

## **VI. Etablierung eines Dampfdruckgenerators für zukünftige Versuche mit flüchtigen Substanzen**

### **VI.1. Einleitung**

In der chemischen Kommunikation der Honigbienen sind Wachse als Träger für Signale und Erkennungsschlüssel von erheblicher Bedeutung (Kapitel I.5.). Auch wenn viele Substanzen direkt auf das Wachs übertragen werden, so spielt die Übertragung durch den Luftraum doch auch eine Rolle. Steinhoff fand schon 1947, daß die Haftdauer von Blütendüften und ätherischen Ölen auf Bienenkörpern durch die Wachs- bzw. Fettschicht des Chitins verlängert wird. Durch Waschungen der Bienen mit Chloroform wurde das Trägermaterial für Düfte (Kutikulawachs) von den Bienen entfernt. Dadurch verkürzte sich die Zeit, in welcher der Duft für die menschliche Nase noch wahrnehmbar war, auf annähernd die Hälfte der Haftdauer mit Kutikulawachs. Die Verbreitung der Königinsubstanz erfolgt im Stock, wenn auch nur zu einem kleinen Teil, ebenfalls über die Luft (Seeley 1979). Sie könnte also ebenso gut wie andere Düfte aus der Luft in das Wachs aufgenommen werden. Blüten-, Pollen- und Propolisduft auf einer Tänzerin werden als mögliche Erkennungsschlüssel für die Bienen postuliert (Seeley 1998). Die Frage ist nun, wie eine solche Aufnahme von Düften aus der Luft in das Wachs erfolgt und inwieweit diese Düfte vom Wachs ad-, absorbiert und wieder desorbiert werden. Es gibt nur sehr wenige Veröffentlichungen, in denen diese Problemstellung behandelt wird. In einer Untersuchung von Naumann et al. (1991) wurde die Übertragungsrates von tritiummarkierter 9-ODA (eine Komponente der Königinsubstanz) von der Königin auf das Wachs und von dort auf die Arbeiterinnen bestimmt. Allerdings beruhen diese Raten auf einem Kontakt der Königin und der Arbeiterinnen mit dem Wachs. Eine Übertragung durch die Luft wurde nicht berücksichtigt. Watmough entwickelte 1997 ein Modell für die Pheromontransmission in Bienenstöcken, basierend auf den Flußraten von Naumann et al. (1991). Eine Annahme des Modells besteht darin, daß das Pheromon von den Kutikulawachsen der Arbeiterinnen genauso absorbiert wird und durch das Wachs diffundiert wie bei den Königinnen. Bei den signifikanten Unterschieden in der Kettenlängenverteilung der Kutikulawachse dieser Kasten ist dies jedoch anzuzweifeln, da die Diffusion eines Moleküls durch das Wachs von der Kettenlänge des Wachses abhängt (Kirsch 1996).

Eine Untersuchung der Aufnahme von Substanzen aus der Luft in das Wachs ist nur möglich, wenn die Konzentration dieser Substanz in der Luft bekannt und konstant ist. Dies ist in einem geschlossenen System nicht möglich, da sich durch die Aufnahme der Substanz in das Wachs die Konzentration im Luftraum (Headspace) ständig ändert. Und in einem gesättigten

Effekt, d.h. es würden sich mehrere Schichten der Substanz auf dem Wachs bilden. Ein offenes System, in dem die Substanz immer wieder kontrolliert der durchströmenden Luft zudosiert wird, würde die oben genannte Bedingung der konstanten Konzentration erfüllen. Ein solches System wurde von Morabito et al. (1990) entwickelt und als Dampfdruckgenerator bezeichnet. Um zu überprüfen, ob ein solcher Dampfdruckgenerator für Adsorptions- und Absorptionsversuche bei Bienenwachsen geeignet wäre, wurde ein Dampfdruckgenerator leicht modifiziert nachgebaut.

## VI.2. Material und Methoden

Eine Apparatur zum Generieren von konstanten Konzentrationen eines mittel- bis schwerflüchtigen Stoffes in Luft (Dampfdruckgenerator) wurde nach Morabito et al. (1990) leicht verändert gebaut. Dazu wurde ein Trägergas ( $N_2$ ) über einen digitalen Flußregler (Typ F201C-FA-11-V, Durchfluß 0-20 ml/min, digitales Auswertesystem E-7500-10-AAA, Wagner Meß- und Regeltechnik, Offenbach) mit einem Fluß von 10-20 ml/min in eine Kupferrohr-Spirale eingeleitet, in einem umgebauten Gaschromatographie-Ofen (GC-Ofen) bis zur gewünschten Temperatur erwärmt und durch ein Desorptionsröhrchen geleitet. In diesem Desorptionsröhrchen konnten verschiedene auf Silica adsorbierte Substanzen eingebracht werden.

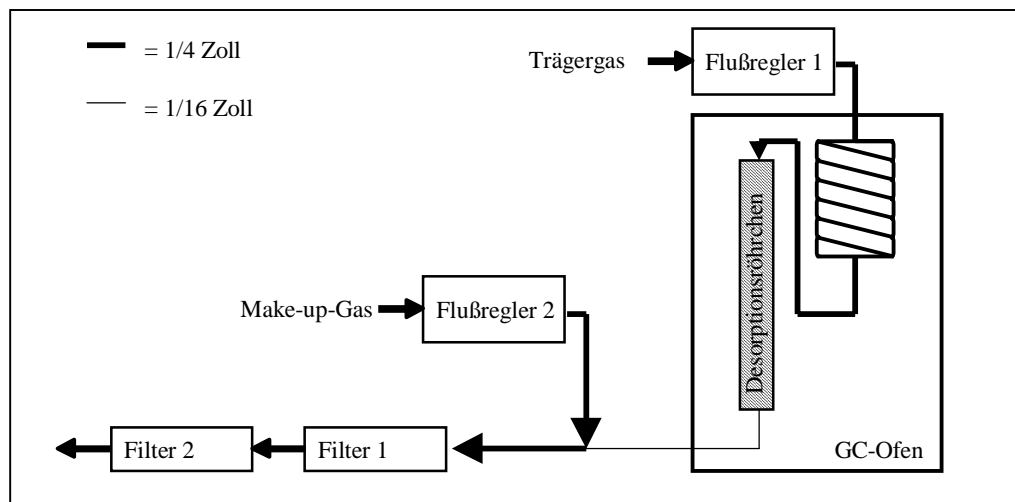


Abb. VI.1: Schematischer Aufbau eines Dampfdruckgenerators nach Morabito et al. (1990) unter Illustration der Flüsse von Trägergas ( $N_2$ : 10-20 ml/min) und Make-up-Gas (Luft: 100-1000 ml/min). Leitungen: Kupferrohre mit Swagelok-Verbinder, Filter und Desorptionsröhrchen: Glas.

Das Trägergas wurde in diesem Röhrchen mit der jeweiligen Substanz bis zur Sättigung beladen. Zu diesem gesättigten Trägergasstrom wurde außerhalb des Ofens Make-up-Gas (Luft) über einen digitalen Flußregler (Typ F201C-FA-11-V, Durchfluß 100-1000 ml/min, digitales Auswertesystem E-7500-10-AAA, Wagner Meß- und Regeltechnik, Offenbach) mit einem Fluß von 100-1000 ml/min zugeleitet.

Durch Veränderung des Make-up-Gasflusses konnte die Konzentration der Testsubstanz in der ausströmenden Luft variiert werden. Um die Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz in der ausströmenden Luft des Dampfdruckgenerators bestimmen zu können, wurden zwei Glasfilter mit einem geeigneten Filtermaterial (Tenax TA, 20/35 mesh, Alltech Associates. Inc., Deerfield, U.S.A.) dem System nachgeschaltet. (Abb. VI.1)

Tenax TA ist ein poröses Polymer auf der Basis von p-2,6-Diphenylphenylenoxid-Bausteinen und wurde ursprünglich für die Gaschromatographie entwickelt. Es ist aber auch zum Sammeln von organischen Dämpfen geeignet (Schoene et al. 1990, Maier and Fieber 1988). Sorptionsisotherme für Tenax finden sich in den Veröffentlichungen von Schoene et al. (1990), Vejrosta et al. (1989) und Vejrosta et al. (1990). Moritz und Crewe (1991) verwendeten Tenax, um flüchtige Substanzen einer lebenden Bienenkönigin zu bestimmen.

Für den Dampfdruckgenerator wurden pro Glasfilter 140 mg konditioniertes Tenax TA eingewogen. Der zweite Filter ermöglichte eine Kontrolle auf Durchbruch der Substanz im ersten Filter. Die Filter wurden nach dem Sammeln mit einem geeigneten Lösungsmittel ausgewaschen. Die erhaltene Lösung wurde mit einer bekannten Menge Standardsubstanz (Tetracosan) versetzt und die Menge der Testsubstanz gaschromatographisch bestimmt.

Als Testsubstanz zum Überprüfen der Funktionsfähigkeit des Dampfdruckgenerators diente Nonadecan (Reinheit >99,8%, Fluka, Deisenhofen). Zum Adsorbieren an Silicagel (70-230 mesh) wurde 0,3 g Nonadecan in 10 ml Diethylether gelöst und mit 10 g Silicagel versetzt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels bis zur Trockne wurde das beladene Silicagel in das Desorptionsröhrchen gefüllt und in den GC-Ofen eingebaut. Das Trägergas (N<sub>2</sub>) wurde mit einem Fluß von 20 ml/min in das System eingeleitet, die Ofentemperatur betrug konstant 50 °C und die Sammeltemperatur für die Filter betrug ca. 20 °C (Raumtemperatur). Der Fluß des Make-up-Gases (Luft) wurde variiert von 200-800 ml/min. Pro Messung wurde mit zwei aufeinanderfolgenden Filtern für 3-6 Stunden die ausströmende Luft gefiltert. Die Filter wurden mit je 20 ml Hexan gewaschen, die Lösung mit 3 µg Tetracosan versetzt und gaschromatographisch analysiert. Aus der Menge der Testsubstanz im Filter, der Sammeldauer und dem Gesamtfluß im System konnte die Konzentration der Substanz in der

### VI.3. Ergebnisse

Nonadecan konnte in der ausströmenden Luft des Dampfdruckgenerators in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Bei einem Make-up-Gasstrom von 200 ml/min betragen die Konzentrationen in Mittel 7,9 ng/l, bei 400 ml/min 3,6 ng/l und bei 800 ml/min 0,9 ng/l (Abb. VI.2). Nach Inbetriebnahme des Dampfdruckgenerators befand sich das System nach 2 Tagen im Gleichgewicht, d.h. daß erst nach 2 Tagen die Konzentrationen konstant gehalten werden konnten, davor erfolgte ein linearer Konzentrationsanstieg ( $r^2=0,959$ ).

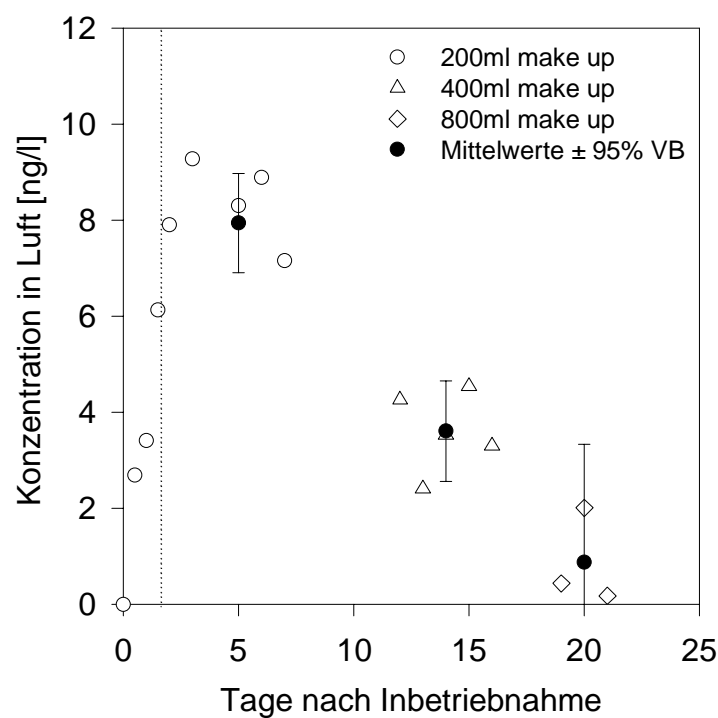


Abb. VI.2: Nonadecan-Konzentrationen in der Luft in Abhängigkeit von der Dauer der Inbetriebnahme, generiert mit dem Dampfdruckgenerator bei 50 °C Ofentemperatur, 20 °C Sammeltemperatur und 20 ml/min Trägergasfluß (N<sub>2</sub>) und bei verschiedenen Make-up-Gasflüssen. Die durchbrochene Linie zeigt den Beginn des Gleichgewichtszustandes an, davor erfolgte ein linearer Konzentrationsanstieg.

#### VI.4. Diskussion

Mit Hilfe des Dampfdruckgenerators lassen sich konstante und reproduzierbare Konzentrationen von mittel- bis schwerflüchtigen Substanzen in Luft erzeugen (Morabito et al. 1990, Abb. VI.2 und VI.3).

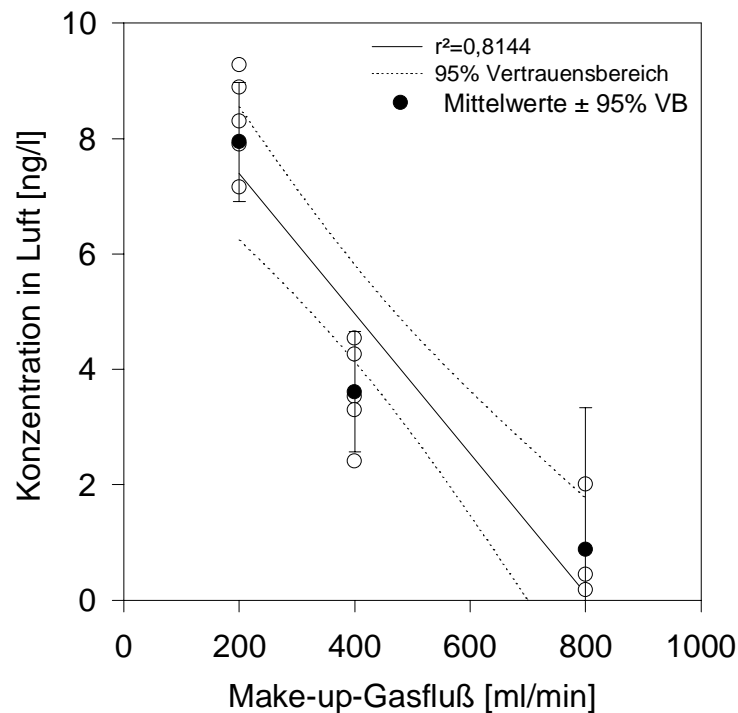


Abb. VI.3: Nonadecan-Konzentrationen in der Luft in Abhängigkeit des Make-up-Gasflusses, generiert mit dem Dampfdruckgenerator bei 50 °C Ofentemperatur, 20 °C Sammeltemperatur und 20 ml/min Trägergasfluß (N<sub>2</sub>).

Bei der Auftragung der Nonadecan-Konzentration in Abhängigkeit des Make-up- Gasflusses (Abb. VI.3) zeigt sich, daß die Konzentration nicht exakt linear ( $r^2=0,8144$ ) vom Make-up-Gasfluß abhängt. Dies liegt wahrscheinlich nicht an einer unterschiedlichen Konzentration des Nonadecans im Trägergas, denn das Trägergas sollte bei einem so geringen Fluß mit Nonadecan gesättigt sein (Morabito et al. 1990), sondern eher an den technischen Gegebenheiten, also der Genauigkeit und dem Zusammenspiel der hier eingesetzten Flußregler. Vor den eigentlichen Versuchen sollten somit mit einer Eichreihe die tatsächlichen Konzentrationen bei dem jeweiligen Make-up-Gasfluß bestimmt werden.

Mit Hilfe einer solchen Eichmessung können die Konzentrationen in der Luft allein über die Dosierung des Make-up-Gases gut eingestellt werden, und diese Konzentrationen können über Tage bis sogar Wochen konstant gehalten werden.

Somit läßt diese Apparatur Versuche zu, bei denen Messungen über mehrere Tage vorgenommen werden müssen, z.B. Sorptionsversuche mit Pheromonen oder Düften für Bienenwachs. Dabei könnte Wachs mit Pheromonen oder Pheromonkomponenten (z.B. Königinsubstanz), die über den Dampfdruckgenerator in konstanter Konzentration in die Luft gebracht wurden, in einer Probenkammer beladen werden. Mit diesem offenen System wäre das Problem der Sättigung der Luft mit Pheromon oder eines Konzentrationsgradienten mit der Zeit (bei geschlossenen Systemen) zu vermeiden. Allerdings müßte auf eine genügende Durchmischung der Luft und damit auf eine Vermeidung von Grenzschichteffekten in der Probenkammer geachtet werden. Es müßte möglich sein, für Düfte und Pheromone bzw. Pheromonkomponenten Diffusionskoeffizienten im Wachs und Wachs-Luft-Verteilungskoeffizienten zu bestimmen. Auch könnte man mit einer Kombination aus Dampfdruckgenerator und Verhaltensversuchen Reizschwellen für die Bienen bestimmen, ab denen ein Duft im Wachs gerade noch wahrnehmbar ist. Diese Versuche würden einen weiteren Einblick in die Rolle des Wabenwachses als Kommunikationsmedium der Bienen ermöglichen.

Eine weitere Möglichkeit, den Dampfdruckgenerator zu nutzen, bestände darin, in das Desorptionsröhrchen Wabenwachs oder Bienen einzubringen. Damit könnten die Abdampfungen von Wabenwachs und Bienen untersucht werden. Allerdings würde dabei der Schritt über die Auswaschung und Aufnahme der Substanzen in Lösungsmittel weiterhin benötigt. Eine bessere Methode wäre die Solid Phase Microextraction (SPME), bei der Substanzen an eine Faserummantelung adsorbiert werden. Dabei wird die Faser der Probe oder deren Headspace ausgesetzt und danach direkt in den Injektor des Gaschromatographen eingebracht und desorbiert. Dies erlaubt eine Auftrennung und die quantitative und qualitative Bestimmung von Substanzen in einem Schritt (Pawliszyn 1997). Diese einfache Methode ermöglicht eine Aufkonzentrierung von Spuren von Komponenten aus der Luft ohne Lösungsmittel. Die SPME ist gerade für lebende Organismen geeignet, da keine Wasseraufnahme in die Faser erfolgt. Somit stellt die SPME eine Möglichkeit zur Identifizierung unbekannter Substanzen dar, die in situ gesammelt wurden. (Auger et al. 1998) Ein Nachteil dabei ist, daß die Ummantelungen der SPME-Fasern selektiv für bestimmte Substanzklassen sind und ein generelles Screening nach unbekanntem Substanzen