöl auf das Fortpflanzungsverhalten von *P. dumerilii*-Männchen. Es sollte geklärt werden, in wieweit Komponenten aus dem Erdöl mit der Wirkungsweise von Gametenabgabe induzierenden Pheromonen zu einer nicht durch das natürliche Pheromon „Harnsäure“ induzierten Spermaabgabe führen. Dazu sollten Ergebnisse der eigenen Diplomarbeit reproduziert, weitere Fraktionen aus dem Siedebereich zwischen Decan und Hexadecan auf ihren verhaltensphysiologischen Charakter untersucht und die Spermaabgabe induzierenden Komponenten identifiziert werden.
- II. Untersuchungen zum Einfluß von flüchtigen Verbindungen zur intraspezifischen chemischen Kommunikation zwischen den Geschlechtern von *P. dumerilii*. Dazu sollten direkt aus dem Schwärmwasser volatile Sexualpheromone, die der Geschlechtererkennung und der Reproduktion dienen, isoliert und identifiziert werden.
- III. Weiterhin sollte der Ursprung der emittierten Sexualpheromone untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft der Tiere

Als Lebensraum bevorzugt der *Platynereis dumerilii* die wärmeren Gebiete Europas, wie die Atlantikküste, Mittelmeer und stellenweise den Ärmelkanal. Eine Brackwasserart bewohnt flache Küstenstreifen am Isefjord (Dänemark). An den deutschen Küsten tritt der Vielborster nur vereinzelt auf. Das Geschlechterverhältnis von Männchen zu Weibchen beträgt in Freilandfängen schwärmender *P. dumerilii* etwa 99:1. Die Hauptschwärmperioden dieser, einem saisonalen Reproduktionszyklus unterliegenden, Spezies ist im natürlichen Habitat auf die Sommermonate von Mai bis August beschränkt. Eine erschöpfende Versorgung mit Tieren über ein ganzes Jahr durch Wildfänge scheidet zwangsläufig aus, so daß eine Hälterung dieser Tiere zu Forschungszwecken unumgänglich ist.

Seit nunmehr 11 Jahren besteht im Arbeitskreis eine Laborkultur von derzeit gut 1500 Tieren. Durch die Zucht- und Hälterungsmethode von Hauenschild und Fischer (1969) ist ganzjährig die Versorgung mit Testtieren und biologischem Ausgangsmaterial gewährleistet.

Reproduktion, Larvalaufwuchs und Metamorphose wurden dabei durch streng limitierende Faktoren wie Salinität, Temperatur, Beleuchtung und künstliche Lunarperiodizität gesteuert.

Als Hälterungsmedium fungierte natürliches, pasteurisiertes Seewasser mit einer Salinität von 3.2%, das von der deutschen Küstenwache (MS Mellum) aus dem Gebiet um Helgoland bezogen wurde. Bei einer Wassertemperatur von 19° - 20°C simulierten Neonröhren mit einem Hell/Dunkelrhythmus von 16:8 Stunden den Organismen einen ständigen Sommer. Dieser Tag/Nacht-rhythmus wurde so gewählt, daß ab 14 Uhr im Zuchtraum Dunkelheit herrschte, um die geschlechtsreifen Tiere am frühen Abend zum Schwärmen zu stimulieren. Zur Synchronisation der Metamorphose, und damit zur Reproduktion, wurde bei natürlichem Vollmond für fünf Tage nachts eine zusätzliche Lichtquelle eingeschaltet. Während der Umbildung vom atoken Polychaeten zum Heteronereiden wurden die Tiere nach Geschlechtern separiert und in 1000 mL Kristallisierschalen gehältet.

2.2 Biotest

Die Entwicklung geeigneter verhaltensphysiologischer Tests ist erforderlich, um die Präsenz von Pheromonen nachzuweisen und ihre Wirkungsweise zu beschreiben. Zusätzlich soll der Biotest Aussagen über die spezifische Funktion eines Botenstoffes in einer getesteten Probe zulassen. Für den Fall, daß von schwärmenden Weibchen mehr als ein Sexualpheromon emittiert wird, sollte in einem verhaltensphysiologischen Biotest ein Unterschied zwischen einem Partnererkennungsspheromon (MRP), das bei einem Männchen zur Abgabe einer kleinen Menge Sperma führt und einem die Spermaabgabe (SRP) induzierenden Pheromon erkennbar sein.

2.2.1 Verhaltensbiologische Tests

Die verhaltensbiologischen (verhaltensphysiologischen) Tests an den Heteronereiden von *P. dumerilii* stellten die zentrale Meßgröße auf der Suche nach verhaltensmodifizierenden Substanzen in der gesamten Arbeit dar.

2.2.1.1 *Platynereis dumerilii*-Männchen

Die Durchführung dieser Tests erfolgte mit Ausnahme einiger Anlockversuche in Kristallisierschalen, die mit ca. 40 mL pasteurisiertem Seewasser gefüllt und mit einem zu testenden, zuvor getrennt geschlechtlich gehälterten Heteronereiden versehen wurden. Nach der Applikation der unterschiedlichen Proben wurden die Schalen mit einem Uhrglas abgedeckt. Versuche zum Anlockverhalten erfolgten in einer rechteckigen Kunstschale (l/b/h; 15×10×7 cm). Die Zeit bis zu einer Spermaabgabe wurde mit einer Stoppuhr bestimmt.

Als ein positiver Test wurde bewertet, wenn ein Testtier auf *n*-Hexan-Eluatproben oder Destillatproben innerhalb von 45 min. mit Gametenabgabe reagierte. Eine zeitliche Verzögerung bis zu einem eindeutigen Testresultat sollte dem Umstand Rechnung getragen werden, daß Komponenten aus der organischen in die wäßrige Phase übertreten müssen. Verhaltensphysiologische Tests mit Komponenten in Aceton oder wäßriger Matrix wurden als positiv bewertet, wenn eine eindeutige Reaktion, die Abgabe einer Portion

Sperma in das Wasser, innerhalb von 45 min. erkennbar war. Als negativ bezüglich einer Spermaabgabe induzierenden Wirkung galt immer ein Test, der innerhalb von 45 min keine Verhaltensänderung des Testindividuums erkennen ließ, und/-oder wenn ein Gegentest mit Harnsäure oder Weibchencoelom positiv ausfiel. Harnsäure, als das natürliche Spermaabgabe induzierende Pheromon, sollte in Lösung demnach in jedem Fall bei den Männchen zu einer Gametenabgabe führen. Unbewertet hinsichtlich einer Gametenabgabe evozierenden Wirkung blieben Gegentests mit Harnsäure oder Coelom weiblicher Tiere bei negativer Reizantwort, also ohne nachfolgende Spermaabgabe.

In verhaltensphysiologischen Experimenten an *P. dumerilii*-Männchen mit Proben aus dem Coelom oder dem Homogenat geschlechtsreifer Weibchen, sollte ein besonderer Augenmerk auf die abgegebene Spermamenge geworfen werden. So ist ein Unterschied zwischen der Reizantwort auf die Zugabe eines Erkennungspheromons (Abgabe einer kleinen Spermamenge - Männchen schwimmt weiter) und einem die Spermaabgabe induzierenden Pheromon (komplette Spermaabgabe - eine „leere“ Körperhülle bleibt zurück) zu erwarten.

Nachfolgende Proben wurden auf ihre verhaltensmodifizierende Wirkung hin untersucht:

- Rohöldestillate des EKO-FISK- Feldes
- *n*-Hexan-Eluate der Säulenchromatographie
- Acetonkondensate der GC-Fraktionierung
- Syntheseprodukte
- Eluate der Festphasenextraktion
- 5-Methyl-3-heptanon (rac.)
- Coelomproben von Männchen und Weibchen
- Filtrate aus Homogenaten beider Geschlechter
- Harnsäure

2.2.1.2 *Platynereis dumerilii*-Weibchen

Die verhaltensbiologischen Tests mit geschlechtsreifen Weibchen wurden prinzipiell in derselben Form durchgeführt, jedoch beschränkten sich die getesteten Proben auf Eluate aus der Festphasenextraktion von homogenisierten Männchen und Spermaproben.

2.2.2 Elektrophysiologischer Test

Zum Einfluß flüchtiger Komponenten aus dem Rohöl und der damit verbundenen Reaktion wurden mit Hilfe eines einfachen Setups elektrophysiologische Ableitungen erstellt. Dazu wurden verschiedene Körperregionen (zumeist der Bauchnervenstrang oder die Frontpartie des Kopfes) der Tiere ausgewählt. Auch wurden elektrophysiologische Experimente an Amputaten durchgeführt. Dabei sollte der Fragestellung durch extrazelluläre Ableitungen nachgegangen werden, wo Chemorezeptoren oder Pheromonrezeptoren bzw. der Ort der Reizempfindung lokalisiert sind.

2.2.2.1 Präparation

Als Versuchstiere dienten adulte, getrennt geschlechtlich gehaltene Heteronereiden verschiedener Reifestadien beider Geschlechter. Sowohl schwärmende als auch noch in der Wohnröhre befindliche Tiere wurden auf Filterpapier plziert und mit Präpariernadeln in einer, mit einem Kautschukboden ausgegossenen Schale (Präparateschale) fixiert. Anschließend wurde die Referenzelektrode in die Nähe des Präparates unter das Filterpapier gelegt und die Meßsonde mit dem Mikromanipulator unter visueller Kontrolle durch eine zuvor mit einer Einwegspritze leicht angeritzte Stelle auf der Körperoberfläche (vornehmlich Prostomium) in die unmittelbare Nähe der abzuleitenden Region geführt.

Das Oberschlundganglion wurde nach dem Decaptieren des Tiers mit einem Skalpelli oder einem Glasmesser vom Rumpf abgetrennt und auf Filterpapier gelegt. Die Meßsonde wurde auf dem Ganglion fixiert und die Referenzelektrode in unmittelbarer Nähe zum Objekt plziert.

Alle Objekte wurde dann mit wenigen Millilitern gereinigtem Seewasser vollständig bedeckt.

Abbildung 2.1 zeigt den Blick durch das Binokkular. Erkennbar dabei die Meßsonde (1) auf dem Prostomium, die beiden Augenpaare (2) des Tieres sowie unterhalb des Kopfes die zur Fixierung dienende Präpariernadel (3).

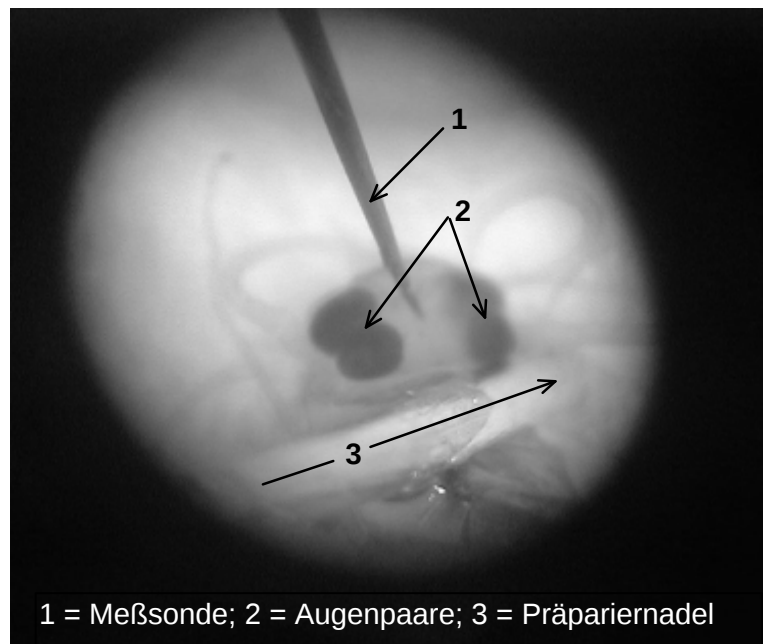


Abb. 2.1: Blick durch das Binokkular

2.2.2.2 Ableitsystem und Reizgebung (Setup)

Als Meßsonde fungierte eine kunststoffummantelte Wolframelektrode mit einem durchschnittlichen Widerstand von einem Megaohm. Ein mit vergoldeten Konnektoren versehender Leiter stellte die Verbindung zwischen Elektrodenhalter und dem Vorverstärker her. Als Referenzelektrode diente ein Stück chlorierter Silberdraht, an dessen Ende ein Kabel gelötet wurde.

Ableitsystem	
Vorverstärker	: Gould
Verstärker	: Universal Gould
Meßelektrode	: Wolframelektrode; Länge: 76 mm, Spitzendurchmesser: 3 µm; Impedanz: 1 MΩ
Referenzelektrode	: chlorierter Silberdraht
Oszilloskop	: Gould Speicheroszilloskop 1425
x-t-Schreiber	: Servogor 5, Potentiometerschreiber, RE 541
Binokkular	: Carl Zeiss (47 50 22-9902)
Mikromanipulator	: Zeiss

Tab. 2.1: Elektrophysiologisches Setup

Die Verschaltung von Meß- und Referenzelektrode erfolgte auf dem Vorverstärker. Die weitere Aufarbeitung und Verstärkung der Signale übernahm der Signalverstärker, der die gemessenen Potentiale zur Visualisierung an ein Oszilloskop und einen x-t-Schreiber weiterleitete. Das Setup wurde zur Vermeidung von Störungen durch äußere elektromagnetische Einstrahlung innerhalb eines Faraday'schen Käfigs platziert. Abbildung 2.2 zeigt das Foto eines elektrophysiologischen Setups, in Tabelle 2.1 ist die Ausstattung des Setups aufgelistet.



Abb. 2.2: Elektrophysiologisches Setup

Die Reizgebungen für die elektrophysiologischen Tests erfolgten entweder über eine kontinuierlich fließende Badperfusion aus Seewasser, in die die zu testende Probe injiziert wurde, oder direkt mittels einer Mikroliterspritze zum Präparat mit unterschiedlichen Proben:

- *n*-Hexan-Eluate der Säulenchromatographie
- Acetonkondensate der GC-Fraktionierung
- 5-Methyl-3-heptanon (rac.)
- Harnsäure

2.3 Probengewinnung

Als Probenausgangsmaterial standen

1. EKO-FISK Rohöl,
2. *P. dumerilii*-Männchen,
3. *P. dumerilii*-Weibchen,
4. Wasser von schwärmenden Weibchen und
5. synthetisierte Alkylbenzole zur Verfügung.

2.3.1 Komponenten aus Rohöl

Zur Aufarbeitung und Probengewinnung von verhaltensmodifizierenden Verbindungen bei der Polychaetenart *P. dumerilii* wurde Rohöl der Typenbezeichnung " MT Alandia Bay - EKO-FISK Crude" vom 23.11.1993 verwendet. Die Isolierung der bioaktiven Komponenten umfaßte folgende Anreicherungs- und Trennmethoden:

1. Zur Abtrennung der stark- und leichtflüchtigen Komponenten wurde zunächst eine Grobdestillation unter Normaldruck durchgeführt. Eine fraktionierende Vakuumdestillation sollte die Komponenten im Siedebereich oberhalb von *n*-Nonan liefern.
2. Im Anschluß an die Grobdestillation wurde eine Feinfraktionierung des Vakuumdestillats vorgenommen, die 46 Fraktionen lieferte.
Zu einer besseren Charakterisierung verhaltensphysiologisch aktiver Substanzen, wurden ausgewählte Destillate der Feinfraktionierung (insgesamt 7 Fraktionen der Destillate zwischen Nr. 16 bis 46) mit Hilfe der Säulenchromatographie aufgetrennt.
3. Das gaschromatographische Peak-Trapping sollte der Anreicherung und Isolierung von flüchtigen Komponenten dienen. Die Trap-Proben wurden hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität in verhaltensbiologischen Tests an Männchen untersucht.

2.3.2 Proben aus geschlechtsreifen Tieren

Als Ausgangsmaterial dienten einerseits schockgefrorene (in flüssigem Stickstoff; bp = -186°C) Heteronereiden, andererseits lebendes Material aus der laboreigenen Hälterung. Zur Verringerung des Seewassereintrags in die Probe, wurden die Tiere kurz auf ein Blatt Filterpapier gelegt und nach Geschlecht getrennt in Duranglasflaschen (Schott, ISO-Gewinde) bei -20°C gelagert.

Die Tiere eines Geschlechts wurden in einem Homogenisator (Bühler-H 04) bei 25000 U·min⁻¹ 20 min. nach Zusatz von wenig Lösungsmittel zerkleinert.

In allen Varianten wurde das Ausgangsmaterial in wenig Milliporewasser zerkleinert und ein graues, hochviskoses Homogenat erhalten, daß durch mehrere Ultrafiltrationsschritte aufgereinigt wurde.

2.3.3 Proben aus Schwärmwasser

Zur Kontrolle auf flüchtige Komponenten im Schwärmwasser geschlechtsreifer *P. dumerilii*-Weibchen wurden, z.T. über Nacht oder für ca. 60 min., jeweils drei schwärmende Tiere in Kristallisierschalen mit ca. 10 mL pasteurisiertem Seewasser belassen. Das Seewasser wurde zuvor über ein Adsorptionsfilter (C18-Phase, Bond Elut; Varian) gereinigt. Die Aktivität des Schwärmwassers wurde in Biotests geprüft. Da ein Teil der Tiere bis zum Morgen, trotz Abwesenheit eines männlichen Sexualpheromons, seine Gameten in das Wasser abgeben hatte, wurden die Eier durch Zentrifugieren sedimentiert und der Überstand der Festphasenextraktion zugeführt. In diesem Fall handelte es sich nicht mehr um Schwärmwasser. Diesem Umstand sollte in der Probencharakterisierung Rechnung getragen werden.

2.3.4 Proben aus dem Coelom der Weibchen

Zum Nachweis der die Spermaabgabe induzierenden Pheromone im Coelom von *P. dumerilii*-Weibchen, wurde frisches Coelom durch vorsichtiges Ausdrücken der Tiere gewonnen. Dazu wurden die geschlechtsreifen, sich aber noch nicht am Schwärmen befindlichen Weibchen auf einem Filter-

papier vom Seewasser befreit und auf eine Glasscheibe gelegt. Durch leichtes Drücken mit einem Objektträger vom Kopfende zum Schwanzende konnte so das Coelom erhalten werden. Dabei war es wichtig die äußere Hülle des Weibchens nach Möglichkeit nicht zu verletzen, so daß das gesamte Coelom mit den Eiern aus dem Pygidium austreten konnte. Das Coelom wurde mit einer Pasteurpipette auf ein 0.22 µm Filter (Micropure-3 Filtereinheit; Amicon) überführt, die Glasscheibe sowie der Objektträger mit 500 µL Milliporewasser gespült und ebenfalls auf das Filter gegeben. Anschließend konnte nach 30 min. bei 11700 Upm. und 4°C in der Kühlzentrifuge ein klares Filtrat erhalten werden. Die Probencharakterisierung erfolgte mit Hilfe der HPLC.

2.3.5 Extraktion von coelomfreien Weibchen

Der Nachweis von wasserlöslichen Pheromonen außerhalb des Coeloms erfolgte mit den zuvor ausgedrückten Weibchen (aus Abs. 2.3.4). Mit einer Pinzette wurden die Leibeshüllen in ein Schraubdeckelglas überführt und mit einem definierten Volumen Milliporewasser überschichtet. Anschließend erfolgte die Extraktion der wasserlöslichen Verbindungen für 30 min. im Ultraschallbad bei einer Temperatur von ca. 0°C (Kühlung mit zerstoßenem Eis). Abschließend wurde die Probe über ein 0.22 µm Filter (Micropure-0.22 Filtereinheit) in der Kühlzentrifuge bei 4°C und 11700 Upm. für ca. 30 min. filtriert und mit RP-HPLC chromatographiert.

2.3.6 Proben aus frischem Sperma

Aus geschlechtsreifen *P. dumerillii*-Männchen konnten Spermaproben durch sanftes Drücken mit einer Stahlfederpinzette auf die Leibeshülle gewonnen werden. Dabei wurden die Tiere zuvor mit wenig Milliporewasser vom Salzwasser befreit und auf einem Uhrglas ausgedrückt. Um von höhermolekularen Bestandteilen abzutrennen, wurden die Proben mit wenig Milliporewasser versetzt und mit Hilfe einer Zentrifuge durch eine 3 kDa Zentrifugen-Ultrafiltereinheit (Microcon-3; Amicon) filtriert, bzw. bei größeren Mengen der

Ultrafiltrationszelle (Amicon 8050) zugeführt und im Anschluß an die Trennoperation bei -20°C gelagert.

2.3.7 Synthetische Proben

Zur Überprüfung der Ergebnisse, die im Rahmen der Diplomarbeit gewonnen wurden, sollten einzelne Komponenten durch Synthese hergestellt und im verhaltensphysiologischen Test hinsichtlich ihrer Aktivität auf *P. dumerilii*-Männchen untersucht werden. Zur Darstellung der Alkylbenzole wurde einerseits der Syntheseweg nach Friedel-Crafts-Alkylierung eingeschlagen, andererseits die Umsetzung halogener Verbindungen in Form einer Wurtz'schen Synthese mit Grignardagenzen gewählt. Versuchsbeschreibungen der Reaktionen befinden sich im experimentellen Teil (Kapitel 2.8, Seite 49 bis 52).

In der nachfolgenden Tabelle sind die synthetischen Verbindungen und der Reaktionsweg aufgeführt:

Nr.	Syntheseprodukt	Reaktion
1	4-Butyltoluol	Grignard-Wurtz
2	3-Butyltoluol	Grignard-Wurtz
3	2-Butyltoluol	Grignard-Wurtz
4	Ethyl-2-isopropylbenzol	Grignard-Wurtz
5	Ethyl-4-isopropylbenzol	Grignard-Wurtz
6	(1.1-Dimethylpropyl)-benzol	Friedel-Crafts-Alkylierung

Tab. 2.2: Synthetisierte Alkylbenzole

2.4 Trennmethoden

2.4.1 Destillation und Rektifikation

Zur Abtrennung der flüchtigen und leichtflüchtigen Komponenten wurde zunächst eine Grobdestillation unter Normaldruck aus gut 700 mL eines EKO-FISK Rohöls durchgeführt. Eine Vakuumdestillation lieferte ein Destillat im Siedepunktbereich zwischen *n*-Nonan und *n*-Nonadekan (Membranvakuumpumpe; $p \approx 18$ hPa; 37° - 186°C), das in einem weiteren Schritt einer Feinfractionierung unterzogen wurde. Daraus resultierten 46 Fraktionen, die der weiteren Aufarbeitung zugeführt wurden.

2.4.1.1 Materialien der Grobdestillation

- Magnetheizrührer (Heidolph MR 2002), 1000 mL Kristallisierschale mit Hochtemperaturheizölbad (Labothermol O; neoLab) und Magnetrührkern, Thermometer;
- 1000 mL Rundkolben (NS 29) mit Rohöl, 60 cm silberverspiegelte Vigreux-Kolonne (NS 29); 20 cm Destillationsbrücke (NS 29) mit Gegenstromkühlung, Destillatthermometer, Glasstopfen, (NS 14), Rundkolben (als Vorlage), Dewarschale (zur Kühlung der Vorlage), Kühlfalle mit Dewar, flüssiger Stickstoff; PTFE-Manschetten als Schliffdichtungen;
- Membranvakuumpumpe, (Vacuubrand MZ 20); Magnetheizrührer (Heidolph MR 2002)

2.4.1.2 Materialien der Feinfractionierung

- FISCHER-SPALTROHR-System® [Typ: HMS 300] (Abbildung 2.3), Vakuumkonstanthalter, integrierte Steuereinheit für heizbare Kolonne, Temperaturkontrolle und Rückflußteiler, Fraktionssammler; 5 mL Rundkolben (für die einzelnen Destillatfraktionen)
- doppelwandige Kühlfalle, Dewar, flüssiger Stickstoff;



Abb. 2.3: Fischer-Spaltrohr System HMS 300

Die Feinfraktionierung erfolgte mit 80 mL Vakuumdestillat. Bei einem Rücklaufverhältnis von 90 % (90 sec. Rücklauf zu 10 sec. Destillatauslauf) wurde bei einem mittleren Druck von 18 hPa im Siedebereich (Kolonnenkopf) zwischen 37° und 186°C fraktioniert. Die so erhaltenen Fraktionen wurden in 5 mL Rundkolben umgefüllt und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

2.4.2 Säulenchromatographische Trennung der Ölfractionen

Zur besseren Charakterisierung der Stoffklassen, der funktionellen Gruppen und struktureller Eigenschaften bioaktiver Komponenten, erfolgte eine Trennung durch Flüssigchromatographie (LC = liquid chromatography) in Alkan-, Aromaten- und Heterokomponenteneluate. Einen Überblick über chromatographische Verfahren zur Trennung von Ölkompontenten in Gruppen mit unterschiedlichen Funktionalitäten durch automatisierte LC zeigen Radke et al. (1989). Aus praktischen Gründen wurde dazu ein Verfahren gewählt, daß im Rahmen des organisch-geochemischen Praktikums an der Universität Oldenburg zur Trennung von Ölschieferextrakten angewendet wird (Rullkötter,

1995). Dazu wurden einige der in den verhaltensbiologischen Tests aktiven Destillatfraktionen ausgewählt.

Material:

- silanierte Glassäulen, (Länge x Durchmesser) 30 x 1.6 cm; 60 x 1.1 cm, 100 x 1.1 cm, mit Schliff (NS 14) am oberen Ende
- silanierte Glaswolle
- Glastrichter
- Pasteurpipetten
- Korkring
- Exsikkator, Blaugel
- Tropftrichter, mit und ohne Schliff (NS 14)
- U-Rohr (NS 14)
- Scheidetrichter
- 10 mL Rundkolben
- 500 µL Spritze (Fa. Hamilton)
- 500 mL Erlenmeyerkolben mit Schliff (NS 29) und Stopfen
- Dichlormethan (HPLC, Fa. Janssen chimica)
- *n*-Hexan (LiChrosolv, Fa. Merck)
- Methanol (nanograde, Fa. Promochem)
- Aceton (nanograde, Fa. Promochem)
- Stickstoff (4.0), Druckminderer,
- Natriumsulfat (p.a., wasserfrei)
- Milliporewasser
- Kieselgel 100 (0,063 - 0,200 mm, 70 - 230 mesh ASTM, Fa. Merck)
- Kieselgel 60 (0,063 - 0,200 mm, 70 - 230 Esc ASTM, Fa. Merck)

2.4.2.1 Silanisierung der Säule

Aufgrund der hohen Toxizität und Flüchtigkeit der Silanisierungsagens (Dimethyldichlorsilan in Toluol) erfolgt die Silanisierung unter dem Abzug!

Eine zuvor sorgfältig mit einem Gummistopfen verschlossene, trockene Glassäule wurde zweimal mit Toluol gespült und in senkrechter Position an einem Stativ befestigt. Dann wurde eine 5%ige Silanisierungslösung hergestellt und

die Säule bis zum Rand damit gefüllt. Die Säule wurde ca. 90 min. unter dem Abzug belassen und anschließend die Lösung vorsichtig entfernt.

Die Glassäule wurde zweimal mit reichlich Toluol gespült und mehrmals mit Wasser gewaschen. Schließlich erfolgte eine weitere Spülung der Säule mit einem milden Detergenz (Geschirrspülmittel) und mit VE-Wasser. Zum Trocknen wurde die Säule 2 Stunden bei 60°C in den Trockenschrank gelegt, darauf zweimal mit *n*-Hexan gespült und wieder für 30 min. in den Trockenschrank gelegt.

2.4.2.2 Vorbereitung der Trennsäule

I. Normaldruck Chromatographie:

Je nach dem Volumen der zu befüllenden Säule wurde eine bestimmte Menge konditioniertes Kieselgel (4 h bei 180°C, Abkühlen über Blaugel im Exsikkator) verwendet. Im Falle einer 5- oder 2.5%-igen Desaktivierung, wurde Milliporewasser in einen verschließbaren Erlenmeyerkolben zu dem Gel hinzugegeben und durch 5 min. kräftiges Schütteln Kieselgel und Wasser homogenisiert. In weitergehenden Trennschritten wurde auf eine Teildesaktivierung verzichtet und voll aktiviertes Kieselgel verwendet. Danach wurde das Kieselgel mit Hilfe des Scheidetrichters in die, zuvor mit silanisierter Glaswolle vor dem Hahn verschlossene Glassäule gefüllt. Durch permanentes Klopfen mit einem Korkring gegen die Säule während des Befüllens, wurde eine gleichmäßige und dichte Säulenpackung erzielt. Mit demselben Verfahren wurde auf die Kieselgelpackung eine Schicht aus ca. 5 g Natriumsulfat (Merck-Schuchardt, p.a., wasserfrei; 4 h bei 180°C im Trockenschrank konditioniert) aufgetragen. Vor der Probenaufgabe wurde das Säulenmaterial mit 50 mL *n*-Hexan gespült.

II. Überdruck Chromatographie:

Zum Befüllen und für den Betrieb der Säulen wurde im Überdruck mit Stickstoff (4.0) bei ca. 150 - 180 kPa gearbeitet. Auf die zu befüllende Säule wurde ein Y-Rohr gesetzt. Auf das Ende in direkter Verlängerung zur Säule wurde ein mit dem konditionierten Kieselgel (wie oben) Tropftrichter gesetzt. Auf das andere Ende befand sich ein mit *n*-Hexan gefüllter Tropftrichter, an dem sich die Einleitung für den Stickstoffstroms befand. Der noch offene Schliff des 1. Trichters wurde mit einem Stopfen verschlossen und alle Schliffe mit Schliff-

klemmen gesichert. In die am unteren Ende mit silanisierter Glaswolle verschlossene Säule ließ man im Überdruck wiederum unter stetigem, intensiven Klopfen das Kieselgel rieseln. Nach Erreichen der vorgesehenen Füllhöhe wurde das Befüllen mit Kieselgel gestoppt. Das Einschlämmen des Kieselgels erfolgte mit *n*-Hexan aus dem zweiten Tropftrichter in der Weise, daß annähernd alle Luft aus der Schüttung verdrängt und nach dem Druckausgleich kein Ausdehnen des Füllmaterials erfolgte. Anschließend wurde ca. 4 g konditioniertes Natriumsulfat auf die Kieselgelschicht gegeben. Mit Hilfe einer Feindruckregulierung konnte der Eluatfluß variabel zwischen 0.4 bis ca. 2 mL pro Minute eingestellt werden.

2.4.2.3 Durchführung der Chromatographie

Zur Probenaufgabe bei Raumtemperatur wurden mit einer 500 µL Spritze nacheinander je 100 µL *n*-Hexan und Destillat aufgezogen. Bei geöffnetem Ablaufhahn wurde der Spritzeninhalt langsam auf die nicht mehr von Lösungsmittel bedeckte Natriumsulfatschicht gegeben. Nach dem Einsickern des Destillats wurde vorsichtig mit Hilfe einer Pasteurpipette 2 - 3 mL *n*-Hexan auf die Säule gegeben.

Durch Zutropfen von 80 mL *n*-Hexan bei einem Fluß von $0.37 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (Normaldruckbetrieb), oder im Überdruckbetrieb bei einem Fluß von 1 mL pro Minute mit 250 mL *n*-Hexan aus einem Tropftrichter, der mit einer druckregulierbaren Stickstoffzuleitung versehen war, wurden die Proben chromatographiert. Die Fraktionen wurden in fünf bis zehn Minutenschritten in Vorlagen aufgefangen. Alle Fraktionen wurden mit Hilfe von gekoppelter Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) untersucht.

Die Elution der Heterokomponenten erfolgte anschließend mit 100 mL einer 10%igen methanolischen Lösung in Dichlormethan. Als Vorlage diente ein 250 mL Kolben. Zum Abtrennen des Lösungsmittels wurden die Heterokomponentenfraktion zunächst bei vermindertem Druck (650 hPa/40°C) im Rotationsverdampfer bis auf etwa 2 mL eingengt, in einen 25 mL Spitzkolben überführt und der Rundkolben mehrfach mit wenig Dichlormethan nachgespült. Die im Spitzkolben vereinten Extrakte wurden dann im schwachen Stickstoffstrom durch Abblasen der Lösungsmittel bis zur Gewichtskonstanz eingengt. Der Rückstand wurde in 2 mL Aceton aufgenommen und gaschromatographisch untersucht. Alle erhaltenen Fraktionen wurden in 15 mL

Schraubdeckelgläschen oder 10 mL Rundkolben im Tiefkühlfach bei -20°C gelagert. Abbildung 2.4 zeigt den schematischen Aufbau der Säulenchromatographie unter Normaldruck.

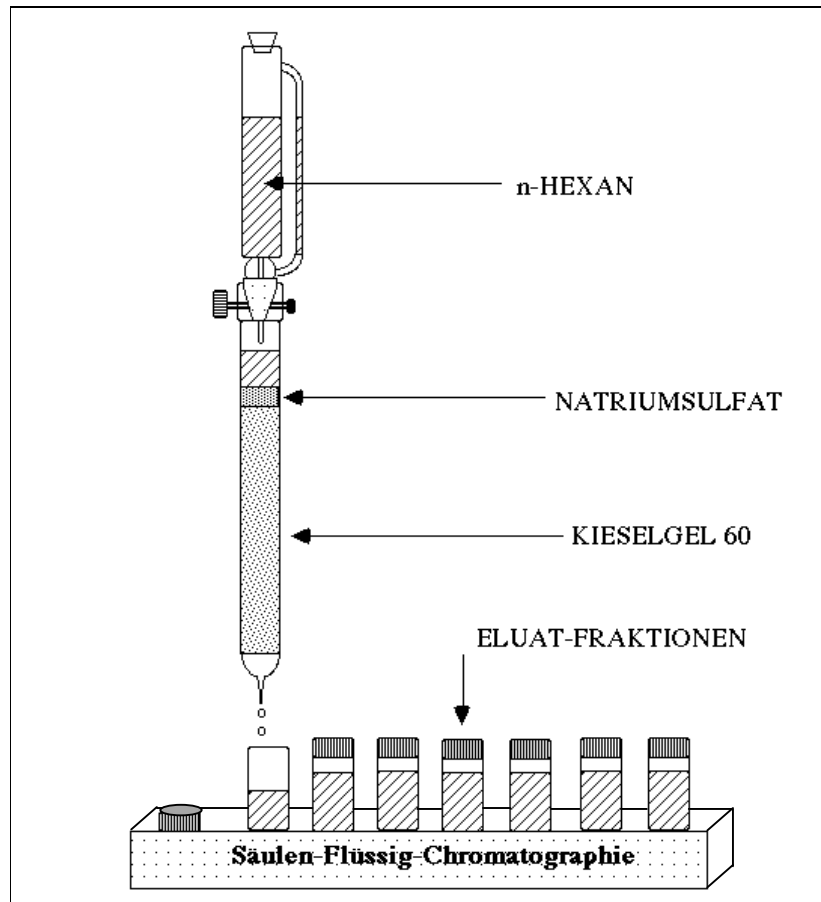


Abb. 2.4: Schematischer Aufbau der Säulenchromatographie

2.4.3 Gaschromatographie (GC)

Die Gaschromatographie diente nicht nur der qualitativen und quantitativen Untersuchung flüchtiger Komponenten sowie der Qualitätskontrolle (z.B. Lösungsmittel), sondern auch der Trennung und Anreicherung einzelner Verbindungen aus komplexeren Matrices.

Mit Hilfe dreier, prinzipiell gleicher Gaschromatographiesysteme wurden Roh-öldestillate, Eluate der Säulenchromatographie und der Festphasenextraktion, der Acetontraps und Produkte der Synthesen auf ihre Inhaltsstoffe untersucht:

System Nr. I:	
Gaschromatograph Doppelsäulenofen	: U.T. Packard, Modell 439
2 Injektoren	: on column (nicht temperierbar)
2 Detektoren	: FID (280°C)
Make-up-Gas	: synthetische Luft; Stickstoff (5.0) und Wasserstoff (5.0) je 28 mL·min ⁻¹
Trennsäulen A B	: 30 m Kapillarsäule DB 5 (J & W Scientific) : ID = 0.25 mm; Filmdicke = 1 µm : ID = 0.25 mm; Filmdicke = 0.25 µm
Vorsäule Säule A	: 50 cm desaktivierte Quarzkapillare
Nachsäulen Säule A	: 2 x 95 cm desaktivierte Quarzkapillare
Trärgas	: Wasserstoff (5.0); linearer Flußgeschwindigkeit = 50 cm·s ⁻¹
Integrator	: Shimadzu C-R3A

Tab. 2.3: Gaschromatographiesystem Nr. I

System Nr. II	
Gaschromatograph	: Hewlett Packard HP 6890
Injektor	: Split/Splitless; Aufgabtemp. = 250°C; splitlose Betrieb
Detektor	: FID; 280°C
Make-up-Gas	: synth. Luft 310 mL·min ⁻¹ ; Stickstoff (5.0), 25 mL·min ⁻¹ ; Wasserstoff (5.0), 30 mL·min ⁻¹
Trennsäule	: 30 m Kapillarsäule DB 5 (J & W Scientific) ID = 0.32 mm; Filmdicke = 0.25 µm
Trärgas	: Wasserstoff (5.0); lineare Flußgeschwindigkeit = 38 cm·s ⁻¹ (2 mL·min ⁻¹)
Datenverarbeitung	: Hewlett Packard Vectra VE, 133 MHz Pentium
Systemsoftware	: HP ChemStation A.05.01

Tab. 2.4: Gaschromatographiesystem Nr. II

System Nr. III	
Gaschromatograph	: VARIAN, Modell 3400
Injektor	: Split/Splitless; Aufgabetemp. = 250°C; splitloser Betrieb oder Splitfluß zwischen 10 und 30 mL
Detektor	: ITD 40 (MAGNUM - Finnigan)
Trennsäule	: 30 m Kapillarsäule DB 5-MS (J & W Scientific) ID = 0.25 mm; Filmdicke = 0.25 µm
Trärgas	: Helium (5.0); Säulenvordruck = 12Psi; lineare Flußgeschwindigkeit = 38 cm*s ⁻¹ ;
Datenverarbeitung	: Cotec AT 386 Personal Computer
Systemsoftware	: Magnum System Version 2.30 (1992)

Tab. 2.5: Gaschromatographiesystem Nr. III

2.4.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die direkte Aufarbeitung wasserlöslicher Proben und Coelomextrakte erfolgte durch Umkehrphasen-Hochleistungschromatographie (RP-HPLC, *reversed phase high-performance liquid chromatography*). Vorinformationen hinsichtlich der stationären und der mobilen Phasen gingen aus den Adsorptionsexperimenten (SPE) hervor. Zusätzlich bot die RP-HPLC in Verbindung mit einem Photodioden-Array-Detektor (PDA) die Möglichkeit einer schnellen und hinreichend genauen qualitativen und quantitativen Bestimmung einzelner Zielkomponenten. Die UV-Spektren wurden in variablen Wellenlängenbereichen von 200 - 600 nm bei einer Aufzeichnungsrate von einem Hz bis zu zehn Hz aufgenommen. Mit dem Pumpensystem konnte in Abhängigkeit des Eluenten und der Säulendimensionierung eine Flußrate zwischen 0.1-10 mL*min⁻¹ realisiert werden. Die Probenaufgabe erfolgte in den meisten Fällen manuell mit einer 100 µL Spritze (Hamilton) über ein 6-Wege Schaltventil (Rheodyne; 7125i) in eine 100 µL Probenschleife. Eine Fraktionierung des Eluatstroms erfolgte ebenfalls manuell in Abhängigkeit zum Detektorsignal (Peak zu Peak-Fraktionierung). Die Fraktionen wurden in Glasgefäßen aufgefangen.

HPLC-System:				
Gradientenformer/ Pumpe	: Waters 600 Controller			
Entgasung	: Waters In-Line Vacuumdegasser			
Injektor 1 (manuell)	: Rheodyne (6-Wege Schaltventil), 7125i			
Injektor 2	: Autosampler: Waters, WFC 44242			
Elutionsmittel	: Wasser (Millipore); $\lambda = 18.3 \text{ M}\Omega$: Wasser/ <u>Methanol</u> (60:40 (v/v)); <u>J.T. Baker, HPLC-Grade</u> : <u>Acetonitril</u> /Wasser (80:20 (v/v)); <u>J.T. Baker, HPLC-Grade</u> : Wasser/0.1% Trifluoressigsäure; <u>Sigma, Protein Sequencing Grade</u>			
Trennsäulen:	Phase:	SD (mm)	PD (μm)	Hersteller
LiChrospher 100	RP18 _{ec}	4x250	5	Merck
LiChrospher 100	RP18 _{ec}	10x250	10	Merck
Amidphase (C16-Amid)	RP16	4x250	5	Supelco
Detektor	:Waters 996 Photodiode Array Detector Wellenlängenbereich: 200 - 600 nm			
Steuerungssoftware	: Waters Millennium ³² Chromatography Manager			
Steuerungseinheit	: Digital Celebris FX2 Pentium/ Windows NT Workstation			
SD: Säulendimensionierung; PD: Partikeldurchmesser; ec.: endcapped				

Tab. 2.6: HPLC System

Als Elutionsmittel wurden Wasser und/oder wasserhaltige Lösungsmittelgemische verwendet. Auswahlkriterium für den Einsatz war deren Eignung für eine hohe UV-Durchlässigkeit sowie die Verträglichkeit mit den RP-Phasen. Die Elution erfolgte entweder isokratisch, oder im binären Gradienten Wasser/Methanol und Acetonitril/Wasser. Wegen der Vermischungseffekte (Volumenkontraktion, Erwärmung und Gasblasenbildung) wurden die binären Gemische im Fall Wasser-/Methanol zuvor im Verhältnis 60:40 und im Fall von Acetonitril/Wasser im Verhältnis 80:20 miteinander gemischt. Einflüsse auf das Retentionsverhalten und die Reproduzierbarkeit der Chromatographie durch gelöste Gase in den Elutionsmitteln wurden durch den Einsatz eines Vakuumentgasers ausgeschlossen. Um eine maximale Elutionseffizienz zu erreichen, wurde die Gradientensteigung der

jeweiligen Probenzusammensetzung angepaßt. Dies sollte eine komplette Elution aller Probenbestandteile gewährleisten. Im Anschluß an den Tagesbetrieb der Chromatographiesäule erfolgte eine Säulenspülung mit einem Leergradienten bis zu einem konstanten Detektorsignal. Über Nacht wurde die Säule zu 100% mit einem der binären Lösungsmittelgemische befüllt. Vor Inbetriebnahme der Chromatographiesäule wurde die Trennphase mit dem für die nächste Chromatographie benötigten Eluenten equilibriert.

2.4.5 Zentrifugieren

- I. Zur Sedimentation grober Bestandteile einer Probe kam eine Tischzentrifuge (Hettich; EBA III) zum Einsatz. Bei maximaler Drehzahl konnte nach 30 min. bei allen Anwendungen ein klarer Überstand erhalten werden.
- II. Zur Sedimentation von groben Bestandteilen und zum Filtrieren von Coelomproben, die über 3 kDa Ausschlußfiltern oder 0.22 µm Filtern (Micropore-0.22 Filtereinheit; 30 min. mit 11700 Upm bei 4°C) erfolgten, wurden eine Tischkühlzentrifuge (Mikro 22 R; Hettich) verwendet.

2.4.6 Ultrafiltration

Zur Vereinfachung der komplexen, biologischen Matrix wurde die Methode der Ultrafiltration gewählt. So konnten hoch- und höhermolekulare Probenbestandteile des Homogenats abgetrennt werden. Angetrieben durch einen Magnetrührer bei ca. 250 Umdrehungen pro Minute wurde eine Ultrafiltrationszelle (Amicon; 8050) mit Filtermembranen (Diaflo-Membran; Ø = 76 mm, regenerierte Zellulose) der Ausschlußgrenzen 10 kDa (YM 10), 3 kDa (YM 3), 1 kDa (YM 1) und 500 D (YC 05) verwendet. Vor Gebrauch wurden die Filtermembranen zum Entfernen von Natriumazid (zur Konservierung) dreimal für jeweils 20 min. in Milliporewasser konditioniert. Bei Raumtemperatur und einem Stickstoffdruck (4.0) von 350 kPa wurden die Filtrate in Schraubdeckelgläsern aufgefangen und direkt der Festphasenextraktion zugeführt. Der Filtrerrückstand wurde noch zweimal mit ca. 1 mL Milliporewasser gespült, anschließend vorsichtig vom Filter entfernt und in einen Schnappdeckel-

gläschen bei -20°C gelagert. Die vereinten Filtrate wurden ebenfalls bei -20°C aufbewahrt.

Kleinere Probenmengen bis zu einem Volumen von 850 µL, wurden zur schnellen Weiterverarbeitung über 3 kDa Ausschlußfilter als Zentrifugen-Ultrafiltereinheit (Microcon-3; Amicon) filtriert. Die Filter wurden auf herkömmliche Eppendorfcaps gesetzt, die zu filtrierende Probe mit einer Pipette auf das Filter pipettiert und anschließend bei 11700 Upm und 4°C zentrifugiert. Es resultierte stets eine klare Lösung, die zur Weiterbearbeitung der HPLC zugeführt wurde.

2.5 Anreicherungsverfahren

2.5.1 Festphasen Extraktion (SPE)

Zur Überprüfung der Anwesenheit flüchtiger Komponenten im Coelom von *P. dumerilii* wurde die Festphasen-Extraktion (solid-phase extraction) gewählt. Die selektive Adsorption von Substanzen aus komplexer, wäßriger Matrix auf stationären Phasen unterschiedlicher Polarität und die Elution mit geeigneten

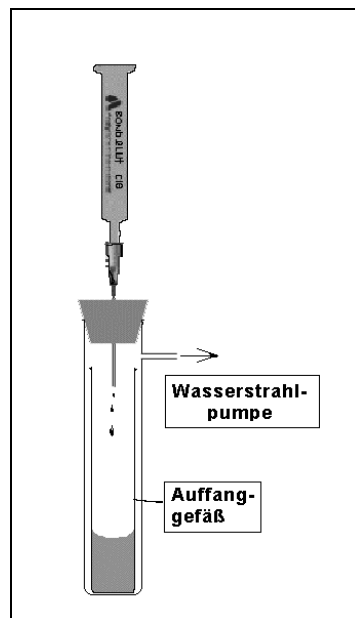


Abb. 2.5: SPE-Apparatur

Lösungsmitteln ermöglichte die Anreicherung u.a. von flüchtigen Komponenten. Alle dafür eingesetzten Lösungsmittel besaßen hohe Reinheitsgrade (nanograde und GC grade). Die Festphasen-Extraktion ist unterteilt in die Schritte Konditionierung (1) der Sorbens, Probenaufgabe/-Adsorption (2) der Komponenten, Matrixentfernen/Waschen (3) des Restanteils der Matrix und nicht adsorbierbarer Substanzen, sowie Elution (4) der adsorbierten Komponenten mit wenig Lösungsmittel in mehreren Schritten um das Eluatvolumen möglichst klein zu halten. Die Extraktion erfolgte mit der in Abbildung 2.5 dargestellten Apparatur.

Aufgrund der angewandten Analytik (GC-MS) und der Überlegungen bezüglich Struktur und Polarität der gesuchten bzw. postulierten Komponenten kamen für die Anreicherung mit der SPE nur eine unpolare bis sehr schwachpolare Adsorbentien in Betracht.

Eine kurze Übersicht der verwendeten Extraktionssäulen und deren Polarität ist in Tabelle 2.7 aufgeführt:

Phase	Belegung	Eigenschaft	
C18	-Si-O-Octadecyl	unpolar	abnehmende Hydrophobizität  zunehmende Polarität
C8	-Si-O-Octyl	unpolar	
CN	-Si-O-Cyan	schwach polar	
NH ₂	-Si-O-Amin	polar	
2OH	-Si-O-Diol	polar	

Tab. 2.7: Ausgewählte Adsorptionsphasen der SPE

Die Extraktion wurde mit Extraktionssäulen (Bond Elut; Analytichem International, 100 mg Adsorbens) in folgenden Schritten durchgeführt (Tabelle 2.8):

1. Konditionieren	
1a.	• Konditionierung mit 2 mL Wasser (Millipore)
1b.	• mit 1 mL Methanol
1c.	• mit 1 mL Aceton
1d.	• mit 1 mL Methanol
1e.	• mit 2 mL Wasser (Millipore)
2. Probenaufgabe	
2.	• Probenaufgabe/Adsorption (variables Volumen)
3. Spülen	
3.	• Matrixentfernen/Spülung mit 2 x 1 mL Wasser (Millipore)
4. Eluieren	
4a.	• Elution der Komponenten mit 50 - 60 µL Aceton
4b.	• mit 50 µL <i>n</i> -Hexan
4c.	• mit 50 µL Aceton
4d.	• mit 50 µL Aceton
4e.	• mit 50 µL Aceton oder MeOH

Tab. 2.8: Arbeitsschritte der SPE

Als Proben wurden

- I. die Filtrate der Ultrafiltration der aufgearbeiteten Homogenate,
- II. das Schwärmwasser von *P. dumerilii*-Weibchen,
- III. frisch gewonnenes Sperma,
- IV. Blindproben und
- V. Standards aus Einzelsubstanzen eingesetzt.

In Abhängigkeit vom Probenvolumen wurde entweder auf das Adsorbens pipettiert, oder man ließ aus einer 10 mL-Spritze, deren Kanüle durch einen Silikonstopfen gestochen und direkt auf die SPE-Kartusche gesetzt wurde, zutropfen. Als Auffangbehältnis großvolumiger Proben diente ein 50 mL Zweihalskolben (NS 14). Dabei wurde ein Hals durch einen mit einer Kanüle durchstochenen Silikonstopfen (als Halterung der Kartusche) verschlossen. Der andere Hals war durch ein Übergangsstück mit Schliff (NS 14) und Olive über einen Silikonschlauch mit einem Sicherheitsgefäß (Zweihalskolben, NS 14) verbunden. Das Sicherheitsgefäß wurde mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert. Bei Proben geringeren Volumens und zu Spülzwecken fand ein Reagenzglas mit Olive als Auffangbehälter Verwendung (Abb. 2.5).

Die Proben wurden nacheinander durch die Filter mit zunehmender Polarität gezogen. Dabei wurde ein Trockenziehen des Adsorbens strikt vermieden.

2.5.2 Grob/Hersch-Closed-Loop-Stripping

Die Anreicherung von flüchtigen Komponenten aus Seewasser- und Homogenatproben erfolgte neben der SPE Methode mit dem Grob/Hersch-closed-loop-stripping-Verfahren (G/H-CLS).

Diese Apparatur erlaubt ein kontinuierliches Ausblasen von wäßrigen Proben in einem geschlossenen Kreislaufsystem mit Luft oder einem Inertgas. Bei diesem Verfahren entwickelt sich eine, durch den Pumpendruck vor der Hersch-Spirale und dem hydrostatischen Druck der Flüssigkeit im Innenzylinder, kontinuierlich aufsteigende Blasenkette. Die vor jeder Blase aufwärts transportierte Flüssigkeit läuft am oberen Ende der Spirale wieder auf die Probe in den Innenzylinder. Die mit den flüchtigen Komponenten kontaminierte Luft wird durch ein Aktivkohle- oder Adsorptionsfilter geleitet. Die Rückführung des Gases im geschlossenen Kreislauf verhindert die Kontaminierung

durch die Laborluft. Um die Sättigung des Filters mit Kondenswasser zu verringern, kann das Gas vor dem Filterdurchtritt auf circa 45°C erwärmt (Heizspannung: 3.5 V am Labornetzgerät NG 304, Uniwatt, Beha) werden.

Neben einer Probe aus dem Homogenat von 25 Weibchen, die mit einem Aktivkohlefilter durchgeführt wurde, kam in Abwandlung der Methode eine Bond Elut C8-Phase zum Einsatz.

Das Aktivkohlefilter wurde mit Aceton, Dichlormethan und *n*-Hexan gewaschen, bei 200°C für 60 min. konditioniert, nochmals mit Aceton gewaschen und abschließend im Vakuum getrocknet. Die Elution des Filters erfolgte mit je 30 µL Aceton, *n*-Hexan und zweimal mit Dichlormethan. Die Eluate wurden anschließend mit GC-MS analysiert.

Um Reaktionen und Umlagerungen an aktivierter Aktivkohleoberfläche von vornherein auszuschließen, wurde der Gasstrom einer Homogenatprobe aus 62 Weibchen durch eine frisch konditionierte C8-Extraktionskartusche geleitet. Auf die Erwärmung des Gasstroms vor der SPE-Kartusche wurde in diesem Fall aufgrund eines möglichen Austrocknens des Adsorbens verzichtet. Die Konditionierung und Elution erfolgte analog der SPE-Methode (Kap. 2.5.1).

2.5.3 Peak-Trapping

Die Auftrennung und Anreicherung einzelner Proben durch fraktionierende Kondensation u.a. mit Hilfe der Gaschromatographie wird als Peak-Trapping bezeichnet. Ein vor dem Detektoreingang platzierter Eluatstromteiler (Split) sollte die selektive Kondensation eines Teils der im Gasstrom befindlichen Substanzen in Aceton ermöglichen (siehe Abbildung 2.6).

Die Kapillarsäule wurde so präpariert, daß ein Eluatstromteiler am Ende der Trennsäule angeklebt und dessen Ausgänge jeweils mit zwei 70 cm langen deaktivierten Kapillarsäulen versehen wurden. Erstrebenswert ist der zeitgleiche Austritt der zu fraktionierenden Substanz aus dem offenen Kapillarsäulenende zu dem Detektorsignal. Durch Verwendung unterschiedlicher Innendurchmesser der beiden deaktivierten Kapillaren lassen sich individuelle Verhältnisse zwischen Signal und Kondensat erreichen. Der Einfachheit halber wurde ein Split-Verhältnis von 1:1 gewählt.

Die Anreicherung und Fraktionierung erfolgte durch dreimaliges Injizieren von jeweils 2 μL Ausgangsprobe bei 80°C und 1°C Aufheizrate pro Minute. Als Vorlagen dienten ca. 50 mm lange Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von ca. 2.5 mm, die am unteren Ende zugeschmolzen wurden. Am oberen Ende wurden die Röhrchen abgeplattet und mit einem etwa 1,5 mm rundem Loch durch langsames Erhitzen mit einem Bunsenbrenner versehen.

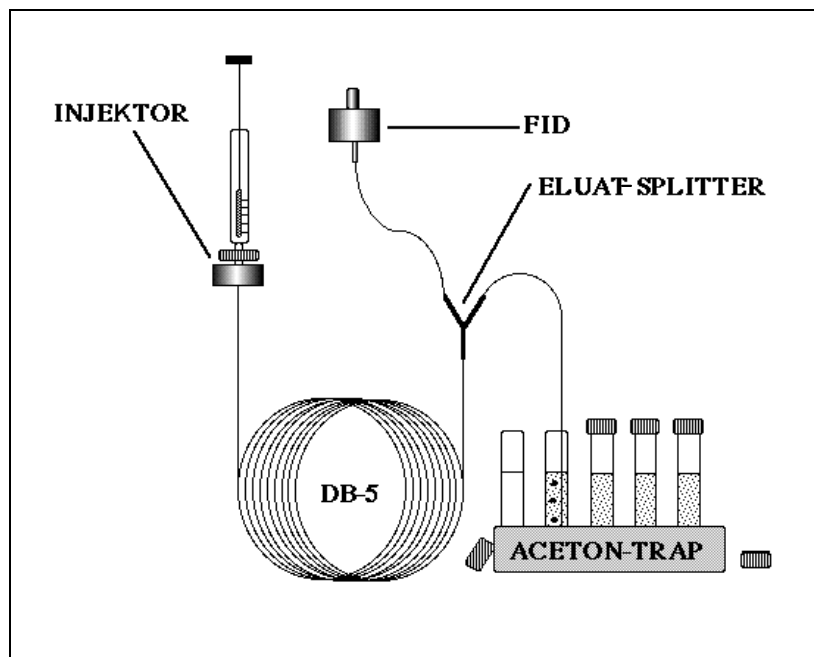


Abb. 2.6: Schematischer Aufbau zur Peak-Trapping Technik

Zum Auffangen des Gasstromes wurden diese Vorlagen mit jeweils 300 μL Aceton gefüllt, das offene Kapillarsäulenende in die gesamte Lösungsmittelsäule eingetaucht und in zuvor festgelegten Zeitabschnitten (innerhalb eines Tailings zwischen zwei Peaks) gewechselt. Zwischen dem Wechsel der Vorlagen schloß sich ein Spülschritt an, wobei das offene Kapillarende kurz in ein mit Aceton gefülltes Rollrandgläschen gehalten wurde. Die einzelnen Fraktionen wurden mit Hilfe gekoppelter GC-MS untersucht, die Röhrchen mit Parafilm oder teflonummantelten Glasstäbchen verschlossen und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

Material:

- System II (Hewlett Packard HP 6890)
2 x 70 cm desaktivierte Kapillarsäule; ID = 0.32 mm;
- System I (U.T. Packard)
2 x 95 cm desaktivierte Kapillarsäule; ID = 0.25 mm;
- Glasröhrchen (50 mm * 2.5 mm ID)
- Aceton (nanograde, Fa. Promochem)
- 5 µL Spritze (Fa. Hamilton)
- Press-Fit Splitter (Fa. Analyt, Mühlheim)

2.5.4 Vakuumaufkonzentration**2.5.4.1 Rotationsverdampfer**

Größere Flüssigkeitsmengen, wie z.B. Heterokomponentenfraktionen der Säulenchromatographie oder wäßrige Proben mit schwerflüchtigen Komponenten, wurden in einem Rotationsverdampfer (Büchi Rotavapor R-114) unter vermindertem Druck (650 hPa/40°C) (Membranpumpe; Vacuubrand, MZ 20/2.4) volumenreduziert.

2.5.4.2 SpeedVac-Konzentrator

Kleinere Flüssigkeitsmengen bis zu 4 mL, aus Proben mit nichtflüchtigen Substanzen in wäßriger Matrix, wurden mit einem Vakuumkonzentrator (Savant SC110) volumenreduziert. Eine Drehschieberölpumpe (ValuPump, VLP 120) sorgte für das Vakuum, und die Proben wurden während des Arbeitsvorganges in einer in drei Stufen temperierbaren Vakuumzentrifuge vom Lösungsmittel befreit. Das verflüchtigte Lösungsmittel wurde vor der Vakuumpumpe in einer mit flüssigem Stickstoff gekühlten Falle kondensiert.

2.5.5 Volumenreduzierung/Lösungsmittelaustausch

Proben mit kleineren Mengen an Lösungsmittel konnten durch Abblasen bis zur Gewichtskonstanz eingeengt werden.

Die in einem Spitzkolben befindlichen Extrakte in leichtflüchtigem Lösungsmittel wurden im schwachen Stickstoffstrom (4.0) volumenreduziert, der

Rückstand in wenig Lösungsmittel aufgenommen und chromatographisch untersucht oder dem Biotest zugeführt. Alle erhaltenen Fraktionen wurden im Tiefkühlfach bei -20°C gelagert.

2.6 Probencharakterisierung

Eine Probencharakterisierung und Substanzidentifizierung erfolgte an einem gekoppelten GC-MS System. Zur gaschromatographischen Trennung wurde ein Modell der Firma VARIAN (System III) verwendet. Als Detektor fungierte ein Massenspektrometer (Ion-Trap-MAGNUM) der Firma Finnigan MAT.

Die Ionisierung der Moleküle erfolgte durch Elektronenstoßionisation. Die Detektion der Fragmente erfolgte im Massenbereich zwischen 38 und 400 m/e mit einem Ion-Trap-Detector (ITD). Zur Bestimmung der Molpeaks einzelner Verbindungen wurde nach der Methode der chemischen Ionisation mit *iso*-Butan (2.5; Messer-Griesheim) ionisiert. In regelmäßigen Abständen erfolgte eine Kalibrierung des Massenspektrometers im „auto setup“ Modus, u.a. für den Ionisierungsstrom, Multiplier-Spannung und die Massenkalisierung, die mit Fluorocarbon (FC-43) durchgeführt wurde. Alle Messungen wurden nach dem „auto setup“ mit einer um 100 V niedrigeren Multiplier-Spannung gemessen. Die Steuerung, Analytik und Datenverarbeitung erfolgte an einem Cotec AT 386 Personal Computer mit der MAGNUM GC-MS-Software[©] (1992). Die Identifikation der einzelnen Verbindungen wurden durch den Vergleich der aufgezeichneten Massenspektren mit einer Spektrenbibliothek (NIST) durchgeführt.

Dazu wurden einzelne Bereiche der Peaks markiert, rechnergestützt bearbeitet und das dazugehörige Massenspektrum der MAGNUM-Bibliothek abgebildet.

2.7 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate des flüchtigen Pheromons 5- Methyl-3-heptanon wurde eine Standardlösung mit einer Konzentration von 10 ng des rac. Ketons pro mL Milliporewasser hergestellt und in einer ersten Versuchsreihe 2 mL bzw. 1 mL dieser Lösung über die SPE-Extraktionskartuschen gegeben, anschließend wurden die Adsorptionsfilter mit Aceton und *n*-Hexan eluiert und die einzelnen Eluate mit gekoppelter GC-MS analysiert und ggf. quantifiziert. Die externe Quantifizierung erfolgte mit je 1 μL der vier Standardlösung des Ketons zu $4.1 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, $2.05 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, $0.82 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ und $0.41 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ über die Flächen unter den Peaks mit dem Temperaturprogramm des GC's von 50°C Starttemperatur und einer linearen Aufheizrate von 1° pro Minute bis 60°C. Anschließend wurde die Säule mit einer Aufheizrate von 10° pro Minute bis 260°C hochgeheizt.

Aufgrund der geringen Konzentration (Peaks verschwinden im Grundrauschen des Ionenstroms) wurde das Integral der Peakflächen in der Einzelionenbetrachtung mit den Fragmenten $m/z = 71$; 99 und 129 bestimmt.

Um den Verlusten durch Verdampfen des Lösungsmittels während der Elution bzw. eines Verbleibs des Lösungsmittels auf dem Filter Rechnung zu tragen, wurde unmittelbar nach dem Elutionsvorgang das resultierende Eluentenvolumen mit einer 100 μL Spritze (Hamilton) bestimmt.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate des Ketons nach einem Trennungsgang über die Ultrafiltrationsanlage, wurde eine Standardlösung des Ketons mit einer Konzentration von 2 ng pro Milliliter Milliporewasser hergestellt und 10 mL der Lösung über einen 3 kDa und einen 500 Da Membranfilter geleitet. Anschließend erfolgte die Ketonanreicherung an einem C8-Adsorptionsfilter. Die Quantifizierung wurde wie im ersten Schritt durchgeführt.

2.8 Synthesen physiologisch aktiver Verbindungen

2.8.1 Verwendete Lösungsmittel und Chemikalien

2.8.1.1 Lösungsmittel

Wenn die Durchführung der Versuche in getrockneten Lösungsmitteln notwendig war, wurde der Index abs. benutzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungsmittel wurden auf folgenden Wegen getrocknet:

Diethylether, *n*-Heptan und Toluol wurden über Natrium unter Rückfluß erhitzt und anschließend destilliert.

Zur Hydrolyse wurde ausschließlich Eis aus VE-Wasser bzw. VE-Wasser selbst verwendet.

Die Reaktionen wurden in nachfolgenden Lösungsmitteln durchgeführt:

Diethylether, (GC-grade, > 99.5 %), bp= 35°C, Fluka Chemika

n-Heptan, (P. A., 99 %), bp = 98°C, ACROS ORGANICS

Toluol, (P. A., 99.5 %), bp = 110.6°C, Scharlau

Benzol, (P.A., 99.9 %), bp = 80.1°C, Merck

2.8.1.2 Substrate

Zur Trocknung der Produkte und zum Absolutieren der Lösungsmittel wurden Substrate höchstmöglicher Reinheit verwendet.

Vor der Grignard-Reaktion wurden die Magnesiumspäne 30 min. bei 140°C im Trockenschrank konditioniert.

2.8.1.3 Verwendete Edukte

Die für die Reaktionen nach der Grignard-Wurtz Synthese und Friedel-Crafts-Alkylierung eingesetzten Ausgangsverbindungen sind in Tabelle 2.9 dargestellt.

Verbindung	Summen -formel	Molmasse [g mol ⁻¹]	Reinheit	Dichte [g/ml]	Sdp: [°C]
2-Methylbenzylbromid	C ₈ H ₉ Br	185.063	98 %, GC	1.381	216
3-Methylbenzylbromid	C ₈ H ₉ Br	185.063	96 %, GC	1.370	185/ _{340mm}
4-Methylbenzylbromid	C ₈ H ₉ Br	185.063	98 %, GC	-	219
4-Brom-1-ethylbenzol	C ₈ H ₉ Br	185.063	99 %	1.343	204
4-Brom- <i>m</i> -xylol	C ₈ H ₉ Br	185.063	90 %	1.370	214
<i>n</i> -Propylbromid	C ₃ H ₇ Br	122.99	98 %, GC	1.35	71
Benzol	C ₆ H ₆	78.11	99.9 %	0.879	80.1
<i>tert.</i> -Amylalkohol	C ₅ H ₁₂ O	88.15	99 %	0.805	102

Tab. 2.9: Verwendete Edukte

2.8.1.4 Strukturbeweis der synthetisierten Verbindungen

Die Identifizierung und der Strukturbeweis der Alkylbenzole erfolgte anhand gekoppelter GC-MS mit dem GC-System Nr. III. Dazu wurden 1:1000 Standardlösungen der Destillate hergestellt und jeweils 1 µL chromatographiert.

Auf weitere Analysemethoden, wie NMR-, IR- und UV-Spektrometrie, wurde verzichtet.

Die Chromatogramme und Massenspektren der synthetisierten und isolierten Verbindungen befinden sich im Anhang unter den Abbildungen A.9 bis A.14 ab Seite 148.

2.8.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Grignard-Verbindungen (Petrov, Zakharov & Krasnova, 1958, 1959 und Petrov & Zakharov, 1960)

2.8.2.1 Darstellung der Ausgangsverbindung Propylmagnesiumbromid

Die Grignard-Reaktion wurden unter einer trockenen Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

In einem 250 ml Dreihalskolben mit Rückflußkühler, Schutzgaszufluß und Tropftrichter mit Blasenähler wurden 3.65 g (0.15 mol) Magnesiumspäne mit

abs. Diethylether überschichtet. Zum Anspringen der Reaktion wurden von der Gesamtmenge, 18.45 g (0.15 mol) Propylbromid, etwa 0.2 mL direkt im Kolben unter das Lösungsmittel unterschichtet.

Nach Anspringen der Reaktion wurde das Bromid in 50 mL abs. Diethylether, unter schwachem Sieden des Reaktionsgemisches über, ca. 4 Stunden zuge-
tropft. Anschließend wurde 45 min. bei 65°C unter Rückfluß erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und bei -10°C unter Schutzgas gelagert.

Lösungsmittelaustausch:

Nachdem ein Großteil des Diethylethers unter Normaldruck bei 55°C abdestilliert wurde, erfolgte mit Hilfe einer Umkehrfritte eine Trennung des nicht abreagierten Magnesiums und der gelösten Grignardreagenz. Reaktionskolben und Fritte wurden mit wenig abs. Diethylether nachgespült und filtriert. Anschließend wurde im Rotationsverdampfer bei 13 hPa und 50°C Badtemperatur über 2 Stunden bis zur Trockene das Lösungsmittel abgetrennt. Nach der Zugabe von 150 mL abs. *n*-Heptan ging unter Schutzgas, nach kurzer Erwärmung bei 70°C - 80°C, der Bodensatz in Lösung.

Ausbeuten wurden nach diesem Syntheseschritt in keinem Fall ermittelt.

2.8.2.2 Darstellung von Phenylalkanen aus Grignard-Verbindungen

In einem Dreihalskolben mit Rückflußkühler und Tropftrichter wurden ca. 0.15 mol der Ausgangsverbindung unter Inertgaszufuhr vorgelegt. Zur Darstellung des Alkylbenzols wurden in dem Tropftrichter 24.0 g (0.13 mol) des betreffenden Bromids in 40 mL abs. *n*-Heptan oder Toluol gelöst und unter ständigen Rühren tropfenweise zur Grignardverbindung hinzugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch 4 Stunden bei 90°C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde das überschüssige Propylmagnesiumbromid mit 1 N Salzsäure hydrolisiert und das gesamte Gemisch in einen Scheidetrichter überführt. Die beiden Phasen wurden voneinander getrennt. Die organische Phase wurde anschließend zweimal mit je 10 mL Wasser extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Abschließend wurde, durch fraktionierende Destillation unter reduziertem Druck (18 hPa) bei ca. 85°C, das Produkt gewonnen

Tabelle 2.10 zeigt eine Übersicht der Ausgangsverbindungen, Lösungsmittel und Ausbeuten bei der Darstellung der Alkylbenzole.

Grignard-Verbindung	Halogenid-Komponente	Lösungsmittel	Ausbeute g / (%)
Propyl-MgBr	4-Brom-1-ethylbenzol	n-Heptan	2.1 / 16.2*
Propyl-MgBr	2-Methylbenzyl-bromid	n-Heptan	5.7 / 29.2
Propyl-MgBr	3-Methylbenzyl-bromid	Toluol	5.8 / 30
Propyl-MgBr	4-Methylbenzyl-bromid	Toluol	5.0 / 28.5
Propyl-MgBr	4-Brom-m-xylol	Toluol	< 0.1 %

Tab. 2.10: Synthesenübersicht

2.8.3 Darstellung von 1.1-Dimethylpropylbenzol nach der Friedel-Crafts-Alkylierung (Huston, Fox & Binder, 1938)

In einem 250 mL Zweihalsrundkolben mit Rückflußkühler, Tropftrichter und Magnetrührkern wurden 3.34 g (25 mmol) Aluminiumtrichlorid (p.a.) in 22.1 mL (0.25 mol) thiophenfreiem Benzol gelöst. Unter ständigem Rühren wurden 5.4 mL (0.05 mol) *tert.*-Amylalkohol zu dem Reaktionsgemisch getropft. Die Reaktionstemperatur lag bei ca. 15-20°C. Während der Reaktion bildete sich Chlorwasserstoff und die Reaktionslösung verfärbte sich in ein Tiefrot. Es wurde über Nacht gerührt, anschließend mit zerstoßenem Eis hydrolisiert und die organische Phase im Scheidetrichter abgetrennt. Die wäßrige Phase wurde noch zweimal mit wenig Diethylether extrahiert. In einem Rotationsverdampfer wurde von den vereinten organischen Phasen bei 350 hPa und 40°C das Lösungsmittel entfernt. Die anschließende, fraktionierende Destillation bei 18 hPa ergab, bei einer Temperatur von 69°C, 6.4 g (43 mmol) (1.1-Dimethylpropyl)-benzol, das einer Ausbeute von 86 % entspricht.

* Ergab als Produkt ein Destillat aus Ethyl-2-isopropylbenzol und Ethyl-4-isopropylbenzol im Verhältnis von ca. 1:1 (GC).

3. ERGEBNIS

3.1 Verhaltensmodifizierende Fraktionen und Komponenten in Rohöl

3.1.1 Ergebnisse der Diplomarbeit

Im Mittelpunkt der Diplomarbeit stand die biotestorientierte Isolierung, Anreicherung und Identifizierung verhaltensbiologisch aktiver Verbindungen aus dem EKO-FISK-Rohöl. Dabei gelang die Anreicherung von, die Spermaabgabe auslösenden Substanzen im Siedebereich zwischen *n*-Decan und *n*-Tetradecan (174°C und 253°C). Abbildung 3.2 zeigt in einem Fließschema den methodischen Trennungsgang von der Ausgangsprobe "Rohöl" zu einer rein aromatenhaltigen, in Aceton kondensierten Probe. Positiv getestete Fraktionen sind darin hervorgehoben.

In zahlreichen verhaltensphysiologischen Tests an männlichen Polychaeten *Platynereis dumerilii* konnte dabei der Einfluß von C₅-alkylierten Benzolderivaten nachgewiesen werden. Als mögliche reaktionsauslösende Verbindungen wurden (1.1-Dimethylpropyl)-benzol (I), *i*-Butyl-4-methylbenzol (II) und 2.4-Diethyl-1-methylbenzol (III) identifiziert (s. Abbildung 3.1).

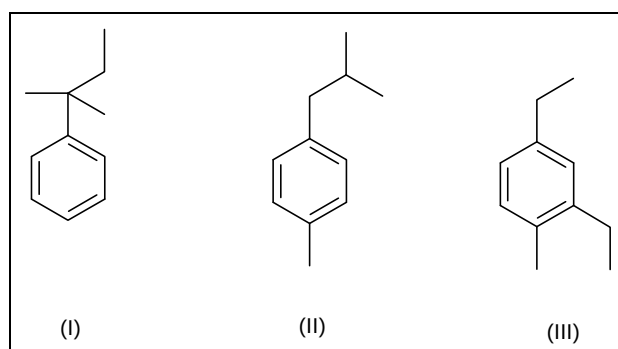


Abb. 3.1: Potentiell aktive Aromaten

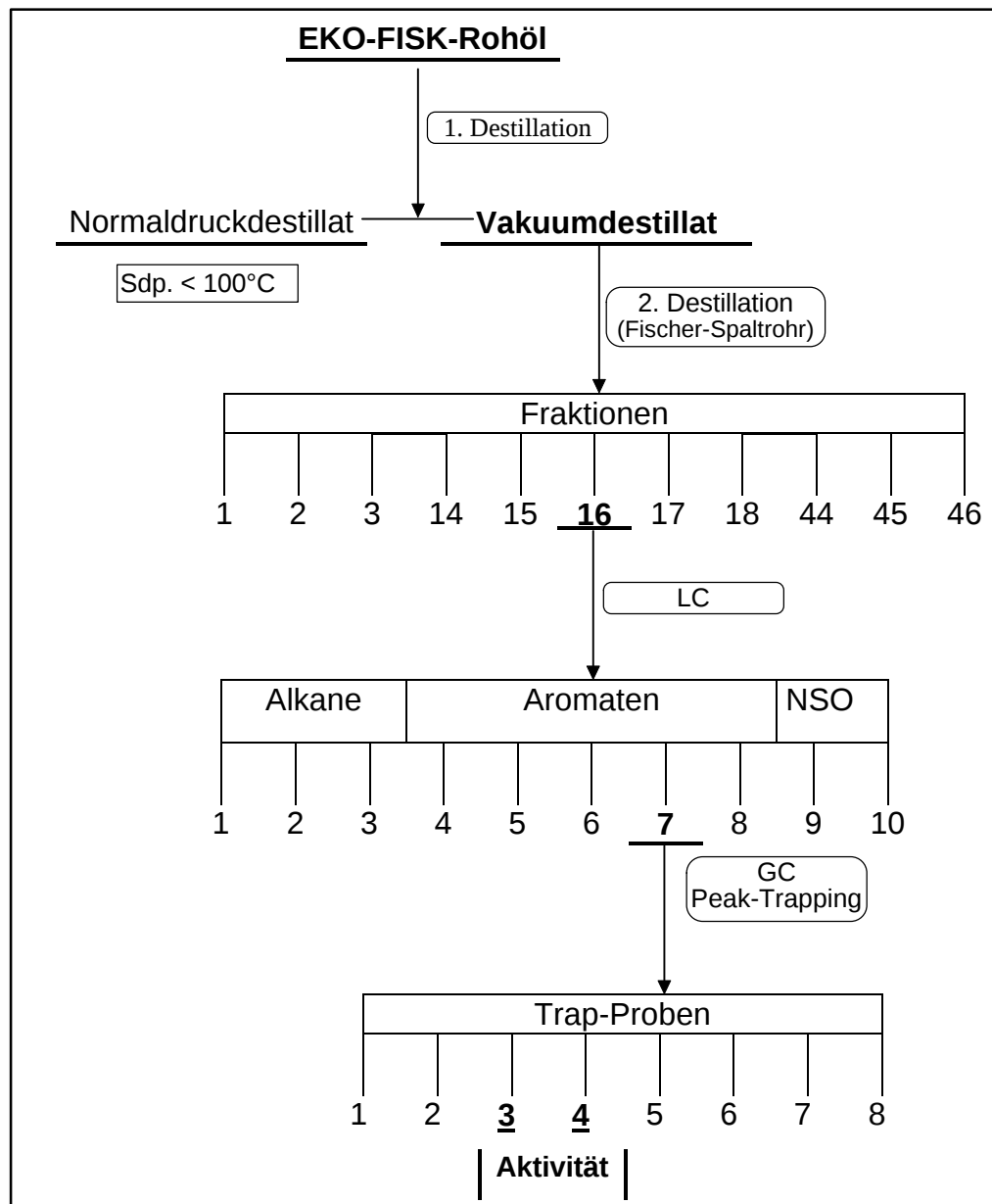


Abb. 3.2: Schematischer Probengewinnungsgang

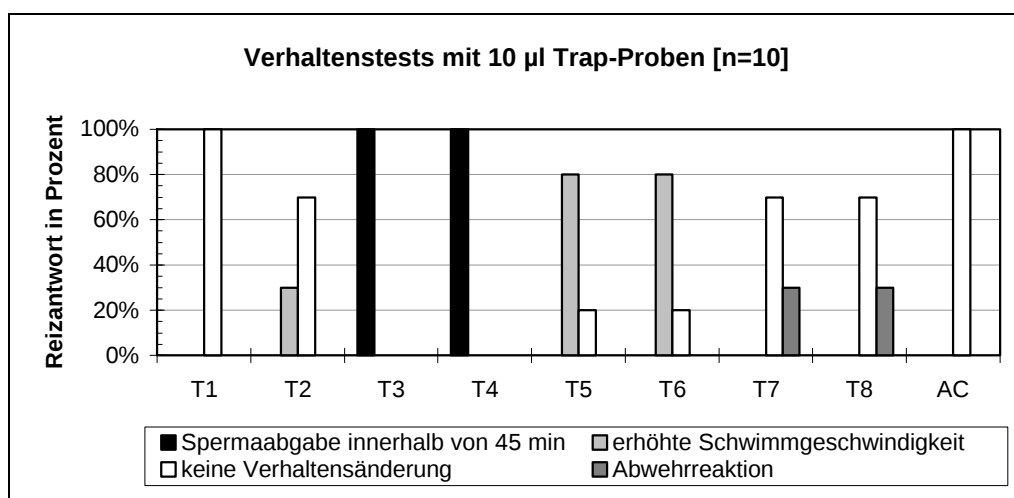
Ein Effekt von Alkanen bzw. heteroatomhaltigen Komponenten aus dem untersuchten Siedebereich (*n*-Decan bis *n*-Tetradecan) bezüglich einer Gametenabgabe induzierenden Wirkung konnte nicht festgestellt werden.

Weiterführende Untersuchungen sollten

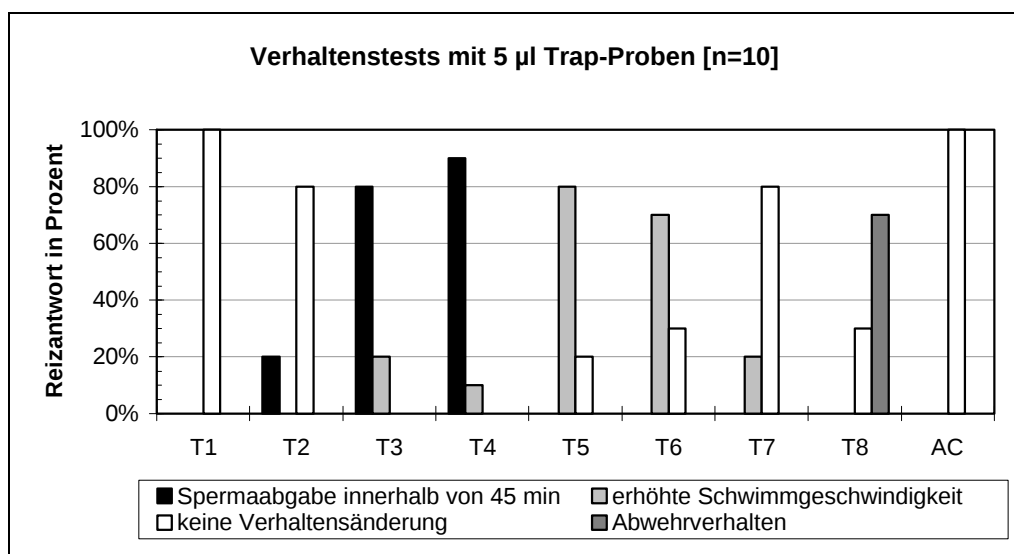
1. - der Identifikation einer, in der Diplomarbeit isolierten, die Gametenabgabe evozierenden Rohölkomponente dienen, sowie deren Struktur durch Synthese beweisen
2. - eine Abschätzung der zur Spermaabgabe notwendigen Konzentration bzw. Menge ermöglichen

3. - eine Aussage zur Abhängigkeit zwischen der Aktivität und der Konstitution der Verbindung machen

Durch die fraktionierende Kondensation der Komponenten in Aceton aus dem säulenchromatographischen Eluat (S1607) resultierten acht Trap-Proben (T1 - T8), die erneut in verhaltensphysiologischen Tests hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht wurden. Als Blindprobe wurde ebenfalls Aceton (AC) in demselben Volumen getestet. Die Tabellen 3.1 und 3.2 geben einen Überblick über die Spermaabgabe induzierende Wirkung dieser Proben.



Tab. 3.1: Verhaltenstests mit 10 µL Probevolumen



Tab. 3.2: Verhaltenstests mit 5 µL Probevolumen

Dabei konnte mit den Proben T3 und T4 bei einem Probenvolumen von 10 μL bei den schwärmenden *P. dumerilii*-Männchen in 100% aller Fälle eine Gametenabgabe hervorgerufen werden. Dagegen lösten die Probe T4 bei einem Volumen von 5 μL in nur noch 90% aller Tests eine Spermaabgabe aus, und bei T3 konnte ein Absinken der Aktivität auf 80% registriert werden. Zusätzlich konnte bei den Biotests mit 5 μL eine Aktivität der Probe T2 beobachtet werden, die in 20% der Tests bei den Tieren zu einer Spermaabgabe führte. Ein Einfluß des Lösungsmittels Aceton konnte in den *Bioassays* weder bei 5 μL noch bei 10 μL festgestellt werden. Die Konzentration der Aromaten wurde auf 10-15 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Trap-Probe geschätzt.

3.1.2 Charakterisierung bioaktiver Kondensatproben

Die genauere Fragmentationenbetrachtung der gaschromatographisch getrennten Kondensatproben aus der Diplomarbeit ließen 12 Pentylbenzolisomere ($M = 148.25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) erkennen, die potentiell für eine die Gametenabgabe auslösende Wirkung verantwortlich gemacht werden konnten.

Abbildungen 3.3 und 3.4 zeigen die beiden Gaschromatogramme mit einer Einzelfragmentationenbetrachtung (SIM; $m/z = 148, 133; 119; 105$) der bioaktiven Acetonkondensatproben mit den Probenindices S1607T3 bzw. T4. Dabei sollte die Fragmentationenbetrachtung Aufschlüsse über den Reinheitsgrad einer Probe ermöglichen.

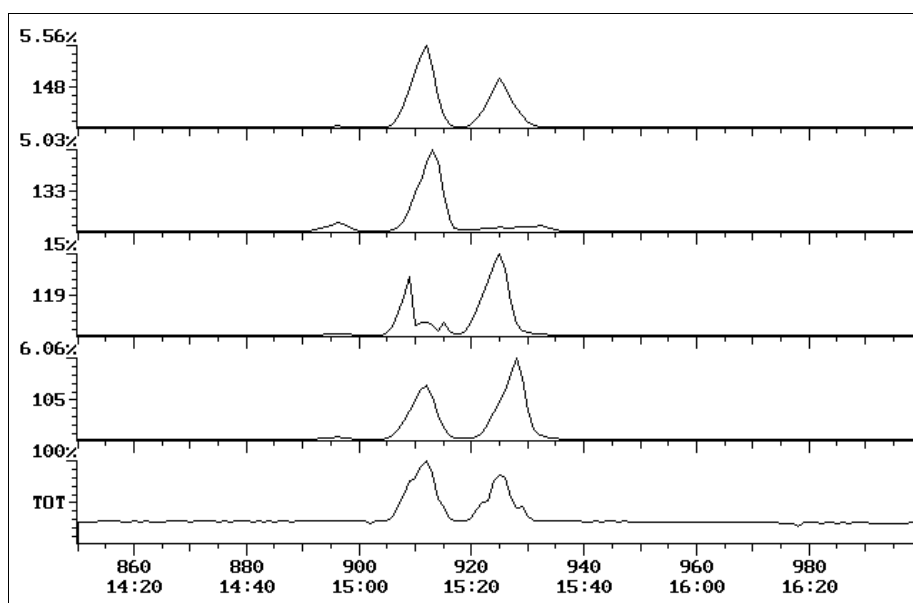


Abb. 3.3: Gaschromatogramm der Trap-Probe T3; GC-System Nr. III;

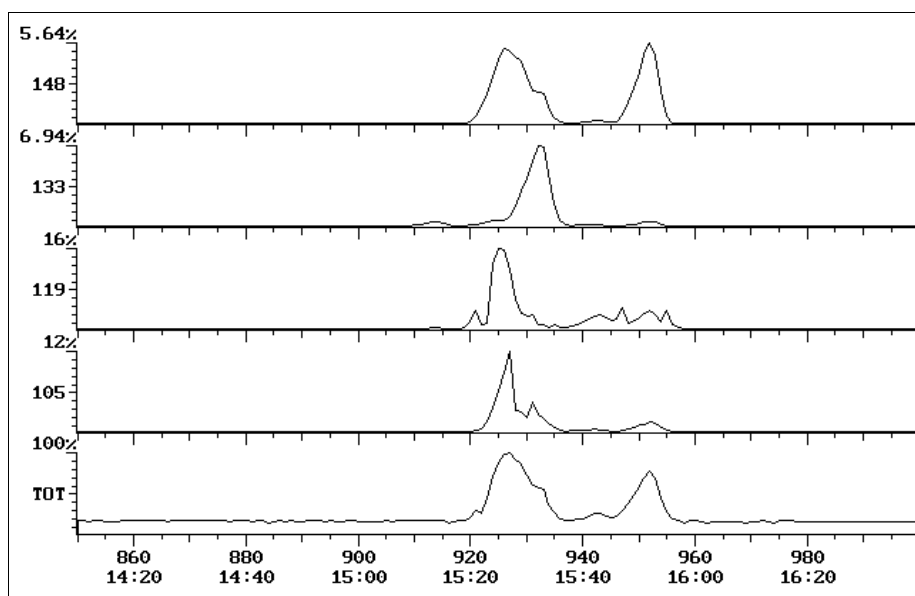


Abb. 3.4: Gaschromatogramm der Trap-Probe T4; GC-System Nr. III;

In der nachfolgenden Tabelle (3.3) sind die 12 Verbindungen nach zunehmender Retentionszeit mit ihren Schlüsselfragmenten sowie die Vorschläge der NIST-Datenbankrecherche aufgeführt. Die Hauptkomponenten in den jeweiligen Trap-Proben, die auch ohne eine Einzelionenbetrachtung zu erkennen sind, wurden hervorgehoben.

Scan	Trap-Nr.	Schlüsselfragmente					NIST-Vorschlag
873	2	119	91	33	120	105	(1.1-Dimethylpropyl)-benzol
892	2	105	106	91	148	39	<i>i</i> -Butyl-4-methylbenzol
896	2, 3	133	119	105	91	148	1.4-Diethyl-2-methylbenzol
904	2, 3	91	92	39	148	71	Pentylbenzol
907	2, 3	119	91	39	148	105	(1.1-Dimethylpropyl)-benzol
910	2, 3, 4	105	106	148	39	91	1- <i>i</i> -Butyl-4-methylbenzol
914	3, 4	133	119	91	105	148	1.4-Diethyl-2-methylbenzol
924	2, 3, 4	119	148	91	105	39	(1.1-Dimethylpropyl)-benzol
929	2, 3, 4	105	106	148	91	39	1- <i>i</i> -Butyl-4-methylbenzol
935	2, 3, 4	133	119	148	91	39	1.4-Diethyl-2-methylbenzol
944	4	119	91	105	148	39	(1.1-Dimethylpropyl)-benzol
956	4	119	91	148	39	77	(1.1-Dimethylpropyl)-benzol

Tab. 3.3: Probencharakterisierung bioaktiver Acetonkondensate

Anmerkung: In der GC-MS-systemeigenen NIST-Datenbank sind lediglich 23 der 51 Pentylnbenzolisomere impliziert. Darunter befindet sich nur ein Massenspektrum mit einem Hauptfragmentpeak von $m/e = 119$, - (1.1-Dimethylpropyl)-benzol.

Eine Identifikation der Substanzen mußte somit über einen indirekten Weg erfolgen.

Der Vergleich der Chromatogramme legte die Vermutung nahe, daß eine Verbindung, die gleichzeitig in den Trap-Proben T3 und T4 präsent ist, für die Spermaabgabe verantwortlich sein konnte. Vermutlich war die Komponente ebenfalls in T2 präsent, jedoch aufgrund des Widerspruchs bezüglich einer Aktivitätszunahme bei Halbierung des Probevolumen und eines ungenügend reproduzierbaren Biotesterfolges, konnte eine absolute Aktivität der Probe T2 als nicht gesichert betrachtet werden.

Zu einer weiteren Analyse und zum Eingrenzen der bioaktiven Komponenten wurde eine Tabelle (Tabelle 3.4) aller 51 Pentylnbenzolisomere (Daten aus einer online-Recherche in der Beilsteindatenbank) erstellt. In ihr sind die Komponenten nach zunehmenden Siedepunkten geordnet. Anhand der Siedepunkte und *n*-Pentylnbenzol als Standard ließen sich die Retentionsbereiche der zu identifizierenden Substanzen grob festlegen.

Hierbei war festzustellen, daß 18 der 23 in der NIST-Datenbank aufgelisteten MS-Datensätze bereits unter den ersten 25 Isomeren der Tabelle vertreten sind. Somit waren kaum Vergleichsspektren für den zweiten Teil präsent.

Nr.	CAS-Nr.	Pentylnbenzolisomere ($M = 148.25 \text{ g mol}^{-1}$)	Kp ^α [°C]	Dichte ^β [gcm ⁻³]	bp ^γ (m/e)	NIST -MS ^δ
1	1007-26-7	(2.2-Dimethylpropyl)-benzol	185.5	0.857	92	ja
2	4481-30-5	(1.2-Dimethylpropyl)-benzol	186.5	0.864	105	ja
3	1075-38-3	<i>t</i> -Butyl-3-methylbenzol	189.2	0.866	133	ja
4	1196-58-3	(1-Ethylpropyl)-benzol	191	0.862	91	ja
5	4920-99-4	Ethyl-3-isopropylbenzol	192	0.859	133	ja
6	2719-52-0	(1-Methylbutyl)-benzol	192	0.862	105	ja
7	2049-95-8	(1.1-Dimethylpropyl)-benzol	192.4	0.874	119	ja
8	98-51-1	<i>t</i> -Butyl-4-methylbenzol	192.7	0.812	133	ja
9	18970-44-0	Ethyl-2-isopropylbenzol	193	0.874	133	nein
10	5160-99-6	<i>i</i> -Butyl-3-methylbenzol	194	0.854	105	nein
11	1772-10-7	<i>s</i> -Butyl-3-methylbenzol	194	0.858	119	nein
12	4706-90-5	1.3-Dimethyl-5-isopropylbenzol	194.5	0.861	133	ja
13	3968-85-2	(2-Methylbutyl)-benzol	196	0.861	92	ja
14	5161-04-6	<i>i</i> -Butyl-4-methylbenzol	196	0.852	105	ja

15	36301-29-8	<i>i</i> -Butyl-2-methylbenzol	196	0.865	105	nein
16	1595-06-8	<i>s</i> -Butyl-2-methylbenzol	196	0.869	119	nein
17	4132-72-3	1.4-Dimethyl-2-isopropylbenzol	196	0.876	133	ja
18	4218-48-8	Ethyl-4-isopropylbenzol	196.6	0.863	133	ja
19	1595-16-0	<i>s</i> -Butyl-4-methylbenzol	197	0.866	119	nein
20	2049-94-7	(3-Methylbutyl)-benzol	198.5	0.856	92	ja
21	4706-89-2	2.4-Dimethyl-1-isopropylbenzol	198.5	0.875	133	ja
22	14411-75-7	1.3-Dimethyl-2-isopropylbenzol	200	0.864	133	nein
23	2050-24-0	1.3-Diethyl-5-methylbenzol	200.4	0.863	119	ja
24	1074-92-6	<i>t</i> -Butyl-2-methylbenzol	200.4	0.890	105	ja
25	* ¹	Ethyl-3-propylbenzol	201* ²	-	119	ja
26	4132-77-8	1.2-Dimethyl-4-isopropylbenzol	202	0.871	133	nein
27	16021-20-8	Ethyl-2-propylbenzol	202	0.874	119	nein
28	3982-64-7	1.3-Dimethyl-5-propylbenzol	202.2	0.861	119	nein
29	13732-80-4	1.2-Diethyl-4-methylbenzol	203.6	0.876	133	nein
30	3042-50-0	1.4-Dimethyl-2-propylbenzol	204.5	0.869	119	nein
31	22539-65-7	1.2-Dimethyl-3-isopropylbenzol	204.5	0.888	133	nein
32	1595-04-6	<i>n</i> -Butyl-3-methylbenzol	205	0.859	105	nein
33	20024-90-2	Ethyl-4-propylbenzol	205	0.859	119	nein
34	1758-85-6	2.4-Diethyl-1-methylbenzol	205	0.875	133	ja
35	538-68-1	<i>n</i> -Pentylbenzol	205.3	0.860	91	ja
36	61827-85-8	2.4-Dimethyl-1-propylbenzol	206	0.873	119	nein
37	13632-93-4	1.2-Diethyl-3-methylbenzol	206.6	0.891	133	nein
38	1595-05-7	<i>n</i> -Butyl-4-methylbenzol	207	0.857	105	nein
39	13632-94-5	1.4-Diethyl-2-methylbenzol	207.1	0.876	133	ja
40	17059-45-9	1.3-Dimethyl-2-propylbenzol	207.6	0.886	119	nein
41	3982-66-9	1.2-Dimethyl-4-propylbenzol	207.7	0.872	119	nein
42	1595-11-5	<i>n</i> -Butyl-2-methylbenzol	208	0.871	105	nein
43	13632-95-6	1.3-Diethyl-2-methylbenzol	208.9	0.891	133	nein
44	3982-67-0	2-Ethyl-1.3.5-trimethylbenzol	210.2	0.886	133	nein
45	17059-44-8	1.2-Dimethyl-3-propylbenzol	210.6	0.886	119	nein
46	17851-27-3	1-Ethyl-2.4.5-trimethylbenzol	212.5	0.889	133	ja
47	18262-85-6	1-Ethyl-2.3.5-trimethylbenzol	213	0.890	133	nein
48	31366-00-4	5-Ethyl-1.2.3-trimethylbenzol	215.8	0.886	133	nein
49	61827-87-0	2-Ethyl-1.3.4-trimethylbenzol	216.6	0.895	133	nein
50	61827-86-9	1-Ethyl-2.3.4-trimethylbenzol	220.4	0.902	133	nein
51	700-12-9	Pentamethylbenzol	231	0.878* ³	133	ja

Tab. 3.4: Isomere des *n*-Pentylbenzols

*¹ 7174210; Beilstein Registration Number

*² Siedepunkt geschätzt

*³ Dichte bei 73.5°C

α Siedepunkt bei 760 Torr (1013hPa)

β Dichte bei 20°C, Referenztemperatur: 4°C

χ bp = base peak; intensivster Peak (= 100 %) im Massenspektrum

ε in der NIST-Datenbank impliziert

3.1.3 Pentylbenzolisomere im EKO-FISK Rohöl

Zu einer besseren Probencharakterisierung und Bestimmung des gaschromatographischen Retentionsverhaltens wurden alle C₅-alkylierten Benzolisomere im EKO-FISK Rohöl identifiziert/analysiert.

Dazu wurden je 100 µL jedes dritten Destillats zwischen den Fraktionen Nr. 6 und Nr. 33 aus dem Siedebereich zwischen Nonan und Tetradecan der Feinfraktionierung vereint. Im Unterschied zu vorangegangenen, säulenchromatographischen Trennungen erfolgte dieser Chromatographieschritt mit einer Glassäule der Dimensionierung 60 x 1.1 cm (Länge x Außendurchmesser). Die säulenchromatographische Trennung (Kieselgel 60/n-Hexan; Dichlormethan/Methanol) unter Normaldruck von 250 µL Probe der vereinten Destillatfraktionen ergab zehn Eluate: Ein Eluat mit aliphatischen und alicyclischen Kohlenwasserstoffen; sieben Eluate mit aromatischen und ungesättigten Komponenten sowie zwei Eluate mit Heterokomponenten der Elution mit 10 %iger methanolischer Dichlormethanolösung.

Die Auswertung der Massenspektren aller Aromateneluat lieferte 47 von 51 Pentylbenzolisomeren. Tabelle 3.5 gibt die Anzahl der identifizierten Verbindungen bezüglich ihrer charakteristischen Hauptfragmente (base peaks) und die reale Anzahl der Komponenten mit diesem Hauptfragment wieder. Eine Übersicht der Retentionsreihenfolge aller identifizierten Isomere liefert Tabelle 3.6. In ihr sind die Retentionszeiten (Scanzahlen), bezogen auf das Temperaturprogramm von 50°C Starttemperatur und einer linearen Aufheizrate von 1°C pro Minute bis 110°C, normiert dargestellt.

Zahl der im Rohöl gefundenen C ₅ -Alkylbenzole		
Komponenten mit base peak	Anzahl der gefundenen	tatsächliche Anzahl
133	21	23
119	13	14
105	8	9
91/92	5	5
gesamt:	47	51

Tab. 3.5: Pentylbenzolisomere im EKO-FISK-Öl

Willkürlich wurde dabei die Retentionszeit von *n*-Pentylbenzol als Referenz mit der Scanzahl 1000 festgelegt. Die Retentionszeiten der anderen Verbindungen ergeben sich aus der Differenz der tatsächlichen Retentionszeit einer Komponente und *n*-Pentylbenzols plus 1000 Scans (Gleichung 3.1). Dieses Verfahren der Scanzahlennormierung hatte den Vorteil, daß bei einer Verschiebung der Retentionszeiten zwischen verschiedenen Chromatogrammen sich trotzdem schnell die gesuchten Komponenten im Vergleich zu einem internen Standard wiederfinden ließ.

Gleichung 3.1

$$[t_{rK} - t_{rPB}] + 1000 = t_{rK^*}$$

mit

t_{rK^*}	modifizierte Scanzahl
t_{rPB}	Retentionszeit <i>n</i> -Pentylbenzol
t_{rK}	Retentionszeit des Isomeres

Alle nicht im EKO-FISK Rohöl identifizierten Verbindungen, deren Retentionszeit sich aber über Standards zuordnen ließen, sind grau unterlegt.

Nr.	Scan	zugeordnete Substanz	Schlüsselfragmente				
1	422	(2.2-Dimethylpropyl)-benzol	92	91	57	77	133
2	537	(1.2-Dimethylpropyl)-benzol	105	39	77	106	79
3	546	<i>t</i> -Butyl-3-methylbenzol	133	105	148	93	91
4	566	(1-Ethylpropyl)-benzol	91	119	77	148	41
5	582	(1.1-Dimethylpropyl)-benzol	119	91	41	39	77
6	600	<i>t</i> -Butyl-4-methylbenzol	133	105	91	115	134
7	640	(1-Methylbutyl)-benzol	105	91	77	39	106
8	651	<i>i</i> -Butyl-3-methylbenzol	105	106	91	148	41
9	656	<i>s</i> -Butyl-3-methylbenzol	119	91	148	91	39
10	663	Ethyl-2-isopropylbenzol	133	105	91	39	148
11	695	<i>i</i> -Butyl-4-methylbenzol	105	148	106	148	39
12	700	<i>s</i> -Butyl-4-methylbenzol	119	91	105	39	77
13	714	<i>s</i> -Butyl-2-methylbenzol	119	91	105	148	39
14	716	<i>i</i> -Butyl-2-methylbenzol	105	106	148	39	91
15	728	1.3-Dimethyl-5-isopropylbenzol	133	148	105	39	91
16	739	Ethyl-4-isopropylbenzol	133	105	148	39	91
17	742	(2-Methylbutyl)-benzol	91	92	57	148	65
18	776	(3-Methylbutyl)-benzol	92	91	39	41	65
19	811	1.4-Dimethyl-2-isopropylbenzol	133	105	148	91	39
20	813	<i>t</i> -Butyl-2-methylbenzol	133	105	91	148	41
21	847	2.4-Dimethyl-1-isopropylbenzol	133	105	148	42	43

22	863	1.3-Dimethyl-5-propylbenzol	119	91	148	105	39
23	895	Ethyl-3-propylbenzol	119	91	105	148	77
24	895	1.2-Diethyl-4-methylbenzol	133	119	91	105	39
25	903	1.3-Dimethyl-2-isopropylbenzol	133	105	148	39	65
26	924	Ethyl-2-propylbenzol	119	91	148	39	77
27	934	1.4-Dimethyl-2-propylbenzol	119	120	91	148	105
28	961	1.2-Dimethyl-4-isopropylbenzol	133	105	148	91	39
29	976	2.4-Diethyl-1-methylbenzol	133	119	91	148	105
30	980	<i>n</i> -Butyl-3-methylbenzol	105	106	91	39	77
31	1000	<i>n</i>-Pentylbenzol	91	92	148	43	39
32	1012	Ethyl-4-propylbenzol	119	91	148	39	105
33	1014	<i>n</i> -Butyl-4-methylbenzol	105	106	91	39	77
34	1028	1.2-Dimethyl-3-isopropylbenzol	133	105	91	65	39
35	1039	1.2-Diethyl-3-methylbenzol	133	119	105	148	91
36	1044	2.4-Dimethyl-1-propylbenzol	119	91	148	105	39
37	1049	<i>n</i> -Butyl-2-methylbenzol	105	106	41	77	91
38	1060	1.4-Diethyl-2-methylbenzol	133	119	148	105	91
39	1081	1.2-Dimethyl-4-propylbenzol	119	91	39	77	120
40	1110	1.3-Dimethyl-2-propylbenzol	119	91	39	148	43
41	1164	1.3-Diethyl-2-methylbenzol	133	119	148	105	91
42	1180	2-Ethyl-1.3.5-trimethylbenzol	133	43	148	91	105
43	1207	1.2-Dimethyl-3-propylbenzol	119	148	91	39	105
44	1255	1-Ethyl-2.4.5-trimethylbenzol	133	148	39	43	91
45	1264	1-Ethyl-2.3.5-trimethylbenzol	133	148	105	119	91
46	1330	5-Ethyl-1.2.3-trimethylbenzol	133	148	105	91	148
47	1378	2-Ethyl-1.3.4-trimethylbenzol	133	148	43	39	105
48	1491	1-Ethyl-2.3.4-trimethylbenzol	133	148	119	105	148
49	1817	Pentamethylbenzol	133	148	105	39	134
50							
51							

Tab. 3.6: Retentionsreihenfolge identifizierter Pentylbenzolisomere

3.1.4 Zusammensetzung der aktiven Trap-Proben

Demnach konnten die vier Isomere *t*-Butyl-3-methylbenzol, *t*-Butyl-2-methylbenzol, Ethyl-3-isopropylbenzol und 1.3-Diethyl-5-methylbenzol im EKO-FISK-Rohöl nicht nachgewiesen werden.

Ein Vergleich der Hauptfragmentpeaks bzw. der Siedepunkte aus Tabelle 3.4 mit der Elutionsreihenfolge der identifizierten C₅-alkylierten Komponenten im Rohöl (Tab. 3.6), sowie *n*-Pentylbenzol als Referenz ergab, daß es sich bei den gesuchten Aromaten in den Trap-Proben Nr. 2, 3 und 4 um Verbindungen handelte, die direkt mit oder kurz nach *n*-Pentylbenzol retendieren.

Scan	Trap	Schlüsselfragmente					zugeordnete Komponenten
873	2	119	91	33	120	105	1.4-Dimethyl-2-propylbenzol
892	2	105	106	91	148	39	<i>n</i> -Butyl-3-methylbenzol
896	2, 3	133	119	105	91	148	2.4-Diethyl-1-methylbenzol
904	2, 3	91	92	39	148	71	<i>n</i> -Pentylbenzol
907	2, 3	119	91	39	148	105	Ethyl-4-propylbenzol
910	2, 3, 4	105	106	148	39	91	<i>n</i> -Butyl-4-methylbenzol
914	3, 4	133	119	91	105	148	1.2-Diethyl-3-methylbenzol
924	2, 3, 4	119	148	91	105	39	2.4-Dimethyl-1-propylbenzol
929	2, 3, 4	105	106	148	91	39	<i>n</i> -Butyl-2-methylbenzol
935	2, 3, 4	133	119	148	91	39	1.4-Diethyl-2-methylbenzol
944	4	119	91	105	148	39	1.2-Dimethyl-4-propylbenzol
956	4	119	91	148	39	77	1.3-Dimethyl-2-propylbenzol

Tab. 3.7: Charakterisierung bioaktiver Acetonkondensate

Anmerkung: Bei der Durchführung des Peak-Trapping-Verfahrens aus diesen *n*-Hexaneluaten konnte keiner der Aromaten selektiv in einer Acetonprobe kondensiert werden, wie aus Abbildung 3.5 und Tabelle 3.7 deutlich ersichtlich ist. Eine zu hohe Anzahl von Verbindungen in einem engen Retentionsbereich macht demnach das Peak-Trapping für eine selektive Anreicherung einer einzelnen Komponente mit dieser Methode unbrauchbar.

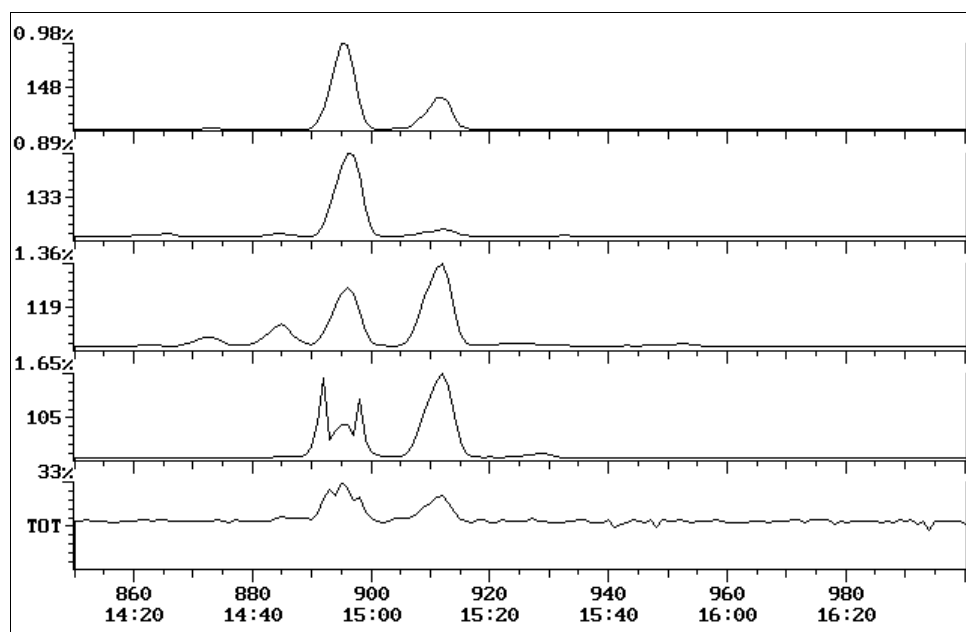


Abb. 3.5: Aceton-Trap; GC-System Nr. III; Starttemperatur: 50°C, Aufheizrate 1° pro min.

3.1.5 *n*-Hexaneluate der Destillatfraktion Nr. 17

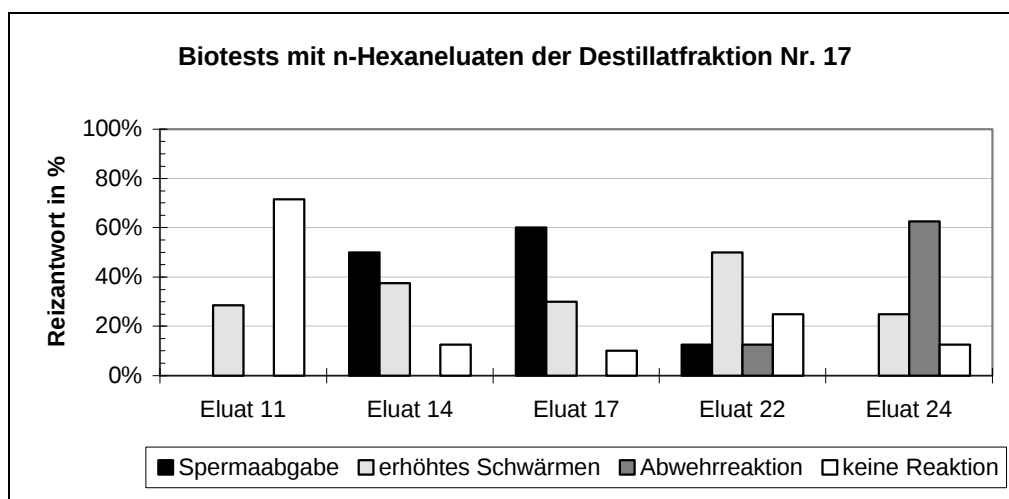
Eine bessere Trennung der einzelnen Aromaten und somit eine geringere Anzahl an Komponenten innerhalb eines Eluates versprach die Säulenchromatographie mit einer längeren Kieselgelsäule, sowie eine Verringerung der Desaktivierung des Kieselgels. Zudem wurde ein Destillat (Fraktion 17) der Feinfraktionierung ermittelt, das in der Hauptsache Komponenten aus dem gesuchten Retentionsbereich aufwies.

Aus diesem neuen Chromatographieschritt mit einer 80 cm langen Kieselgelsäule und keiner Desaktivierung des Gels resultierten 24 Aromateneluate, die alle gaschromatographisch charakterisiert und z.T. im *Bioassay* auf ihre verhaltensphysiologische Aktivität getestet worden sind. Dabei erwiesen sich die Eluate Nr. 14 und 17 (Tabelle 3.8) als besonders aktiv.

Verhaltensbiologische Tests mit Eluaten der Fraktion Nr. 17					
	Eluat 11	Eluat 14	Eluat 17	Eluat 22	Eluat 24
keine Reaktion	5	1	1	2	1
erhöht. Schwärmen	2	3	3	4	2
Spermaabgabe	0	4	6	1	0
Abwehrreaktion	0	0	0	1	5
gesamt:	7	8	10	8	8

Tab. 3.8: Biotestergebnisse mit 2.5 μ L *n*-Hexaneluaten

Beide Eluate induzierten bei den schwärmenden Männchen eine Spermaabgabe. Bei einem weiteren Eluat (Nr. 21) konnte eine starke Erhöhung der Schwärmgeschwindigkeit festgestellt werden. Tabelle 3.9 gibt einen Überblick über die Ergebnisse des *Bioassays* mit 2.5 μ L Probe der ausgewählten Eluate der Fraktion Nr. 17.



Tab. 3.9: Biotests mit Aromateneluaten der Fraktion Nr. 17

Aufgrund der erzielten Biotestergebnisse wurden die Eluate Nr. 14 und Nr. 17 zur weiteren Probenaufbereitung durch die Peak-Trapping-Methode ausgewählt. Die massenspektrometrische Analyse der beiden Eluate ergab als Hauptkomponenten die bereits in der Diplomarbeit untersuchten und separierten Pentylbenzolisomere, wie die Einzelionenbetrachtung im nachfolgenden Chromatogramm von Eluat Nr. 17 in Abbildung 3.6 veranschaulicht.

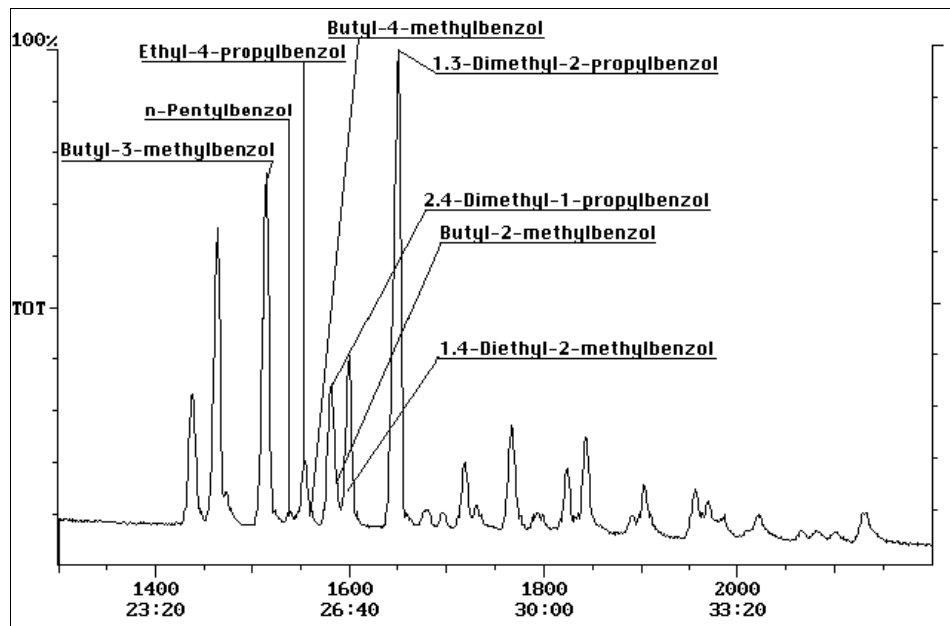


Abb. 3.6: Gaschromatogramm von Eluat Nr. 17; GC-System Nr. III, 50°C Starttemperatur, Aufheizrate 1° pro min. bis 110°C

3.1.6 Trap-Proben der Eluate Nr. 17 und Nr. 14

Die Kondensation einzelner Peaks in Aceton ergaben für das Eluat Nr. 17 fünf und für das Eluat Nr. 14 drei Proben, die rechromatographiert und massenspektrometrisch untersucht wurden. Anschließend wurden alle Proben auf ihre verhaltensphysiologische Aktivität untersucht.

3.1.6.1 Verhaltensphysiologische Tests mit Trap-Proben

In den verhaltensphysiologischen Tests mit den in Aceton kondensierten Verbindungen an *P. dumerilii*-Männchen (Tabelle 3.10) konnten vier Verhaltensmerkmale nach der Probenapplikation (n = 7 Tests pro Probe) beobachtet werden:

- Das Tier zeigte keine Reaktion auf die Probe. (n)
- Das Tier begann deutlich schneller im Kreis zu schwimmen. (+)
- Das Tier schwamm in engen Kreisen (Hochzeitstanz) und gab (++) Sperma ins Wasser ab. (Anmerkung: Eine Abgabe des gesamten Spermas wurde in keinem der Tests beobachtet).

Bioassay mit 5 μ L Trap-Proben [n = 7]		
Trap-Probe Nr.	Reizantwort	Reaktionszeit
1	+	-
2	++ (6/7)	bis zu 40 min.
3	+	-
4	n	-
5	n	-
6	++ (4/7)	bis zu 45 min.
7	n	-
8	n	-
++ = Spermaabgabe; + = erhöhtes Schwärmverhalten; n = keine Reaktion; Spalte 2: (x/n) = Verhältnis der Anzahl: Reizantworten/Tests		

Tab. 3.10: Biotests mit 5 μ L Trap-Proben der Eluate Nr. 14 und 17

Nur die Trap-Proben Nr. 2 und Nr. 6 führten bei *P. dumerilii*-Männchen zu einer Spermaabgabe. Probe Nr. 1 und Nr. 3 führten bei den Testtieren dagegen nur zu einer Erhöhung der Schwimmggeschwindigkeit. Es konnte mit diesen Proben weder eine Spermaabgabe noch ein Hochzeitstanz ausgelöst werden. Alle anderen Trap-Proben (Traps Nr. 4, 5, 7 und 8) hatten keinen sichtbaren Einfluß auf das Schwärmverhalten der Männchen.

Die Variation des Injektionsvolumens der Spermaabgabe auslösenden Trap-Proben Nr. 2 und Nr. 6 sollte eine untere, für die Tiere detektierbare Reizschwelle, bzw. ein Verhältnis zwischen Probevolumen und Reaktionszeit ergeben.

Für die Probe Nr. 2 ergab sich, wie schon bei den Biotests mit Trap-Proben aus der Diplomarbeit, bei einer Reduzierung des Injektionsvolumens eine Verkürzung der Reaktionszeit. Die untere Grenze des detektierten Volumens, bei gleichzeitiger Auslösung der Spermaabgabe, betrug minimal 2 μ L. Unterhalb von 2 μ L Probevolumen konnte keine Verhaltensänderung im Schwärmverhalten bei den Tieren registriert werden.

Bioassay mit Trap-Proben unterschiedlicher Volumina			
Trap-Nr.	Volumen [μL]	Reizantwort	Reaktionszeit
2	10	++ (1/3)	bis 45 min.
2	5	++ (4/5)	bis 45 min.
2	3	++ (3/3)	bis 40 min.
2	2	++ (3/3)	1 - 33 min.
2	1	n	-
6	10	++ (2/3)	30 - 45 min.
6	5	++ (3/5)	1 - 33 min.
6	2.5	+ (3/3)	-
6	2	n (3/3)	-
6	1	n (3/3)	-
++ = Spermaabgabe; + = erhöhtes Schwärmverhalten; n = keine Reaktion; Spalte 3: (x/n) = Verhältnis der Anzahl: Reizantworten/Tests			

Tab. 3.11: Biotests mit Trap-Proben (variables Volumen)

Bei Probe Nr. 6 konnte in keinem Fall durch Verringerung des Probevolumens eine Gametenabgabe ausgelöst werden. Die unterste Grenze, bei der bei einem Männchen eine Verhaltensänderung zu beobachten war (Reizantwort: Erhöhte Schwimmgeschwindigkeit), lag in diesem Experiment bei einem Volumen von $2.0 \mu\text{L}$. Eine Spermaabgabe konnte dagegen nicht unterhalb eines dazudosierten Volumens von $5 \mu\text{L}$ induziert werden. Die Konzentration der Hauptkomponenten in beiden Proben konnte als in etwa gleich angesehen werden (ca. $3 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Probe). Sie erfolgte grob durch Bestimmung der Flächen unter den Peaks in Vergleich zu einem externen Standard.

3.1.6.2 Komponentenzusammensetzung der Trap-Proben

Ein Vergleich der Massenspektren in den jeweiligen Chromatogrammen (siehe Anhang: Abbildungen A.1 bis A.8) mit der in Tabelle 3.6 aufgestellten Retentionsreihenfolge, ergab für die Trap-Proben folgende Zusammensetzung:

Scan	Komponenten →	enthalten in Trap Nr.								Scan t_{RK}^*
		+	++	+	n	n	++	n	n	
866	1.2-Diethyl-4-methylbenzol	1								895
873	1.4-Dimethyl-2-propylbenzol	1								934
896	2.4-Diethyl-1-methylbenzol									976
896	<i>n</i> -Butyl-3-methylbenzol	1								980
904	<i>n</i> -Pentylbenzol			3						1000
907	Ethyl-4-propylbenzol		2							1012
912	<i>n</i> -Butyl-4-methylbenzol		2							1014
915	1.2-Diethyl-3-methylbenzol		2	3						1040
929	2.4-Dimethyl-1-propylbenzol		2	3	4			7		1047
930	<i>n</i> -Butyl-2-methylbenzol						6	7		1049
935	1.4-Diethyl-2-methylbenzol			3	4	5	6	7		1051
955	1.3-Dimethyl-2-propylbenzol				4	5	6	7	8	1110
968	(105/133/91/39) $m/z = 162$					5				1113
	(131/91/146/105) $m/z = 146$								8	1151
++ = Spermaabgabe; + = erhöhtes Schwärmverhalten; n = keine Reaktion;										

Tab. 3.12: Zusammensetzung der Trap-Proben Nr. 1 - 8; (die Scanzahlen links beziehen sich auf die Retentionszeiten bei 50°C Starttemperatur und einer Aufheizrate von 3° pro min.)

Somit konnten die Pentylbenzolisomere Ethyl-4-propylbenzol, *n*-Butyl-4-methylbenzol, 1.2-Diethyl-3-methylbenzol sowie 2.4-Dimethyl-1-propylbenzol in der Trap-Probe Nr. 2 und 1.4-Diethyl-2-methylbenzol, *n*-Butyl-2-methylbenzol, 1.2-Dimethyl-4-propylbenzol und ebenfalls 1.3-Dimethyl-2-propylbenzol in der Trap-Probe Nr. 6 als potentielle, die Spermaabgabe induzierende Substanzen, betrachtet werden. Ebenso sollte eine, oder dieselbe, der in der Tabelle genannten Verbindungen für eine Erhöhung der Schwimmge-

schwindigkeit während des Schwärmvorgangs, ohne nachfolgende Spermaabgabe, verantwortlich gewesen sein.

Wie die genauere Analyse der Chromatogramme durch die Einzelionenbetrachtung zeigte, konnte die Selektivität der Probenanreicherung zwar erhöht werden, doch war es wiederum nicht möglich, einzelne Komponenten in Aceton zu kondensieren.

Eine genauere Betrachtung der Trap-Proben war daher stets unabdingbar, wie deutlich aus dem Chromatogramm von S1714_T1 (Abbildung 3.7) hervorgeht: Obgleich die Totalionenspur (unteres Chromatogramm: TOT) einen einzelnen Peak zeigt, gaben erst die Einzelionenspuren (SIM) der wichtigsten Fragmente ($m/z = 133$, 119 und 105) einen Eindruck über den Reinheitsgrad dieser Probe. So lassen sich bei den Scans 1698 (SIM: $m/z = 105$) und 1760 (SIM: $m/z = 119$) mindestens zwei weitere Substanzen erkennen, die im Totalionenstrom nicht zu identifizieren sind.

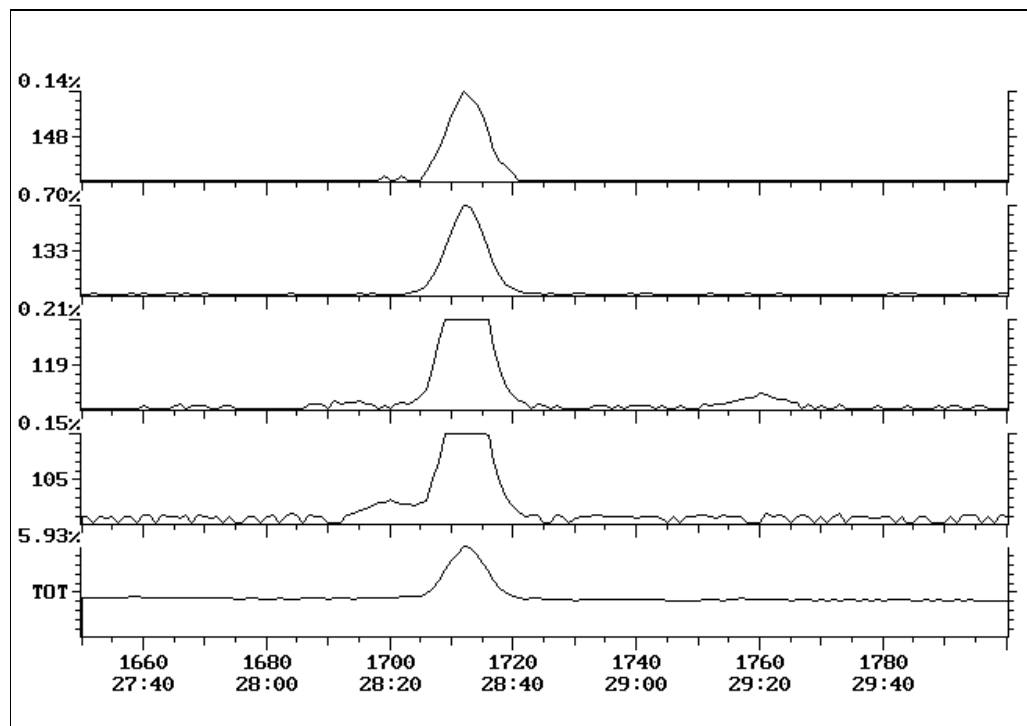


Abb. 3.7: Chromatogramm mit Einzelionenbetrachtung einer Trap-Probe am Beispiel von Trap Nr. 6

3.1.6.3 Identifizierung bioaktiver Komponenten in den Trap-Proben

Die Tatsache, daß die Anreicherung einer Komponente sich als äußerst schwierig erwies, machte es notwendig, sich dem Ergebnis auf der Suche nach Spermaabgabe auslösenden Substanzen durch den Vergleich der Komponentenzusammensetzung positiv und negativ getesteter Trap-Proben zu nähern. Dazu wurden die Komponenten der Trap-Proben aus der Diplomarbeit und die der neueren Untersuchung gegenübergestellt (Tabelle 3.13).

Trap (Dipl.)		Komponente	neue Trap-Proben							
		<i>n</i> -Butyl-3-methylbenzol	1b							
3a		2.4-Diethyl-1-methylbenzol	1b							
3a		<i>n</i> -Pentylbenzol			3b					
3a		Ethyl-4-propylbenzol	1b	2b						
3a	4a	<i>n</i> -Butyl-4-methylbenzol		2b						
3a	4a	1.2-Diethyl-3-methylbenzol		2b	3b					
3a	4a	2.4-Dimethyl-1-propylbenzol		2b	3b	4b			7b	
3a	4a	<i>n</i> -Butyl-2-methylbenzol						6b	7b	
3a	4a	1.4-Diethyl-2-methylbenzol			3b	4b	5b	6b	7b	
	4a	1.2-Dimethyl-4-propylbenzol								
	4a	1.3-Dimethyl-2-propylbenzol				4b	5b	6b	7b	8b

Tab. 3.13: Vergleich der Probenzusammensetzung der aktiven Trap-Proben aus der Diplomarbeit und aktuellen Trap-Proben

Ein Vergleich zwischen den einzelnen Hauptkomponenten in einem Acetonkondensat (hervorgehoben) und der Probenzusammensetzung der Trap-Proben um einzelne Komponenten als verhaltensphysiologisch inaktiv zu beschreiben, ist aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen in den jeweiligen Proben nicht möglich! Somit ließe sich nicht folgern, daß 1.4-Diethyl-2-methylbenzol inaktiv ist, weil die Trap-Probe 4b inaktiv ist.

Auswahlkriterium Nr. 1: Mindestens eine der identifizierten Komponenten mußte in der Spermaabgabe induzierenden Probe vertreten sein. Damit kamen von vornherein nur die 11 der 51 Pentylbenzolisomere aus der Tabelle 3.13 in Betracht.

Als 2. Auswahlkriterium wurde hypothetisch die Präsenz nur einer verhaltensphysiologisch aktiven Verbindung in den zwei aktiven Trap-Proben Nr. 2b und 6b angenommen.

Verbindungen, die als Hauptkomponenten in inaktiven Trap-Proben und als Spuren in aktiven Trap-Proben vertreten waren, sollten keine die Spermaabgabe auslösende Aktivität besitzen (3. Kriterium). Damit wurde 1.3-Dimethyl-2-propylbenzol (4b) nicht weiter berücksichtigt.

Damit blieben insgesamt sechs potentiell aktive Komponenten übrig, die in Tabelle 3.14 aufgelistet sind.

Nr.	Komponente
1	Ethyl-4-propylbenzol
2	<i>n</i> -Butyl-4-methylbenzol
3	1.2-Diethyl-3-methylbenzol
4	2.4-Dimethyl-1-propylbenzol
5	<i>n</i> -Butyl-2-methylbenzol
6	1.4-Diethyl-2-methylbenzol

Tab. 3.14: Potentiell aktive Komponenten

Um mindestens eine der Spermaabgabe auslösenden Komponenten aus dem Erdöl zu identifizieren, wurde der Versuch unternommen, die ohne größeren Aufwand zugänglichen C₅-alkylierten Benzole auf synthetischem Wege herzustellen. Ebenfalls stand für verhaltensphysiologische Experimente das kommerziell erhältliche *n*-Pentylbenzol zu Verfügung.

3.1.7 Synthetische Proben zur Identifizierung Spermaabgabe induzierender Verbindungen

3.1.7.1 Ergebnis der Synthesen einiger ausgewählter Pentylbenzolisomere

Als erste Komponenten wurden die drei *n*-Butyl-methylbenzole (*m*-BMB, *p*-BMB und *o*-BMB), von denen *o*- und *p*-BMB in den aktiven Kondensatproben vertreten sein konnten, durch die Grignard-Wurtz-Reaktion synthetisiert und im Biotest untersucht.

Die Synthese (Grignard-Wurtz-Reaktion) von 2,4-Dimethyl-1-propylbenzol ergab bei schlechter Ausbeute (unter 0.1 %) ein Destillat mit dem Edukt 4-Brom-*m*-Xylol (bp. = 214°C) und dem Zielprodukt 2,4-Dimethyl-1-propylbenzol (bp. = 206°C). Diese Komponenten ließen sich weder destillativ noch gaschromatographisch (Peak-Trapping) voneinander trennen. Die Synthese von Ethyl-4-propylbenzol blieb erfolglos. Statt dessen wurden bei der Grignard-Wurtz-Synthese mit 4-Ethyl-Brombenzol und Propylmagnesiumbromid die Isomere Ethyl-2-isopropylbenzol (E-2-iPB) und Ethyl-4-isopropylbenzol (E-4-iPB) erhalten. Beide Verbindungen konnten für sich selektiv in Aceton kondensiert und im Biotest auf ihre verhaltensphysiologische Wirkung hin untersucht werden.

Als weitere Verbindung wurde durch Friedels-Craft-Alkylierung das (1,1-Dimethylpropyl)-benzol (DMP-B) hergestellt, das laut der Datenbankrecherche (NIST) die Hauptkomponente der aktiven Trap-Probe (S1607_T4) darstellte und somit eventuell Strukturparallelen zu möglichen aktiven Verbindungen aufwies.

Die durch Synthese gewonnenen Verbindungen sowie *n*-Pentylbenzol (n-PB) wurden mit Hilfe der Peak-Trapping-Methode **selektiv** fraktioniert und im Verhaltenstest untersucht. Abbildung 3.8 zeigt das Chromatogramm und das dazugehörige Massenspektrum des in Aceton kondensierten *para n*-Butyl-methylbenzols. Die Abbildungen A.9 bis A.14 im Anhang zeigen jeweils einen Ausschnitt eines Chromatogramms der synthetischen Trap-Proben in der Einzelionenbetrachtung ($m/z = 105, 119, 133$ und 148), oder mit einem Massenspektrum, als Beispiele für **selektives** Peak-Trapping.

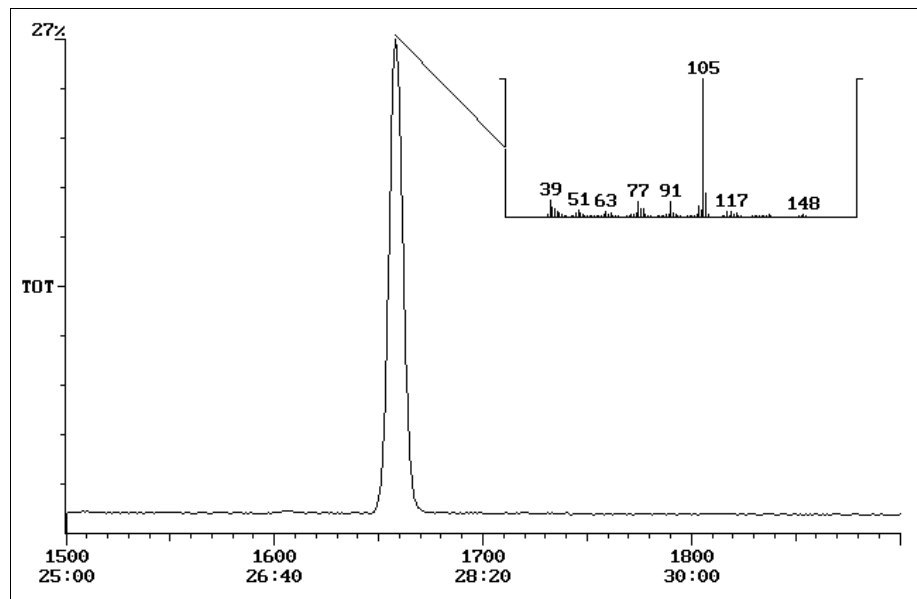


Abb. 3.8: Gaschromatogramm von *para n*-Butyl-methylbenzol; GC-System Nr. III; Starttemperatur: 50°C; Aufheizrate: 1° pro min.

3.1.7.2 Verhaltensphysiologische Tests mit synthetischen C₅-Alkylbenzolen

In den verhaltensphysiologischen Tests mit den synthetischen Proben wurden die Reizantworten der Tiere nach Zugabe unterschiedlicher Probevolumina untersucht (Tabelle 3.15).

Biotestergebnis nach Zugabe von µL synth. Trap-Probe							
	10		5		2.5		< 2.5
<i>m</i> -BMB	(+)	2/3	(+)	2/2	(+)	5/6	(+) 1/4 2 µL
<i>p</i> -BMB	(++)	2/3	(++)	2/3	(++)	5/6	(+) 1/3 1.5 µL
<i>o</i> -BMB	(-)	2/2	(+)	1/3	(+)	1/6	(-) 2/2 2 µL
<i>n</i> -PB	(-)	2/2	(-)	3/3	(+)	1/6	(-) 1/1 2 µL
(DMP)B	(-)	1/2	(+)	2/3	(+)	4/6	(+) 1/3 2 µL
E-2-iPB	(+)	1/1	(+)	2/2	(++)	3/6	(-) 2/2 1.5 µL
E-4-iPB	(-)	2/2	(-)	2/2	(+)	3/6	(-) 1/1 1 µL
Legende: (++) = Spermaabgabe; (+) = erhöhtes Schwärmen; (-) = keine Reaktion; x/n = Anzahl beobachteter Reaktionen/Anzahl der Tests							

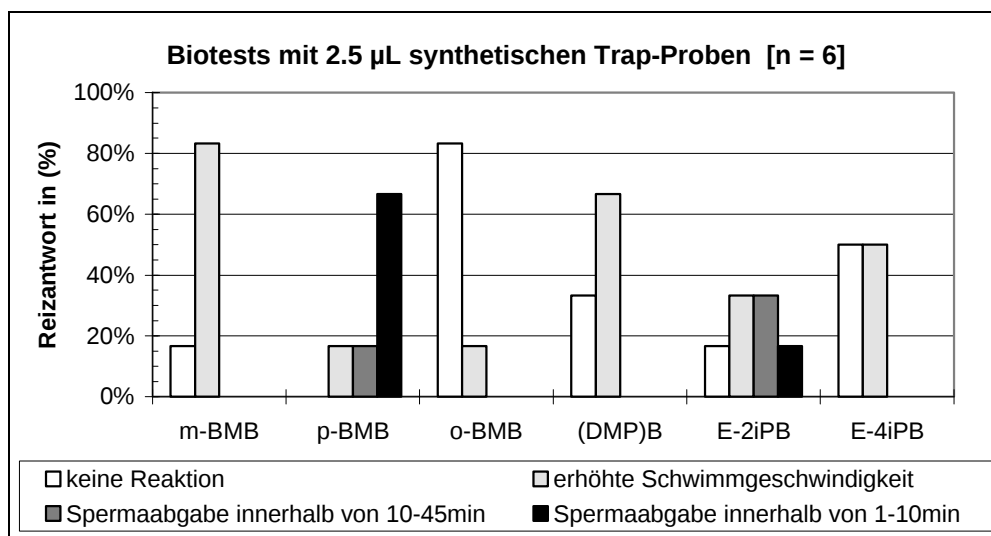
Tab. 3.15: Biotestergebnisse mit variabler Probenkonzentration

In Tabelle 3.16 sind die Ergebnisse für die Biotests mit 2.5 µL Probe der sieben Komponenten nochmals genauer aufgeschlüsselt. Dabei geht aus den Spalten Nr. 2 und Nr. 3 die Anzahl der Tests hervor, bei denen die Männchen innerhalb eines definierten Zeitraums zur Spermaabgabe angeregt wurden. Das Acetonkondensat mit *n*-Butyl-4-methylbenzol erwies sich bei diesen Tests als die verhaltensphysiologisch aktivste Verbindung und führte in zwei Drittel der Fälle zu einer Gametenabgabe innerhalb von 10 Minuten.

Ergebnisse zum Bioassay mit 2.5 µL Acetonkondensat der Benzole [n = 6]				
	Spermaabgabe innerhalb von		Verstärktes Schwärmen	Normales Schwärmen
	1 - 10 min.	11 - 45 min.		
<i>m</i> -BMB	0	0	5	1
<i>p</i> -BMB	4	1	1	0
<i>o</i> -BMB	0	0	1	5
<i>n</i> -PB	0	0	1	5
(DMP)B	0	0	4	2
E-2-iPB	1	2	2	1
E-4-iPB	0	0	3	3

Tab. 3.16: Ergebnisse der Biotests mit synthetischen Proben

Die Quantifizierung durch einen externen Standard und Extrapolation der Peakflächen der rechromatographierten Trap-Proben ergab für *n*-Butyl-4-methylbenzol 9.1 ng pro Mikroliter Acetonkondensat.



Tab. 3.17: Biotests mit 2.5 µL synthetischen Trap-Proben

Dieser Wert, umgerechnet auf ca. 40 mL Seewasservolumen im Biotest, entsprach einer Konzentration von 0.57 ng pro Milliliter Seewasser. Die Konzentrationen der weiteren Trap-Proben sind der Tabelle 3.18 zu entnehmen. Die kleinste Dosis *n*-Butyl-4-methylbenzol, die bei den *P. dumerilii*-Männchen zu einer Spermaabgabe führte, betrug 2.5 µL, entsprechend einer Gesamtmenge von 22.7 ng pro Biotest. Zudem wurde durch Variation des Probevolumens versucht, eine untere Grenze, die Reizschwelle, zu ermitteln, bei der das Testtier mit einer Verhaltensänderung reagiert. Diese wurde mit einem Probevolumen von 1.5 µL erreicht, das einer Konzentration im Seewasser von 0.34 ng·mL⁻¹ entspricht. Als eine weitere aktive Komponente wurde Ethyl-2-isopropylbenzol identifiziert, die bei einer Konzentration von 1.76 ng·mL⁻¹ im Seewasser eine Spermaabgabe auslöste.

Konzentrationsverhältnisse bei den Biotests mit 2.5 µL Acetonkondensat							
C ₅ -Alkylbenzole	<i>m</i> -BMB	<i>p</i> -BMB	<i>o</i> -BMB	<i>n</i> -PB	E-2iPB	E-4iPB	DMP-B
Trap-Konz. [ng·µL ⁻¹]	6.7	9.1	9.7	8.0	28.2	28.9	8.1
Konzentration im Seewasser [ng·mL ⁻¹]	0.42	0.57	0.61	0.5	1.76	1.81	0.51
Konz. [nmol·L ⁻¹]	2.83	3.84	4.10	3.38	11.9	12.2	3.42

Tab. 3.18: Konzentrationen der synthetischen Trap-Proben

3.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse: Spermaabgabe induzierende Verbindungen aus dem Siedebereich zwischen Undecan und Dodecan des EKO-FISK Rohöls

Der in der Diplomarbeit untersuchte Retentionsbereich der C₅-alkylierten Benzole wurde erneut untersucht. Zur Bestimmung des Retentionsverhaltens der 51 Pentylnbenzolisomere wurden mehrere Destillatfraktionen des EKO-FISK Rohöls im Siedebereich zwischen Nonan und Hexadecan vereint, säulenchromatographisch in Alkane-, Aromaten- sowie Heterokomponentenfraktionen separiert, 47 Isomere daraus identifiziert und nach zunehmender Retentionszeit geordnet. Daraus konnte der Retentionsbereich der verhaltensphysiologisch aktiven Verbindungen im Siede- und Retentionsbereich um *n*-Pentylbenzol bestimmt werden. Die säulenchromatographische Trennung

einer geeigneten Destillatfraktion lieferte zwei aromatenhaltige Eluate, die in verhaltensphysiologischen Experimenten mit *P. dumerilii*-Männchen eine Spermaabgabe induzierten. Diese Eluate, mit einer geringen Anzahl an Verbindungen, wurden nach der Peak-Trapping Methode in mehrere, in Aceton rekondensierte Fraktionen, separiert und anhand von Biotests untersucht. Die nach dieser Methode erhaltenen Trap-Proben konnten nicht als Einkomponentenfraktionen erhalten werden. Im Verhaltenstest konnte zwei Fraktionen die Hauptaktivität zugeordnet werden. Durch den Komponentenvergleich mit inaktiven Proben wurden insgesamt sechs Verbindungen identifiziert, die potentiell zur Abgabe von Sperma führen könnten. Dabei handelte es sich um die Verbindungen Ethyl-4-propylbenzol, *n*-Butyl-4-methylbenzol, 1,2-Diethyl-3-methylbenzol, 2,4-Dimethyl-1-propylbenzol, *n*-Butyl-2-methylbenzol und 1,4-Diethyl-2-methylbenzol.

Beide (*n*-Butyl)-methylbenzole sowie das *ortho*-substituierte Isomer wurden durch eine Grignard-Wurtz-Reaktion synthetisiert und in verschiedenen Konzentrationen auf ihren Gametenabgabe auslösenden Charakter untersucht. Mit den *ortho*- und *meta*-substituierten *n*-Butyl-methylbenzolen ließ sich in keinem Fall eine Spermaabgabe induzieren, jedoch konnte in einzelnen Fällen eine Steigerung der Schwärmaktivität beobachtet werden.

Eine Spermaabgabe konnte dagegen durch das *para*-substituierte *n*-Butyl-methylbenzol bei den schwärmenden Tieren ausgelöst werden. Die untere Grenze, die bei den Männchen zu einer Spermaabgabe führte, betrug 0.57 ng pro Milliliter Seewasser.

In einer zweiten aktiven Fraktion (Trap Nr. 6) konnte als Hauptkomponente 1,4-Diethyl-2-methylbenzol identifiziert werden. Nach dem Ausschlußprinzip wurden zwei weitere Probenbestandteile (*n*-Butyl-2-methylbenzol und 1,3-Dimethyl-2-propylbenzol), die nur in kaum detektierbaren Spuren vorlagen, als inaktiv betrachtet. Eine Konzentrationsabschätzung ergab ca. $4.7 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Trap-Probe. Ein abschließender Beweis der biologischen Aktivität von 1,4-Diethyl-2-methylbenzol durch Synthese konnte nicht erbracht werden.

In einer weiteren Synthese sollte das Ethyl-4-propylbenzol ebenfalls durch die Grignard-Wurtz Reaktion hergestellt werden. Neben einigen Nebenprodukten wurde dagegen Ethyl-2-isopropylbenzol und Ethyl-4-isopropylbenzol erhalten. Beide Komponenten wurden durch Peak-Trapping in Aceton kondensiert und in verhaltensphysiologischen Tests an *P. dumerilii*-Männchen hinsichtlich ihrer Spermaabgabe auslösenden Wirkung untersucht. Dabei konnte mit dem in

ortho-Stellung substituierten Isomer in der Hälfte der Fälle bei einer Konzentration $1.76 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ Seewasser eine Gametenabgabe induziert werden. Diese Konzentration stellte gleichzeitig die Reizschwellenkonzentration dar, unterhalb der keine Reaktion bei den Tieren beobachtet wurde.

Das Ethyl-4-isopropylbenzol führte bei keinem der getesteten Männchen zu einer Spermaabgabe.

3.1.9 Effekte von Destillaten höherer Siedebereiche auf *P. dumerilii*

In weiterführenden Experimenten sollte die Frage nach einer Spermaabgabe auslösenden Wirkung von EKO-FISK Destillatfraktionen höherer Siedebereiche geklärt werden. Dazu wurden die Destillatfraktionen Nr. 22, 31, 34, 37, 40 und 43 aus dem Siedebereich zwischen Dodecan und Octadecan (Kp. 215 - 317°C) in verhaltensphysiologischen Tests an *P. dumerilii*-Männchen untersucht. In der Tabelle 3.19 sind die Retentionsbereiche R_b in Bezug zu den *n*-Alkanen und die Retentionszeiten t_R (GC-Konditionen: 50°C Starttemperatur und lineare Aufheizrate von 3° pro min.) der Fraktionen dargestellt.

Fraktion	t_R	R_b
Nr. 22	17:00 - 26:30	$C_{12} - C_{13}$
Nr. 31	22:10 - 28:30	C_{13} - C_{14}
Nr. 34	25:00 – 31:10	$C_{14} - C_{15}$
Nr. 37	28:00 – 33:10	$C_{14} - $ C_{15} $ - C_{16}$
Nr. 40	30:20 – 37:00	$C_{15} - $ C_{16} $ - C_{17}$
Nr. 43	33:00 - 39:30	C_{16} - C_{17}

Tab. 3.19: Retentionsbereiche weiterer Destillatfraktionen

3.1.9.1 Verhaltensbiologische Tests mit Destillaten höherer Siedebereiche

Mit einer Mikroliterspritze wurden jeweils 2.5 µL der ausgewählten Destillate entnommen und direkt auf den Boden einer Testschale zu den Tieren injiziert, so daß ein kleiner Tropfen auf dem Schalenboden haftete. Nach kurzer Zeit und mehrmaligem Durchschwimmen der Injektionsstelle (Probenraum) konnten verschiedene Verhaltensänderungen bei den Tieren beobachtet werden:

- ◆ Die schwärmenden Tiere schwammen ca. 1 - 5 min. nach der Probenzugabe normal, begannen dann sich stark zuckend und schlängelnd zu bewegen und sanken bewegungslos auf den Boden. Diese Erscheinung wurde als „narkotisierender Effekt“ definiert. Selbst nach dem Umsetzen der Tiere in frisches Seewasser blieb der Lähmungszustand irreversibel.
- ◆ Die Tiere schwammen mit normaler Geschwindigkeit weiter, stoppten abrupt vor/in dem Probenraum und bewegten sich stark schlängelnd rückwärts aus diesem Bereich, vergleichbar einem Abwehrverhalten, setzten aber das Schwärmen ohne erkennbare Verhaltensänderung fort.
- ◆ Die Tiere reagierten mit einem erhöhten Schwärmverhalten: Nach kurzer Zeit erhöhte sich die Schwimmgeschwindigkeit erheblich nach dem Durchschwimmen des Probenraumes. Es erfolgte keine Spermaabgabe, der erhöhte Schwärmvorgang wurde im Beobachtungszeitraum fortgesetzt.
- ◆ Die Tiere begannen stark zu zucken und schwammen mit erheblich verringerter Schwimmgeschwindigkeit und abnormer Körperhaltung enge Kreise.
- ◆ Die Tiere zeigten ein erhöhtes Schwärmverhalten, schwammen stets enge Kreise und gaben eine kleine Menge Sperma in das Wasser ab.

In der Tabelle 3.20 sind die Ergebnisse des Biotests mit verschiedenen Destillatfraktionen an jeweils sechs schwärmenden Männchen dargestellt.

Verhaltenstest mit 2.5 µL Destillat aus höheren Siedebereichen [n = 6]					
Fraktion Nr.	(+ +)	(a +)	(+)	(-)	(- -)
22	2	2	0	0	2
31	4	0	1	0	1
34	3	1	0	1	1
37	2	1	2	1	0
40	2	0	2	1	1
43	1	0	0	0	5

Tab. 3.20: Ergebnisse von Biotests mit Destillaten höherer Siedebereiche

(+ +) = Spermaabgabe;

(-) = Abwehrverhalten;

(a +) = Schwimmen in engen Kreisen;

(+) = verstärktes Schwärmen;

(- -) = narkotisierender Effekt.

Diese Beobachtungen bei Biotests mit Destillatfraktionen spiegelten ebenfalls die Ergebnisse der Untersuchungen der Diplomarbeit wider. Generell konnte keinem Destillat eine spezifische Wirkung zugeordnet werden, jedoch wurden die Beobachtungen 1.1 und 2.3 (narkotisierender Effekt und Spermaabgabe) häufiger registriert. Bei den Gegentests mit dem natürlichen Pheromon Harnsäure konnte bei den vier Tieren aus den Biotests mit Fraktion Nr. 37 in keinem Fall eine Spermaabgabe induziert werden. Die Tiere schwammen ohne Verhaltensänderung durch den neuen Probenraum. In den Gegentests bei den übrigen Testreihen konnten die Männchen bereits mit kleinsten Mengen Harnsäure zu einer Gametenabgabe bewegt werden.

Schlußfolgerung: Hypothetisch mußte davon ausgegangen werden, daß jedes Rohöldestillat eine die Gametenabgabe induzierende Komponente enthalten konnte, aber antagonistische Effekte eine Spermaabgabe verhinderten oder synergistische Effekte eine narkotisierende oder letale Wirkung zur Folge hatten.

3.1.10 Verhaltensphysiologische Tests mit aromatenhaltigen Eluatfraktionen höherer Destillatfraktionen

Um eine aktivierende Wirkung der aromatischen Komponenten aus dem Rohöl zu belegen und damit vorangegangene Ergebnisse zu bestätigen, wurden die zuvor getesteten Destillate säulenchromatographisch über eine Glassäule (60 x 1.1 cm), die mit Kieselgel 60 unter Druck gefüllt wurde, in Aromaten-, Alkan- und Heterokomponentenfraktionen getrennt. Um die längeren Retentionszeiten der höheren Verbindungen zu verkürzen, wurde unter leichtem Überdruck mit Stickstoff bei einer Flußgeschwindigkeit von ca. 1 - 1.5 mL pro min. ($0.35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ unter Normaldruck) chromatographiert. Dies führte zu einer Verkürzung der Chromatographiedauer um zwei Drittel zu drei Viertel der Zeit unter Normaldruck.

Einzelne aromatenhaltige Hexaneluate einer Destillatfraktion wurden in *Bioassays* auf ihre verhaltensphysiologische Aktivität überprüft.

3.1.10.1 Verhaltensphysiologische Biotests mit aromatenhaltigen Fraktionen der säulenchromatographischen Trennung

Die Experimente mit aromatenhaltigen *n*-Hexaneluaten der sechs Destillatfraktionen wurden mit einer Probenmenge zwischen 1 und 5 μL durchgeführt. Wie im vorangegangenen Experiment wurde mit einer Mikroliterspritze die Probe als kleines Tröpfchen auf den Schalenboden gegeben. Bei diesen Biotests konnte ebenfalls mit einigen Eluaten unterschiedlicher Destillate die Spermaabgabe bei den Männchen ausgelöst werden (s. Tabelle 3.21). Zusätzlich ließen sich einzelnen Eluaten einer Destillatfraktion in Abhängigkeit ihrer Retentionszeiten eine spezifische Reizantwort der Tiere zuweisen: So zeigten die Tiere bei den Tests mit Eluaten höherer Retentionszeiten oftmals Lähmungserscheinungen oder verendeten. Auch ließ sich vereinzelt bei auf dem Schalenboden verharrenden Männchen eine Spermaabgabe nach ca. 8 - 15 h beobachten. Dieses war dadurch zu erkennen, daß im Gegensatz zu einer natürlichen Spermaabgabe, am Pygidium (Schwanzende) ein kleiner, auf einen engen Bereich des Schalenbodens lokalisierter „Spermafleck“ sichtbar war. In dem natürlichen Verhalten konnte diese Art der Spermaabgabe nur beobachtet werden, wenn

vor dem Schwärmen das Männchen in seiner Röhre eingeklemmt war und sie nicht verlassen konnte.

Eluate aus dem mittleren Retentionsbereich riefen bei den Männchen ein ungewöhnliches Schwärmverhalten hervor: Die Tiere reagierten selbst im vorangeschrittenem Schwärmstadium (im Labor zu Mitternacht!) weder mit einer Gametenabgabe noch stellten sie das Schwärmen ein. So wurden Männchen nach 12 - 18 h Dauer in ihrem ursprünglichem Schwärmzustand oder mit extrem erhöhter Schwimmgeschwindigkeit vorgefunden. Bei erneuten Tests mit denselben aromatenhaltigen Proben konnte im Anschluß an den Biotest bei den Männchen eine Gametenabgabe, weder mit frischem Coelom von schwärmenden Weibchen, noch mit dem natürlichen Pheromon (Harnsäure) hervorgerufen werden. Selbst das Umsetzen der Tiere in frisches Seewasser ergab keine Abschwächung des Schwärmverhaltens oder eine Pheromonerkennung durch das Männchen.

Biotests zur Spermaabgabe auslösenden und zur narkotisierenden Wirkung von aromatenhaltigen <i>n</i> -Hexaneluaten						
Fraktion	früher Bereich		mittlerer Bereich		später Bereich	
Nr. 22	S2204		S2206		S2208	
	(++) 5/5	(—) 0/5	(++) 0/5	(—) 0/5	(++) 0/5	(--) 5/5
Nr. 31	S3114		S3117		S3120	
	(++) 1/5	(—) 0/5	(++) 0/4	(—) 0/4	(++) 1/5	(--) 2/5
Nr. 34	S3406		S3412		S3418	
	(++) 5/9	(—) 0/9	(++) 0/5	(--) 4/5	(++) 0/5	(--) 4/5
Nr. 37	S3710		S3715		S3719	
	(++) 1/7	(--) 1/7	(++) 0/4	(--) 1/4	(++) 0/5	(--) 2/5
Nr. 40	S4006		S4010		S4014	
	(++) 3/3	(—) 0/3	(++) 2/4	(—) 0/4	(++) 1/4	(--) 1/4
Nr. 43	S4305		S4312		S4320	
	(++) 5/8	(—) 0/8	(++) 0/10	(—) 0/10	(++) 0/4	(—) 0/4
(++) = Spermaabgabe auslösend; (—) = narkotisierender Effekt x/n = Anzahl beobachteter Reaktionen/Anzahl der Tests						

Tab. 3.21: Verhaltensphysiologische Tests mit Eluaten aus verschiedenen Retentionsbereichen

Bei den Biotests mit Eluaten aus dem höheren Retentionsbereich, speziell bei Eluaten der Destillatfraktion Nr. 22 und 34, reagierten die Tiere mit einem lähmungsartigen Zustand. Dabei schwamm das Männchen zuerst mit normaler Schwärmgeschwindigkeit, nach kurzer Zeit stoppte es abrupt vor dem Probenraum, begann sich zu winden und sank leblos direkt vor dem Probentröpfchen auf den Boden.

3.1.10.2 Charakterisierung der aromatenhaltigen Eluate

Die Charakterisierung der getesteten Proben durch GC-MS ergab, daß sich die Spermaabgabe auslösenden Eluate aus einkernigen, alkylsubstituierten Aromaten zusammensetzten. Dabei konnten ein-, zwei- und dreifach alkylierte Benzolderivate mit einer Molmasse von 176, 190, 204 und 218 g identifiziert werden (siehe Chromatogramme in den Einzelionenbetrachtungen). Ebenfalls läßt sich anhand der Einzelionenbetrachtung erkennen, daß Komponenten mit einem 105 m/z base peak in den aktiven *n*-Hexaneluaten vertreten sind.

n-Hexaneluate aus dem mittleren Retentionsbereich, die zu einer Steigerung des Schwärmverhaltens führten, enthielten laut Datenbankrecherche höher substituierte Alkylbenzolderivate, alkylierte und nicht-alkylierte Dihydro- und Tetrahydronaphthalinderivate sowie Dihydro-Alkylindene.

Eluatfraktionen höherer Retentionszeiten, die in den Biotests eher einen narkotisierenden Charakter besaßen, setzten sich aus mehrkernigen Aromaten, und bizyklischen Ringsystemen (Alkyl-naphthalinen, Alkylindenen, Azulenen), und vierfach oder höher alkylsubstituierten Benzolen zusammen. Abbildung 3.9 zeigt ein Chromatogramm des Eluats Nr. 2208 aus dem Bereich der höheren Retentionszeit.

Abbildung 3.10 zeigt das Chromatogramm des Eluates S3418, das sich hauptsächlich aus Naphthalinderivaten zusammensetzte. Darin konnten Dimethyl-, Etyl-, Trimethyl-, Ethyl-methyl- und Propylnaphthaline detektiert werden, wie aus den Einzelionenbetrachtungen für die C3-Alkyl-naphthaline ($m/z = 170$ und 155) und für die C2-Alkyl-naphthaline ($m/z = 156$ und 141) hervorgeht.

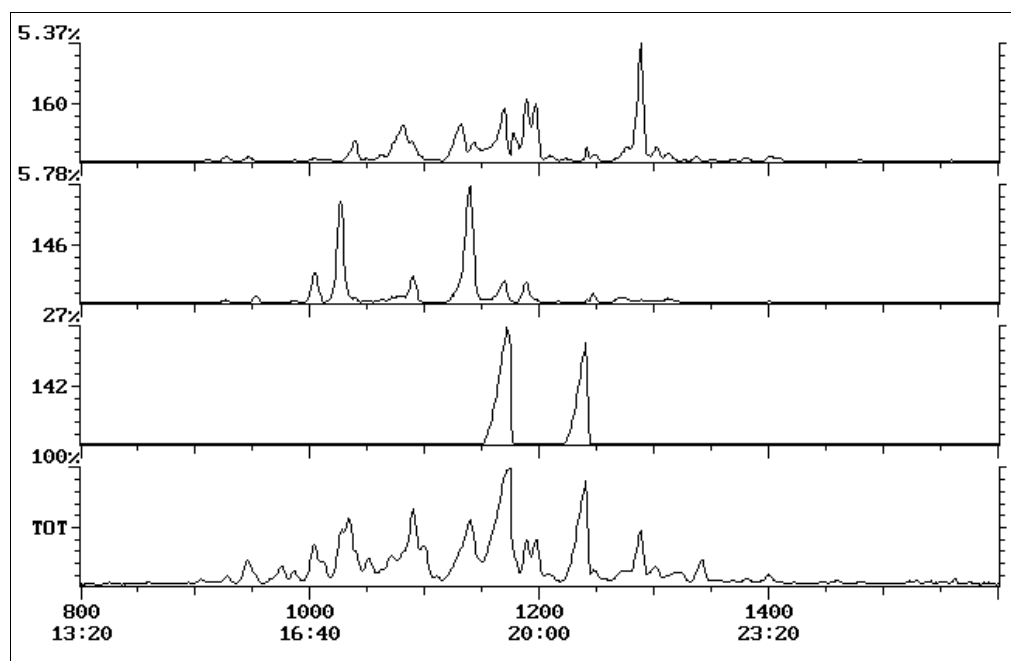


Abb. 3.9: Gaschromatogramm von Eluat Nr. 2208 mit Einzelionenbetrachtung der Fragmente $m/z = 160$; 146 und 142. GC-System Nr III; 50°C Starttemp., Aufheizrate: 3° pro min.

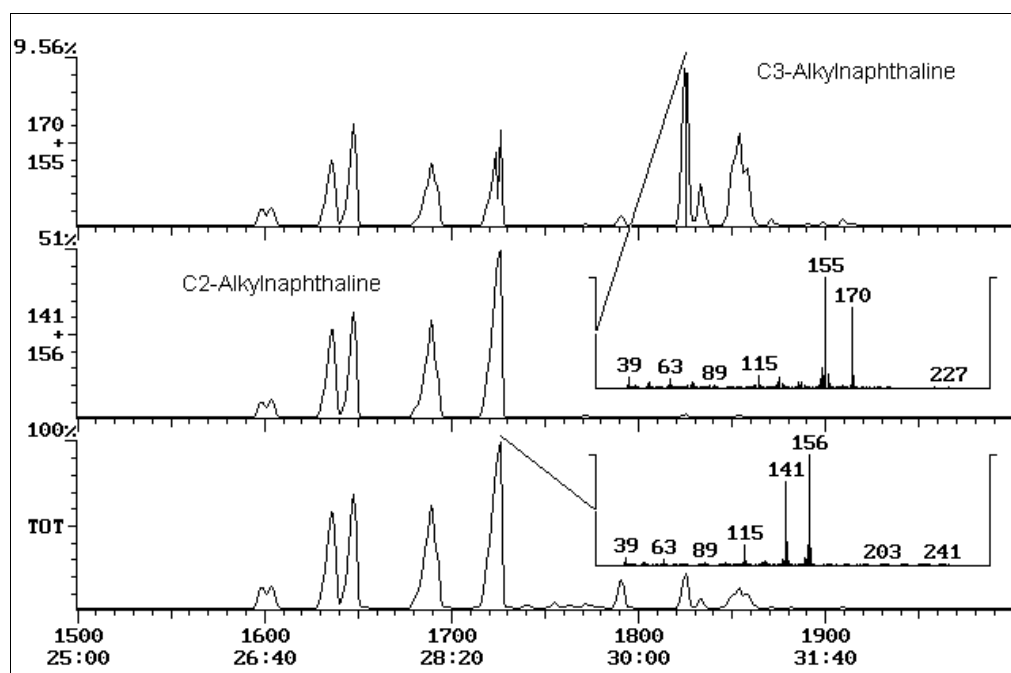


Abb. 3.10: Gaschromatogramm von Eluat Nr. 3418 mit Einzelionenbetrachtung der Fragmente $m/z = (170, 155)$ und $(156, 141)$. GC-System Nr. III, 50°C Starttemperatur, Aufheizrate von 3° pro min.

3.1.11 Verhaltensphysiologische Tests mit Naphthalinderivaten

In einem abschließenden, verhaltensphysiologischen Experiment sollten vier zweikernige Aromaten aus dem *n*-Hexaneluat der Destillatfraktion Nr. 22 mit höherer Retentionszeit auf ihre Wirkung bei schwärmenden *P. dumerilii*-Männchen untersucht werden. Dazu wurde je ein Mikroliter der Verbindungen 1- und 2-Methylnaphthalin (Fluka; CAS-Nr. [90-12-0]; [91-57-6]) sowie 1- und 2-Ethylnaphthalin (Fluka; CAS-Nr. [1127-76-0]; [939-27-5]) in je 5 mL Milliporewasser dispergiert (1:5000) und 10 µL bzw. 20 µL mit einer Spritze (Hamilton) zu den schwärmenden Männchen in die Schale injiziert. Da nicht mit einer spontanen Spermaabgabe zu rechnen war, wurden die Tiere nach ca. 60 min. Beobachtungsdauer in ihren Schalen belassen und das Ergebnis einer Verhaltensänderung am nächsten Tag (ca. 15 Stunden später) begutachtet. In einem Blindtest wurden vier schwärmende Männchen ohne Probenzugabe ebenfalls über Nacht in ihren Schalen belassen.

Als Beobachtung konnten 5 Verhaltensmerkmale registriert werden:

1. Spermaabgabe innerhalb von 60 min. (SA: 60 min).
2. Narkotisierender Effekt (nark. Effekt): Das Männchen brach den Schwärmvorgang abrupt ab und sank leblos zu Boden. Am Testende waren keine „Lebenszeichen“ zu erkennen (Anstoßen mit der Pipette, Umsetzen in frisches Seewasser).
3. Das Tier lag leblos am Boden, hatte aber während des Schwärmens eine kleine Portion Sperma in das Wasser abgegeben (leblos / SA-Wasser). Dies war durch eine leichte Trübung des Wassers zu erkennen.
4. Das Tier lag leblos am Boden. Am Schwanzende (Pygidium) des Männchen war eine kleine Spermalache deutlich erkennbar (leblos / SA-Boden). Das Männchen mußte also im Liegen sein Sperma aus der Leibeshülle gepreßt haben.
5. Das Tier befand sich nach 15 Stunden noch immer im schwärmenden Zustand (Schw.: + / SA: -). Während der unbeobachteten Versuchsdauer konnte das Männchen dabei Sperma in das Wasser abgegeben haben, das aber für die Auswertung des Tests von keiner Bedeutung war.

Tabelle 3.22 gibt einen Überblick über die Verteilung der Verhaltensmerkmale in Abhängigkeit der Verbindung und dem Probevolumen (Anzahl beobachteter Reaktionen zur Gesamtzahl der Tests mit einer Verbindung).

Biotests mit 10 und 20 µL Naphthalinderivaten (1:5000)					
Probe	1-MeN	2- MeN	1- EtN	2- EtN	Blind
Reaktion \ Vol. [µL]	10 : 20	10 : 20	10 : 20	10 : 20	
(SA: 60 min)	0 : 0	0 : 1	0 : 0	4 : 0	0
(nark. Effekt)	1 : 0	0 : 1	0 : 3	5 : 4	0
(leblos/SA-Wasser)	0 : 0	3 : 0	1 : 0	2 : 1	3*
(leblos/SA-Boden)	4 : 2	3 : 0	0 : 2	1 : 0	0
(Schw.: + / SA: -)	2 : 3	1 : 3	4 : 0	0 : 0	0
gesamt:	7 : 5	7 : 5	5 : 5	12 : 5	4*
* Tier Nr. 4 leblos am Boden ohne erkennbare Gametenabgabe					

Tab. 3.22: Biotestergebnisse mit Naphthalinderivaten

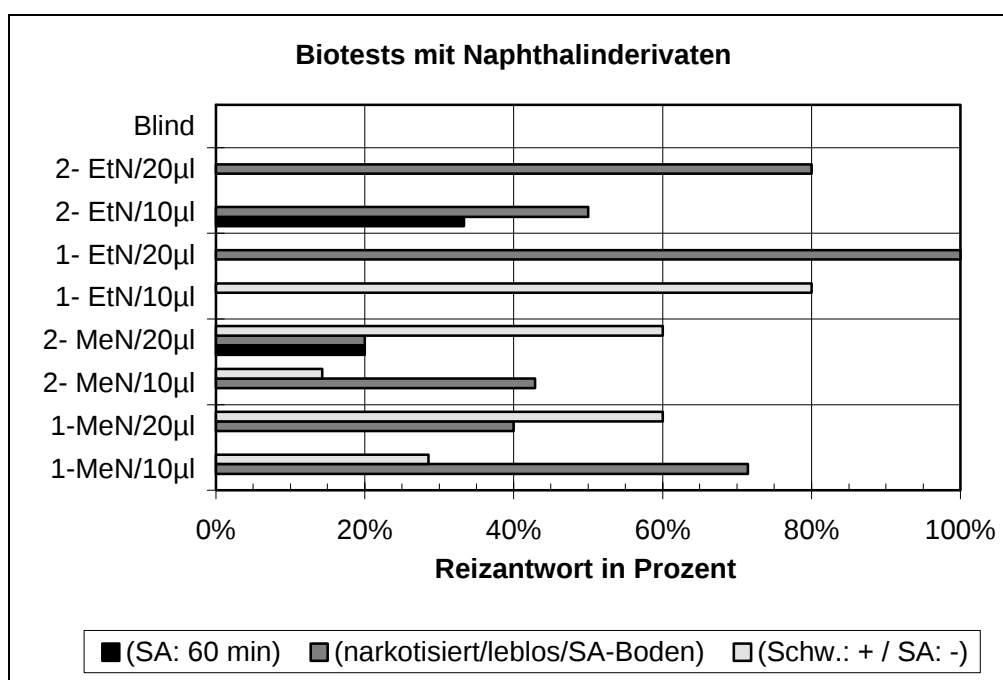
Ein von allen Naphthalinderivaten ausgehender, narkotisierender Effekt konnte nicht beobachtet werden. Jedoch zeigten die Tiere bei der Beprobung mit der doppelten Dosis an Ethylnaphthalinen eher ein narkotisiertes Verhalten als bei 10 µL Probenzugabe. Eine Spermaabgabe innerhalb von 60 Minuten konnte in fünf von 51 Fällen beobachtet werden. In 13 von 51 Fällen zeigten die Tiere über 15 Stunden ein erhöhtes Schwärmverhalten (vorausgesetzt, daß sie in der beobachtungsfreien Dauer von ca. 10 h keine Ruhepausen eingelegt hatten) und gaben vereinzelt kleinste Mengen Sperma während des Schwärmens in das Wasser ab.

Das natürliche Schwärmverhalten endet vermutlich mit der Spermaabgabe während des Schwimmens, da bei den Blindtests eine starke Trübung des Wassers zu erkennen war und die Männchen am nächsten Tag regungslos (tot) auf dem Schalenboden lagen. In einem von vier Fällen lag dagegen das Männchen leicht gekrümmt auf dem Schalenboden, ohne sein Sperma abgegeben zu haben.

Somit zeigten sieben der untersuchten Tiere einem, dem natürlichen Schwärmvorgang gleichendes Ende: Sie entließen ihr Sperma während des Schwärmens in das Wasser, sechs bei der Probendosis von 10 µL. In 14 aller Fälle konnte ein narkotisierender Effekt beobachtet werden, der bei 12 Tieren

durch Ethylnaphthalinproben ausgelöst wurde. In weiteren 12 Fällen wurde eine Gametenabgabe im Anschluß an das Schwärmen registriert, da keine Trübung des Wassers erkennbar war, jedoch sich am Körperende des Tieres ein kleiner Spermafleck befand.

In Tabelle 3.23 ist der Einfluß der Naphthalinderivate auf die schwärmenden *P. dumerilii*-Männchen mit den Probevolumina von 10 und 20 µL zusammenfassend dargestellt. Dabei sind die Ergebnisse aus den Biotests mit „narkotisierendem Effekt“ und „leblos mit einer Spermalache am Boden“, als anormales und unter natürlichen Bedingungen nicht zu beobachtendes Verhalten, zusammengefaßt.



Tab. 3.23: Einfluß ausgewählter Naphthalinderivate auf das Schwärmverhalten von *P. dumerilii*-Männchen

3.1.12 Zusammenfassung der Ergebnisse von verhaltensphysiologisch aktiven Verbindungen aus dem Siedebereich zwischen Dodecan und Heptadecan des EKO-FISK Rohöls

Im Gegensatz zu den in der Diplomarbeit untersuchten Destillatfraktionen (Nr. 9, 14, 16 und 23) besaßen die in dieser Arbeit untersuchten Fraktionen (Nr.

22, 31, 34, 37, 40 und 43) alle einen, mehr oder weniger starken, verhaltensphysiologisch Effekt bezüglich ihres Spermaabgabe induzierenden Charakters. Alle Destillatfraktionen waren in der Lage, mindestens in einem Fall bei den schwärmenden *P. dumerilii*-Männchen eine Gametenabgabe auszulösen. Dieser Effekt kann auf die im Rohöl enthaltenen, einkernigen Benzolderivate zurückgeführt werden und ist somit keine „Laborkuriosität“ einzelner C₅-Alkylbenzole oder eines bestimmten Substitutionsmusters. Die säulenchromatographische Trennung einzelner Destillatfraktionen aus dem Siedebereich zwischen Dodecan und Heptadecan lieferten Alkanfraktionen, Aromatenfraktionen und Heterokomponentenfraktionen. Dabei erwiesen sich in Biotests stets die Eluate des vorderen Retentionsbereichs als Spermaabgabe induzierend. Eluate aus dem mittleren Retentionsbereichs führten dagegen zu einer Steigerung des Schwärmverhaltens in der Weise, daß Männchen nach 15 Stunden mit hoher Geschwindigkeit im Kreis schwimmend in der Testschale vorgefunden wurden. In zahlreichen Fällen konnte bei diesen Tieren mit dem natürlichen Pheromon Harnsäure keine Spermaabgabe erreicht werden.

Ein weiterer, zuvor bei den Biotests nicht beobachteter Effekt, ausgehend von *n*-Hexaneluaten der Aromatenfraktion höherer Retentionszeit und von Alkyl-naphthalinen, ließ die Männchen bei Biotests auf dem Schalenboden verharren. Dabei stießen sie eine kleine Menge Sperma aus dem Schwanzende (Pygidium) aus, das als kleine Spermalache sichtbar war.

Ein von Alkyl-naphthalinen ausgehender narkotisierender Effekt ließ sich nicht pauschalisierend feststellen, jedoch zeigten Tiere bei der Beprobung mit Ethyl-naphthalinen eher die Tendenz leblos auf den Boden zu sinken als bei Methyl-naphthalinen. Allerdings konnte mit 2-Ethyl-naphthalin auch die Spermaabgabe induziert werden.

Ein Vergleich der Aktivitäten des die Gametenabgabe auslösenden Potentials alkylierter Benzolderivate und den biogetesteten alkylierten Naphthalinderivaten, ergab für die einkernigen Aromaten eine die Spermaabgabe induzierende Rate von 43 %, für die bizyklischen Aromaten lediglich eine Rate von 10 % der getesteten Proben.

3.2 Verhaltensphysiologisch aktive Proben aus biologischem Material

3.2.1 Biotests mit Wasser von schwärmenden *P. dumerilii*-Weibchen und - Männchen

Seit länger Zeit ist aus Beobachtungen bei Biotests an männlichen *P. dumerilii*-Männchen die Aktivität von Weibchenschwärmwasser (Hauenschild und Fischer 1969) bekannt: Wird ein geschlechtsreifes Männchen in eine Testschale, in der zuvor ein Weibchen geschwärmt hat, gesetzt, wird der Hochzeitstanz eingeleitet und es erfolgt spontan eine Spermaabgabe. Dieser Versuch läßt sich ebenfalls mit einigen Millilitern aktiven Schwärmwassers reproduzieren.

Schwärmwasser, das bei Raumtemperatur belassen wurde, zeigte nach 24 Stunden keine Spermaabgabe auslösende Wirkung.

In keinem Fall ließ sich jedoch der Hochzeitstanz oder eine Gametenabgabe bei *P. dumerilii*-Weibchen mit Schwärmwasser von Männchen erzielen.

Nach dem Umsetzen von einem oder mehreren schwärmenden Weibchen in eine Testschale, die mit einem Uhrglas abgedeckt wurde, konnte nach kurzer Schwärmzeit ein schwacher, aber charakteristischer, dem Triethylamin vergleichbarer Geruch registriert werden.

Aus diesen Beobachtungen ließen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

1. Nur Weibchen emittieren während des Schwärmvorganges einen Botenstoff, der bei dem anderen Sexualpartner eine Gametenabgabe bewirkt.
2. Das Anlocken eines Sexualpartners wird ausschließlich durch das Weibchen initiiert.
3. Die Aktivität des weiblichen Pheromons ist degressiv.
4. Während das Schwärmens wird/werden (eine) Komponente(n) freigesetzt, die in die Gasphase übergehen könnten.

3.2.2 Untersuchung von Weibchenschwärmwasser

3.2.2.1 Versuch der Anreicherung durch Festphasenextraktion

Aus den Schlußfolgerungen resultierend, wurde der Versuch unternommen, aus dem Schwärmwasser der Weibchen, mit Hilfe der Festphasenextraktion, verhaltensphysiologisch aktive Komponenten anzureichern. Da über die chemische Natur der Substanzen keine Kenntnisse vorlagen, wurden Sorbentien unterschiedlicher Polaritäten verwendet (C18 -; C8 -; CN - und NH₂-Adsorptionsfilter).

Von besonderem Interesse war bei diesen Untersuchungen, die Existenz von 5-Methyl-3-heptanon (5-M-3-H) im Schwärmwasser zu überprüfen. Dieses Keton wurde aus dem Coelom der Tiere dieser Spezies isoliert und wird für das Finden der Geschlechter verantwortlich gemacht, bzw. dient als Aphrodisiakum während der Reproduktion (Hardege, 1991b).

Als Ausgangsprobe dienten jeweils 10 - 15 mL Seewasser, in dem zuvor drei Weibchen 30 - 60 min. geschwärmt hatten und das bei *P. dumerilii*-Männchen spontan zur Abgabe einer kleinen Menge Sperma führte. Um die Anzahl der flüchtigen Komponenten in den Eluat zu minimieren, wurde das pasteurisierte, natürliche Seewasser über eine C18 Bond Elut Kartusche geleitet und als Schwärmwasser bereitgestellt.

Von großer Bedeutung war dabei die Quelle der mit gekoppelter GC/MS detektierten Verbindungen. Für den Fall, daß das Schwärmwasser die Quelle des flüchtigen Pheromons repräsentiert, wurde die Analytik in folgender Reihenfolge durchgeführt:

1. Analyse flüchtiger Komponenten im natürlichen Seewasser
2. Analyse flüchtiger Komponenten aus den Filterpatronen
3. Analyse flüchtiger Komponenten im Schwärmwasser

Abschließend sollten verhaltensphysiologische Tests mit den Extrakten aus dem Schwärmwasser die Präsenz von flüchtigen Verbindungen verifizieren.

3.2.2.2 Ergebnis der Festphasenextraktion

Mit den Eluaten der Adsorptionsversuche an den Phasen C18-; C8- und CN- konnte im Verhaltenstest bei *P. dumerilii*-Männchen weder die Spermaabgabe noch der Hochzeitstanz eingeleitet werden.

Die mit Hilfe der gekoppelten GC-MS untersuchten Eluatproben führten zu keinen Rückschlüssen auf die Anwesenheit flüchtiger Komponenten in Schwärmwasser von *P. dumerilii*-Weibchen.

Nur ein Eluat (Eluat Nr. 4; 50 µL Aceton) aus dem Adsorptionsschritt mit einem NH₂-Bond Elut Filter führte bei den schwärmenden Männchen spontan zu einer Spermaabgabe. Die Aktivität der Probe war auf 24 Stunden beschränkt, da Biotests mit diesem Eluat in keinem Fall bei den Männchen zu einer Gametenabgabe führte. In zwei Fällen konnte dagegen eine leichte Erhöhung der Schwärmaktivität beobachtet werden. Die massenspektrometrische Analyse dieses Acetoneluates, zuzüglich zweier Einzelionenbetrachtungen der Fragmente $m/z = 57, 71$ und 85 für Alkylgruppen sowie der Fragmente $m/z = 129, 99$ und 71 für 5-Methyl-3-heptanon (Abbildung 3.11), ergab im Vergleich zu einem Blindwert aus gereinigtem Seewasser, keine Rückschlüsse auf die Anwesenheit von flüchtigen Komponenten.

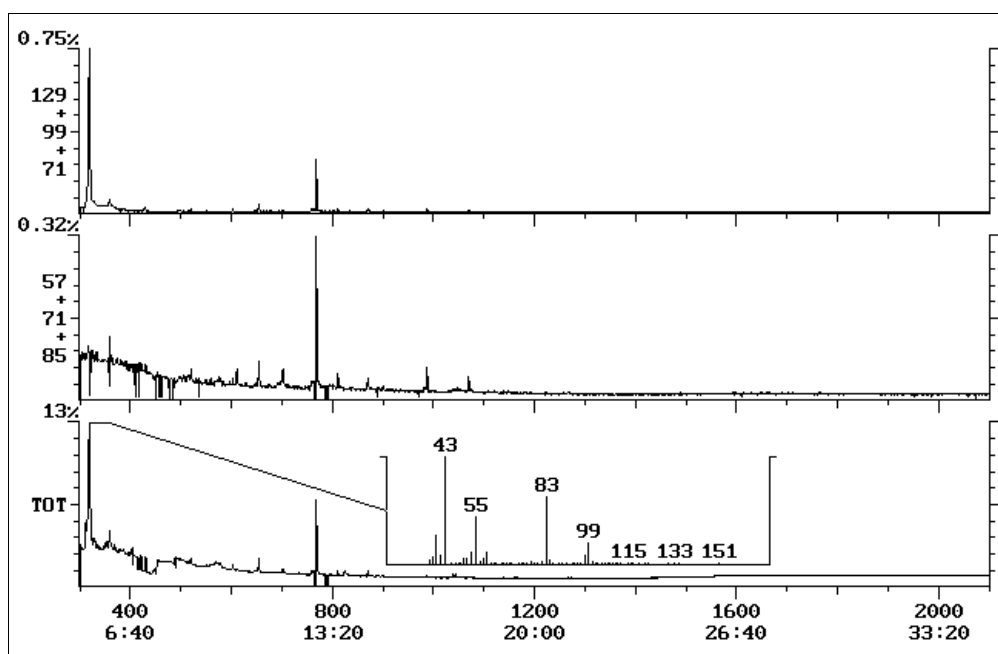


Abb. 3.11: Gaschromatogramm des 4. Eluats einer NH₂-Phase von einer Schwärmwasserprobe; GC-System Nr. III, 75°C Starttemperatur, 2 min. isotherm, 10° pro min. Aufheizrate.

Von einer quantitativen Adsorption an der NH_2 -Phase mußte ausgegangen werden, da in einem Gegentest das Filtrat keine Aktivität bezüglich einer Verhaltensänderung aufwies. Zwei Vergleichschromatogramme von Eluaten einer zuvor gereinigten Seewasserprobe bzw. einer ungereinigten Seewasserprobe sind im Anhang unter Abbildung A.16 und A.17 zu finden.

Im Retentionsbereich von 5-M-3-H bei ca. 512 bis 523 Scans (Starttemperatur, 50°C ; Aufheizrate 1° pro min.) konnte in keinem der erhaltenen Eluate das Keton detektiert werden. Ein Vergleich zwischen den Gaschromatogrammen aus einer Schwärnwasserprobe und einem Standard (0.41 ng Keton pro Mikroliter Injektionsvolumen) der jeweils 3. Eluate, in dem der Großteil des Ketons wiederzufinden war, läßt im Schwärnwasser kein 5-Methyl-3-heptanon erkennen (Abbildungen 3.12 und 3.13).

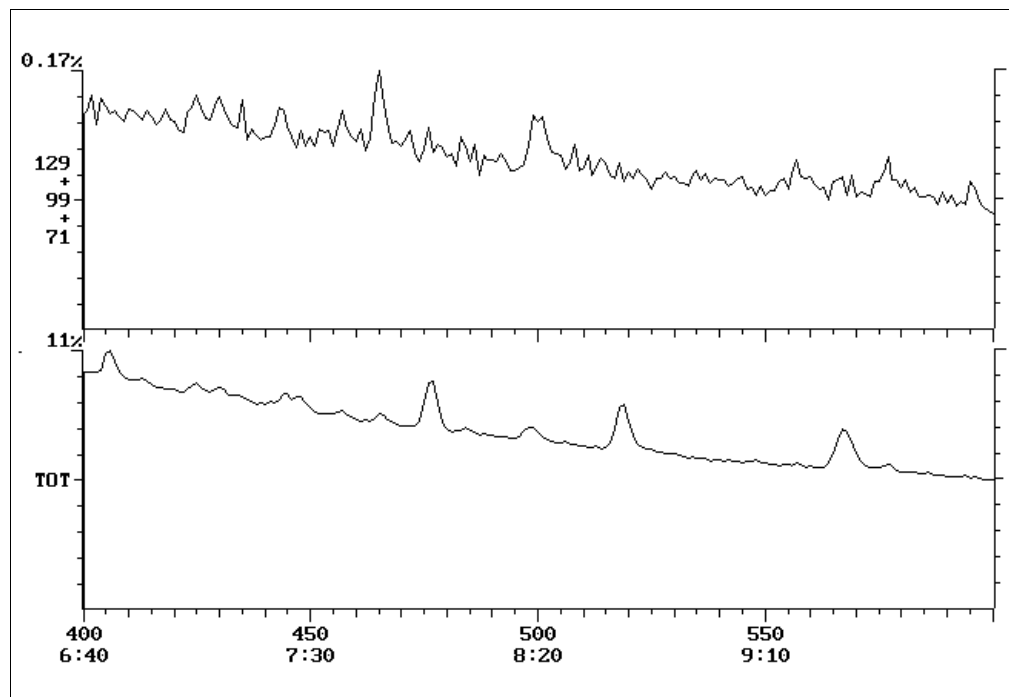


Abb. 3.12: Gaschromatogramm (3. Eluat C8-Phase) einer Schwärnwasserprobe; GC-System Nr. III, 50°C Starttemperatur, 1° pro min. Aufheizrate.

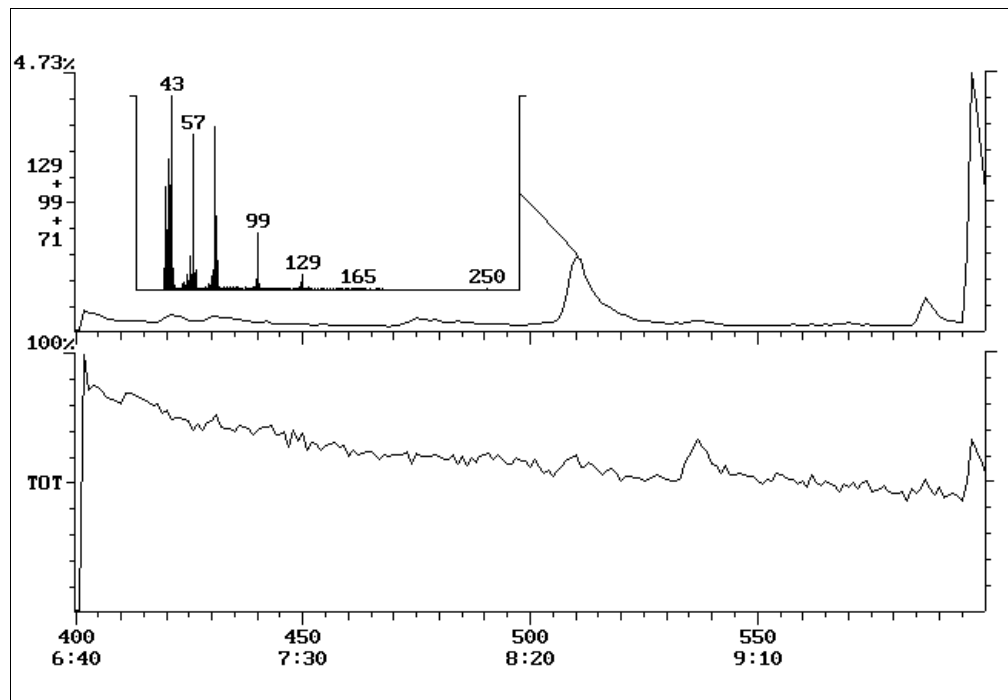


Abb. 3.13: Gaschromatogramm eine 5-M-3-H Standards; GC-System
Nr. III, Bedingungen wie im 3.11.

3.2.2.3 Vorüberlegungen für weitere Arbeitsschritte

Dieses Resultat warf neue Fragen und Überlegungen nach der Art und chemischen Natur des Sexualpheromons sowie dessen Aufgabe auf und bestimmte die Methodenwahl der nachfolgenden Arbeitsschritte:

1. Detektionsvermögen des Massenspektrometers

Um diskriminierenden Effekten oder einer für das Massenspektrometer nicht nachweisbaren Konzentration vorzubeugen, sollte das Ergebnis mit einer größeren Anzahl von Tieren reproduziert werden. Zu einer Verringerung des Aufwandes und aus praktischen Gründen wurde dazu das Probenmaterial aus dem Homogenat der Tiere gewonnen.

2. Stabilität des Pheromons im Seewasser

Da die Aktivität der Eluatprobe wie auch die des Schwärnwassers degressiv ist, sollten a) als Randbedingung alle stabilen Verbindungen als Spermaabgabe induzierend ausgeschlossen werden und b) aus einem größerem Pool an biologischen Ausgangsmaterial mit kurzen Arbeitsschritten bei intensiver Kühlung unter Inertgas gearbeitet werden.

3. Adsorptionsvermögen der Festphasen

Aufgrund der Adsorption des Pheromons an einer Aminophase, die aber auch als Ionentauscher fungieren kann, sollte es sich bei der gesuchten Verbindung um ein Molekül mit einer Aminogruppe handeln. Dagegen konnten flüchtige Kohlenwasserstoffe (keine Aktivität, die von der C18-Phase ausging) sowie schwach polare Verbindungen (wegen C8) von vornherein ausgeschlossen werden.

4. Existenz flüchtiger, bereits identifizierter Verbindungen

Aus älteren Arbeiten über Pheromone bei *P. dumerilii* war die Existenz der Enantiomere einer flüchtigen Verbindung (R- und S- 5-Methyl-3-heptanon) bekannt, die zu einer Erhöhung der Schwärmaktivität und auch in einzelnen Fällen zu einer Gametenabgabe führte. Um einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der beobachteten Spermaabgabe und einer bereits identifizierten, aber im aktiven Acetoneluat nicht nachweisbaren Verbindung zu belegen, mußten Wiederfindungsraten von 5-Methyl-3-heptanon an den benutzten Adsorptionsphasen bestimmt werden, um für weitere Anreicherungs-schritte, mit einer größeren Anzahl von Tieren, eine geeignete Adsorptionsphase (maximales Adsorptionsvermögen für dieses Keton) zu bestimmen.

5. Funktionsweise/Bestimmung des Pheromons

Da bei den verhaltensphysiologischen Tests (sowohl mit dem Acetoneluat als auch mit dem Weibchenschwärmwasser) nach der Probenzugabe nur die Abgabe einer kleinen Menge Sperma in das Wasser beobachtet werden konnte, mußte diesem Pheromon die Aufgabe des Findens der Geschlechter (mate recognition pheromone) zugeordnet werden.

3.2.3 Bestimmung der Wiederfindungsrate von 5-Methyl-3-heptanon an je 100 mg Sorbens der Phasen C18; C8; CN und NH₂

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden eine Standardlösung mit einer Konzentration von 10 ng rac. 5-Methyl-3-heptanon pro mL Milliporewasser hergestellt und in einer ersten Versuchsreihe 2 mL bzw. 1 mL dieser Lösung über die Filter gegeben, anschließend mit Aceton und *n*-Hexan vom Adsorptionsfilter eluiert und die einzelnen Eluate mit gekoppelter GC-MS analysiert und ggf. quantifiziert. Die externe Quantifizierung erfolgte mit je

1 μL der vier Standardlösungen des Ketons zu $4.1 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, $2.05 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, $0.82 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ und $0.41 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ über die Flächen unter den Peaks.

Aufgrund der geringen Konzentration (Peaks verschwinden im Grundrauschen des Ionenstroms) wurde das Integral der Fläche unter den Peaks mit der Einzelionenbetrachtung $m/z = 71$; 99 und 129 bestimmt.

Um den Verlusten durch Verdampfen des Lösungsmittels während der Elution, bzw. eines Verbleibs des Lösungsmittels auf dem Filter, Rechnung zu tragen, wurde unmittelbar nach dem Elutionsvorgang das resultierende Eluentenvolumen mit einer 100 μL Spritze (Hamilton) bestimmt.

Wiederfindungsrate von rac. 5-Methyl-3-heptanon (1. Versuchsreihe)				
Phase	1 mL Volumen = 10 ng	Prozent	2 mL Volumen = 20 ng	Prozent
C18	—	—	9.1 ng	45.5%
C8	8.7 ng	87%	19.2 ng	96%
CN	7.6 ng	76%	12.2 ng	61%
NH ₂	—		nicht nachweisbar	—

Tab. 3.24: Ergebnisse zur Bestimmung der Wiederfindungsrate

Zweite Versuchsreihe: Bestimmung der Wiederfindungsrate des Ketons nach einem Trennungsgang über die Ultrafiltrationsanlage

Dazu wurden 10 mL der Standardlösung des Ketons mit einer Konzentration von 2 ng pro Milliliter Milliporewasser über einen 1 kDa und einen 0.5 kDa Membranfilter geleitet. Anschließend erfolgte die Ketonanreicherung an einem C8-Adsorptionsfilter. Die Quantifizierung wurde wie im ersten Schritt durchgeführt. Die Wiederfindungsrate betrug dabei 16.4 ng (82 %).

Eine Übersicht der ermittelten Wiederfindungsraten gibt Tabelle 3.24.

Schlußfolgerung: Auf der Suche nach flüchtigen Komponenten aus dem Coelom, speziell nach dem Keton 5-Methyl-3-heptanon, ist die C8-Adsorptionsphase am besten geeignet. Aus arbeitsstrategischen Gründen wurden weitere Adsorptionsschritte aus dem biologischen Material an den Adsorptionsphasen C8, und CN in der Reihenfolge zunehmender Polarität durchgeführt.

3.2.4 Probengewinnung aus Homogenaten

Um zumindest einen Teil einer instabilen Komponente zu isolieren, wurde die Menge des Ausgangsmaterials vergrößert. Somit wurden die Proben direkt aus dem Homogenat einer größeren Anzahl von Tieren gewonnen.

Abbildung 3.14 zeigt den schematischen Arbeitsgang vom Homogenat der das Pheromon emittierenden Quelle, über die SPE und *Bioassay* zur Probencharakterisierung.

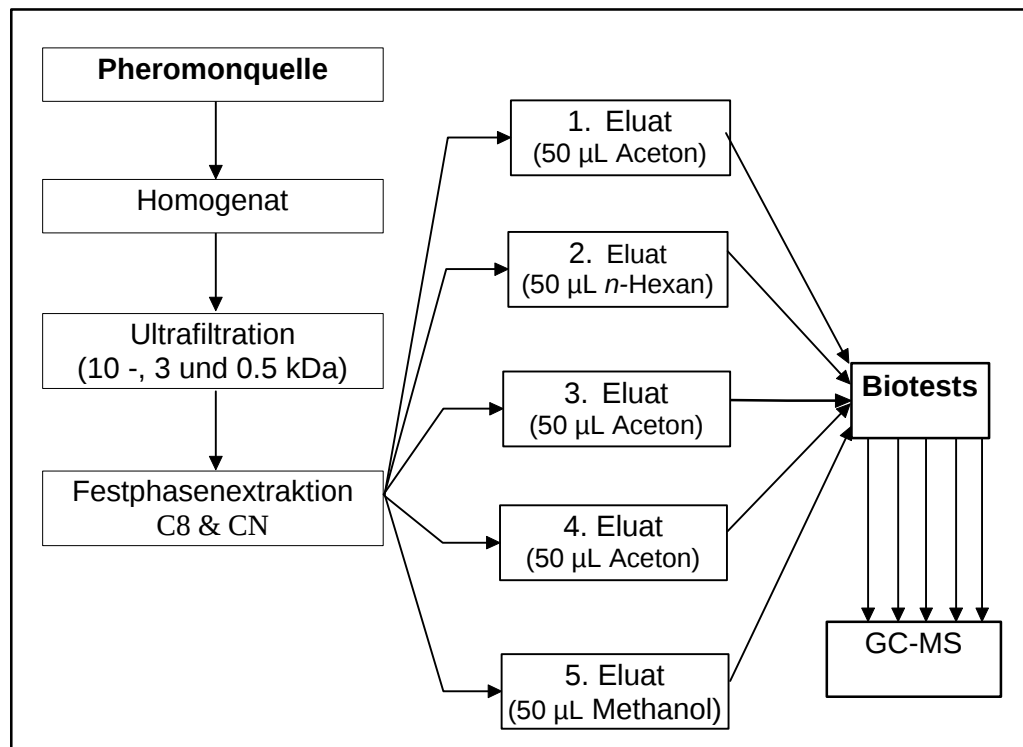


Abb. 3.14: Schematischer Probengewinnungsgang aus Homogenaten

3.2.4.1 Probengewinnung

Um eine größere Menge an Ausgangsmaterial zu erhalten, wurde aus praktischen Gründen auf Schwärnwasser als Ausgangsmaterial verzichtet. Statt dessen sollte die Probengewinnung aus der Pheromonquelle erfolgen. Dazu wurden 2 Proben aus tiefgefrorenen Weibchen (68 und 113 Tiere) und eine Probe aus geschlechtsreifen frischen Weibchen (24 Tiere) untersucht. Das Homogenat der Tiere wurde über Ausschlußfilter der Größen 10 kDa, 3 kDa und 0.5 kDa ultrafiltriert, zur Anreicherung der Coelombestandteile über die Adsorptionsfilter gegeben und anschließend mittels gekoppelter GC-MS

untersucht. Nach Möglichkeit wurden die Eluate sofort im Anschluß an die Probengewinnung auf ihre biologische Aktivität untersucht.

3.2.4.2 Ergebnisse der Analyse von Eluaten aus der Festphasenextraktion mit Homogenaten

C8-Phase:

1. In keiner Eluatprobe, die durch Festphasenextraktion gewonnen wurde, konnte 5-Methyl-3-heptanon nachgewiesen werden.
2. Bei der Auswertung der Gaschromatogramme konnten abzüglich der durch Lösungsmittel und „Adsorbensbluten“ eingetragenen Verbindungen ca. 40 Verbindungen nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich bei einem Großteil der Verbindungen um Alkane. Des weiteren konnten einige Aromaten, Aldehyde und Ester detektiert werden sowie eine in den Eluaten Nr. 2 bis 5 dominierende Verbindung (vermutlich stickstoffhaltigen Substanz) mit einem Molpeak von 217 m/z und dem Fragmentierungsmuster: 217 m/z (100 %), 55 (88), 99 (73), 111 (57), 42 (55) und 43 (47).

CN-Phase:

1. In keiner der Festphasenextraktion unterzogenen Proben konnte 5-Methyl-3-heptanon nachgewiesen werden.
2. Weitere massenspektrometrische Analysen der gewonnenen Eluate ergaben keine Hinweise auf leichtflüchtige Komponenten im Coelom, jedoch fanden sich auch in diesen Eluaten größere Mengen derselben Verbindung (m/z = 217) wie zuvor.

3.2.4.3 Ergebnisse der Biotests mit Eluaten der Festphasenextraktion

Bei den verhaltensphysiologischen Tests mit den Eluaten der SPE an schwärmenden Männchen konnten mit den Eluaten der tiefgefrorenen Proben (1. 68 Weibchen, 2. 113 Weibchen) in keinem Fall eine Spermaabgabe induziert werden. Nur ein Eluat (Nr. 4, 50 µL Aceton) aus einer Probe von 24 frisch aufgearbeiteten Weibchen zeigte eine extrem hohe Aktivität und

induzierte während der Biotests im Anschluß an die Elution die komplette Abgabe des Spermas (erkennbar durch eine annähernd leere Leibshülle der Männchen). Dabei wurden verschiedene Volumina zu den Männchen injiziert (Tabelle 3.25).

Probenvolumen [μL]	Reaktion	Anzahl bei
5.0	erhöhte Schwärmgeschwindigkeit	1/1
2.5	Spermaabgabe innerhalb von 15 sec.	2/2
1.5	spontane Spermaabgabe	2/2
0.2	spontane Spermaabgabe	3/3
0.1	spontane Spermaabgabe	3/3
probenbenetzte Spritzenadel	spontane Spermaabgabe	2/2

Tab. 3.25: Biotestergebnisse mit aktiven Eluat Nr. 4 von C8-SPE

Nach 24 Stunden besaß dieses Eluat in Biotests keine die Spermaabgabe auslösende Wirkung, führte aber stets zu einer Erhöhung der Schwärmgeschwindigkeit. Die erneute GC-MS-Analyse dieses Eluats ergab keine Rückschlüsse auf ein Verschwinden oder die Intensitätsabnahme einer Verbindung.

Eine Analyse der vom Lösungsmittel Aceton befreiten und in Milliporewasser aufgenommenen Probe mit Hilfe der HPLC (semiprep. RP 18 ec.) ergab durch den Vergleich von Retentionszeit und des charakteristischen UV-Spektrums von Harnsäure ($\lambda_{\text{max}1} = 234 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{max}2} = 288 \text{ nm}$) keinen Hinweis auf die Anwesenheit des natürlichen Spermaabgabe auslösenden Pheromons Harnsäure in der Probe. Ferner konnten zwei Peaks detektiert werden, deren Identität nicht bestimmt wurde. Vermutlich handelte es sich um zwei Nukleoside (Guanosin und Hypoxanthin).

3.2.4.4 Adsorptionsvermögen von Harnsäure an einer Bond Elut C8-Phase

Um die Präsenz von Harnsäure in dem Eluat und dadurch die Möglichkeit eines positiven Biotestergebnisses auszuschließen, wurde die Adsorbierbarkeit von Harnsäure an einer C8-Phase bestimmt. Dazu wurden 2 mL einer

0.01 mmolaren Harnsäurestammlösung (Gesamtgehalt: 3.36 µg) über das Filter gegeben und anschließend zweimal mit 100 µL Methanol eluiert. Aceton als Lösungsmittel konnte aufgrund seiner starken Wechselwirkungen mit der RP18_{ec}-Phase nicht eingesetzt werden. Die HPLC-Analyse des Filtrats ergab keine erkennbare Konzentrationsabnahme gegenüber der Stammlösung. In den beiden methanolischen Eluaten konnte keine Harnsäure nachgewiesen werden.

3.2.5 Anwesenheit von 5-Methyl-3-heptanon bei *P. dumerilii* ?

Um eine Existenz des Ketons 5-Methyl-3-heptanon in männlichen und weiblichen Polychaeten der Spezies *P. dumerilii* zu falsifizieren, sind jeweils zwei weitere Versuche durchgeführt worden.

3.2.5.1 Analyse einer Coelomprobe von 57 Männchen

Eine tiefgefrorene Coelomprobe von 57 Männchen (11 mL) aus dem Jahr 1996 wurde aufgetaut, durch 3 kDa und 1 kDa Ausschußfilter ultrafiltriert und das Filtrat über eine C8- und eine CN-Extraktionskartusche (je 100 mg) geleitet. Alle erhaltenen Eluate wurden anschließend mit gekoppelter GC-MS auf die Präsenz von 5-Methyl-3-heptanon untersucht. Ein Biotest an schwärmenden Weibchen wurde zu keiner Zeit, weder mit der Coelomprobe noch mit den Eluaten der SPE, aufgrund des Alters der Probe durchgeführt. In keinem der untersuchten Eluate konnte das Keton nachgewiesen werden. Ein deutlich erkennbarer Peak im Gaschromatogramm von Eluat Nr. 2 stammt wie schon bei den Homogenatproben der Weibchen von einer Verbindung mit einem Molpeak von 217 g (Abbildung 3.15). Des weiteren konnten im Eluat Nr. 3 einige langkettige Alkohole und Aromaten, sowie Spuren verzweigter Alkane identifiziert werden (Gaschromatogramm unter Abbildung A.18 im Anhang).

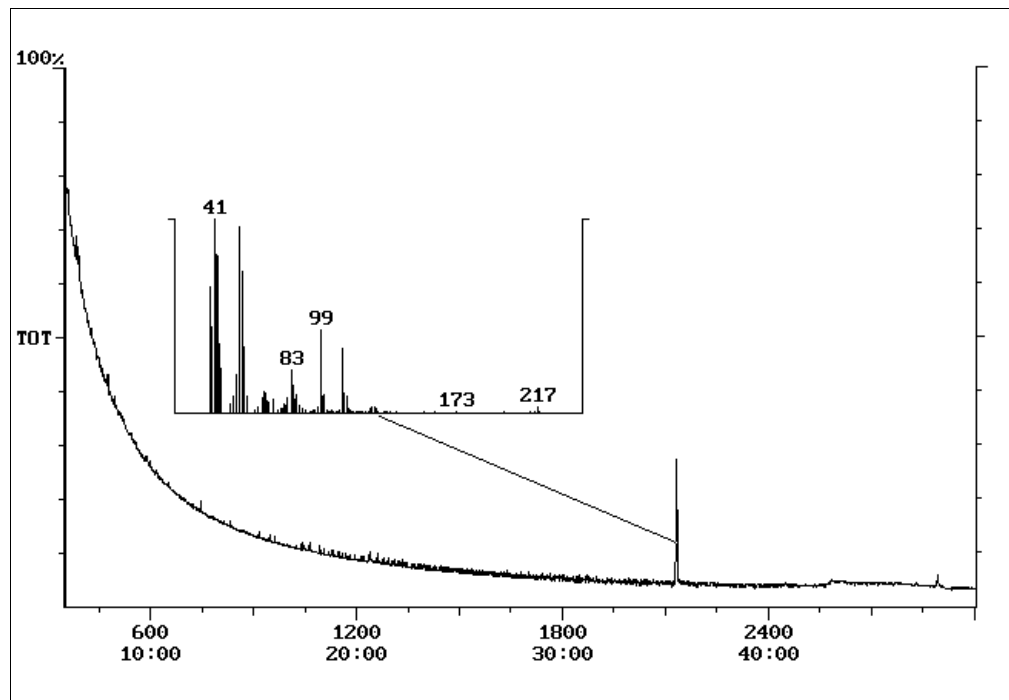


Abb. 3.15: Gaschromatogramm von Eluat Nr. 2 von C8-Phase; GC-System Nr. III; 50°C Starttemperatur, 3° pro min. Aufheizrate.

3.2.5.2 Homogenat von 129 Männchen

Das Homogenat von 129 tiefgefrorenen Männchen, die über einen Zeitraum von ca. 6 Wochen gesammelt wurden, wurde zunächst zentrifugiert, der Rückstand noch zweimal mit 1 mL Milliporewasser nachgespült und in einem weiteren Schritt über 10 kDa, 3 kDa und 0.5 kDa Ausschlußfilter ultrafiltriert. Verhaltensphysiologische Tests erfolgten im Anschluß an den 3 kDa Filtrationsschritt mit dem Filtrat. Dabei konnte in keinem Fall bei schwärmenden Weibchen eine Gametenabgabe erzielt werden, noch zeigten die Weibchen eine Reaktion nach der Probenzugabe. Das Filtrat besaß demnach keine Aktivität.

Das gesamte 0.5 kDa Filtrat wurde erstens über eine C8- und zweitens über eine CN-Extraktionskartusche (je 100 mg) geleitet und anschließend die adsorbierten Komponenten von den Phasen eluiert. Alle aus dem Elutionsschritt resultierenden Proben wurden mit GC-MS untersucht (Abbildung A.19 im Anhang).

Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der über die SPE erhaltenen Komponenten ergaben in keinem Fall Hinweise auf die Anwesenheit von 5-Methyl-3-heptanon in männlichen Polychaeten der Spezies *P. dumerilii*.

3.2.5.3 Homogenat von 25 Weibchen nach der G/H-CLS Methode

Das Homogenat von 25 frischen Weibchen wurde nach der G/H-CLS Methode analysiert. Dazu wurde die flüchtigen Verbindungen aus Milliporewasser über einen Zeitraum von 24 Stunden ausgeblasen und an einem 5 mg Aktivkohlepräzisionsfilter adsorbiert. Das Filter wurde mit je 20 µL Lösungsmittel in vier Schritten eluiert.

Alle analysierten Eluate wiesen kein 5-Methyl-3-heptanon auf. Dagegen konnten im vorderen Bereich des Chromatogramms (unterhalb von 1000 Scans) einige Alkylbenzole und Alkane identifiziert werden. Im Retentionsbereich zwischen 1000 und 3000 Scans ließen sich höhere Alkohole und vereinzelt Alkane identifizieren (Abbildung 3.16).

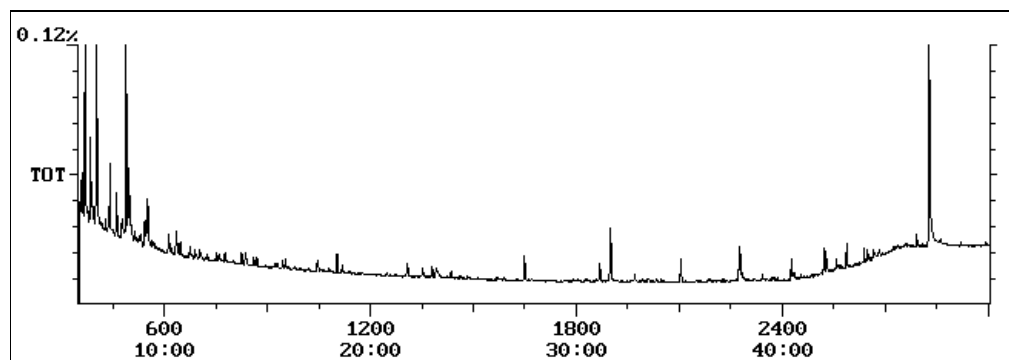


Abb. 3.16: Gaschromatogramm des 2. Eluates der G/H-CLS; GC-System Nr. III; 50°C Starttemperatur, Aufheizrate: 3° pro min.

3.2.5.4 Homogenat von 62 Weibchen nach der G/H-CLS Methode

In leichter Abwandlung zu der Grob/Hersch-Closed-Loop-Stripping Methode wurde statt an einem Präzisions-Aktivkohlefilter an einer Bond Elut C8-Extraktionskartusche (100 mg) adsorbiert. Dazu wurde Milliporewasser zuvor für 24 Stunden über ein C8-Filter ausgeblasen. Das Homogenat von 62 teils tiefgefrorenen, teils frischen Weibchen wurde ohne weitere Zusätze in das

Milliporewasser gegeben und die Anlage für weitere 24 Stunden in Betrieb genommen. Nach Beendigung des Adsorptionsschrittes wurde die C8-Kartusche direkt ohne nachfolgenden Wasserspülschritt eluiert, die Eluate gaschromatographiert und im Biotest bezüglich ihrer Aktivität an schwärmenden Männchen getestet.

Auch dieser Versuch die Präsenz von 5-Methyl-3-heptanon im Coelom von *P. dumerilii*-Weibchen zu verifizieren, blieb erfolglos. In keinem Eluat der modifizierten Grob/Hersch-Closed-Loop-Stripping Methode konnte 5-Methyl-3-heptanon detektiert werden.

Die Biotestergebnisse mit den gewonnenen Eluate waren negativ. In keinem Fall konnte eine Steigerung im Schwärmverhalten oder eine Gametenabgabe bei den Weibchen beobachtet werden.

3.2.5.5 Biotests mit dem synthetischen Keton 5-Methyl-3-heptanon

In zwei Experimenten sollte die Funktion und Wirkung des Ketons überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde mit einer wäßrigen Stammlösung der Konzentration 7.8 nmolar aus rac. 5-Methyl-3-heptanon gearbeitet. Diese Konzentration entspricht der von Hardege (1991) bestimmten artspezifischen Wirkkonzentration von 10^{-10} bis $10^{-11} \text{ g L}^{-1}$ im Seewasser. In dem ersten Versuch wurden zwischen einem und $10 \mu\text{L}$ der Lösung zu einem schwärmenden Männchen, das sich in einer runden Kristallisierschale befand, injiziert. In sechs von zehn Fällen konnte dabei eine Erhöhung der Schwärmgeschwindigkeit registriert werden. Die Induktion des für die Reproduktion charakteristischen Hochzeitstanzes konnte in keinem Fall beobachtet werden. In einem zweiten Experiment sollte der chemotaktische Einfluß untersucht werden. Da die Tiere in runden Schalen stets im Kreis schwammen, wurden dazu die Männchen in eine rechteckige Schale gesetzt und die Probe in eine Ecke der Schale injiziert.

In keinem der fünf untersuchten Fälle, zeigte ein Männchen ein zur Injektionsstelle gerichtetes Schwimmverhalten, noch wurde ein Hochzeitstanz beobachtet. Die Tiere schwammen in großen Kreisen orientierungslos, wie auf der Suche nach dem Sexualpartner, durch die Schale.

3.2.6 Zusammenfassung der Teilergebnisse

Auf der Suche nach der Anwesenheit von volatilen, verhaltensphysiologisch aktiven Verbindungen, respektive flüchtigen Pheromonen wurden mehrere Versuchen unternommen, biologisch aktive Bestandteile mit Hilfe der SPE- und der G/H-CLS Methode an geeigneten Sorbentien aus dem Homogenat und dem Schwärnwasser von geschlechtsreifen Weibchen sowie dem Coelom und dem Homogenat geschlechtsreifer Männchen anzureichern.

Weder aus dem Schwärnwasser noch aus dem Homogenat geschlechtsreifer Weibchen ließen sich verhaltensphysiologisch aktive, flüchtige Bestandteile isolieren. Dabei konnte, wie auch in dem Probenmaterial geschlechtsreifer Männchen, die Frage nach der Präsenz des Ketons 5-Methyl-3-heptanon in keinem Fall verifiziert werden. Ein verhaltensphysiologisch äußerst aktives Eluat konnte dagegen bei der SPE eines Filtrats aus einer frischen Weibchen-Homogenatprobe an C8 gewonnen werden, das zu einer kompletten Spermaabgabe bei den Männchen führte. Gekoppelte GC-MS Analysen ergaben keinen Hinweis auf eine oder mehrere volatile Substanzen. Eine Anwesenheit des natürlichen Weibchenpheromons Harnsäure in dem Eluat konnte durch HPLC-Untersuchungen nicht bestätigt werden. Ebenso war mit der SPE nicht möglich, Harnsäure aus einer wäßrigen Lösung an einer C8 Phase zu adsorbieren.

Die Stabilität, und damit die Aktivität des isolierten Pheromons war stark degressiv: In Biotests zeigte das zuvor bioaktive Eluat nach 24 Stunden keine Spermaabgabe induzierende Wirkung. Die gleichen Stabilitätsverhältnisse wurden bei dem männlichen Pheromon beobachtet: Die Aktivität der Probe ging während der Aufarbeitung eines Homogenats im zweiten 3 kDa Ultrafiltrationsschritt vollständig verloren.

3.2.7 Überlegungen zu den vorangegangenen Ergebnissen

Da keine flüchtigen Verbindungen als Pheromone bei der Synchronisation der Reproduktion von *P. dumerilii* eine Rolle spielen, mußte von der Analytik, basierend auf der Gaschromatographie, Abstand genommen werden. Alle weiteren Trennoperationen sollten auf das Arbeiten mit nichtvolatilen Verbindungen umgestellt werden.

Da das natürliche Pheromon Harnsäure nicht in dem verhaltensphysiologisch aktiven Eluat der SPE über eine C8-Phase identifiziert werden konnte, mußte hypothetisch von einem weiteren Pheromon bei den Weibchen ausgegangen werden, das im Unterschied zur Harnsäure im Biotest eine vollständige Spermaabgabe induziert. Dies aber warf die Frage nach der Quelle, bzw. dem Ursprung und der Funktion innerhalb des Reproduktionszyklusses der beiden Pheromone auf. Weiterführende Versuche sollten klären, ob

1. sich die beiden Pheromone voneinander separieren ließen, das zur Folge hätte, daß als Ausgangsprobe nicht mehr auf Ganztierhomogenate zurück gegriffen werden müßte,
2. eines der Pheromone im Schwärmwasser von Weibchen wiederzufinden war und
3. sich mit Hilfe der HPLC eine pheromonale Substanz isolieren ließ, die keine Harnsäure enthielt, aber trotzdem bei den männlichen *P. dumerilii* zu einer Spermaabgabe führte?

3.3 Verhaltensphysiologisch aktive Komponente aus weiblichem Coelom

Umfassende Untersuchungen sollten die Existenz eines weiteren Pheromons der *P. dumerilii*-Weibchen belegen und deren Ursprung klären. Zusätzlich mußte die Funktion des Pheromons Harnsäure im Reproduktionsprozeß der Tiere genauer analysiert und das Schwärmwasser geschlechtsreifer Weibchen auf Inhaltsstoffe bzw. einem oder mehrere Erkennungspheromone untersucht werden. Diese Untersuchung wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl. Chem. Ingo Röhl, AG Zeeck durchgeführt.

3.3.1 Aktive Komponenten im Coelom

3.3.1.1 Analyse des Coeloms

In einem ersten Experiment wurde das Coelom eines geschlechtsreifen, noch nicht schwärmenden Weibchens auf unkonventionelle Art gewonnen: Das Weibchen wurde zum Entfernen von am Körper haftenden Seewasser auf einem Filterpapier gewendet, auf eine zuvor gesäuberte Glasplatte gelegt und mit einem Objektträgerglas durch vorsichtiges Drücken von Kopfende her das Coelom aus dem Pygidium herausgepreßt, nach Möglichkeit ohne das Tier an anderen Körperstellen zu verletzen. Das resultierende Coelom wurde in gut 500 µL Milliporewasser aufgenommen und mit einer Pipette in eine Microcon-3 Zentrifugen-Ultrafiltereinheit überführt. 25 µL des Filtrats wurden durch HPLC über eine Amidphase getrennt. Der Rest der Lösung wurde auf ein Sechstel volumenreduziert und ebenfalls über die C16-Amidphase chromatographiert. Abbildung 3.17 zeigt das HPLC-Chromatogramm einer Coelomprobe auf einer RP18_{ec}-Phase.

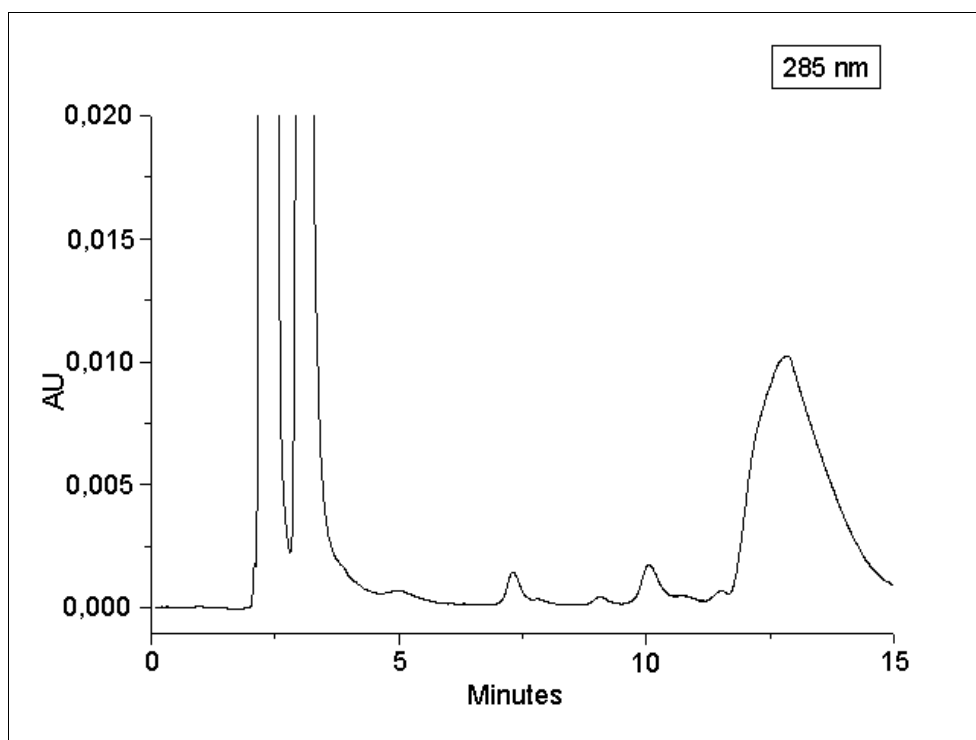


Abb. 3.17: Chromatogramm einer Coelomprobe auf einer RP18_{ec}-Phase; Detektionswellenlänge: $\lambda = 285 \text{ nm}$.

Um die Möglichkeit einer Überlagerung der Harnsäure durch eine coeluierende Verbindung zu minimieren, wurden weitere, auf diese Weise erhaltene Proben auf einer analytischen RP18_{ec}-Phase mit Wasser isokratisch und wahlweise mit 0.1%iger Trifluoressigsäure angesäuertem Eluenten chromatographiert.

In allen Fällen konnte keine Harnsäure im 3 kDa Coelomfiltrat detektiert werden. 25 μL des 1:10 verdünnten Konzentrats wurden in einem dritten HPLC-Lauf über eine analytische RP18_{ec}-Phase chromatographiert, um eine eventuelle Überlagerung der Harnsäure durch eine coeluierende, zweite Komponente zu minimieren. Auch auf dem neuen Trennsystem konnte Harnsäure nicht detektiert werden.

Die Abbildung 3.18 zeigt das Chromatogramm desselben mit 10 ng Harnsäure dotierten Filtrats unter denselben Chromatographiebedingungen.

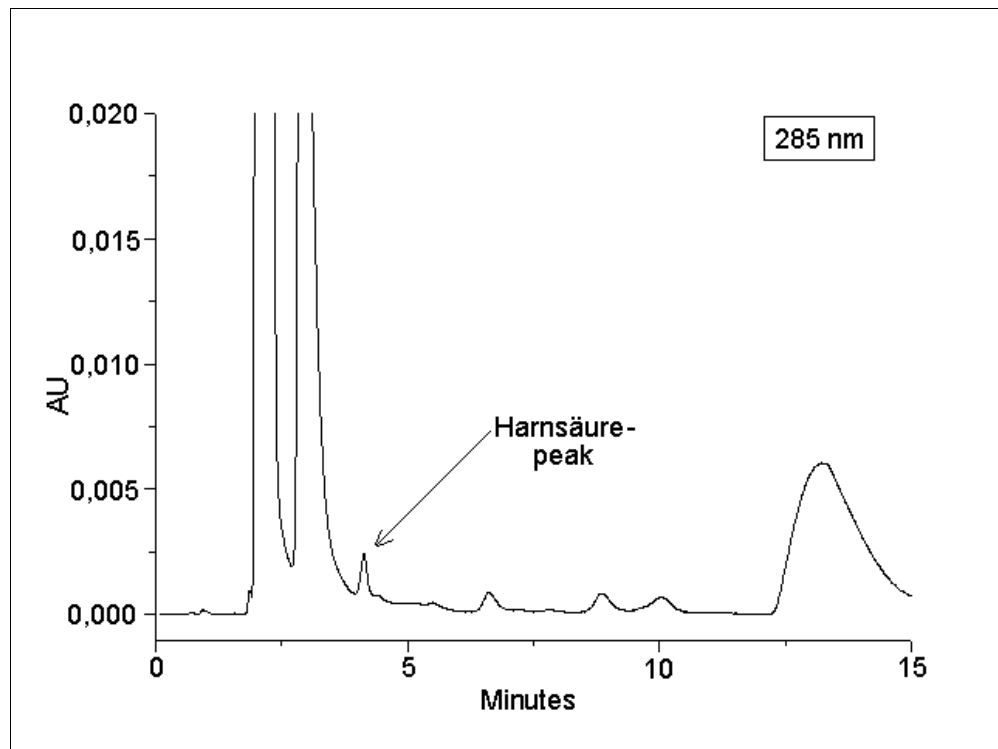


Abb. 3.18: Chromatogramm eines mit Harnsäure dotierten Coelomfiltrats auf einer RP18_{ec}-Phase; Detektionswellenlänge: $\lambda = 285$ nm.

3.3.1.2 Biotests mit Harnsäure freiem Coelom

In den Biotests mit dem frischen Coelom sowie mit den 3 kDa Filtraten konnte bei keinem *P. dumerilii*-Männchen weder eine spontane, noch zeitlich verzögerte Spermaabgabe induziert werden. Es wurden dabei Volumina zwischen 10 und 250 μ L getestet.

Diese Ergebnisse belegten eindeutig, daß das Coelom von Weibchen in keinem Fall die Quelle der Harnsäure, oder eines anderen, die Spermaabgabe auslösenden Pheromons repräsentiert.

3.3.2 Aktive Komponenten außerhalb des Coeloms

Da in dem vorangegangenen Experiment keine Harnsäure im Coelom der Weibchen nachgewiesen werden konnte, sollte die Harnsäure in der vom Coelom befreiten Körperhülle nachzuweisen sein.

Dazu wurden leere Körperhüllen in ein Eppendorfcap überführt, mit 500 μL Milliporewasser versetzt und 30 min. im Ultraschallbad extrahiert.

Zwei HPLC-Läufe (je 25 μL Extrakt über eine Amid-C16 und eine RP18_{ec} -Phase) ließen eindeutig die Präsenz von Harnsäure bei einer Retentionszeit von 5.1 Minuten in dem Extrakt erkennen (Abbildung 3. 19).

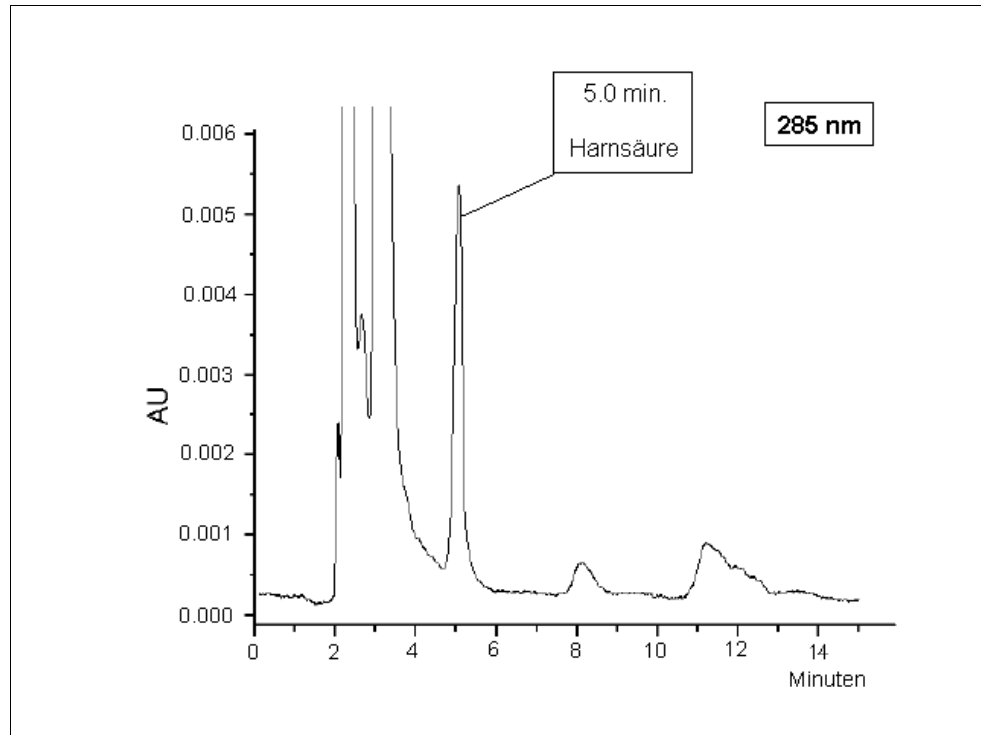


Abb. 3.19: Chromatogramm eines Körperhüllenextraktes; auf einer RP18_{ec} -Phase; Detektionswellenlänge: $\lambda = 285 \text{ nm}$.

Dieses Experiment wurde zu Zwecken der Quantifizierung von Harnsäure im Extrakt der Körperhüllen von fünf Weibchen wiederholt. Die Probe wurde auf dieselbe Weise wie zuvor gewonnen. Die leeren Körperhüllen wurden in ein 1.5 mL Schraubdeckelgläschen, das mit 1000 μL reinem Milliporewasser gefüllt war, überführt. Zusätzlich wurde bei der Extraktion über 30 min in einem Ultraschallbad, die Probe in zerstoßenem Eis bei 0°C gekühlt.

Die Quantifizierung des Extraktes aus der Körperhülle der fünf geschlechtsreifen Weibchen ergab mit einem externen Standard eine Harnsäuremenge von 23 μg oder eine durchschnittliche Menge von 4.6 μg pro Tier.

3.3.3 Harnsäure im Schwärmwasser von *Platynereis dumerilii*-Weibchen

In einem Experiment zur Identifizierung eines, durch Weibchen während des Schwärmens abgegeben Pheromons, konnte Röhl Harnsäure nachweisen. Dazu wurde ein geschlechtsreifes Weibchen, das unmittelbar zuvor seine Wohnröhre verlassen hatte, in ein mit 250 µL gereinigtem (über C18-Adsorbens) Seewasser gefülltes Uhrglas gesetzt. Nach 15 min. wurden 25 µL des „Schwärmwassers“ über das HPLC-System mit einer RP18_{ec}-Phase chromatographiert. In der isokratischen Elutionsphase konnte dabei eine Substanz detektiert werden. Im weiteren Verlauf der Chromatographie konnten keine zusätzlichen Substanzen aus dem Schwärmwasser detektiert werden. Durch Vergleich der Retentionszeit und der charakteristischen Maxima des UV-Spektrums ($\lambda_{\text{max}1} = 234 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{max}2} = 288 \text{ nm}$) konnte die isolierten Substanz als Harnsäure identifiziert werden. In einem erneuten Versuch über das HPLC-System mit einer Amid C16-Phase konnte bei geänderter Retentionszeit die Anwesenheit sowie das UV-Spektrum reproduziert werden. Eine Quantifizierung der Schwärmwasserprobe ergab einen Harnsäuregehalt von ca. 250 ng in 250 µL. Im Biotest mit der zunächst fraktionierten Substanz und anschließend volumenreduzierten Probe konnte bei den Männchen die Abgabe einer Portion Sperma induziert werden. In 87.5% aller Tests [n = 8] konnte eine Spermaabgabe mit 2 µL (2 ng) des Schwärmwassers erzielt werden. Mit 3 µL Schwärmwasser wurden bei 100% [n = 8] der getesteten Männchen eine Gametenabgabe induziert.

3.3.4 Zusammenfassung der Teilergebnisse

In 3 kDa Filtraten aus dem Coelom von geschlechtsreifen *P. dumerilii*-Weibchen konnte durch RP-HPLC keine Harnsäure nachgewiesen werden. Dennoch lösten bei verhaltensbiologischen Tests 2 µL einer wäßrigen Lösung aus frischem Coelom bei Männchen eine Gametenabgabe aus. Die Bioaktivität der Proben war stark degressiv. So mußte eine Abnahme der Aktivität um den Faktor 30 innerhalb von 2 Stunden registriert werden. Versuche, ein Spermaabgabe induzierendes Eluat durch Fraktionierung zu erhalten, blieben erfolglos. In dem Extrakt der coelomfreien Weibchen konnte dagegen Harnsäure identifiziert werden. Die Quantifizierung eines Extraktes

aus 5 Weibchen ergab einen durchschnittlichen Harnsäuregehalt von 4.6 µg pro Tier.

In einem Versuch zur Identifizierung aktiver Komponenten im Wasser schwärmender Weibchen konnte eine Substanz detektiert und isoliert werden. Dabei handelte es sich um Harnsäure. Bei verhaltensbiologischen Tests konnte dabei nach Injektion von 2 µL des Schwärmwassers, das einer Menge von 2 ng Harnsäure entsprach, bei den Männchen eine Spermaabgabe ausgelöst werden.

Abbildung 3.20 zeigt einen schematischen Überblick der Ergebnisse aus den Kapiteln 3.2 und 3.3 über die Probengewinnung von der Probenquelle bis zur Probencharakterisierung.

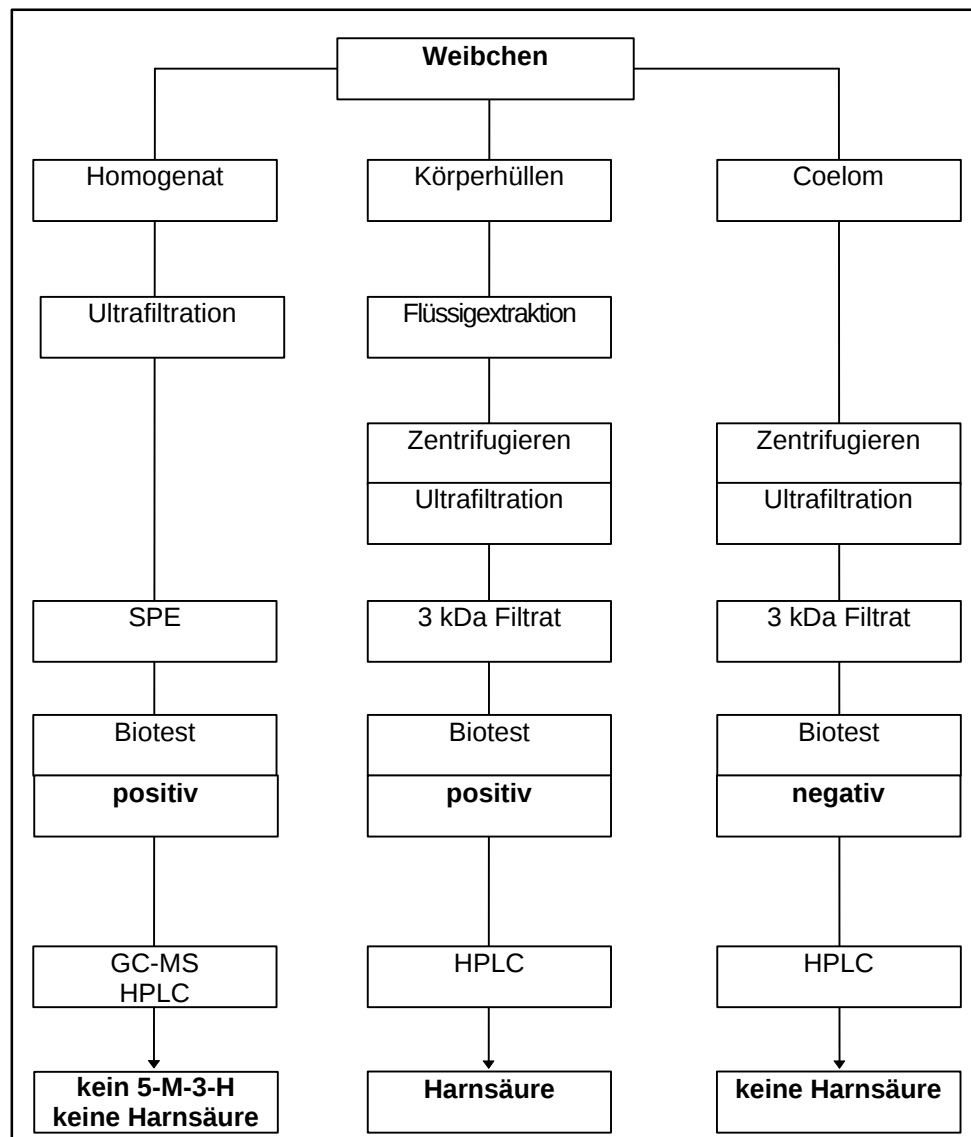


Abb. 3.20: Schematischer Probengewinnungsgang

3.4 Elektrophysiologische Tests

In einfachen, elektrophysiologischen Experimenten sollte in zwei Versuchsreihen der Wirkmechanismus von aromatenhaltigen Eluaten, 5-Methyl-3-heptanon (5M3H) und dem natürlichen Pheromon Harnsäure untersucht werden. In der ersten Versuchsreihe wurde dabei am Prostomium (Kopfbereich) von geschlechtsreifen *P. dumerilii* die Reizausbildung, vergleichbar einem Elektroenzephalogramm, abgeleitet. In der zweiten Versuchsreihe erfolgten die elektrophysiologischen Ableitungen an frisch aus dem Schlundkopf präparierten Oberschlundganglien (Abbildung 3.21), die einen Teil des Zentralnervensystem dieser Tiere darstellen.

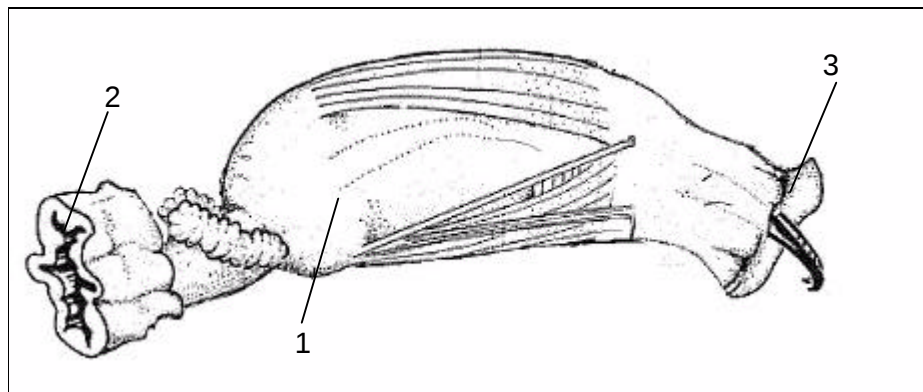


Abb. 3.21: Schlundkopf einer atoken *Platynereis*; 1 = Schlundkopf, 2 = Mitteldarm, 3 = Mundöffnung,

3.4.1 Elektrophysiologische Ableitungen am Prostomium

Die Reizung der Tiere wurde mit dem aromatenhaltigen Eluat Nr. 17 (Kap. 3.5.1), das bei einem Großteil der Männchen in den verhaltensbiologischen Tests eine Spermaabgabe auslöste, sowie Harnsäurelösung und einer 6.25 mM Lösung aus rac. 5-Methyl-3-heptanonlösung durchgeführt. Wie die Abbildungen 3.22 - 3.24 zeigen, traten bei den Tests mit Eluat Nr. 17 und der Ketonlösung jeweils zeitliche Verzögerungen zwischen Probenzugabe und der Reizantwort auf. Dabei wurde in Abhängigkeit des Probenvolumens (1 und 10 μ L) eine Verzögerung zwischen 2 und 4 min beobachtet. Bei der Harnsäure dagegen konnte unmittelbar im Anschluß an die Probenapplikation ein Reiz detektiert werden.

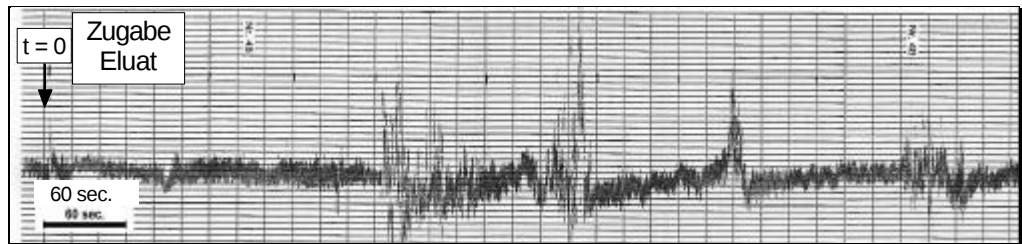


Abb. 3.22: Ableitung nach Zugabe von Eluat Nr. 17

Wie in Abbildung 3.23 zu erkennen ist, wurde auch bei der Reizgebung mit der Ketonlösung eine zeitliche Verzögerung bis zur Änderung des Ruhepotentials gemessen. In diesem Fall betrug die Verzögerung 2 Minuten.

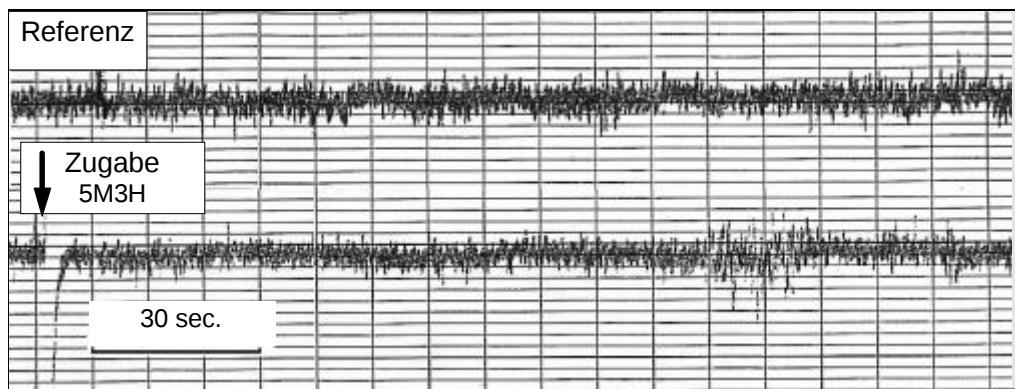


Abb. 3.23: Ableitung nach Zugabe von 5M3H

Im Gegensatz zu den beiden vorangegangenen Ableitungen trat nach der Zugabe von Harnsäurelösung keine Verzögerung in der Antwort auf (Abbildung 3.24). Die Reiztransduktion des natürlichen Pheromons zwischen Pheromonrezeptor und ZNS erfolgte spontan und direkt.

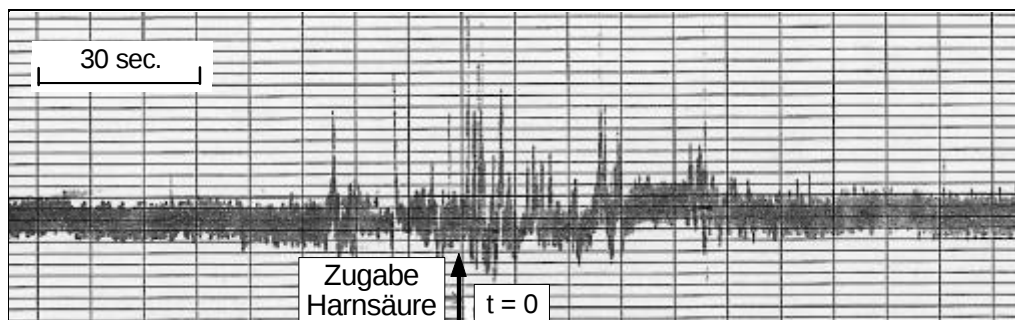


Abb. 3.24: Ableitung nach Zugabe von Harnsäure

3.4.2 Elektrophysiologische Ableitungen am Oberschlundganglion

Das abzuleitende Schlundganglion wurde für diese Versuche frisch aus dem Prostomium geschlechtsreifer *P. dumerilii*-Männchen präpariert, in eine Präparateschale auf Filterpapier gelegt und mit wenig Wasser komplett bedeckt. Zur Reizung der Präparate dienten ebenfalls die unter 3.4 verwendeten Proben.

Wie aus den Abbildungen 3.25 und 3. 26 deutlich ersichtlich ist, konnten bei den Proben von Eluat Nr. 17 und 5M3H keine zeitliche Verzögerung zwischen der Zugabe und der Potentialänderung beobachtet werden.

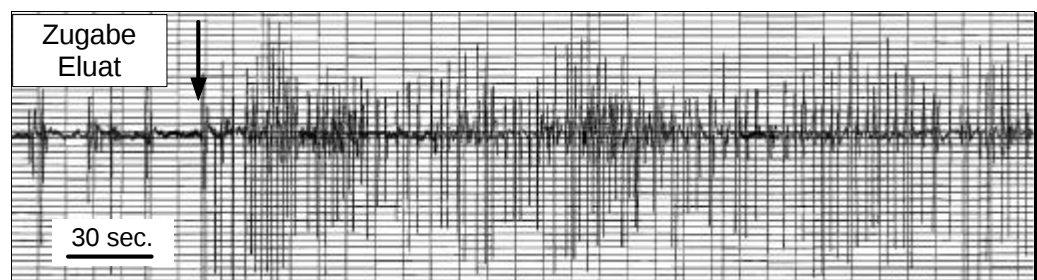


Abb. 3.25: Ableitung am Oberschlundganglion nach Zugabe von Eluat Nr. 17

Die Ableitung nach Zugabe von Harnsäurelösung ließ im Gegensatz zu den vorangegangenen Ableitungen keine Potentialänderung erkennen (Abbildung 3.27).

Diese Ergebnisse belegten, daß sowohl Aromaten als auch das Keton 5-Methyl-3-heptanon eine direkte, physiologische Wirkung auf das ZNS der Tiere besaßen. Harnsäure dagegen vermochte selbst keine Reizung des ZNS's auszuüben, jedoch führten die Ableitungen am Individuum zu einer spontanen Reizausbildung.

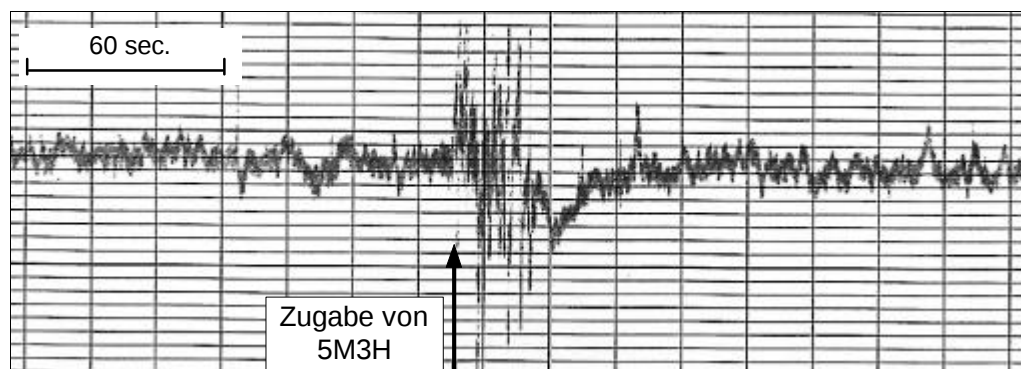


Abb. 3.26: Ableitung am Oberschlundganglion nach Zugabe von 5M3H

Dies legte die Vermutung nahe, daß das Eluat und die Ketonprobe nicht an einem spezifischen Rezeptor auf der Körperoberfläche, wie bei einem Pheromon am Pheromonrezeptor, sondern in das ZNS gelangen und dort einen Reiz hervorrufen.

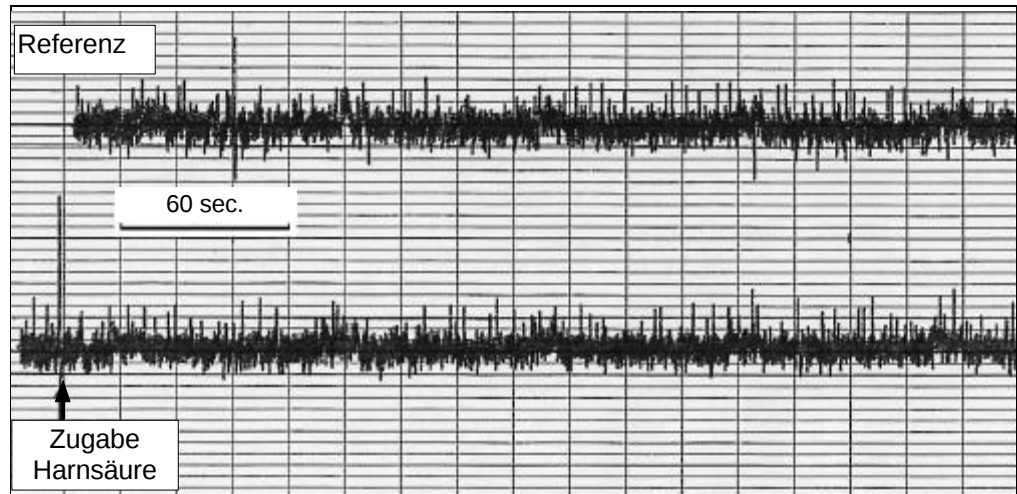


Abb. 3.27: Ableitung am Oberschlundganglion nach Zugabe von Harnsäure

Als weitere Erkenntnis aus den elektrophysiologischen Untersuchungen mit Aromatenuaten folgte, daß unabhängig vom Geschlecht und im Gegensatz zu den Experimenten mit Harnsäure und 5M3H, eine Erregung über einen längeren Zeitraum zu beobachten war. So konnte innerhalb der ersten Minuten nach der starken Potentialänderung nur eine schwache Abnahme der Reizung registriert werden. Mit zunehmender Versuchsdauer trat sowohl eine Abnahme der in zeitlichen Blöcken aufgezeichneten Reizintensitäten (Amplitude der Spikes), als auch eine Zunahme der Abstände zwischen den „Reizblöcken“ ein (Abbildung 3.28).

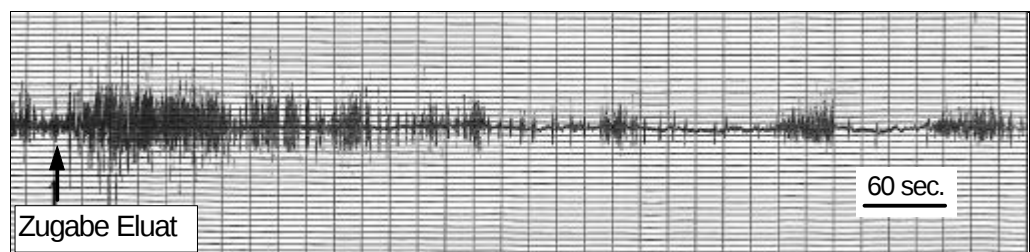


Abb. 3.28: Ableitung am Oberschlundganglion auf Zugabe von Eluat Nr. 17

4. Diskussion

4.1 Verhaltensphysiologisch aktive Komponenten in Rohöl

Die Untersuchungen über die Wirkung von Rohölkomponenten zeigten eindeutig den verhaltensmodifizierenden Einfluß von Substanzen aus der wasserlöslichen Rohölfraction auf geschlechtsreife männliche Nereiden. Ein Hinweis auf aromatische Verbindungen als die die Spermaabgabe auslösenden Substanzen ergaben sich aus der Analyse aktiver säulenchromatographischer Eluate vorangegangener eigener Arbeiten, sowie aus den Arbeiten von Beckmann (1996).

Daß es sich bei diesen verhaltensphysiologisch aktiven Verbindungen u.a. um C₅-alkylierte Verbindungen ($FG = 148.25 \text{ g mol}^{-1}$) handelte, konnte in dieser Arbeit anhand von drei Methoden nachgewiesen werden:

- I. Die säulenchromatographische Trennung von Rohöldestillaten auf einer aktivierten Kieselgel 60-Phase mit *n*-Hexan lieferte Alkan- und Aromatenfraktionen sowie Fraktionen aus heteroatomhaltige Komponenten. Dabei erwiesen sich in den verhaltensbiologischen Tests mit männlichen Nereiden ausschließlich Aromatenfraktionen als aktiv.
- II. Die gaschromatographische Trennung mit anschließender Kondensation von Substanzen aus aktiven, aromatenhaltigen *n*-Hexaneluaten in Aceton (Peak-Trapping) führte zu einzelnen, die Gametenabgabe auslösenden Fraktionen. In den massenspektrometrischen Analysen konnten eindeutig Pentylbenzolisomere im gaschromatographischen Retentionsbereich um und nach *n*-Pentylbenzol identifiziert werden.
- III. Die Synthese einzelner C₅-alkylierter Benzole lieferte zwei Verbindungen (4-Butyl-methylbenzol und Ethyl-2-isopropylbenzol), die durch Peak-Trapping in Aceton kondensiert wurden und die in Biotests bei schwärmenden Männchen eine Spermaabgabe induzierten.

Sowohl Destillatfraktionen und aromatenhaltige Eluate als auch einzeln separierte C₅-alkylierte Benzole in geringen Konzentrationen induzierten bei schwärmenden *Platynereis dumerilii*-Männchen das charakteristische Fortpflanzungsverhalten, sowie eine Spermaabgabe ohne Anwesenheit des

Geschlechtspartners oder des natürlichen Pheromons. Aufgrund der Beobachtungen aus verhaltensphysiologischen Tests ist die Präsenz von die Gametenabgabe auslösenden Verbindungen im gesamten Siedebereich zwischen *n*-Decan und *n*-Heptadecan nicht auszuschließen. Auch dieser Effekt ist ausschließlich auf die im Rohöl enthaltenen Aromaten zurückzuführen, wie durch die Eluate der säulenchromatographischen Trennung gezeigt werden konnte. Nur mit aromatenhaltigen Proben gelang eine Stimulation der Tiere. Selbst eine schlechtere Wasserlöslichkeit von Alkanen wurde in vorangegangenen Biotests Rechnung getragen (Priesnitz 1994): Vor dem Plazieren eines Männchens in die Schale wurden die Proben mit einer Pinzette verteilt. Dies hatte eine deutliche Verkürzung der Reizantwort auf die Probe zur Folge. Eine zeitliche Verzögerung zwischen der Probenapplikation und einer Reizantwort der Tiere bei *n*-Hexaneluaten und Destillatfraktionen durfte nicht verwunderlich sein, da verhaltensphysiologisch aktive Komponenten aus dem Probentröpfchen herausdiffundieren mußten. Bei den Biotests mit den in Aceton kondensierten Komponenten dagegen wurde eine kürzere Reizantwort erwartet, da Aceton selbst gut wasserlöslich ist, die Komponenten folgerichtig schneller in die Wassersäule gelangten. Diese Vermutung konnte durch die Beobachtungen bei den Tests, im Vergleich zwischen den aromatenhaltigen Eluaten und den daraus hervorgegangenen Trap-Proben, bestätigt werden.

In Abhängigkeit des Substitutionsmusters (Konstitution) der einzelnen Komponenten konnte eine Varianz in der verhaltensphysiologischen Aktivität verzeichnet werden. Wie am Beispiel der drei *n*-Butyl-methylbenzole gezeigt werden konnte, war eine steigende Aktivität vom *ortho*- über das *meta*- zum *para*- substituierten Isomer ersichtlich. Dagegen schien sich die Aktivität bei den beiden aus der Synthese isolierten Ethyl-4-isopropylbenzol und Ethyl-2-isopropylbenzol umzukehren. So konnte mit dem in *para* substituierten Isomer keine Gametenabgabe ausgelöst werden, jedoch zeigte das in 1.2-Stellung substituierte Isomer in einzelnen Fällen eine die Spermaabgabe induzierende Wirkung. Beckmann (1996) konnte bei *Nereis succinea*-Männchen einen die Gametenabgabe induzierenden Einfluß von C₄-alkylierten Benzolen nachweisen. Dabei zeigte das Methyl-2-propylbenzol aus der Gruppe der getesteten Isomere die höchste Bioaktivität und führte bei einer Konzentration von 5.4 nmol·L⁻¹ zur Spermaabgabe. Die in dieser Arbeit bestimmte Konzentration für das Auslösen der Gametenabgabe bei *P. dumerilii* von 3.8 nmol·L⁻¹ durch das *n*-Butyl-4-methylbenzol lag somit gleichfalls in dem von Beckmann ermittelten Konzentrationsbereich.

Auch schien eine näherungsweise Planarität von Vorteil. Bei allen Verbindungen, die als die Gametenabgabe auslösend identifiziert wurden, ließen sich ein Großteil der Gerüstkohlenstoffatome in eine Ebene überführen (*n*-Butyl-4-methylbenzol, Ethyl-2-isopropylbenzol und 1.4 Diethyl-2-methylbenzol), dagegen führten (1.1-Dimethylpropyl)-benzol und ein Eluat der Säulenchromatographie mit *t*-Butyl-4-methylbenzol zu keiner Induktion der Gametenabgabe.

Die strukturellen Voraussetzungen für eine die Spermaabgabe induzierende Wirkung scheinen dann erfüllt, wenn

- I. ein konjugiertes π -System, wie im Benzol oder Naphthalin, vorliegt,
- II. am Benzolring zwei Alkylgruppen substituiert sind, oder eine substituierte Alkylgruppe an Naphthalin vorliegt,
- III. eine Methylgruppe als Zweitsubstituent in *para*-Stellung steht, oder eine Ethylgruppe in *ortho*-Stellung,
- IV. eine annähernde Planarität des gesamten Moleküls vorliegt.

Dennoch wiesen alle die als die Spermaabgabe induzierend identifizierten Verbindungen, mit Ausnahme des bizyklischen Aromaten Ethylnaphthalin, keine Ähnlichkeit mit dem natürlichen Pheromon Harnsäure oder den als ebenfalls die Spermaabgabe auslösenden Verbindungen 3-Methyl-harnsäure und Xanthin (Harder, 1996) auf (vergleiche Abbildung 4.1).

Daß nicht alle verhaltensbiologisch aktiven Benzolderivate erkannt wurden, ist in keinem Fall auszuschließen. Anhand der Biotestergebnisse wird offensichtlich, daß Aromaten in einem konkreten Konzentrationsintervall ihre Aktivität entfalten. So wurden bei den Tests mit Trap-Proben (Tab. 3.11, Tab. 3.15) eine Spermaabgabe in einem schmalen Konzentrationsfenster registriert: Bei Ethyl-2-isopropylbenzol lag der Konzentrationsbereich zwischen ca. 24 und $7.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Zudem zeigte sich, daß die Verringerung einer dazudosierten aktiven Probe in einigen Fällen mit einer Verkürzung der Reizantwort einher ging.

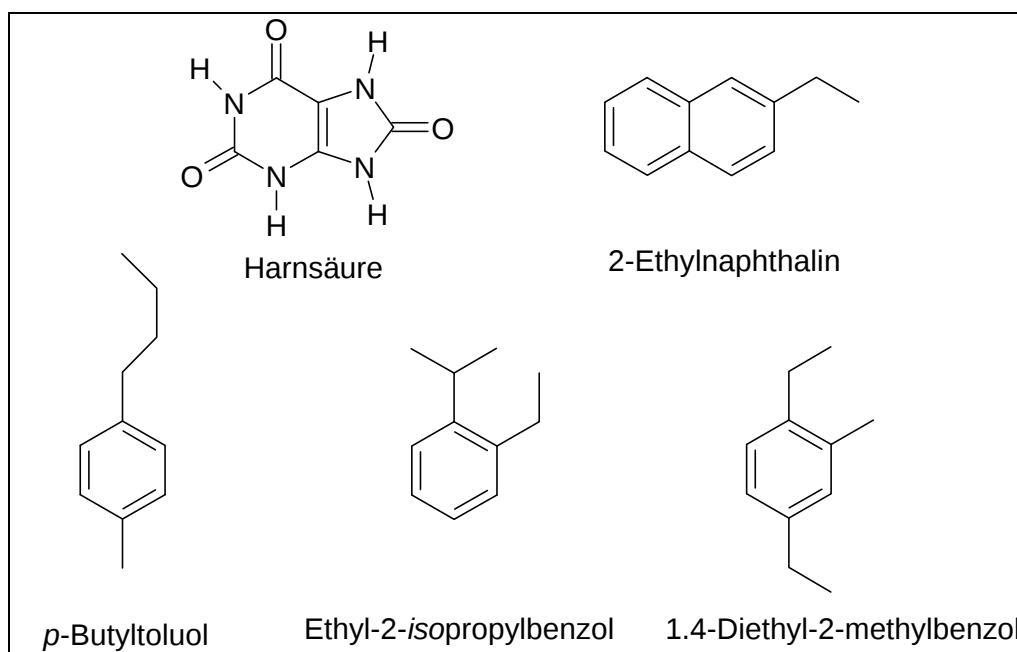


Abb. 4.1: Strukturvergleich der Spermaabgabe auslösenden Verbindungen

Interessant in diesem Zusammenhang sind aber auch die Ergebnisse der verhaltensphysiologischen Tests mit Eluaten höherer Destillatfraktionen. Auch hier konnten neben den Rohödestillaten die aromatenhaltigen Fraktionen der Säulenchromatographie eine Gametenabgabe bei schwärmenden Männchen induzieren. Wie gezeigt werden konnte (Tab. 3.21), vermochten insbesondere Aromateneluat aus dem frühen Retentionsbereich der Säulenchromatographie die Spermaabgabe auszulösen. Eine genauere Charakterisierung dieser Eluate, und damit die Identifikation weiterer aktiver Komponenten, wurde aus Gründen des Arbeitsaufwandes nicht weiter verfolgt. Zusätzlich ist mit einer zunehmenden Anzahl der Kohlenstoffatome in den Molekülen die Zunahme an Isomeren eines Alkylbenzols korreliert, so daß eine genaue Identifizierung erschwert wird.

Anzahl Kohlenstoffatome	1	2	3	4	5	6
Anzahl der Isomere	1	3	8	22	51	135

Tab. 4.1: Zunahme der Isomere mit steigender Kohlenstoffanzahl

Im Gegensatz zu der aktivierenden Wirkung der einkernigen Aromaten stand der narkotisierende Effekt, der von den Eluaten mit höchster Retentionszeit ausging. Hier konnten überwiegend mehrkernige Verbindungen, wie Indene, Alkyl-naphthaline und Azulene, identifiziert werden.

Bei den Tests mit diesen Eluaten konnte keine Gametenabgabe oder verstärktes Schwärmen festgestellt werden, sondern die Tiere zeigten zuerst Abwehrverhalten, legten sich dann auf den Boden und waren selbst durch Anstoßen mit einer Pinzette zu keiner Regung zu bewegen. Auch nach dem Umsetzen der narkotisierten Tiere in frisches Seewasser erwies sich dieser Effekt als irreversibel.

Diese Beobachtungen spiegeln die Ergebnisse von J.M. Neff und J.W. Anderson (1981) wieder, die die Wirkung von Rohöl und einzelnen Rohölkomponenten auf marine Organismen untersuchten. Dabei wurden LC₅₀-Tests (letale Konzentration, bei der 50 % der Tiere verendeten) mit polyzyklischen Kohlenwasserstoffen an marinen Polychaeten *Neanthes arenaceodentata* durchgeführt. Die durchschnittliche Konzentration, bei der 50 % der Tiere nach 96 Stunden verendet waren, lag für Naphthalin bei 3.8 ppm und für Dimethylnaphthaline bei 2.6 ppm.

Eine weitere Studie über Letalkonzentrationen von wasserlöslichen Rohölkomponenten aus dem "South Louisiana Crude Oil" auf die *Platynereis dumerilii* sowie die beiden benthischen Arten *Neanthes arenaceodentata* und *Capitella capitata* belegte, daß *Platynereis dumerilii* im Vergleich zu den beiden anderen Polychaeten empfindlicher auf Rohölkomponenten reagierte: Nach 48 Stunden waren 50 % der Tiere bereits bei einer Konzentration von 12.3 ppm verendet, *Neanthes arenaceodentata* bei 13.9 ppm und *Capitella capitata* erst bei 16.2 ppm.

Der Letaleffekt konnte in etwa bestätigt werden (Kap. 3.1.11), jedoch schienen die Konzentrationen der untersuchten Verbindungen in den verhaltensphysiologischen Experimenten etwa zwei Zehnerpotenzen tiefer zu liegen. In gut 50 % (26 von 51) der Experimente mit Naphthalinderivaten, bei einer Konzentration von ca. 0.05 und 0.1 ppm, fanden die Tiere ein unnatürliches Ende, indem sie abrupt den Schwärmvorgang beendeten und narkotisiert zu Boden sanken oder nach 12 bis 15 Stunden leblos am Boden lagen und eine kleine Menge Sperma aus dem Hinterleib gedrückt hatten. Jedoch zeigte keines der Tiere im Biotests mit den synthetischen Proben die auffallende Wirkung wie das Eluat Nr. 8 des Destillats Nr. 17, das in allen Fällen sofort bei den Tieren eine irreversible Paralyse auslöste. Dies war vermutlich auf eine wesentlich höhere Konzentration an letalisierenden Verbindungen in dem Eluat oder aber auf weitere, im Erdöl befindliche, Komponenten mit einem weitaus stärker narkotisierenden oder letalisierenden Effekt als die Alkyl-naphthaline zurückzuführen. Jedoch erstaunte der die Spermaabgabe

auslösende Effekt von 10 µl einer wäßrigen 2-Ethyl-naphthalinlösung. Dieser Effekt wurde nur bei den Experimenten mit diesem Volumen, bzw. dieser Konzentration beobachtet. Bei Verdopplung des Injektionsvolumens wurde diese Verhaltensänderung in keinem Fall beobachtet.

Nicht ohne Bedeutung erwies sich auch die Beobachtung während der Biotests mit aromatenhaltigen Proben, daß schwärmende Männchen im Anschluß an einen Test keine Reaktion auf das natürliche Pheromon Harnsäure zeigten, oder die zu den Männchen in die Testschale gesetzten Weibchen ignoriert wurden. Diese Interferenzen zwischen Rohölkomponenten und chemischen Signalstoffen, die der Kommunikation dienen, erschweren das Auffinden der Sexualpartner oder machen es unmöglich. Dieses wurde bereits ausführlich bei Hummern (*Homarus americanus*) studiert (Atema et al., 1982). Ebenso waren Hummer bei einer Konzentration von 0.3 ppm Rohöl im Seewasser nicht in der Lage, ihr Futter aufzuspüren. Andererseits nutzen wiederum Hummerfischer mit Kerosin getränkte Backsteine dazu, die Tiere in Reusen zu locken (Atema, 1977).

Zu der Frage nach einem Wirkmechanismus von Aromaten auf *P. dumerilii* konnten Teilantworten gefunden werden:

- I. Aus den einfachen, elektrophysiologischen Messungen von Summenpotentialen aus extrazellulären Ableitungen werden die anfangs erläuterten Einschränkungen (Kap. 1.7) des Biotests deutlich: Das Auftreten von Potentialänderungen, sogenanntes „Spikes“, muß nicht auf die Präsenz von Pheromonen zurückzuführen sein, wie in Kapitel 3.4 eindrucksvoll gezeigt wurde. Auf jede Art eines Reizes, sei es durch Pheromone, Kohlenwasserstoffe oder mechanische Reize, resultiert eine Reaktion, die in einem elektrophysiologischen Diagramm als Spike oder Potentialänderung sichtbar wird. Diese Signale können durch Muskelkontraktionen hervorgerufen werden, oder von mechanischen, chemischen oder physikalischen Rezeptoren stammen. Nur die Ableitung an dem für die Pheromonerkennung zuständigen Rezeptor, in der Regel durch intrazelluläre Einzelzelleableitungen, verschafft Einblick über die Anwesenheit von Pheromonen. Rückschlüsse auf die Präsenz von Pheromonen durch extrazelluläre Ableitungen sind daher nicht aussagekräftig.

- II. Die elektrophysiologischen Experimente konnten belegen, daß ein Reiz der Tiere nach der Zugabe von aromatenhaltigen Proben oder dem Keton 5-Methyl-3-heptanon mit einer zeitlichen Verzögerung detektiert wurde.
- III. Elektrophysiologische Messungen direkt am isolierten ZNS ergaben sowohl bei den aromatenhaltigen Proben wie auch bei dem Keton keine Verzögerung bis zur Änderung des Ruhepotentials. Harnsäure dagegen hatte keine Signaländerung zur Folge.

Diese Interpretation der Ergebnisse ließ folgende Schlußfolgerungen zu:

Harnsäure zeigte keine Signaländerung am isolierten ZNS, weil keine Rezeptoren zur Harnsäureerkennung vorhanden waren. Dagegen zeigten 5-Methyl-3-heptanon und Aromateneluat eine spontane Änderung des Ruhepotentials, weil diese Verbindungen durch ihre lipophilen und hydrophoben Eigenschaften direkt im ZNS wirken konnten.

Dieser Wirkmechanismus könnte für ein unentwegtes Schwärmen der Tiere über einen Zeitraum von 12 bis 15 Stunden und das Ignorieren des natürlichen Pheromons verantwortlich gewesen sein.

Da eine strukturelle Verwandtschaft zwischen alkylierten Benzolen und Catecholaminen (s. Abbildung 4.2), die als Neurotransmitter im Zentralnervensystem wirken, besteht, wäre eine direkte Reizung des ZNS denkbar. Auch das Dopamin, das die Vorstufe des Noradrenalins darstellt, besitzt strukturelle Eigenschaften der Benzolderivate und fungiert als Neurotransmitter des sensorischen Systems im ZNS von Polychaeten (Golding, 1992).

Denkbar wäre zudem eine Wirkungsweise von Acetylcholin-Analoga wie, *Carbachol* oder *Succinylcholin*, die wie Curare an den Acetylcholin-Rezeptor binden, ihn jedoch nicht blockieren, sondern aktivieren und dadurch eine postsynaptische Reizung in der Peripherie von *P. dumerilii* auslösen. Dies könnte z.B. zu einer starken Muskelkontraktion und einer daraus resultierenden Spermaabgabe führen. Ließen sich zudem die an der postsynaptischen Endungen befindlichen Moleküle nicht durch die drei Mechanismen, Diffusion, enzymatischer Abbau oder Wiederaufnahme entfernen, könnte eine permanente Reizung, wie bei den Versuchen mit aromatenhaltigen Eluaten (Abbildung 3.27), die Folge sein. Weitere Reize, wie z.B. durch das eigentliche Pheromon oder ein schwärmendes Weibchen, blieben undetektiert.

In Untersuchungen zur Wirkung von Aromaten bei Vertebraten konnte ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Dopamin und Benzolderivaten

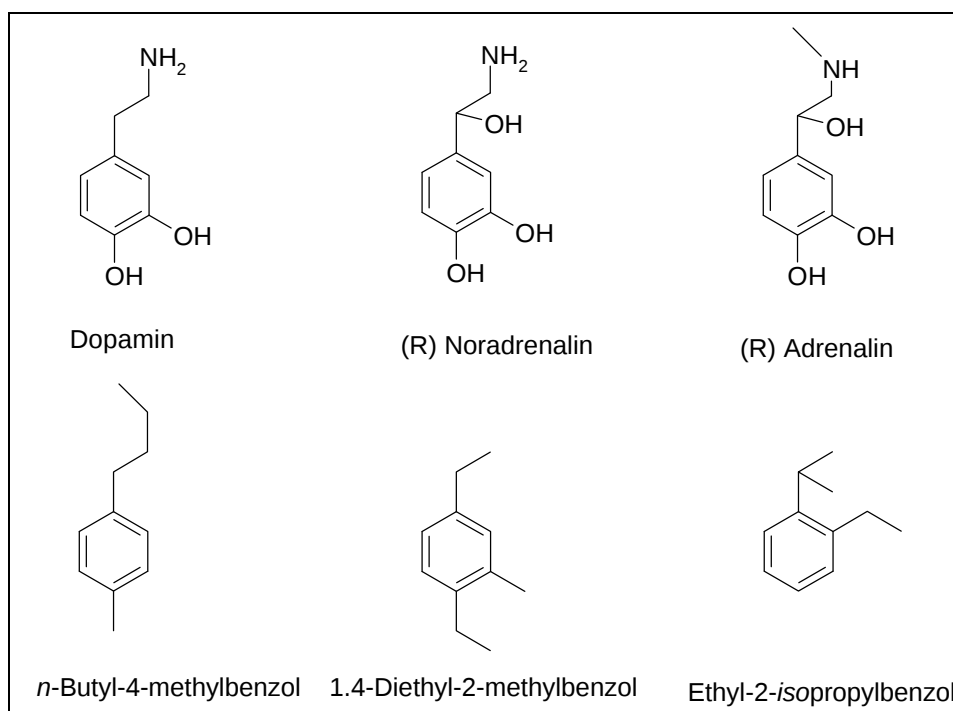


Abb. 4.2: Struktureller Vergleich zwischen Catecholaminen und bioaktiven C₅-Alkylbenzolen

hergestellt werden. Bei den Experimenten an Hasen war das Dopamin das Angriffsziel von Aromaten, die durch Biotransformation umgewandelt wurden und in einer nichtenzymatischen Reaktion mit diesen kondensierten. Die Kondensationsprodukte zeigten keine Neurotransmittereigenschaften (Mutti et al., 1988; Romanelli et al., 1986).

Dagegen konnte bei Studien zur Wirkung von Toluol und Benzol durch orale Aufnahme bei Mäusen eine vermehrte Ausschüttung der Neurotransmitter Serotonin, Dopamin und Noradrenalin in einigen Regionen des Gehirns festgestellt werden (Hsieh et al., 1988, 1990). Eine weitere Studie zur Struktur-Toxizitätsbeziehung bei Mäusen ergab einen Anstieg der LD₅₀ Rate mit zunehmender Hydrophobizität der untersuchten Aromaten (Tanii et al., 1995). Unter ökologischen Gesichtspunkten stellt die Anwesenheit flüchtiger und verhaltensphysiologisch aktiver Komponenten aus dem Rohöl eine besondere Gefahr für *P. dumerilii* und andere semelparous Spezies dar: In dem Zeitraum der Reproduktion zwischen Anfang Juni und Ende September wäre durch eine sofortige Abnahme an erfolgreichen Vermehrungsprozessen der Fortbestand der Tiere in Frage gestellt. Gerade die als „Light Crude Oils“ bekannten EKO-FISK und Arabian Light Öle akkumulieren an der Wasseroberfläche, an der auch die Reproduktion stattfindet.

Aber nicht allein die Tatsache, daß das Männchen sein Sperma vor dem Auffinden eines geschlechtsreifen Weibchens abgegeben hat, stellt eine erfolgreiche Vermehrung in Frage, sondern auch die Beobachtung, daß die Männchen durch Aromaten zwar zu einem verstärkten Schwärmverhalten angeregt werden, aber anschließend nicht in der Lage sind, das vom Weibchen emittierte natürliche Pheromon (Harnsäure) zu detektieren. Dieser Effekt macht ein Treffen der Geschlechter aussichtslos und stellt eine Gefahr für die Reproduktion dar.

Eine weitere Gefahr birgt die Beobachtung eines narkotisierenden Effekts durch Komponenten aus dem Rohöl: Diese Verbindungen, im Wasser präsent, könnten die Männchen leblos am Boden verharren und den Zeitpunkt zur Befruchtung der Eier verpassen lassen. Dieser Effekt ist um so gravierender, da der natürliche Reproduktionsprozeß auf nur etwa je ein bis zwei Stunden in der Nacht und über drei bis vier Tage innerhalb einer Fortpflanzungsperiode beschränkt ist.

Eine narkotisierende Wirkung von Rohölkomponenten aus dem hier untersuchten Siedebereich ist auch bei der Miesmuschel (*Mytilus edulis*) bekannt (Donkin et al., 1991). Bei dieser Spezies wird eine Narkose bereits bei einer Konzentration von 0.02 ppm im Seewasser ausgelöst.

Welche in dieser Arbeit beobachteten Effekte in der Natur, beispielsweise nach einem Tankerunglück, Bruch einer Unterwasserpipeline oder Einleiten öl- oder aromatenhaltiger Abwässer, zum Tragen kommen, ist von der Zusammensetzung des Öls, dem Zeitpunkt des Eintrags und der Verteilung im Seewasser abhängig. Zusätzlich zu der Gefahr durch die in der Wassersäule befindlichen Stoffe, ergibt sich ein weiteres Gefahrenpotential für alle benthischen Nereidenarten durch die sich im Sediment akkumulierenden PAH's (Emery und Dillon, 1996).

Die hier durchgeführten Studien zur Wirkung von flüchtigen Komponenten im Rohöl sind Untersuchungen zu verhaltensphysiologischen Effekten während der Reproduktionszeit. Langzeitstudien über Kontaminationen und Untersuchungen zur Letaldosis von Komponenten aus dem Rohöl bei Larven und adulten Tieren wurden ebenfalls angestrengt. Dagegen ist der Wirkmechanismus von pheromon-mimikrierenden Verbindungen bislang nicht untersucht, somit ist der Ort der Reizdetektion weiterhin unbekannt.

4.2 Funktion von 5-Methyl-3-heptanon

Die im Rahmen dieser Arbeit angestrebten Untersuchungen zum Nachweis der Präsenz des Ketons 5-Methyl-3-heptanon in *Platynereis dumerilii* (Zeeck et al., 1988), das von Hardege (1991) isoliert und identifiziert wurde, blieben erfolglos. Die experimentellen Randbedingungen zur Anreicherung des Ketons durch die Festphasenextraktion waren gegeben. Bei Wiederfindungsraten für die C8-Adsorptionsphase von mehr als 90 % eines 20 ng 5-M-3-H-Standards und 87 % eines 10 ng Standards, sowie einer Wiederfindungsrate von 82 % des 20 ng Standards mit den Schritten der Ultrafiltration, waren die geeigneten Voraussetzungen zur Anreicherung des Keton aus der biologischen Matrix. Auch die Detektion und Identifizierung des Ketons in kleinsten Mengen, hätte bei einer detektierbaren Konzentration von 200 pg pro Injektionsvolumen durch gekoppelte GC/MS keine Probleme geben sollen. Aber auch in verhaltensbiologischen Tests konnte die zuvor beschriebene Wirkung des Ketons, Abgabe einer kleinen Menge Sperma und schwimmen enger Kreise, nicht beobachtet werden. Daß in den hierbei untersuchten Proben kein 5-M-3-H gefunden wurde, könnte vermutlich auf einen der folgenden Gründe zurückgeführt werden:

- I. Die bei Freilandfängen gefundene Menge an 5-M-3-H betrug 1 ng pro Männchen und 0.35 ng je Weibchen. In der dritten Generation, von im Labor gezüchteten Männchen, wurde eine Abnahme um den Faktor 20 festgestellt (Hardege, 1991; Zeeck et al., 1988). Von einer 5-M-3-H Abnahme bei Weibchen wurde nicht berichtet. Das jährliche Auffrischen des Zuchtbestandes, und damit das Einkreuzen von Tieren aus Freilandfängen, hätte über einen längeren Zeitraum eine kontinuierliche, aber geringe Abnahme der 5-M-3-H Menge gegenüber der Laborkultur bedeutet. Eine Abnahme des Ketons bei den Weibchen kann nicht ausgeschlossen werden.
- II. Die Extraktion der Futteralgen *Ulva lactuca* und *Risoella* aus den natürlichen Habitaten der Tiere ergab die Anwesenheit von 5-M-3-H. In den für die Laborkultur verwendeten Futterstoffen Spinat, *Dunaliella terziolecta* und *Platymonas suecica* konnte dagegen kein 5-M-3-H nachgewiesen werden (Hardege, 1991). Da die Untersuchungen ausschließlich mit Tieren aus der Kultur erfolgten, scheint eine Absenz des Ketons im Homogenat der Männchen und der Weibchen als nicht unrealistisch.

- III. In älteren Arbeiten zur Anreicherung flüchtiger Komponenten an Aktivkohlefilter mit der G/H-CLS Technik, wurden die stoffwechselhemmenden Substanzen Natriumazid (1.95 g L^{-1}) und Iodessigsäure (185.5 mg L^{-1}) sowie Streptomycin und Penicillin, die einen biologischen Abbau verhindern sollten, zur Probe gegeben. Die in dieser Arbeit durchgeführte Anreicherung an Aktivkohle mit der G/H-CLS Technik (25 Weibchen, Kap. 3.2.5.3) ohne Konservierungszusätze ergaben keinen Hinweis auf 5-M-3-H. Demnach könnte die Bildung des Ketons auf die Verwendung der Zusätze zurückzuführen sein. Der enzymatischer Abbau des hochspezifischen 5-M-3-H durch die Nichtverwendung von Konservierungsstoffen scheint dagegen unwahrscheinlich.
- IV. Durch die Verwendung von Tieren aus Freilandfängen konnte eine Anreicherung flüchtiger Substanzen nicht ausgeschlossen werden. So z.B. die Akkumulation von Schadstoffen und chemischen Verbindungen aus dem Seewasser in der Bucht von Arcachon, die durch anthropogene Einflüsse in das Habitat der Tiere gelangten. Allerdings konnte auch in einer Seewasserprobe aus Arcachon aus dem Jahr 1997 mit der SPE kein 5-M-3-H nachgewiesen werden. Auf ein Beispiel für die mögliche Anreicherung von verhaltensphysiologisch aktiven Substanzen aus Seewasser anthropogenen Ursprungs verwies Ackman (1997), der das aus dem Coelom der Nereiden *Arenicola marina* isolierte Pheromon 2-Ethyl-1-hexanol (Hardege et al., 1996) als Rückstand aus der Produktion von Weichmachern (Phthalaten) lokalisierte. Ethyl-1-hexanol besitzt wie 5-M-3-H acht Kohlenstoffatome und ein Sauerstoffatom und somit besteht eine große Strukturähnlichkeit zwischen den beiden Verbindungen. Die Hydrolyse von Phthalsäureestern könnte demnach direkt durch enzymatische Reaktionen (Esterasen) in den Nereiden erfolgen, oder aber auf den Einfluß von im Wasser befindlichen Bakterien (z.B. *Pseudomonas cepacia* und *Bacillus subtilis*), die eine Esterspaltung vornehmen, zurückzuführen sein (Sakagami et al., 1982a,b). Das in der Zucht verwendete Seewasser wurde stets über Aktivkohlefilter gereinigt und pasteurisiert. Eine Akkumulation von organischen Verbindungen im Gewebe der Tiere, die auf die Hälterung der Tiere in kontaminiertem Seewasser zurückzuführen wäre, erscheint daher unwahrscheinlich.

Gegen eine Verwendung von 5-M-3-H als Erkennungpheromon bei *P. dumerilii* sprechen dagegen mehrere Argumente. An den vier Gegenbeispielen, pheromonale Wirkung, de novo Synthese, Akkumulation des Ketons im Wasser und Artabgrenzung soll die Funktion von 5-M-3-H als Pheromon widerlegt werden.

- I. Im Schwärmwasser von männlichen *P. dumerilii* ließen sich keine Substanzen mit einer pheromonalen Wirkung isolieren oder identifizieren. Ferner besitzt nur das Schwärmwasser geschlechtsreifer Weibchen eine Aktivität (Hauenschild, 1969), da es das die Spermaabgabe induzierende Pheromon Harnsäure enthält.
- II. Demnach besteht für die Männchen keine Veranlassung de novo ein chirales, hochspezifisches Pheromon zu synthetisieren, das im Reproduktionszyklus keine Anwendung findet. Thiessen (1977) schlug drei mögliche Quellen zur Entstehung von Pheromonen vor, von denen zwei verwandt, und beide wahrscheinlicher als die dritte sind: (1) Pheromonproduktion auf dem Weg der natürlichen Biosynthese, z.B. als Folge des natürlichen Selektionsdrucks im Laufe der Zeit; (2) Synthese durch einen in Symbiose lebenden Organismus oder (3) de novo Synthese einer neuen Verbindung. In den ersten beiden Fällen werden Chemikalien aus dem natürlichen, biochemischen und biokatalytischen Pfad, der Biogenese, verwendet. Im dritten Falle müßte auf neuem Wege eine neue Verbindung synthetisiert werden. Dies scheint aber aus energetischen und evolutionären Gründen unwahrscheinlich. Harnsäure entsteht dagegen als Abbauprodukt von Guanotin und Adenin durch Desaminierung und Oxidation. De novo Synthesen sind dagegen in der Insektenwelt, z.B. bei weiblichen Schmetterlingen (*Lepidoptera*), bekannt (Bestmann & Vostrowsky, 1993). Dabei verläuft die Biosynthese über komplexe Reaktionen zu langkettigen Fettsäuren, einer Vorstufe des Pheromons, die dann wiederum durch spezielle Enzymsysteme dehydriert und reduziert werden.
- III. Als stabile Verbindung sollte während der Paarungszeit, bei der sich mehrere Tausend Tiere auf einem Quadratmeter fortpflanzen, 5-M-3-H mittelfristig an der Wasseroberfläche akkumuliert werden. Die Abnahme der Konzentration scheint nur durch Verdampfen möglich. Das Finden der Geschlechter bei einer stetig zunehmenden Konzentration an Erkennungpheromon und in einem Aktivitätsbereich zwischen 10^{-9} - 10^{-12} g·L⁻¹ wäre erschwert, wenn nicht sogar unmöglich. Harnsäure dagegen wirkt auf einem eng lokalisierten Bereich in relativ hoher Konzentration 3 - 5 ng,

punktuell in direkter Nähe zum schwärmenden Männchen; bei einer unteren Detektionsschwellengrenze von $0.6 \mu\text{M}$. Im Anschluß an die Fortpflanzung erfolgt eine Verdünnung durch natürliche Konvektion und durch Abbau im Seewasser zu Allantoin (Harder, 1996).

IV. Eine Artabgrenzung zwischen den, in demselben Habit (Isefjord, Dänemark) vorkommenden Nereiden *Platynereis dumerilii* und *Nereis succinea*, durch Verwendung verschiedener Konzentrationen eines Erkennungspheromons, wie 5-M-3-H (Zeeck et al., 1990), muß in Frage gestellt werden. Die Detektionsschwellengrenze von 5-M-3-H bei *N. succinea* wurde mit $1.5 \cdot 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ festgestellt und lag damit um den Faktor 100 höher als bei *P. dumerilii*. Das bei der Reproduktion von *N. succinea*, die in kleineren Schwärmen als bei *P. dumerilii* abläuft, in das Wasser emittierte Erkennungspheromon, lockte nach kurzer Zeit, in Folge der natürlichen Konzentrationserniedrigung die andere Spezies an. Jedoch, aufgrund einer viel höheren Menge an emittiertem Keton durch *N. succinea* und einer großflächigen Verteilung, wäre das Auffinden des Sexualpartners für *P. dumerilii* extrem erschwert.

Der Mechanismus der Reizdetektion und Reizverarbeitung könnte unter den gleichen Annahmen, die unter 4.1 (Reizverarbeitung durch Aromaten) gemacht wurden, betrachtet werden. Jedoch besteht eine anders geartete Strukturverwandtschaft zwischen 5-M-3-H und den Catecholaminen (s. Abbildung 4.3).

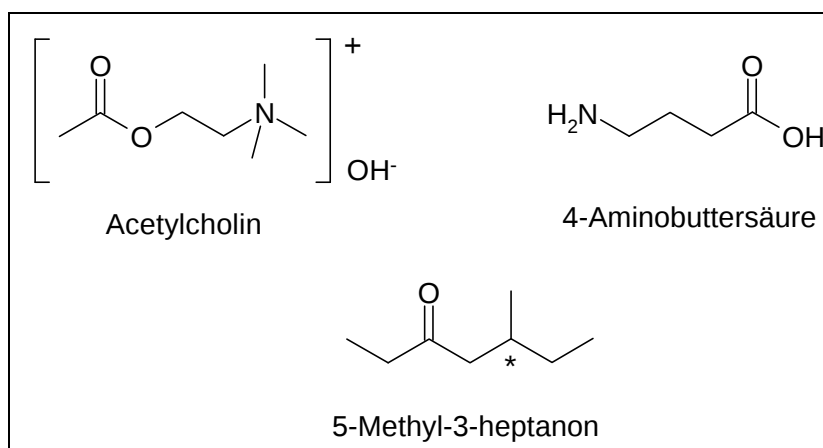


Abb. 4.3: Strukturvergleich zwischen Neurotransmittern und 5-M-3-H

Größere Übereinstimmungen in ihren Strukturen bestehen zwischen den Neurotransmittern Acetylcholin (ACh) und γ -Aminobuttersäure (GABA), sowie dem Keton 5-M-3-H. Als ein Analogon zum ACh, daß hauptsächlich als neuromuskulärer Transmitter fungiert, könnten spezifische Aromaten über Umwege einen Reiz im postsynaptischen Bereich ausgelöst und vereinzelt Tiere zum schnelleren Schwimmen angeregt haben. GABA dagegen ist ein wichtiger Transmitter im ZNS bei der Polychaetenart *Nereis diversicolor* und arbeitet vermutlich als interneuronaler Transmitter (Golding, 1992). Dieses könnte ein Grund für die Stimulierung bei den elektrophysiologischen Ableitungen am isolierten ZNS gewesen sein.

4.3 Verhaltensbiologisch aktive Verbindungen bei

P. dumerilii-Weibchen

Bei den Untersuchungen zur Isolierung und Anreicherung von biologisch aktiven Substanzen, die der Synchronisation des Fortpflanzungsverhaltens dienen, wurden zwei Ansätze verfolgt: Der erste Ansatz sah die Anreicherung volatiler Verbindungen aus dem Schwärmwasser sowie dem Homogenat der Weibchen durch Festphasenextraktion (SPE) und in einem Einzelfall durch die Grob/Hersch-Closed-Loop-Stripping Technik (G/H-CLS) vor. Der zweite Ansatz basierte auf der Isolierung und Anreicherung nichtflüchtiger Verbindungen aus dem Coelom und den Körperhüllen der Weibchen.

Da im Schwärmwasser keine flüchtigen Komponenten, die eine Spermaabgabe induzierten, detektiert wurden, jedoch ein aktives Eluat aus der SPE an einer NH_2 -Phase resultierte (Kap. 3.2.2.2), das innerhalb von 24 Stunden seine Aktivität verloren hatte, ergaben sich daraus richtungsweisende Annahmen:

- 5-M-3-H konnte in den Eluaten der SPE weder an einer C8- noch an einer CN-Phase identifiziert werden. Es war zudem nicht mit der Abnahme der biologischen Aktivität durch Zersetzung innerhalb eines Tages zu rechnen. Diese Ergebnisse schlossen die Funktion von 5-M-3-H als Erkennungspheromon aus.
- Die an einer NH_2 -Phase adsorbierte Substanz sollte eine Verbindung mit einer Amin- oder Amidfunktionalität sein. Oder aber sie sollte die Fähigkeit besitzen, Anionen zu bilden, da die NH_2 -Phase auch Ionentauscherfunktion besitzt.

- Durch die Identifizierung der Harnsäure, als das die Spermaabgabe induzierende Pheromon im Schwärmwasser, handelte es sich bei der adsorbierten Verbindung vermutlich um Harnsäure. Sie liegt im Wasser in Abhängigkeit des pH-Werts in der dissoziierten Form, also als Mono- oder Dianion vor, und es besitzt Amidfunktionalität.

Die Untersuchungen zur Isolierung nichtflüchtiger Verbindungen standen unter anderen Gesichtspunkten und neuer Fragestellung:

- 1) Haben flüchtige Verbindungen überhaupt eine Bedeutung bei der Reproduktion von *P. dumerilii*?
- 2) Lassen sich neben der Harnsäure weitere Sexualpheromone aus dem Coelom der weiblichen Tiere isolieren?
- 3) Können andere Coelombestandteile eine spontane und vollständige Spermaabgabe induzieren?
- 4) Wo ist die Harnsäure lokalisiert?

Die Frage nach flüchtigen, das Reproduktionsverhalten koordinierenden Verbindungen, konnte zufriedenstellend beantwortet werden. In keinem der aus der SPE mit Homogenaten von Weibchen gewonnenen Eluate konnten volatile Komponenten identifiziert werden, die bei den Männchen eine Spermaabgabe induzierten. Desgleichen konnte aus dem Homogenat von Männchen mit der SPE keine Probe gewonnen werden, die in verhaltensphysiologischen Tests bei Weibchen eine Eiabgabe auslöste, oder sie zu einer erhöhten Schwärmtätigkeit anregte. In nur einem Experiment konnte mit einem Eluat, das aus der SPE an einer C8-Phase mit dem Homogenat zum Teil frischer Weibchen hervorging, bei *P. dumerilii*-Männchen eine spontane Gametenabgabe ausgelöst werden (Kap. 3.2.4.3). Diese Probe besaß eine extrem hohe verhaltensphysiologische Aktivität. Die probenbenetzte Nadel einer 10 µL Spritze war ausreichend, um eine sofortige und vollständige Spermaabgabe zu induzieren. Die anschließende Chromatographie der Probe ergab keinen Anhaltspunkt für die Präsenz von Harnsäure. In einem nachfolgenden Experiment war es nicht möglich, Harnsäure an einer C8-Phase zu adsorbieren.

Die biologische Aktivität der Probe war allerdings auf nur 24 Stunden beschränkt. Aus dem Homogenat einer größeren Menge an tiefgefrorenen Weibchen konnten keine aktiven Fraktionen isoliert werden.

Der zweimalige Versuch aus dem Homogenat von Weibchen, mit Hilfe der G/H-CLS-Technik, verhaltensphysiologisch aktive Komponenten zu isolieren, war erfolglos. Weder an einem speziellen Aktivkohlefilter, noch an einer C8-Phase, die in Abwandlung der Methode eingesetzt wurde, konnte ein bioaktives Eluat isoliert werden.

Diese Ergebnisse lassen den Einfluß von volatilen Verbindungen auf das Reproduktionsverhalten als äußerst unwahrscheinlich erscheinen.

Die Präsenz weiterer Pheromone, die bei männlichen *P. dumerilii* zu einer spontanen Abgabe von Sperma in größeren Mengen führen, sind nicht auszuschließen. Die Harnsäure im Schwärmwasser führt lediglich zur Abgabe einer kleinen Portion Sperma, die für das Erkennen durch den weiblichen Geschlechtspartner ausreichend ist. Eine vollständige Spermaabgabe durch Harnsäure konnte in keinem Fall beobachtet werden. Während der Reproduktion könnte dagegen ein zweites, das die Spermaabgabe induzierende Pheromon, durch das Weibchen emittiert werden. Dieses Pheromon hätte die Funktion, das Männchen zur sofortigen und vollständigen Gametenabgabe zu bewegen und damit einen maximalen Befruchtungserfolg der Eier zu garantieren. Dieses Pheromon könnte mit den zu befruchtenden Eiern im Coelom, oder aber auf anderem Weg zeitgleich zusammen mit den Eiern abgegeben werden. Allerdings ist für das Männchen eine komplette Abgabe seines Spermas von Nachteil, da es in der Regel seine Gene auf verschiedene Nachkommen, durch Paarung mit mehreren Weibchen, übertragen möchte. Dies ist nach einer einmaligen und spontanen Gametenabgabe mit nachfolgendem Tod nicht möglich.

Ein eindeutiger Beweis für die Existenz einer weiteren Verbindung konnte nicht geliefert werden, jedoch läßt das bereits angeführte Ergebnis von Bio-tests mit einem Eluat der SPE (Kap. 3.2.4.3) den hypothetischen Schluß zu, daß ein weiteres, nichtflüchtiges Sexualpheromon der Koordination des Reproduktionsverhaltens bei *P. dumerilii* dienen könnte.

Seit den Arbeiten von Boilly-Marer (1974) und Boilly-Marer und L'Homme (1986) galt allgemein die Coelomflüssigkeit der Tiere als die Quelle der Pheromone. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit kann dieses zumindest für das Coelom von geschlechtsreifen Weibchen der Spezies *P. dumerilii* ausgeschlossen werden. Durch eine neue Methode der Probengewinnung wurde pheromonfreies Coelom erhalten. Dazu wurden die geschlechtsreifen Weibchen nach dem Entnehmen aus der Schale kurz auf Filterpapier gelegt, um den Gehalt des anhaftenden Seewassers zu minimieren. Dann wurde vorsichtig vom Kopfe her mit einem Objektträgerglas das Coelom aus dem Pygidium gepreßt. Von erheblicher Bedeutung war es, das Tier nicht an anderen Körperregionen zu verletzen, bzw. das Coelom, das aus anderen Stellen ausgetreten war, nicht weiter zu verwenden. Wie im Laufe der Untersuchungen deutlich wurde, gelangten bei unachtsamer Präparation kleinste Mengen Harnsäure in das Coelom und wurden durch die HPLC mit dem PDA-Detektor detektiert und identifiziert. Dagegen wies das aus dem Pygidium gewonnene Coelom keine Harnsäure auf. In mehreren Versuchen wurden zudem über zwei Phasen (RP18_{ec} und C16-Amid) chromatographiert, um ein Überdecken der Harnsäure durch coeluierende Substanzen zu minimieren. Ferner wurde zum Laufmittel 0.1 % Trifluoressigsäure hinzugesetzt, das zu einer besseren Peaksymmetrie und zu einer leichten Verschiebung der Retentionszeit führte. In keinem Fall konnte dabei Harnsäure im ausgedrückten Coelom, das aus dem Pygidium ausgetreten war, identifiziert werden. Abbildung 4.4 zeigt zwei Chromatogramme, wobei das untere Chromatogramm aus dem 0.22 µm Filtrat des Coeloms resultiert. Das obere Chromatogramm zeigt das mit 10 ng Harnsäure dotierte Filtrat.

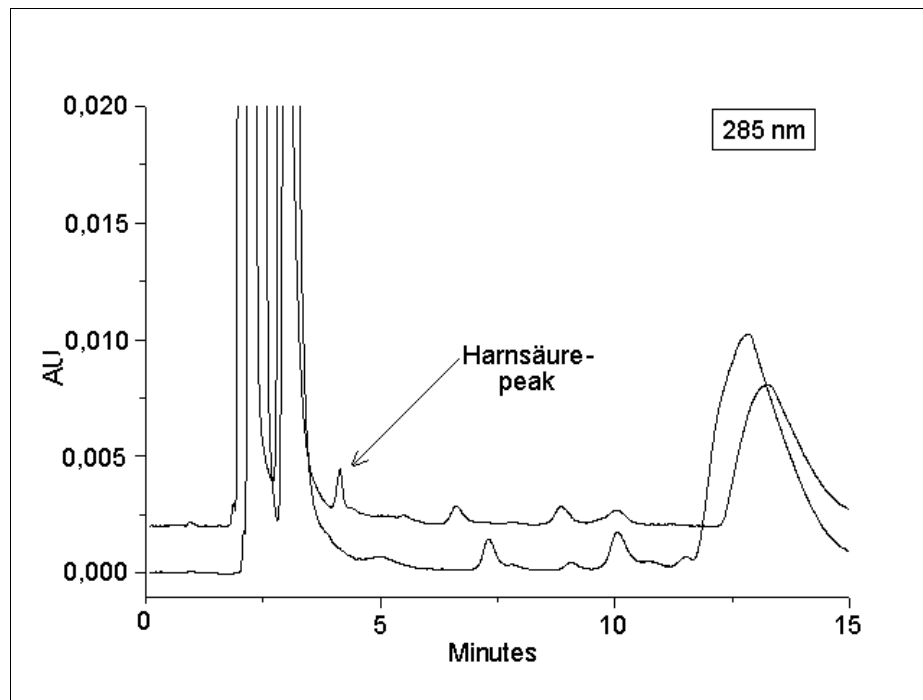


Abb. 4.4: Chromatogramme vom Coelomfiltrat mit und ohne Harnsäuredotierung (10 ng in der Probe)

Deutlich ist darin der durch die Harnsäure verursachte Peak erkennbar. In den verhaltensbiologischen Tests konnte weder das Filtrat der Coelomflüssigkeit noch das Coelom selbst bei schwärmenden *P. dumerilii*-Männchen eine Spermaabgabe auslösen. Auch konnte keine Steigerung des Schwärmens bei den Tieren registriert werden. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß das Coelom der weiblichen *P. dumerilii* in keinem Falle die Quelle des Pheromons darstellt.

Daß sich Harnsäure außerhalb des Coeloms befinden muß, wird auch durch die Beobachtungen bei den Biotests deutlich: Neben dem, im aktiven Schwärmwasser von Weibchen befindlichen Pheromon sind keine weiteren, detektierbaren Bestandteile vertreten, noch sind Eier, die mit dem Coelom in das Wasser abgegeben werden, erkennbar.

Die Bestätigung lieferte die Analyse der coelomfreien Körperhüllen. Durch kurze Extraktion mit Wasser als Lösungsmittel im Ultraschallbad bei einer Temperatur von 0°C konnte Harnsäure eindeutig identifiziert werden. Die Quantifizierung des Extrakts ergab eine Menge von 4.6 µg pro Tier. Dieser Wert entspricht in etwa dem zuvor bestimmten Wert von 4.0 µg pro Tier (Harder, 1996, Zeeck et al., 1998a).

Die unterschiedlichen Werte könnten jeweils auf die praktizierten Methoden zurückzuführen sein, da bei der Quantifizierung aus dem Homogenat das Volumen der Körperflüssigkeit sich zum Lösungsmittelvolumen addiert, und daraus ein etwas größeres Volumen mit einer geringeren Konzentration resultiert. Bei der Extraktion der ausgedrückten Tiere in einem definierten Volumen Milliporewasser sollte sich keine Coelomflüssigkeit zum Gesamtvolumen addieren. Dagegen ist eine leichte Abnahme des Volumens durch osmotische Effekte (Salinität der Körperzellen sollte dem des Seewassers entsprechen; 3.2 %) anzunehmen, was zu einer Aufkonzentrierung führte. Resultat wäre ein höherer Harnsäuregehalt als der tatsächliche.

Hauptursache liegt aber vermutlich in der größeren Zahl der Tiere, die in der Arbeit von Harder den Durchschnittswert der Konzentration lieferte. Der in dieser Arbeit bestimmte Wert basiert aus methodischen Gründen auf einer Anzahl von drei bis fünf Tieren pro Messung. Bei einer größeren Anzahl von Tieren lassen sich die unterschiedlichen Größen der Weibchen und individuelle Unterschiede im Harnsäuregehalt besser angleichen.

Gegenstand weiterer Untersuchungen ist die Klärung der Frage zur Existenz eines weiteren, die Spermaabgabe auslösenden, Sexualpheromons bei *P. dumerilii*. Auch sollten die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse die Erforschung der das Pheromon Harnsäure emittierenden Quelle rechtfertigen.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung zur Wirkung von Verbindungen, die das Reproduktionsverhalten der Art *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta) beeinflussen.

- I. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden Aromaten aus dem EKO-FISK Rohöl isoliert, die bei schwärmenden *Platynereis dumerilii*-Männchen eine Spermaabgabe induzierten. Die zu dieser Trennung angewandten Methoden setzten sich aus der Destillation des Rohöls, der säulenchromatographischen Separation einzelner Destillatfraktionen in Alkan- und Aromatenfraktionen sowie Fraktionen aus heteroatomhaltigen Komponenten, der gaschromatographischen Isolierung und der Anreicherung durch Peak-Trapping zusammen. Aus einer Gruppe von Verbindungen, die nach Voruntersuchungen alle potentiell einen die Gametenabgabe auslösenden Effekt besitzen konnten, wurde das *n*-Butyl-4-methylbenzol als verhaltensphysiologisch aktiv identifiziert und durch eine Grignard-Wurtz Reaktion synthetisiert. Bei *Bioassays* in 40 mL Seewasser konnte mit 22.7 ng ($3.84 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) des Syntheseprodukts die Spermaabgabe induziert werden. In einzelnen Fällen konnte mit 70.5 ng ($11.9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) Ethyl-2-isopropylbenzol, das durch Synthese gewonnen wurde, ebenfalls die Spermaabgabe ausgelöst werden.
- II. Aromatenhaltige Fraktionen der Säulenchromatographie von einzelnen Destillaten aus dem Siedebereich zwischen Dodecan und Octadecan zeigten in *Bioassays* mit Männchen einen die Gametenabgabe induzierenden Charakter.
- III. In verhaltensbiologischen Tests mit Fraktionen der Säulenchromatographie, die einen hohen Anteil an Naphthalinderivaten und mehrgliedrigen Ringsystemen aufwiesen, konnte eine narkotisierende oder eine letale Wirkung auf männlichen Nereiden beobachtet werden. Dabei reagierten die Tiere bereits bei Konzentrationen zwischen 0.05 und 0.1 ppm mit einer abrupten Beendigung des Schwärmverhaltens oder einer untypischen Spermaabgabe im regungslosen Zustand auf dem Schalenboden.
- IV. In weiteren Experimenten zu dieser Arbeit konnten die Enantiomere des Ketons 5-Methyl-3-heptanon, die für die Geschlechtererkennung bei *P. dumerilii* verantwortlich gemachten werden, weder bei den Männchen noch

bei den Weibchen identifiziert werden. Der Trennungsgang setzte sich aus extraktiven und gaschromatographischen Methoden zusammen. Die Analyse wurde mit gekoppelter Gaschromatographie/Massenspektrometrie durchgeführt.

- V. Die Funktion der Harnsäure als das die Spermaabgabe induzierende Pheromon muß neu definiert werden, da Harnsäure im Wasser von schwärmenden Weibchen nachgewiesen werden konnte und somit auch der Geschlechtererkennung während der Reproduktion dient. Mit dieser Arbeit konnte zum ersten Mal, entgegen früheren Annahmen, gezeigt werden, daß das Coelom geschlechtsreifer Weibchen in keinem Fall die Quelle für das das Reproduktionsverhalten synchronisierende Pheromon repräsentiert. Das durch ein neu entwickelte Probennahmeverfahren gewonnene Coelom weiblicher Tiere, zeigte in *Bioassays* keine Wirkung auf das andere Geschlecht und enthielt keine Harnsäure. Dagegen konnte Harnsäure durch Extraktion aus der Leibeshülle der Weibchen isoliert und eine durchschnittliche Gesamtmenge von 4.6 µg bei geschlechtsreifen Weibchen ermittelt werden.
- VI. In elektrophysiologischen Experimenten an männlichen *P. dumerilii* konnte zum ersten Mal ein direkter Einfluß von Aromaten und von einer rac. 5-Methyl-3-heptanonlösung auf das Zentralnervensystem gezeigt werden. Die extrazellulären Ableitungen wurden an frisch aus dem Prostomium präparierten Oberschlundganglien durchgeführt und ergaben eine spontane Reizbildung nach der Probenzugabe.

6. Literatur

- Ackman, R.G.** (1997). 2-Ethyl-1-hexanol: contamination or sex pheromone in *Arenicola marina*?. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 152, 311-312.
- Alyomov, S.** (1997). Some Aspects of *Nereis diversicolor*, (O. F. Müller), (Polychaeta, Annelida) Interaction with oil pollution. Abstract. *Bull. Mar. Sci.* 60, 608.
- Amaral, A.C., Morgado, E.H. & Salvador, L.B.** (1998). Polychaetes as bioindicators of organic pollution on the beaches of Sao Paulo. Abstract. *Rev. Bras. Biol.* 58, 307-316.
- Ameyaw-Akumfi, C. & Hazlett, B.A.** (1975). Sex recognition in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Science* 190, 1225-1226.
- Amon, P., Haas, E. & Sumper, M.** (1998). The sex-inducing pheromone and wounding trigger the same set of genes in the multicellular green alga *Volvox*. *Plant Cell* 10, 781-789.
- Atema, J** (1977). Effects of oil on lobster. *Oceanus* 20, 63-73.
- Atema, J. & Cowan, D.F.** (1986). Sex-identifying urine and molt signals in the lobsters, *Homarus americanus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 12, 2065-2080.
- Atema, J. & Engstrom, D.G.** (1971). Sex pheromone in the lobster (*Homarus americanus*). *Nature (London)* 232, 261-263.
- Atema, J., Karnovsky, E.B., Olszko-Szuts, S. & Bryant, B.** (1982). Project summary: Sublethal effects of number 2 fuel oil on lobster's behavior and chemoreception. *Res. Dev.*, EPA-600 / S3-82-013.
- Bartels-Hardege, H.D., Hardege, J.D., Zeeck, E., Müller, C.T., Wu, B.L. & Zhu, M.Y.** (1996). Sex pheromones in marine polychaetes V: A biologically active volatile compound from the coelomic fluid of female *Nereis* (*Neanthes*) *japonica* (Annelida Polychaeta). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 201, 275-284.
- Beckmann, M., Hardege, J.D. & Zeeck, E.** (1995). Effects of the volatile fraction of crude oil on spawning behaviour of nereids (Annelida, Polychaeta). *Mar. Environ. Res.* 40, 267-276.

- Beckmann, M.** (1996). Identifikation von Substanzen im Rohöl zur Induktion der Spermaabgabe bei *Nereis succinea*- und *Platynereis dumerilii*-Männchen (Annelida, Polychaeta) und Identifikation des Pheromonkomplexes zur Induktion der Eiabgabe bei *Nereis succinea*-Weibchen. *Dissertation*, Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg, FB Chemie.
- Bestmann, H. J. & Vostrowsky, O.** (1993). Chemische Informationssysteme der Natur: Insektenpheromone. *Chem. Unserer Zeit*. 3, 123-133.
- Boilly-Marer, Y.** (1974). Etude experimentale du comportement nuptial de *Platynereis dumerilii* Aud. et M. Edw., Annélides, Polychètes): chemoréception, émission des produits genitaux. *Mar. Biol.* 24, 167-169.
- Boilly-Marer, Y. & Lassalle, B.** (1978). Electrophysiological responses of heteronereis stimulated with sex pheromones. *J. Exp. Zool.* 205, 119-124.
- Boilly-Marer, Y. & Lassalle, B.** (1980). Electrophysiological responses of the central nervous system in the presence of homospecific heterospecific sex pheromones in nereids (Annelida, polychaeta). *J. Exp. Zool.* 213, 33-39.
- Boilly-Marer, Y.** (1981). Pheromones et reproductions chez un invertébré marin (*Platynereis dumerilii* Aud et. M. Edw., Annélides, Polychètes). *Océanis* 7, 749-754.
- Boilly-Marer, Y. & L'Homme, M.F.** (1986). Sex pheromones in the marine polychaete *Platynereis dumerilii*. In: Prochet, M., Andries, J.C. & Dhainhaut, A. (Eds.). *Adv. Inverteb. Reprod.* IV. Elsevier, Amsterdam, 494-498.
- Boland, W., Marner F.J., Jaenicke, L., Müller, D.G. & Folster, E.** (1983). Comparative receptor study in gamete chemotaxis of the seaweeds *Ectocarpus siliculosus* and *Cutleria multifida*. An approach to interspecific communication of algal gametes. *Eur. J. Biochem.* 134, 97-103.
- Boland, W.** (1995). The chemistry of gamete attraction: chemical structures, biosynthesis, and (a)biotic degradation of algae pheromones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 37-43.

- Breithaupt, T., Lindstrom, D.P. & Atema, J.** (1999). Urine release in freely moving catheterised lobsters (*Homarus americanus*) with reference to feeding and social activities. *J. Exp. Biol.* 202, 837-844.
- Brown, W., Eisner, T. & Whittacker, H.** (1970). Allomones and kairomones: Transspecific chemical messengers. *BioSciences* 20, 21-28.
- Butenandt, A., Beckmann, R., Stamm, D. & Hecker, E.** (1959). Über den Sexuallockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und Konstitution. *Z. Naturforsch.* 14b, 283-284.
- Butler, C.G.** (1957). Some work at Rothamsted on the social behaviour of honeybees. *Proc. Roy. Soc. B* 147, 275-288.
- Donkin, P., Widdows, J., Evans, S.V. & Brinsley, M.D.** (1991). QSARs for the sublethal responses of marine mussel (*Mytilus edulis*). *Sci. Total. Environ.* 109/110, 461-476.
- Emery, V.L. Jr. & Dillon, T.M.** (1996). Chronic toxicity of phenanthrene to the marine polychaete worm, *Nereis* (*Neanthes arenaceodentata*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 265-279.
- Fong, P.P.** (1991). The effects of salinity, temperature, and photoperiod on epitokal metamorphosis in *Neanthes succinea* (Frey and Leuckart) from San Francisco Bay. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 149, 177-190.
- Fong, P.P.** (1993). Lunar control of epitokal swarming in the polychaete *Platynereis bicanaliculata* (Baird) from central California. *Bull. Mar. Sci.* 52, 911-924.
- Golding, D.W.** (1992). In: Polychaeta: Nervous system. Annelida, microscopic anatomy of invertebrates. Harrison, F.W. & Gardiner, S.L. (Eds.). 153-179. Wiley-Liss, Inc.
- Hardege, J.D., Bartels-Hardege, H.D. & Zeeck, E.** (1991). Volatile compound from the coelomic fluid of *Nereis succinea*: biological activity as sex pheromone. *Inverteb. Reprod. Dev.* 19, 97-99.
- Hardege, J.D.** (1991). Verhaltensmodifizierende Naturstoffe (Pheromone) bei der Fortpflanzung von Nereiden (Annelida, Polychaeta). *Dissertation*, CVO-Universität Oldenburg, FB Biologie.
- Hardege, J.D., Bentley, M.G., Beckmann, M. & Müller, C.T.** (1996). Sex pheromones in marine polychaetes: volatile organic substances (VOS) isolated from *Arenicola marina*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 139, 157-166.

- Hardege, J.D., Müller, C.T. & Beckmann, M.** (1997). A waterborne female sex pheromone in the ragworm, *Nereis succinea* (Annelida, Polychaeta). *Polychaete Res.* 4, 5-10.
- Harder, T.,** (1996). Isolation und Strukturaufklärung eines Sexualpheromons des marinen Polychaeten *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). *Dissertation*, CvO-Universität Oldenburg, FB Chemie.
- Hauenschild, C. & Fischer, A.** (1969). Grosses Zoologisches Praktikum *Platynereis dumerilii*: Mikroskopische Anatomie, Fortpflanzung, Entwicklung. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 8- 16.
- Hsieh, G.C., Sharma, R.P. & Parker, R.D.** (1988). Subclinical effects of groundwater contaminants. II. Alteration of regional brain monoamine neurotransmitters by benzene in CD-1 mice. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17, 799-805.
- Hsieh, G.C., Raghubir, P., Sharma, R.P., Parker, R.D. & Coulombe, Jr., R.A.** (1990). Evaluation of toluene exposure via drinking water on levels of regional brain biogenic monoamines and their metabolites in CD-1 mice. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 20, 175-184.
- Huston, R.C., Fox, W.B. & Binder, M.N.** (1938). Condensation of aliphatic alcohols with aromatic compounds in the presence of aluminium chloride. II. Tertiary aliphatic alcohols and benzene. *J. Am. Chem. Soc.* 50, 251-260.
- Hutchinson, T.H., Jha, A.N. & Dixon, D.R.** (1995). The Polychaete *Platynereis dumerilii* (Audouin and Milne-Edwards: A new species for assessing the hazardous potential of chemicals in the marine environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31, 271-281.
- Hutchinson, T.H., Jha, A.N., Mackay, J.M., Elliott, B.M. & Dixon, D.R.** (1998). Assessment of developmental effects, cytotoxicity and genotoxicity in the marine polychaete (*Platynereis dumerilii*) exposed to disinfected municipal sewage effluent. *Mutat. Res.* 399, 97-108.
- Jaenicke, L.** (1977). Sex pheromones of brown algae. *Naturwissenschaften* 64, 69-75.
- Jaenicke, L. & Boland, W.** (1982). Signalstoffe und ihre Rezeption im Sexualcyclus mariner Braunalgen. *Angew. Chem.* 94, 659-670.

- Jha, A.N., Hutchinson, T.H., Mackay, J.M., Elliott, B.M. & Dixons, D.R.**
(1996). Development of an in vivo genotoxicity assay using the marine worm *Platynereis dumerilii* (Polychaeta: Nereidae). *Mutat. Res.* 359, 141-150.
- Jha, A.N., Hutchinson, T.H., Mackay, J.M., Elliott, B.M. & Dixons, D.R.**
(1997). Evaluation of the genotoxicity of municipal sewage effluent using the marine worm *Platynereis dumerilii* (Polychaeta: Nereidae). *Muta.t Res.* 391, 179-188.
- Kaiszling, K., Kasang, G., Bestmann, H., Stransky, W. & Vostrowsky, O.**
(1978). A new pheromone of the silkworm moth *Bombyx mori*: Sensory pathway and behavioral effect. *Naturwissenschaften* 65, 382-384.
- Karlson, P. & Lüscher, M.** (1959). Pheromones: A new term for a class of biologically active substances. *Nature* (London) 183, 55-56.
- Kasang, G., Kaiszling, K., Vostrowsky, O. & Bestmann, H.** (1978). Bombykal, eine zweite Pheromonkomponente des Seidenspinners *Bombyx mori* L. *Angew. Chem.* 90, 74-75.
- Müller, D.G., Boland, W., Marner F.J. & Gassmann, G.** (1982a). Viridienne, the sexual pheromone of *Syringoderma* (Phaeophyceae). *Naturwissenschaften* 69, 501-502.
- Müller, D.G., Gassmann, G., Marner F.J., Boland, W. & Jaenicke, L.**
(1982b). The sperm attractant of the marine brown algae *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *Science* 218, 1119-1120.
- Mutti, A., Falzoi, M., Romanelli, A., Bocchi, M.C., Ferroni, C. & Franchini, I.** (1988). Brain dopamine as a target for solvent toxicity: Effects of some monocyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol.* 49, 77-82.
- Neff, J. M. & Andersen, J. W.** (1981). Response of marine animals to petroleum and specific petroleum hydrocarbons. Applied Science Publishers LTD, London.
- Petrov, A.D., Zakharov E.P. & T.L. Krasnova** (1958). Synthesis of some alkylbenzenes and alkylcyclohexanes of composition C₁₄-C₁₅. *C. A.* 52, 8063i.
- Petrov, A.D., Zakharov, E.P. & T.L. Krasnova** (1959). Synthesis of alkylbenzenes with composition C₁₄-C₂₀ by means of the Wurtz-Grignard reaction in nonetheral medium. *C. A.* 53, 18890.

- Petrov, A.D. & Zakharov E.P.** (1960). Synthesis of alkylbenzenes by the Grignard-Wurtz reaction with the replacement of the ether by hydrocarbon solvent. *C. A.* 54, 4426.
- Priesnitz, F.** (1994). Identifikation und quantitative Erfassung von mit Sexualpheromonen von Nereiden interferierenden Substanzen in niedrigsiedenden Fraktionen des EKO-FISK-Rohöls. *Diplomarbeit*, CvO-Universität Oldenburg, Fachbereich Chemie.
- Radke, M., Willsch, H. & Welte, D.H.** (1980). Preparative hydrocarbon group type determination by automated Medium Pressure Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 52, 406-411.
- Romanelli, A., Falzoi, M., Mutti, A., Bergamaschi, E. & Franchini, I.** (1986). Effects of some monocyclic aromatic solvents and their metabolites on brain dopamine in rabbits. *J. Appl. Toxicol.* 6, 431-436.
- Rossi, S. & Anderson, J.** (1976). Toxicity of water-soluble fractions of no. 2 fuel oil and South Louisiana crude oil to selected stages in the life history of the polychaete, *Neanthes arenaceodentata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 16 (1), 18-24.
- Rossi, S. & Anderson, J.** (1978). Petroleum hydrocarbon resistance in the marine worm *Neanthes arenaceodentata* (Polychaeta: Annelida), Induced by chronic exposure to no. 2 fuel oil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 20 (4), 513-521.
- Rossi, S. & Anderson, J.** (1978). Effects of no. 2 fuel oil water-soluble-fractions on growth and reproduction in *Neanthes arenaceodentata* (Polychaeta, Annelida). *Water, Air, Soil Pollut.* 9, 155-170.
- Rullkötter, J.** (1995). Skript zum organisch-geochemischen Praktikum: Version IV, ICBM, AG Organische Geochemie.
- Ryan, E. P.** (1966). Pheromones: Evidence in a decapod crustacean. *Science* 151, 340-341.
- Sakagami, Y., Tanaka, K., Watanabe, K., Odagiri, M., Mori, K. & Murooka, H.** (1982a). Isolation of bacteria which decompose phthalate esters from sea water and sea mud. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48, 633-637.

- Sakagami, Y., Tanaka, K., Watanabe, K. & Murooka, H.** (1982b). Identification and characterisation of the phthalate ester-degrading bacteria isolated from sea mud. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48, 639-642.
- Schneider, D. & Hecker, E.** (1956). Zur Elektrophysiologie der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* bei Reizung mit angereicherten Extrakten des Sexuallockstoffes. *Z. Naturforsch.* 11 b, 121-124.
- Schneider, D.** (1957). Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori*. *Z. Vergl. Physiol.* 40, 8-41.
- Snell, T.W., Rico-Martinez, R., Kelly, L.N. & Battle, T.E.** (1995). Identification of a sex pheromone from rotifer. *Mar. Biol. (Berlin)* 123, 347-353.
- Shorey, H.H. & Bartell, R.J.** (1970). Role of a volatile female sex pheromone in stimulating male courtship behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Anim. Behav.* 18, 159-164.
- Takahashi, F.T. & Kittredge, J.S.** (1973). Sublethal effects of the water soluble component of oil: chemical communication in the marine environment. In: *The Microbial Degradation of Die Pollutants*. Louisiana State University, Baton Rouge, LA, LSU-SG-73-01.
- Tanii, H., Huang, J. & Hashimoto, K.** (1995). Structure-acute toxicity relationship of aromatic hydrocarbons in mice. *Toxicol Lett* 76, 27-31.
- Thiele, O.W.** (1979). Lipide, Isoprenoide mit Steroiden, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Thiessen, D.** (1977). Thermoenergetics and the evolution of pheromone communication. *Prog. Psychobiol. Physiol. Psychol.* 7. Spargue, J. and Epstein, A. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 92-183.
- Wilson, E.** (1965). Chemical communication in the social insects. *Science* 149, 1064-1071.
- Young, D. J.; Silverstein, R. M.** (1975). Study of Communication Systems In: *Methodes in olfactory research*. Moulton, Turk, Johnston (Eds.). Academic Press, London.
- Zeeck, E., Hardege, J.D., Bartels-Hardege, H.D. & Wesselmann, G.** (1988). Sex pheromone in a marine polychaete: Determination of the chemical structure. *J. Exp. Zool.* 246, 285-292.

- Zeeck, E. & Hardege, J.D.** (1990a). Sex pheromones in nereids: Volatile compounds of the coelomic fluid of *Nereis virens*. *Z. Naturforsch.* 45c, 924-925.
- Zeeck, E., Hardege, J.D. & Bartels-Hardege, H.D.** (1990b). Sex pheromones and reproductive isolation in two nereid species, *Nereis succinea* and *Platynereis dumerilii*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 67, 183-188.
- Zeeck, E., Hardege, J.D., Bartels-Hardege, H.D., Willig, A. & Wesselmann, G.** (1991). Sex pheromones in a marine polychaete: Biologically active compounds from female *Platynereis dumerilii*. *J. Exp. Zool.* 260, 93-98.
- Zeeck, E., Harder, T., Beckmann, M. & Müller, C.T.** (1996). Marine gamete-release pheromones. *Nature* (London) 382, 214
- Zeeck, E., Harder, T. & Beckmann, M.** (1998a). Uric acid: The sperm-release pheromone of the marine polychaete *Platynereis dumerilii*. *J. Chem. Ecol.* 24/1, 13-22.
- Zeeck, E., Harder, T. & Beckmann, M.** (1998b). Inosine, L-glutamic acid and L-glutamine as components of a sex pheromone complex of the marine polychaete *Nereis succinea* (Annelida: Polychaeta). *Chemoecology* 8, 77-84.
- Zeeck, E., Müller, C.T., Beckmann, M., Hardege, J.D., Papke, U., Sinnwell, V., Schroeder, F.C. & Francke, W.** (1998c). Cysteine-glutathione disulfide, the sperm-release pheromone of the marine polychaete *Nereis succinea* (Annelida: Polychaeta). *Chemoecology* 8, 33-38.

A. Chromatogramme

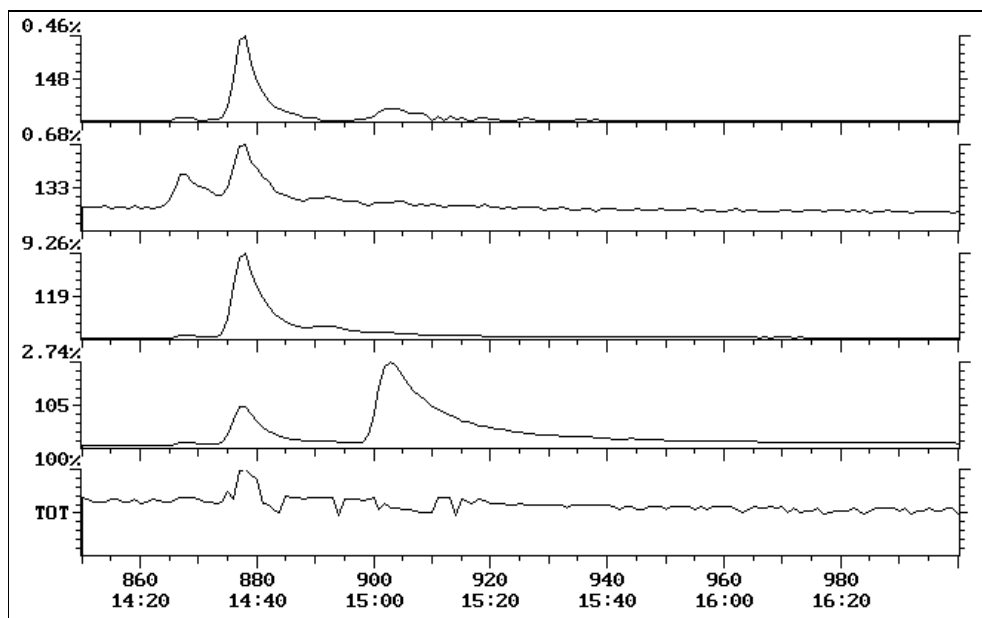


Abb. A.1: Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 1, System Nr. III, Starttemp. 50°C, 3° pro min. Aufheizrate.

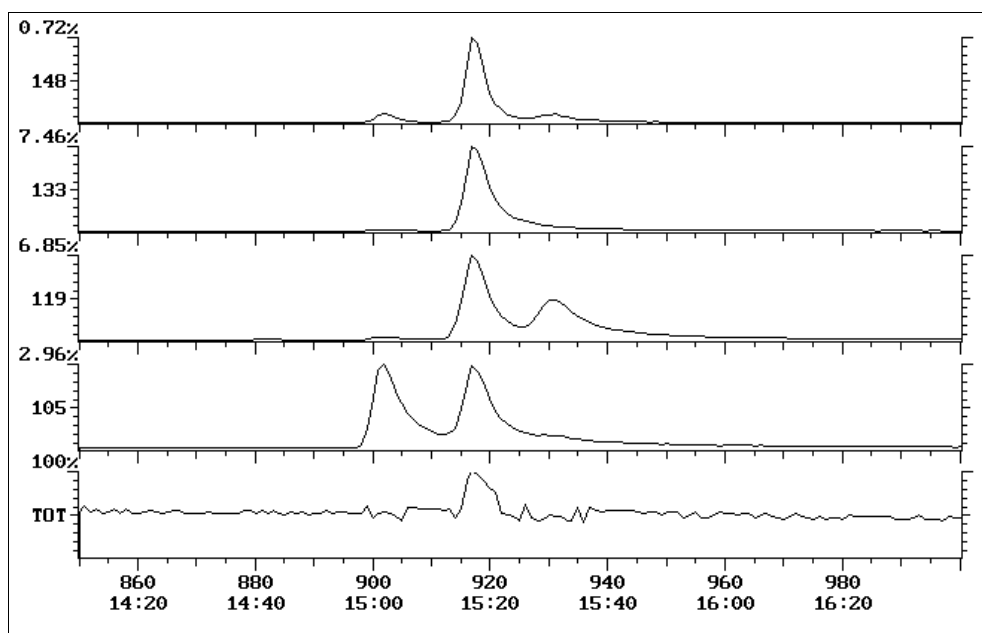


Abb. A.2: Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 2, System Nr. III, Starttemp. 50°C, 3° pro min. Aufheizrate.

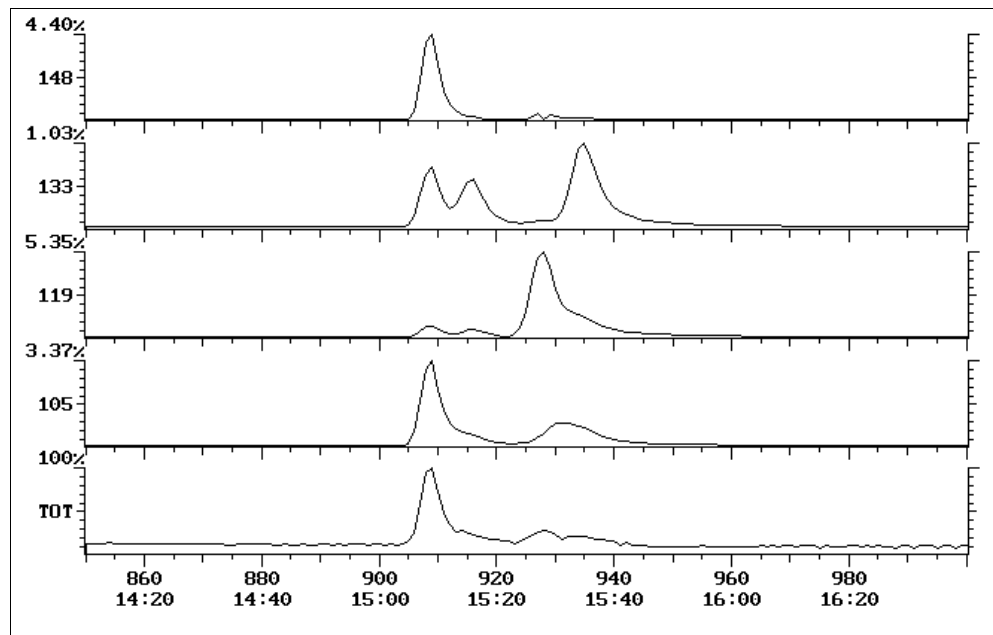


Abb. A.3: Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 3, System Nr. III, Starttemp. 50°C, 3° pro min. Aufheizrate.

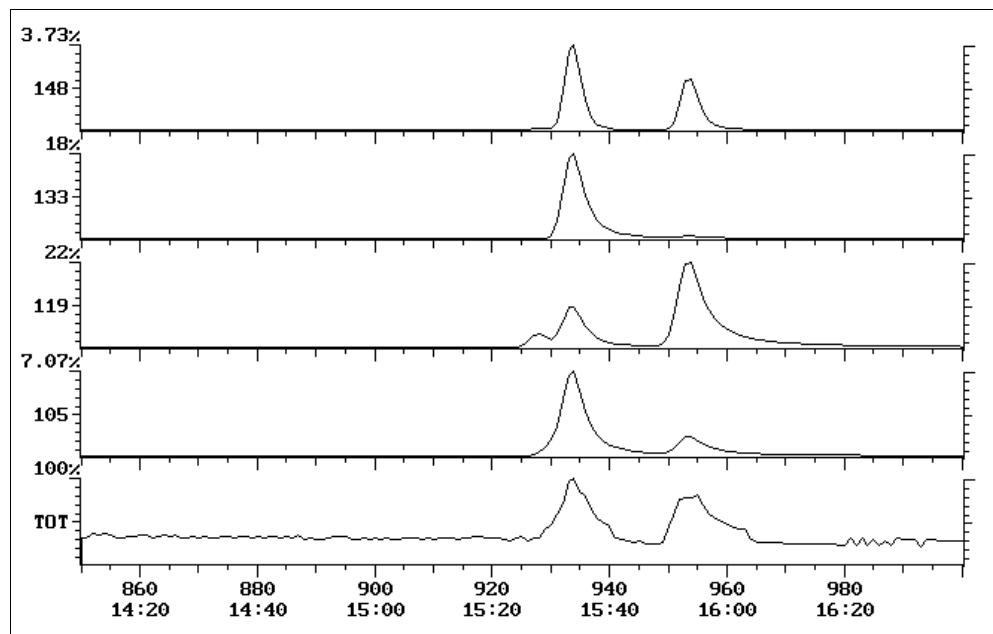


Abb. A.4: Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 4, System Nr. III, Starttemp. 50°C, 3° pro min. Aufheizrate.

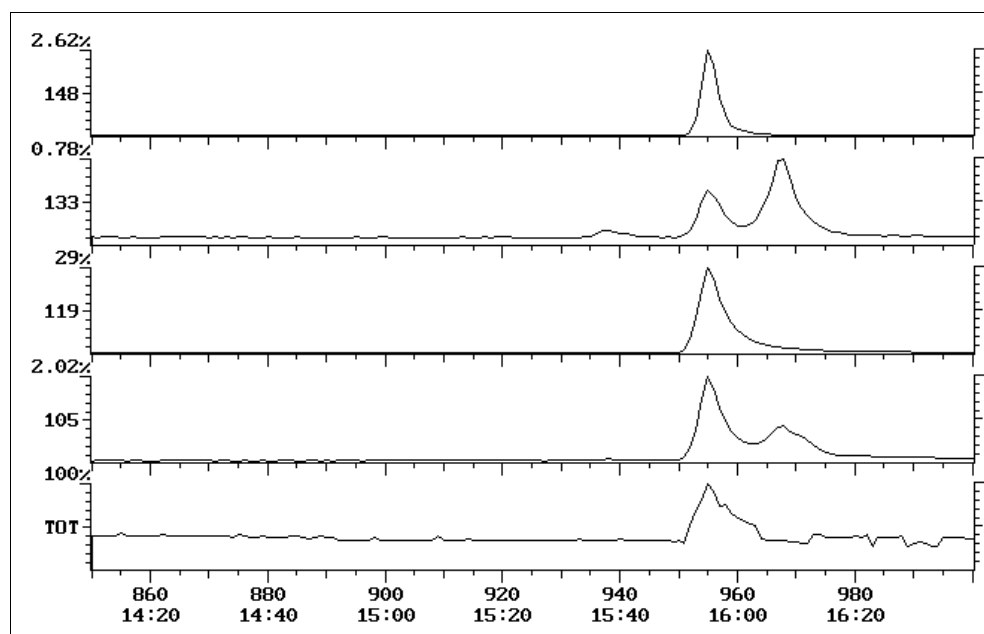


Abb. A.5: Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 5, System Nr. III, Starttemp. 50°C, 3° pro min. Aufheizrate.

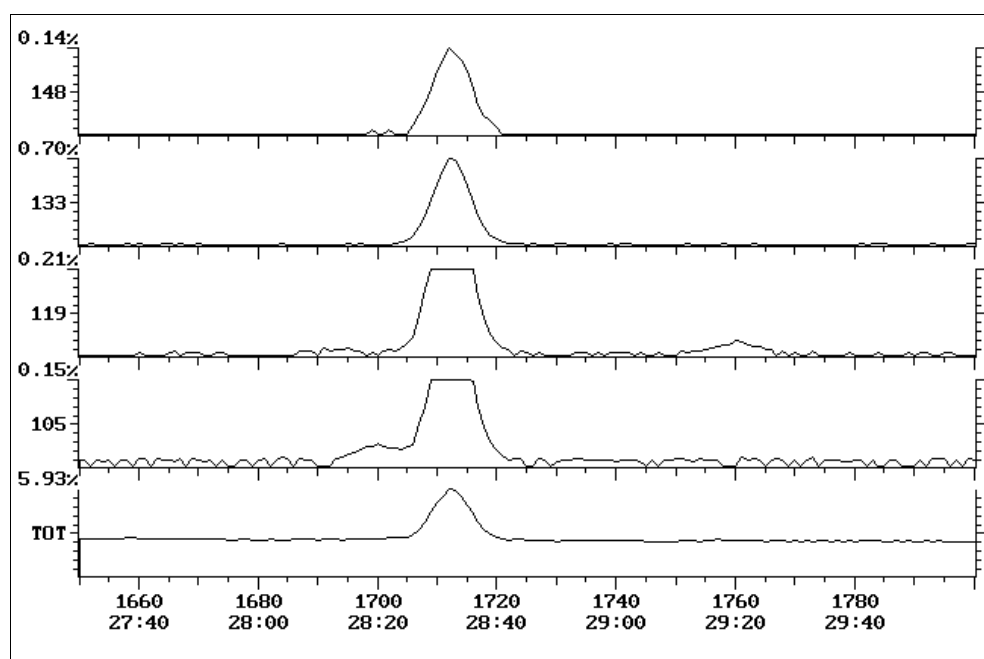


Abb. A.6: Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 6, System Nr. III, Starttemp. 50°C, 1° pro min. Aufheizrate.

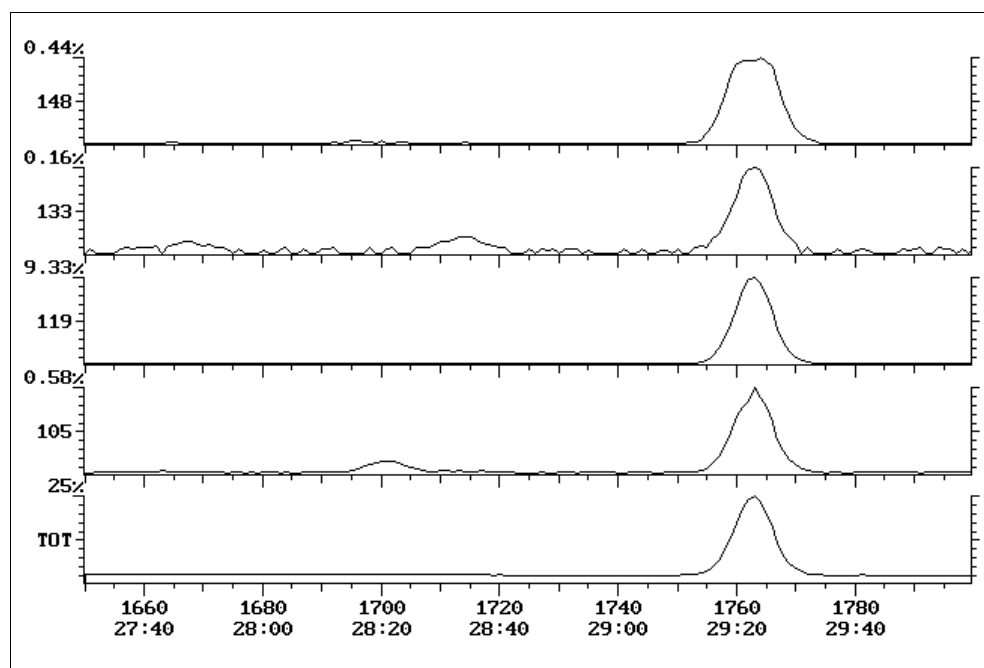


Abb. A.7: Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 7, System Nr. III, Starttemp. 50°C, 1° pro min. Aufheizrate.

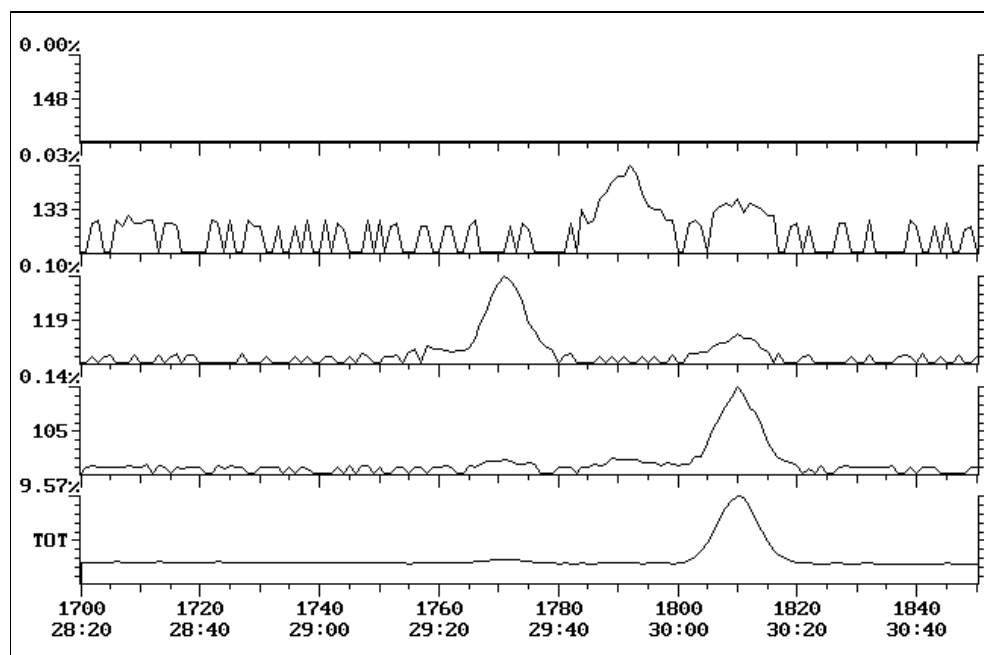


Abb. A.8: Chromatogramm mit SIM von Trap-Probe Nr. 8, System Nr. III, Starttemp. 50°C, 1° pro min. Aufheizrate.

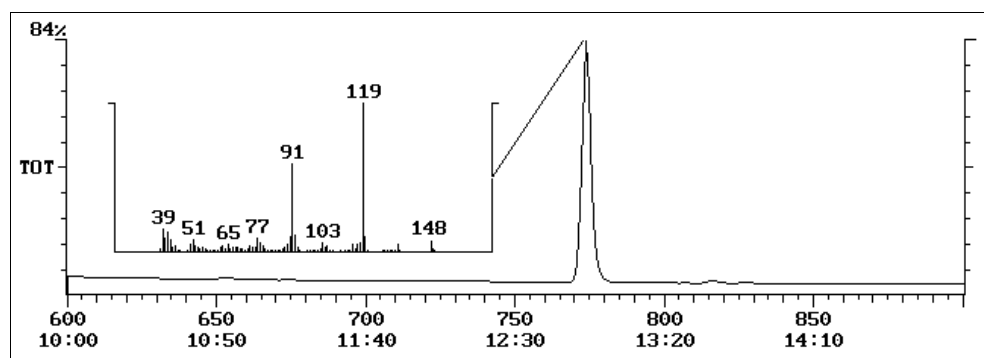


Abb. A.9: Chromatogramm mit Massenspektrum von (1,1-Dimethylpropyl)-benzol, System Nr. III, 50°C Starttemp., 3° pro min. Aufheizrate.

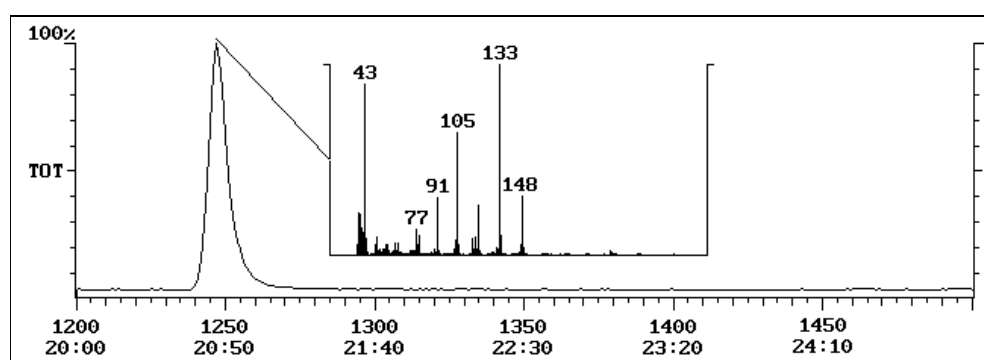


Abb. A.10: Chromatogramm mit Massenspektrum von Ethyl-2-isopropylbenzol, System Nr. III, 50°C Starttemp., 1° pro min. Aufheizrate.

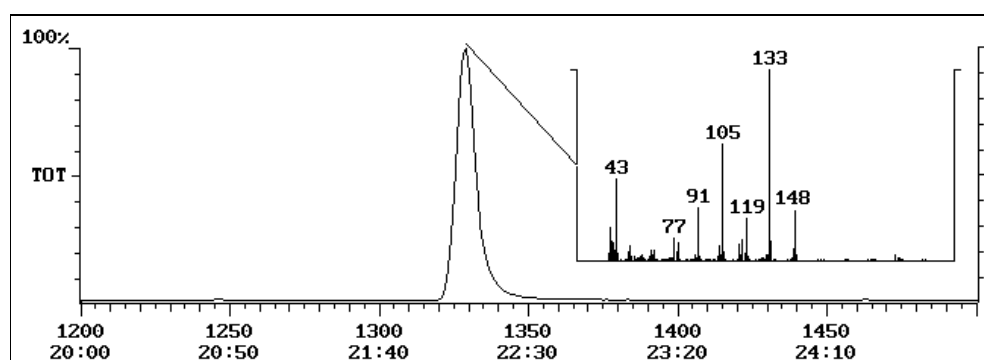


Abb. A.11: Chromatogramm mit Massenspektrum von Ethyl-4-isopropylbenzol, System Nr. III, 50°C Starttemp., 1° pro min. Aufheizrate.

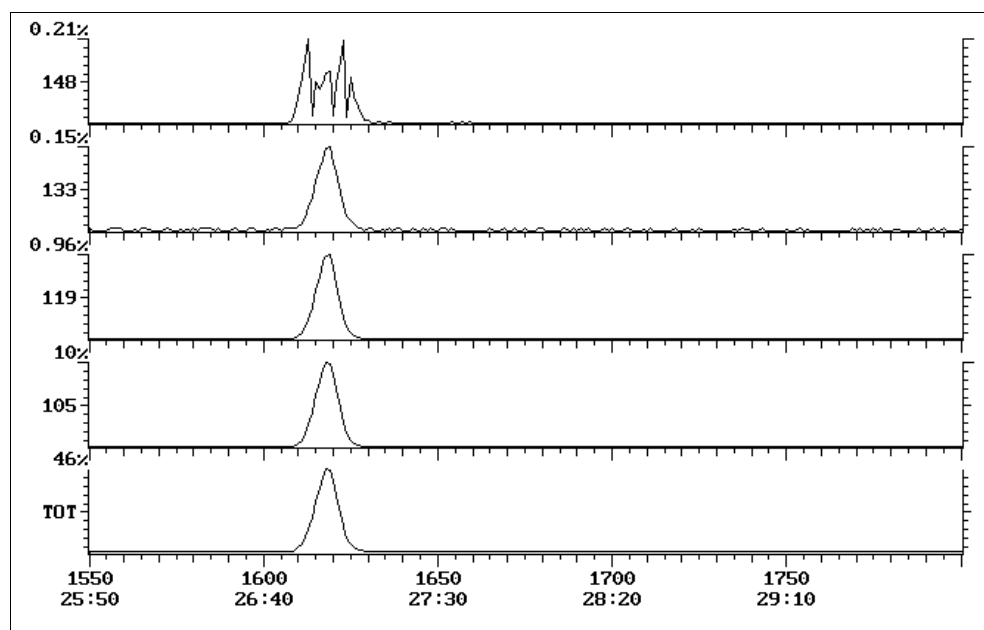


Abb. A.12: Chromatogramm von *n*-Butyl-3-methylbenzol-Trap,
System Nr. III, 50°C Starttemp., 1° pro min. Aufheizrate.

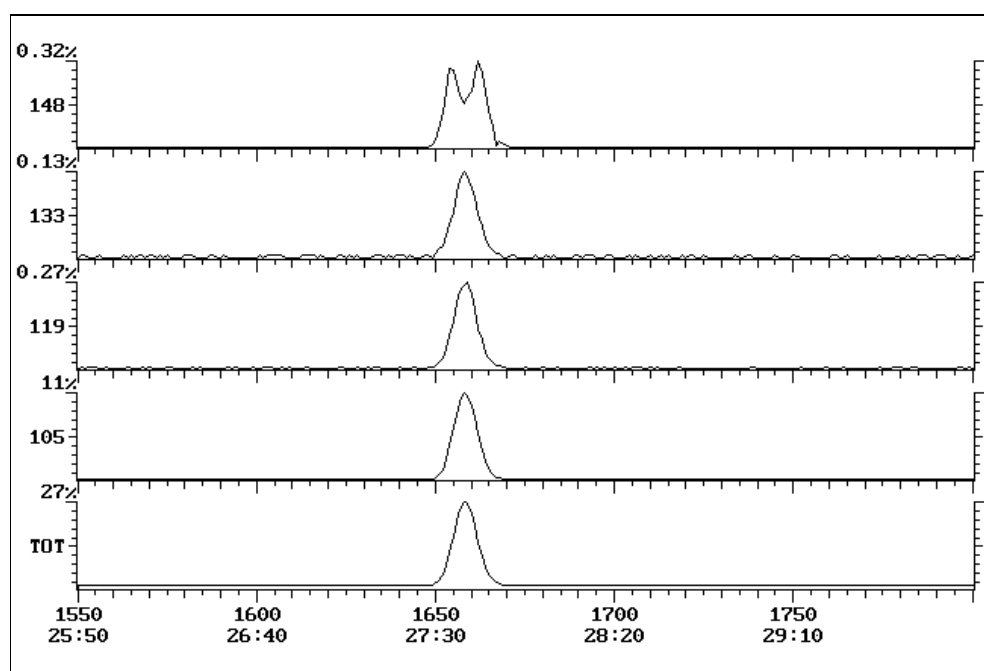


Abb. A.13: Chromatogramm von *n*-Butyl-4-methylbenzol-Trap,
System Nr. III, 50°C Starttemp., 1° pro min. Aufheizrate.

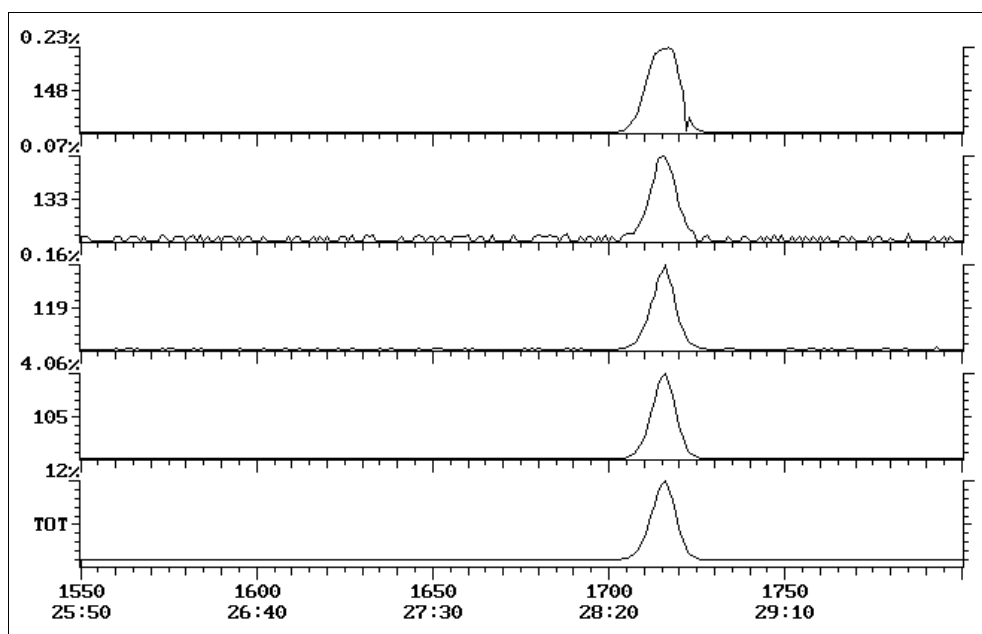


Abb. A.14: Chromatogramm von *n*-Butyl-2-methylbenzol-Trap,
System Nr. III, 50°C Starttemp., 1° pro min. Aufheizrate.

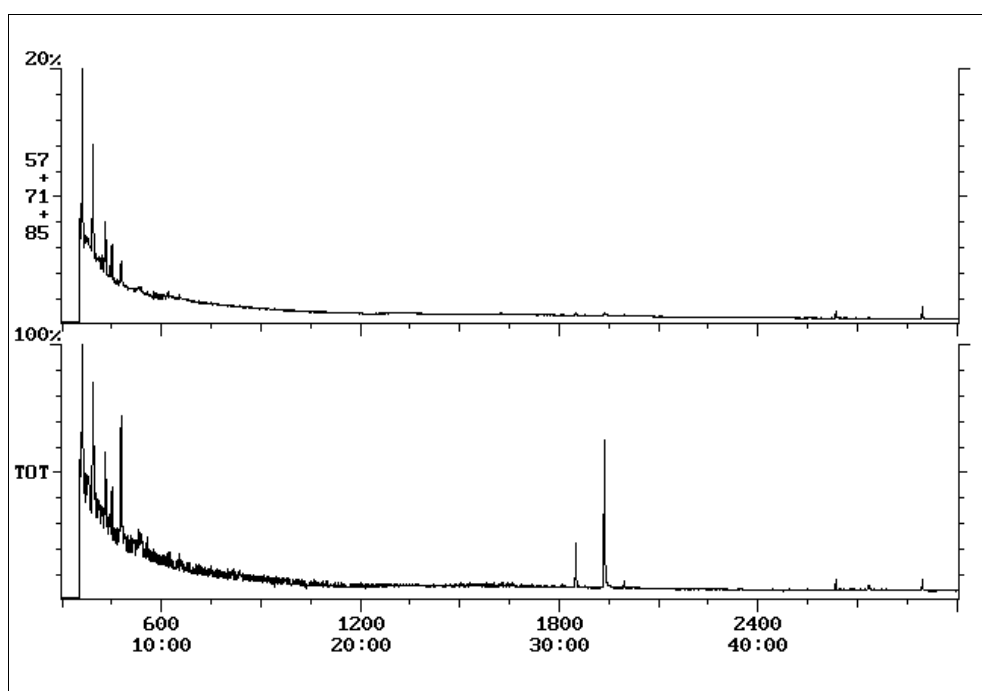


Abb. A.15: Chromatogramm von Weibchenschwärmwasser über C8-
Kartusche (SPE), System Nr. III, 50°C Starttemp., 3° pro min.
Aufheizrate.

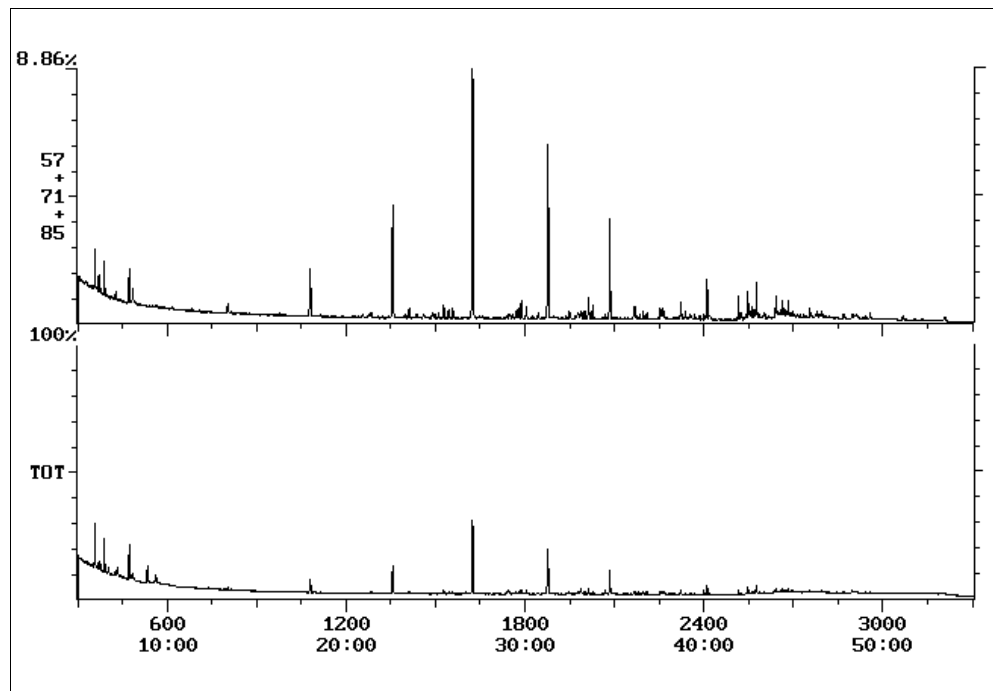


Abb. A.16: Chromatogramm einer ungereinigten Seewasserprobe über C8-Kartusche (SPE), System Nr. III, 50°C Starttemp., 1° pro min. Aufheizrate.

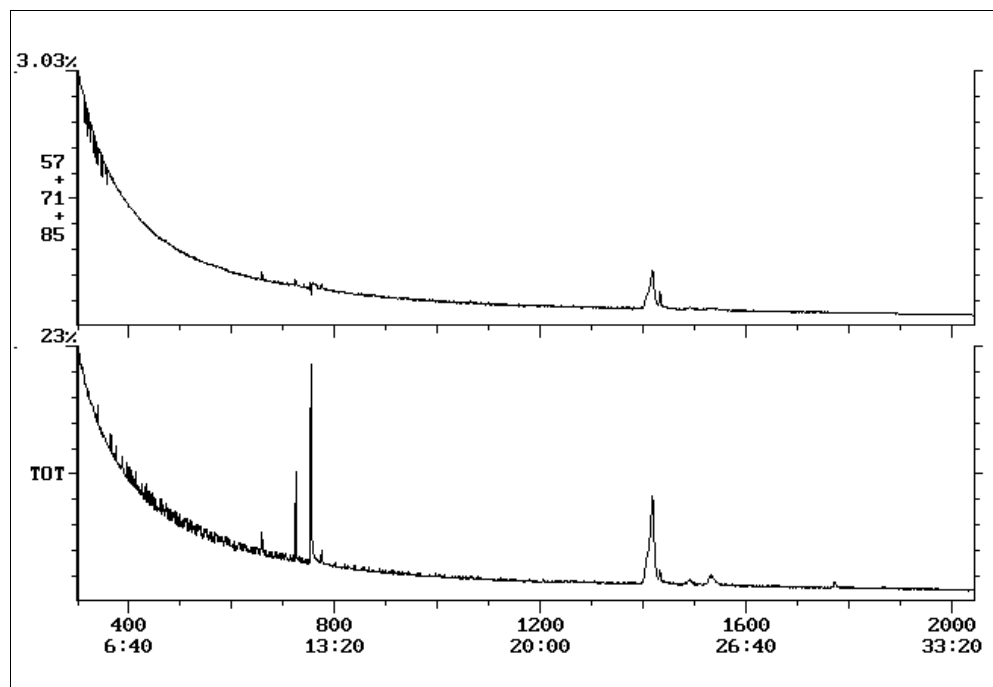


Abb. A.17: Chromatogramm von Eluat Nr. 3, gereinigte Seewasserprobe über C8-Kartusche (SPE), System Nr. III, 75°C Starttemp., 2 min. isotherm, 10° pro min. Aufheizrate.

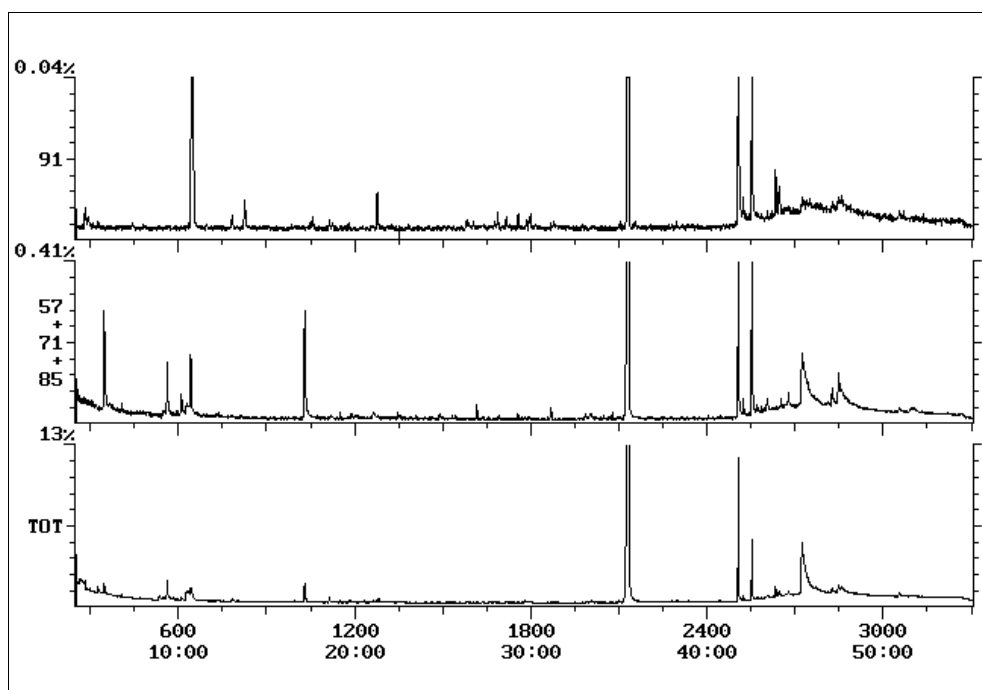


Abb. A.18: Chromatogramm mit SIM von Weibchenhomogenat über C8-Kartusche (SPE), System Nr. III, Starttemp. 50°C, 3° pro min. Aufheizrate.

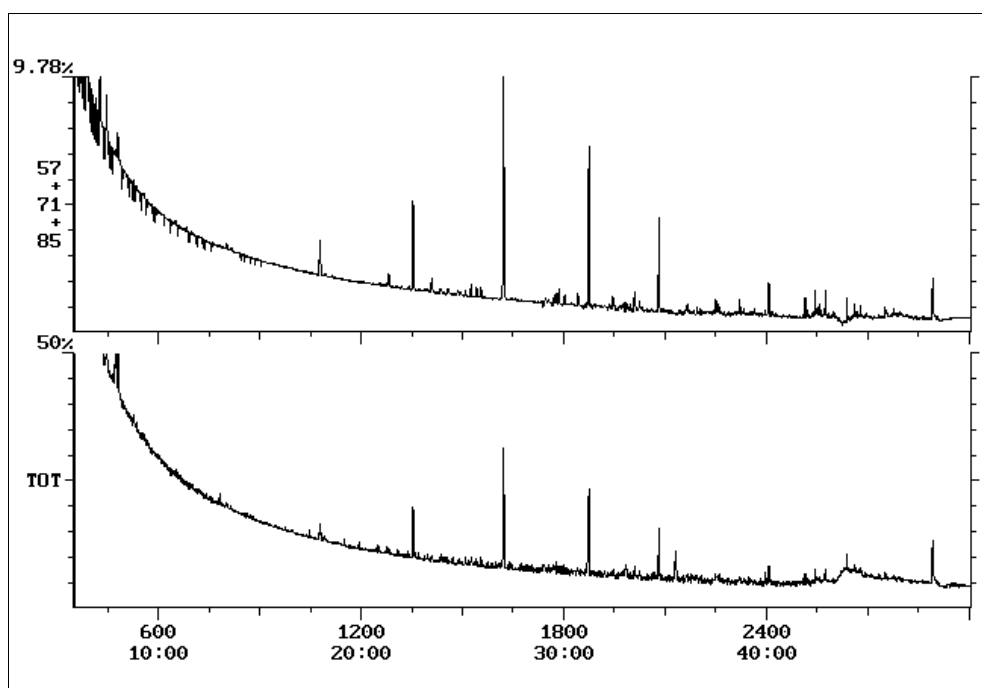


Abb. A.19: Chromatogramm mit SIM von Männchenhomogenat über C8-Kartusche (SPE), System Nr. III, Starttemp. 50°C, 3° pro min. Aufheizrate.

Lebenslauf

Name, Vornamen: Priesnitz, Frank Michael

Geburtsdatum: 18.10.1966

Geburtsort: Oldenburg / Niedersachsen

Familienstand: Verheiratet

Schulischer Werdegang:

1973 - 1977	Grundschule Drielake (Oldenburg)
1977 - 1979	Orientierungsstufe Osternburg (Oldenburg)
1979 - 1987	Cäcilienchule Oldenburg
1987	Abitur

Ersatzdienst:

1984 - 1992	Dienst in der Sanitätsbereitschaft im Katastrophenschutz der Stadt Oldenburg
-------------	--

Studium:

1987 - 1994	Studium an der Universität Oldenburg Fachrichtung Chemie. Thema der Diplomarbeit: <i>Identifikation und quantitative Erfassung von Sexualpheromonen von Nereiden interferierender Substanzen in niedrigsiedenden Fraktionen des „EKO-FISK“-Rohöl</i>
Seit April 1995	Promotion

Berufstätigkeit:

Seit November 1995	Anstellung als Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. E. Zeeck Physikalischen Chemie und Chemische Ökologie
--------------------	---

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Oldenburg, den 26. Januar 2000

Frank M. Priesnitz