

Bestimmung der Herkunft von Steroidhormonen

**ERARBEITUNG EINER METHODE ZUR
PROBENAUFARBEITUNG VON RINDERFAECES
FÜR DIE GC-C-IRMS ANALYTIK**

vorgelegt von

Staatlich geprüfter Lebensmittelchemikerin

Anja Weltring

aus Hannover

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technische Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

-Dr. rer. Nat.-

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzende: Professor Dr. A.Hartwig

Berichter: Professor Dr. A.W. Kroh

Berichter: Professor Dr. R. Wittkowski

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 06. Dezember 2004

Berlin 2004

D 83

ABSTRACT

In the context of the EU-project “ISOSTER - Determination of the Origin of Hormones in Cattle” (funded by the European Commission, DG RTD “Growth” Programme, Project No. GRD1-2001-40085) a method was developed and validated to extract steroids from cattle faeces for GC-C-IRMS analysis. The aim of this GC-C-IRMS analysis is the detection of an administration of natural steroid hormones by isotope ratios. This method is principally based on the assumption of an alteration of isotope ratios through an administration. Whereas isotope ratios of the precursors reflect the animals’ basic value, isotope ratios of hormones and metabolites are influenced by the substance that was administered.

Since the GC-C-IRMS measurements demand very clean extracts, the developed clean up procedure consists of different extensive purification steps to meet these requirements.

The method consists of an extraction step with methanol by soxhlet or accelerated solvent extraction followed by precipitation and filtration. Filtrates are purified on polymer based solid phase extraction columns. Sulphate conjugates of steroids are hydrolysed with sulphuric acid in ethyl acetate and the extracts are washed with sodium hydroxide solution. The organic layer is further purified on an HPLC gradient system by an enrichment of the analytes on a restricted access material precolumn prior to their separation on a reversed phase material. The steroids are collected and the fractions are acetylated. The acetates are further separated and purified on a second reversed phase HPLC system. The steroids in the collected fractions of the second HPLC step are extracted with n-hexane. They are first analysed by GC-MS to confirm their identity subsequently followed by GC-C-IRMS analysis.

The high requirements of GC-C-IRMS measurements on sample clean up, including high purity of extracts, prevention of isotopic discrimination and an sufficient amount of target analytes in the extracts of above 10 ng, are met by the method developed for at least one precursor and several hormones or their metabolites. In validation experiments it could be shown that the requirements on purity lead to a loss in recovery of analytes. No discrimination of isotopes during the clean up for dehydroepiandrosterone, 17 α -estradiol, progesterone, epiandrosterone and etiocholanolone occurred. Dependent on the concentration of the steroid, the extraction of up to 100 g of cattle faeces can be necessary to reach sufficient amounts of target steroids in the extracts. Due to the complex sample preparation the method is not suitable for routine analysis of large sample numbers, but it enables measurements of isotope ratios of at least one precursor and several hormones and metabolites.

DANKSAGUNG

Frau Professor Dr. Hartwig, Herrn Professor Dr. Kroh und Herrn Professor Dr. Wittkowski herzlichen Dank.

Danken möchte ich Frau Dr. Preiß-Weigert am Bundesinstitut für Risikobewertung für die Bereitstellung des Themas sowie die Betreuung der Arbeit.

Finanziert und durchgeführt wurde diese Arbeit im Rahmen des EU-Projektes “ISOSTER - Determination of the Origin of Hormones in Cattle” (Funded by the European Commission, DG RTD “Growth” Programme, Project No. GRD1-2001-40085).

Besonders danken möchte ich Herrn W. Heil und Frau A. Sönmez für die tatkräftige Unterstützung bei den Aufarbeitungen und Messungen, sowie allen Kollegen am Bundesinstitut für Risikobewertung für die gute Zusammenarbeit.

Frau Lang herzlichen Dank für die IRMS-Messungen und die nette und konstruktive Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Höfler von der Fa. Dionex danke ich für die Einarbeitung in die ASE und das Interesse an dieser Arbeit.

Den Mitarbeitern des Versuchsguts, besonders Frau Dr. Banneke, für die Durchführung der Tierexperimente und die gute Zusammenarbeit vielen Dank.

Ebenfalls ein Dank an Herrn Bahn für die Gefriertrocknung der Proben.

Leonie, der Dicken, den vier Grazien, Spike, Wolli, Katschi, Andi, Uwe, Tom und Jerry danke ich für die Produktion von viel inhaltsreichem Probenmaterial.

Meinen Eltern und Freunden lieben Dank für die unendliche Geduld, wenn in den letzten Jahren die Ergebnisse verwirrend und das Chaos groß war.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	GRUNDLAGEN	3
2.1	Steroidhormone	3
2.2	Chemisch-physikalische Eigenschaften der Steroide	6
2.3	Biosynthese und Metabolismus	11
2.4	Isotopenverhältnisse und deren Messung	14
2.5	Auswahl geeigneter Zielanalyten	15
2.6	Strategien zur Probenaufarbeitung	18
2.7	Grundschemata der Aufarbeitungsmethode	19
3	ERGEBNISSE	20
3.1	Extraktion	20
3.1.1	Extraktion nach Soxhlet	20
3.1.2	Optimierung einer beschleunigten Lösemittlextraktion	22
3.2	Hydrolyse gebundener Steroide	25
3.3	Festphasenextraktion	26
3.3.1	Vergleich verschiedener Materialien	26
3.3.2	Aufreinigungsverhalten verschiedener Materialien	32
3.4	Flüssig-Flüssig-Extraktion	35
3.5	HPLC	36
3.5.1	Phasenmaterialien und Fließmittel	37
3.5.2	Peakparameter	41
3.5.3	Detektierbarkeit/Nachweisgrenzen	43
3.5.4	Fraktionierung	45
3.5.5	Restricted Access Material-Vorsäule	46
3.5.6	Acetate	48
3.6	Steroidprofile	52
3.6.1	Qualitative Messungen	52
3.6.2	Semi-quantitative Messungen	53
3.7	Validierung	54
3.7.1	Wiederfindungen	56
3.7.2	Isotopendiskriminierung	57
3.7.3	Wiederholbarkeit	58
4	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	65
4.1	Extraktion	65

4.2	Hydrolyse.....	67
4.3	Festphasenextraktion	68
4.4	Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	72
4.5	HPLC	73
4.6	Untersuchungen von Steroidmustern in Faecesproben mittels GC-MS	79
4.7	Validierung.....	80
5	EXPERIMENTELLER TEIL	83
5.1	Faecesproben.....	83
5.2	Reagenzien.....	84
5.3	Geräteparameter	87
5.4	Durchführung der Experimente	94
5.4.1	Extraktion	94
5.4.2	Hydrolyse	97
5.4.3	SPE	99
5.4.4	Flüssig-Flüssig-Extraktion	102
5.4.5	HPLC	104
5.4.6	Steroidprofile.....	111
5.4.7	Validierung.....	114
6	ZUSAMMENFASSUNG	117
7	LITERATURVERZEICHNIS	119

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abbildung 2-1.	Steuerung von Hormonvorgängen im Körper.....	4
Abbildung 2-2.	Steroidgrundgerüst	6
Abbildung 2-3.	Stellung der Ringe A und B im Steroidgerüst.....	6
Abbildung 2-4.	Biosynthese und Metabolismus der Steroide	13
Abbildung 2-5.	Aufarbeitungsstrategie Rinderfaeces.	19
Abbildung 3-1.	Extraktionsausbeute mit unterschiedlichen Lösungsmitteln.	21
Abbildung 3-2.	Temperaturabhängigkeit der Extraktionsausbeute.....	23
Abbildung 3-3.	RP-HPLC-Chromatogramme der Temperaturoptimierung	24
Abbildung 3-4.	RP-HPLC Chromatogramme der ASE Zellfüllungsversuche.	24
Abbildung 3-5.	Extraktionsausbeuten bei unterschiedlichen Zellfüllungen.....	25
Abbildung 3-6.	Steroidgehalte in hydrolysierte und nicht hydrolysierte Teilprobe.	26
Abbildung 3-7.	Elutionsmuster von Aminopropylmaterialien.	27
Abbildung 3-8.	Elutionsmuster von Umkehrphasenmaterialien auf Kieselgelbasis.	28
Abbildung 3-9.	Elutionsmuster von Umkehrphasenmaterialien auf Polymerbasis.....	29
Abbildung 3-10.	Wiederfindungen nach SPE an RP-Materialien auf Kieselgelbasis.	30
Abbildung 3-11.	Wiederfindungen nach SPE an RP-Materialien auf Polymerbasis.....	31
Abbildung 3-12.	Wiederfindungen nach SPE an Aminopropylmaterialien.	32
Abbildung 3-13.	Chromatogramme Methanolextrakt aufgereinigt – nicht aufgereinigt	33
Abbildung 3-14.	Wiederfindungen nach Waschschritten auf OnGuardII-RP-Material.....	34
Abbildung 3-15.	Ermittelte Gehalte nach Aminophasen-SPE und LLE.....	36
Abbildung 3-16.	Retentionszeiten einzelner Steroide auf CN-Material.....	37
Abbildung 3-17.	Retentionszeiten einzelner Steroide für Gradientensysteme	39
Abbildung 3-18.	Einfluss der Säulentemperatur auf die Auflösung von Analytpaaren.....	39
Abbildung 3-19.	Retentionszeiten einzelner Steroide auf CN-Material.	40
Abbildung 3-20.	Variablen zur Bestimmung der Peakparameter.	41

Abbildung 3-21.	Fraktionierung auf RP8-Material.	46
Abbildung 3-22.	Wiederfindung nach verschiedenen Waschzeiten mit RAM-Vorsäule	47
Abbildung 3-23.	HPLC-Chromatogramme acetylierter und nicht acetylierter Standards .	49
Abbildung 3-24.	Fraktionierung auf RP8-Material nach Acetylierung.....	49
Abbildung 3-25.	Steroidgehalte nach unterschiedlichen HPLC-Aufarbeitungen.	51
Abbildung 3-26.	Gehalte einzelner Steroide vor und nach Behandlung mit Estradiol.	54
Abbildung 3-27	Fließschema Aufarbeitung Rinderfaeces für GC-C-IRMS-Analytik.....	55
Abbildung 3-28.	Wiederfindungen der Zielanalyten	56
Abbildung 3-29.	$\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Diskriminierungsversuche	58
Abbildung 3-30.	Relative Intensitäten der Qualifierionen.....	60
Abbildung 3-31.	GC-MS Chromatogramm der Androst-5-en-3 β ,17 β -diol-Fraktion	61
Abbildung 3-32.	GC-MS Chromatogramme der DHEA- und 17 α -Estradiol-Fraktion	61
Abbildung 3-33.	GC-C-IRMS-Chromatogramm DHEA-Fraktion.....	62
Abbildung 3-34.	$\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Wiederfindungsversuche	64

VERZEICHNIS DER TABELLEN

Tabelle 2-1. Physikalische und analytische Daten ausgewählter Steroide.....	7
Tabelle 2-2. Auswahlkriterien für Zielanalyten.	17
Tabelle 3-1. Gradientensysteme für Umkehrphasenmaterialien.	38
Tabelle 3-2. Peakparameter für Säulenmaterialien unter Normalphasen-Bedingungen.	43
Tabelle 3-3. Signal/Rauschverhältnis verschiedener Steroide	44
Tabelle 3-4. Retentionszeiten und Flächen nach Injektion auf eine RAM-Vorsäule.....	48
Tabelle 3-5. Retentionszeiten und MS-Daten einzelner Steroide.....	52
Tabelle 3-6. Relative Ionenintensitäten.....	59
Tabelle 3-7. Wiederholbarkeit: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte, Mittelwerte und Standardabweichung.	63
Tabelle 5-1. Codierung der Faecesproben.....	83
Tabelle 5-2. Standardsubstanzen.	84
Tabelle 5-3. Standardlösungen	85
Tabelle 5-4. Reagenzien und Lösungsmittel	86
Tabelle 5-5. Verwendete Geräte.....	87
Tabelle 5-6. Gradientensysteme für Umkehrphasenmaterialien	105
Tabelle 5-7. Waschzeiten und Fließmittelzusammensetzung für RAM-Vorsäule.....	107

VERZEICHNIS DER GLEICHUNGEN

Gleichung 2-1. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis vsPDB	14
Gleichung 3-1. Asymmetrie	42
Gleichung 3-2. Theoretische Böden	42
Gleichung 3-3. Fraktionsanfang	45
Gleichung 3-4. Fraktionsende	45
Gleichung 3-5. Standardabweichung.....	62

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

ADS	Alkyl Diol Silica	Steroide:	
GC-C-IRMS	Kopplung Gaschromatographie mit Isotopenmassenspektrome- trie (gas chromatography- combustion-isotope ratio mass spectrometry)	5α-DHT	Androst-5-en-3 β ,17 β -diol
		α-E2	17 α -Estradiol
		β-E2	17 β -Estradiol
		DHEA	Dehydroepiandrosteron
		E1	Estron
GC-MS	Kopplung Gaschromatogra- phie mit Massenspektrome- trie (gas chromatography- mass spectrometry)	EA	Epiandrosteron
		ET	17 α -Testosteron
		Etio	Etiocholanolon
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie (high performance liquid chromatography)	P	Progesteron
		Preg	Pregnenolon
		T	17 β -Testosteron
LC	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)		
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion (liquid-liquid-extraction)		
RAM	Restricted Access Material		
RP	Umkehrphase (reversed phase)		
RP8	Umkehrphasenmaterial mit Octylketten (reversed phase)		
SIM	Single Ion Monitoring		
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)		
UV	Ultraviolett		

1 EINLEITUNG

Steroide sind im Tier- und Pflanzenreich als Hormone weit verbreitet. Eine wichtige Klasse der Steroidhormone im Tierreich sind die Geschlechtshormone. Sie werden beispielsweise als Therapeutika eingesetzt. Einige Steroide führen zu einem verbesserten Muskelaufbau und finden aufgrund dieser anabolen Wirkung auch als Masthilfe in der Viehwirtschaft [MARCHAND P, ET AL (2000)] oder als Dopingmittel im Sport [LEVESQUE J-F, ET AL (2002)] Anwendung.

Manche Steroidhormone stehen in Verdacht, neurobiologische, genotoxische und karzinogene Eigenschaften zu besitzen. Aufgrund dieser möglichen gesundheitlichen Risiken für den Verbraucher sind in der EU seit 1988 Stoffe mit hormonaler Wirkung als Wachstumsförderer in der Tiermast verboten [Richtlinie des Rates 96/22/EG]. In den USA und Kanada ist die Verwendung einiger dieser Substanzen in der Viehwirtschaft weiterhin erlaubt. Diese Länder protestierten daher gegen das für die EU bestehende Einfuhrverbot von mit Hormonen als Wachstumsförderer behandelten Tieren und deren Produkten. Es kam zu einer Auseinandersetzung mit der EU vor der Welthandelsorganisation (WTO). Die Regelungen der EU wurden dabei 1998 aufgrund einer zu allgemeinen Risikobewertung als nicht konform mit den Anforderungen des „Sanitary and Phytosanitary Agreements“ befunden [EUROPÄISCHE KOMMISSION, IP/02/604, 22.04.2002]. Der wissenschaftliche Ausschuss für Veterinärmaßnahmen im Zusammenhang mit der öffentlichen Gesundheit (SCVPH) gab daraufhin 1999 eine Stellungnahme zu diesen Substanzen ab. 17 β -Estradiol sei danach als karzinogen einzustufen und für die anderen Substanzen sei von einem Risiko für den Verbraucher auszugehen, welches aber nicht quantifiziert werden könne. [EUROPÄISCHE KOMMISSION, SCVPH OPINION 30/04/99]. Nach erneuter wissenschaftlicher Begutachtung bestätigt das SCVPH 2000 und 2002 seine Stellungnahme [EUROPÄISCHE KOMMISSION, SCVPH 03/05/2000 und EUROPÄISCHE KOMMISSION, SCVPH OPINION 10/04/2002]. Die Regelungen der Richtlinie des Rates 96/22/EG über das Verbot bestimmter Substanzen mit hormonaler oder thyreostatischer Wirkung und β -Agonisten in der Viehwirtschaft wurden 2003 vom Europäischen Parlament und dem Rat durch eine weitere Richtlinie 2003/74/EG ergänzt, die die Empfehlungen der WTO Appellate Body Entscheidung von 1998 berücksichtigt. In dieser Richtlinie wird das Verbot von Substanzen mit hormoneller Wirkung als Wachstumsförderer in der Tiermast bestätigt und die Verwendung des 17 β -Estradiols auch als Therapeutikum in der Viehwirtschaft weiter eingeschränkt.

Daher ist die Entwicklung geeigneter Methoden zum Nachweis einer Behandlung mit Hormonen notwendig, einerseits um die Einhaltung der Regelungen innerhalb der EU zu kontrollieren, aber auch, um Einfuhrkontrollen für tierische Produkte aus Drittländern zu ermöglichen.

Da Estradiol, Testosteron und Progesteron von den Tieren auch ohne Behandlung gebildet werden und diese mit den verabreichten Hormonen chemisch identisch sind, ist der Nachweis einer Behandlung mit herkömmlichen Methoden wie beispielsweise GC-MS über den bloßen Nachweis der Substanzen nicht möglich. Auch die Festlegung von Grenzwerten ist aufgrund der Schwankungen der endogenen Gehalte der Substanzen nicht realisierbar [FERCHAUD V, ET AL (2000)]. Es ist daher dringend erforderlich, andere Verfahren zu entwickeln.

Im Rahmen des EU-Projekts "ISOSTER - Determination of the Origin of Hormones in Cattle" (Funded by European Commission, DG RTD "Growth" Programme, Project No. GRD1-2001-40085) soll eine GC-C-IRMS-Methode entwickelt werden, die einen Nachweis von in der Tiermast angewendeten natürlichen Steroidhormonen über das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis ermöglicht. Im Sportdoping wie auch bei Rindern wurden in Urinproben bereits Isotopenmessungen von Steroiden durchgeführt [BECCHI M, ET AL (1994) und PRÉVOST S, ET AL (2001)]. Über solche Messungen in Faeces liegen dagegen noch keine Daten vor. Rinderfaeces ist jedoch aufgrund seiner leichteren Zugänglichkeit bei der Probennahme eine mögliche Alternative zum Urin.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer Aufarbeitungsmethode zur anschließenden Bestimmung der Isotopenverhältnisse von Steroiden in Rinderfaeces. Dies beinhaltet auch die Prüfung der Eignung von Rinderfaeces als Probenmatrix. Da im Faeces andere Metaboliten vorliegen als im Urin ist eine Aussage über die Eignung dieser Matrix zur Unterscheidung einer exogenen von einer endogenen Herkunft der Steroide erst nach Untersuchungen von Stabilisotopenverhältnissen der Steroide in dieser Matrix möglich.

Die IRMS-Messung stellt hohe Anforderungen an die zu messenden Extrakte. Während der gesamten Aufarbeitung darf es beispielsweise bei einer HPLC-Fraktionierung nicht zu einer Diskriminierung der schwereren oder leichteren Kohlenstoffatome kommen. Pro Injektion werden mindestens 10 ng Analyt benötigt, wobei die Extrakte eine Reinheit aufweisen müssen, die im GC eine vollständige Abtrennung der Analyten von allen anderen Komponenten ermöglicht. Die Probenaufarbeitung ist daher der zentrale Aspekt der Gesamtmethode und Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

2 GRUNDLAGEN

2.1 Steroidhormone

Das Hormonsystem dient der Informationsübertragung im Körper. Die Hormone sind dabei die Botenstoffe, die die Informationen zu den Zielzellen transportieren, wobei sie bereits in geringsten Mengen wirken. Der Körper höherer Wirbeltiere erzeugt die Hormone in speziellen Drüsen oder Geweben aus mit der Nahrung aufgenommenen Vorläufersubstanzen. Die gebildeten Hormone werden über das Blut zu den Zielzellen transportiert. Zum Transport innerhalb des Körpers über den Blutkreislauf sind Steroidhormone meist an Carrierproteine gebunden [NOZAKI O (2001)].

Die Hormone sind nicht art- aber wirkungsspezifisch. Ihre spezifische Wirkung ist dadurch bedingt, dass Hormonrezeptoren, also Proteine, an die die Hormone binden können, nur in den jeweiligen Empfängerzellen vorkommen. Die Steroidhormone dringen im Gegensatz zu den Peptid- und Proteinhormonen, die bereits an der Zellmembran an Rezeptorproteine gebunden werden, in die Zelle ein. An die Rezeptoren gebunden können sie im Zellkern als Hormon-Rezeptor-Komplex bestimmte Gene aktivieren.

Die Möglichkeit der Änderung der Hormonkonzentration im Körper ist die Voraussetzung für die Steuerung bestimmter Organfunktionen. Durch Abbauvorgänge von im Blut kreisenden Hormonen ist der Körper in der Lage, die Konzentration eines Hormons zu verringern. Die Inaktivierung der Steroidhormone erfolgt in der Leber, die Ausscheidung der Hormone selbst oder ihrer Metaboliten dann hauptsächlich über Nieren und Urin [TAYLOR W (1971)]. Zur leichteren Ausscheidung werden die Steroidhormone hierbei zu einem großen Teil in eine wasserlösliche Form zu Glucuroniden oder Sulfaten umgesetzt. Die Steroidkonjugate, die über die Galle in den Darmtrakt gelangen, werden dort durch Mikroorganismen größtenteils wieder hydrolysiert und teilweise resorbiert. Der nicht resorbierte Teil der Steroide wird dann mit dem Faeces ausgeschieden. Es ist ebenfalls beschrieben, dass es durch die Darmflora zu einem weiteren Abbau der Steroide kommen kann [GROH H, ET AL (1993), PALME R, ET AL (1996), SCHWARZENBERGER F, ET AL (1996)].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Hormone zu unterteilen. Nach ihrem Aufbau unterscheidet man Steroidhormone, Peptid- und Proteinhormone, aus Aminosäuren gebildete Hormone und aus Fettsäuren gebildete Hormone.

Eine weitere Möglichkeit der Unterteilung erfolgt nach dem Ort ihrer Bildung. Hormone, die in speziellen Drüsen gebildet werden, die das Hormon direkt an das durchströmende Blut

abgeben, bezeichnet man als Drüsenhormone. Zu diesen Drüsenhormonen zählen die Steroidhormone.

Die Bildung von Hormonen kann aber auch in Geweben erfolgen, die in der Hauptsache andere Aufgaben haben. Diese Hormone bezeichnet man als Gewebshormone. Sie werden dabei oft nur in die unmittelbare Umgebung der sie produzierenden Zellen abgegeben. Ein Beispiel für Gewebshormone sind die von Nervenzellen gebildeten Neurohormone.

Zwischen Drüsen- und Gewebshormonen gibt es dabei fließende Übergänge, wie beispielsweise das Noradrenalin, das sowohl in der Nebennierenrinde als auch in neurosekretorischen Zellen gebildet wird.

Die Tätigkeit von Hormondrüsen, wie beispielsweise die der Nebennierenrinde, wird durch Hormone des Hypophysenvorderlappens gesteuert. Die Abgabe dieser Vorderlappenhormone wird wiederum vom Hypothalamus durch spezielle Neurohormone, die Releasing-Hormone, reguliert. Die Produktion der Releasing-Hormone wird über eine negative Rückkopplung zwischen Hypothalamus, Hypophyse und endokrinen Drüsen gesteuert, die in Abbildung 2-1 schematisch dargestellt ist. Ein Anstieg der Hormonkonzentration der regulierten Drüsen im Blut wirkt so über das Zwischenhirn auf die Hypophyse zurück und verringert dort die Abgabe des hormondrüsenanregenden Hypophysenhormons.

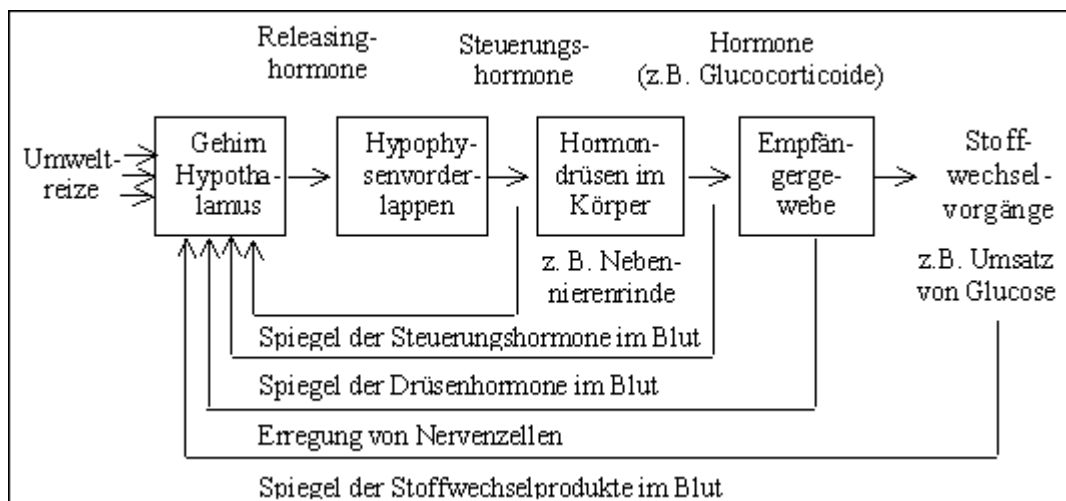


Abbildung 2-1. Steuerung von Hormonvorgängen im Körper - [nach BAYRHUBER H, KULL U, BÄBLER U, DANZER A (HRSG.), Linder Biologie, 1991].

Eine Gruppe der Steroidhormone, die Corticoide werden in der Nebennierenrinde gebildet. Die Mineralocorticoide beeinflussen den Natrium- und Kaliumhaushalt, die Glucocorticoide beeinflussen den Kohlehydrat- und Eiweißstoffwechsel. Das Cortisol beispielsweise bewirkt

in der Leber die Synthese von Glucose und hat durch eine Beeinflussung des Immunsystems eine entzündungshemmende Wirkung.

In den Keimdrüsen und zum Teil auch in den Nebennieren der Wirbeltiere werden die Geschlechtshormone gebildet. Sie beeinflussen die geschlechtliche Entwicklung des Organismus, den Körperbau und das Stoffwechselgeschehen [LANGE IG, ET AL (2002)].

Androgene steuern die Ausprägung sekundärer männlicher Geschlechtsmerkmale und zählen daher zu den männlichen Geschlechtshormonen. Bei männlichen Tieren werden sie überwiegend im Testes gebildet, bei weiblichen Tieren in der Nebennierenrinde und zu geringen Teilen in den Eierstöcken. Sie beeinflussen durch ihre proteinanabole Wirkung das Körperwachstum und veranlassen bei männlichen Tieren die fortgesetzte Bildung von Spermien. Zu den Androgenen zählen Androstandiole, Androstandion, Androstanolon, Androsteron, Dehydroepiandrosteron, 17β -Testosteron, und der inaktive Metabolit 17α -Testosteron [LANGE IG, ET AL (2002)].

Estrogene zählen zu den weiblichen Geschlechtshormonen, da sie die Ausbildung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale bewirken. Ihre Bildung erfolgt in den Eierstöcken und der Plazenta und bei männlichen Tieren im Testes. Sie wirken schwach protein- und stark fettanabol. Die wichtigsten Estrogene sind die Estradiole. Weitere Estrogene sind Estron und Estriol. 17β -Estradiol und Estron fördern die Verdickung der Uterusschleimhaut und erhöhen ihre Durchblutung. Sie sind außerdem zusammen mit Progesteron an der Steuerung des weiblichen Zyklus beteiligt. Ein Vorderlappenhormon, das luteinisierende Hormon (LH) bewirkt die Bildung des Gelbkörpers (Corpus luteum) aus einem geplatzten Follikel. Dieser Gelbkörper bildet sowohl Estrogene als auch das Gelbkörperhormon Progesteron. Progesteron, das einzige natürliche Gestagen, bewirkt zusammen mit den Estrogenen die Umwandlung der Uterusschleimhaut zur Vorbereitung einer Einnistung eines Eies und hemmt die Reifung weiterer Follikel. Da bei einer Nichtbefruchtung des Eies die Bildung von Progesteron durch eine Degeneration des Gelbkörpers aufhört, kommt es zum Durchlaufen eines erneuten Zyklus. Bei einer Schwangerschaft beginnt nach der Einnistung des Keimes dieser mit der Bildung von Progesteron, Estrogenen und Gonadotropin, das den Gelbkörper in Funktion hält, bis schließlich die Estrogen- und Progesteronbildung von der Plazenta übernommen wird [LANGE IG, ET AL (2002) und WITORSCH RJ (2002)].

2.2 Chemisch-physikalische Eigenschaften der Steroide

Die Zielmoleküle der in dieser Arbeit durchgeführten Analytik sind Steroide, also tetrazyklische Kohlenwasserstoffe mit unterschiedlichen Seitenketten und Substituenten. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome und Ringe ist in Abbildung 2-2 dargestellt.

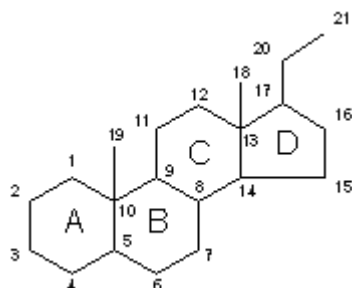


Abbildung 2-2. Steroidgrundgerüst – [nach BREUER H (HRSG.), dtv-Atlas zur Chemie, Tafeln und Texte, Band 2, 1994].

Bei den Steroidhormonen ist an das C-3 entweder eine Hydroxy- oder eine Ketogruppe gebunden. Am C-17 kommen unterschiedliche Gruppen oder Seitenketten vor.

In Abbildung 2-3 sind die möglichen Stellungen der Ringe A und B zueinander dargestellt. Es gibt zwei Möglichkeiten: die 5 α - und die 5 β -Form. In der 5 α -Form liegen die beiden Ringe in einer Ebene zueinander, in der 5 β -Form stehen sie gewinkelt zueinander. Die 5 β -Form kommt nur selten beispielsweise bei den Häutungshormonen der Insekten, bei Krötengiften, Herzglycosiden und Gallensäuren vor. Befindet sich zwischen C5 und C6 eine Doppelbindung, entspricht die Stellung der Ringe A und B der der 5 α Form. Die Steroidhormone weisen damit eine relativ planare Struktur auf.

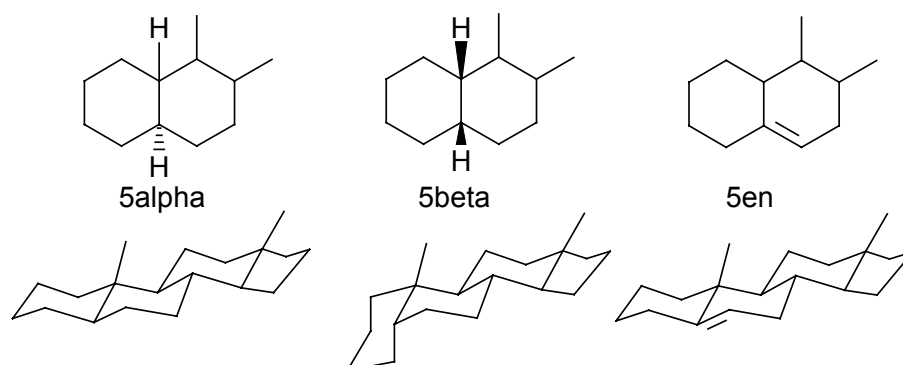


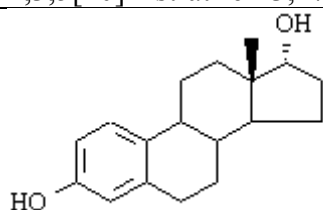
Abbildung 2-3. Stellung der Ringe A und B im Steroidgerüst.

Für einige Steroide, die als mögliche Zielanalyten in Frage kommen, sind in Tabelle 2-1 die Strukturformeln, physikalischen Eigenschaften und analytischen Daten aus der Literatur zusammengestellt [MAKIN J, TRAFFORD DJH, NOLAN J (HRSG), Mass Spectra and GC Data of Steroids, 1998 und O'NEIL MJ (HRSG.), The Merck Index, 2001].

Tabelle 2-1. Physikalische und analytische Daten ausgewählter Steroide.

17 α -Estradiol (α -E2)

1,3,5[10]-Estratrien-3,17 α -diol



$C_{18}H_{24}O_2$

CAS-Nr.: [57-91-0]

Xn R 20/21/22-40S 22-36

Physikalische Eigenschaften:

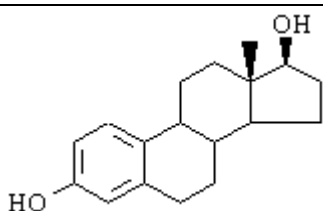
Molare Masse: 272,39 g · mol⁻¹
 Löslichkeit: (MeOH) 20 °C löslich
 (n-Hexan) 20 °C fast unlöslich

Analytische Daten:

UV-Maxima: (200); (220); 280 nm (ACN/H₂O)
 MS-Daten (EI): *m/z*: 91(10), 107(14), 146(34),
 160(50), 172(35), 185(11),
 213(34), 226(8), 253(6),
 272(100)

17 β -Estradiol (β -E2)

1,3,5-Estratrien-3,17 β -diol



$C_{18}H_{24}O_2$

CAS-Nr.: [50-28-2]

Xn R40-48-60-61 S 22-24/25

Physikalische Eigenschaften:

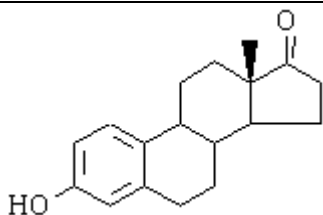
Molare Masse: 272,39 g · mol⁻¹
 Schmelzpunkt: 177,5 – 178,6 °C
 $[\alpha]_D$: + 78° (EtOH)
 Löslichkeit: (DMSO) 20 °C löslich

Analytische Daten:

UV-Maxima: (200), (220), 280 nm (ACN/H₂O)
 MS-Daten EI: *m/z*: 73(9), 91(11), 172(22),
 186(8), 213(41), 272(100)

Estron (E1)

1,3,5-Estratrien-3-ol-17-on

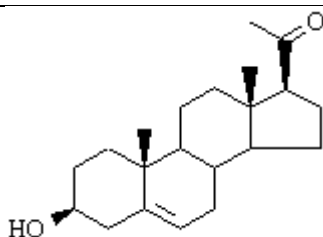
 $C_{18}H_{22}O_2$

CAS-Nr.: [53-16-7]

Xn R40-48-60-61 S 22-24/25

Physikalische Eigenschaften:

Molare Masse: 270,37 g · mol⁻¹
 Schmelzpunkt: 261 - 262 °C
 $[\alpha]_D$: +165° (CHCl₃)
 Löslichkeit: 1,2 mg · mL⁻¹ in EtOH

*Analytische Daten:*UV-Maxima: (200), (220), 280 nm (ACN/H₂O)MS-Daten (EI): m/z: 91(19), 107(35), 149(18),
213(10), 252(5), 270(100)**Pregnenolon (Preg)**Pregn-5-en-3 β -ol -20-on $C_{21}H_{32}O_2$

CAS-Nr.: [145-13-1]

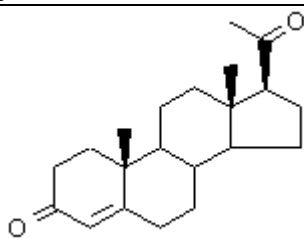
S 22-24/25

Physikalische Eigenschaften:

Molare Masse: 316,49 g · mol⁻¹
 Schmelzpunkt: 188 - 190 °C
 $[\alpha]_D$: +27° (EtOH)
 Löslichkeit: (MeOH) 20 °C löslich
 (n-Hexan) 20 °C fast unlöslich

*Analytische Daten:*UV-Maxima: ≤ 200 nm (ACN/H₂O)MS-Daten (EI): Trimethylsilylderivat
m/z: 73(91), 157(83), 195(14),
445(100), 460(12)**Progesteron (P)**

Pregn-4-en-3,20-dion

 $C_{21}H_{30}O_2$

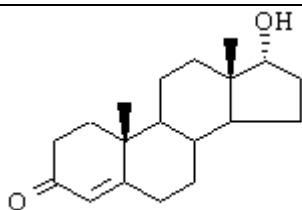
CAS-Nr.: [57-83-0]

Xn R40-48-60-61 S 22-24/25

Physikalische Eigenschaften:

Molare Masse: 314,47 g · mol⁻¹
 Schmelzpunkt: 121 - 122 °C/127 -131 °C (dimorph)
 $[\alpha]_D$: +186 - +192° (EtOH)
 Löslichkeit: (MeOH) 20 °C löslich,
 (n-Hexan) 20 °C fast unlöslich

*Analytische Daten:*UV-Maxima: 245 nm(ACN/H₂O)MS-Daten (EI): Trimethylsilylderivat
m/z: 73(84), 157(100), 247(13),
443(61), 458(59)

17 α -Testosteron (ET)Androst-4-en-17 α -ol-3-onC₁₉H₂₈O₂

CAS-Nr.: [481-30-1]

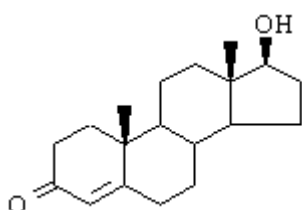
Xn R 20/21/22-40 S 22-36

Physikalische Eigenschaften:

Molare Masse: 288,43 g · mol⁻¹
 Löslichkeit: (MeOH) 20 °C löslich
 (n-Hexan) 20 °C fast unlöslich

Analytische Daten:

UV-Maxima: 245,5 nm (ACN/H₂O)
 MS-Daten (EI): Trimethylsilylderivat
m/z: 73(82), 209(30), 327(15),
 417(10), 432(100)

17 β -Testosteron (T)Androst-4-en-17 β -ol-3-onC₁₉H₂₈O₂

CAS-Nr.: [58-22-0]

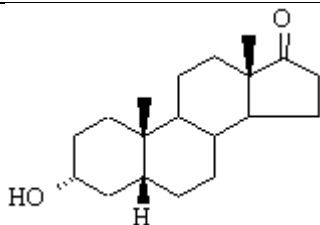
Xn R40-48-60-61 S 22-24/25

Physikalische Eigenschaften:

Molare Masse: 288,43 g · mol⁻¹
 Schmelzpunkt: 154,3 – 154,8 °C
 [α]_D: + 109° (EtOH)
 Löslichkeit: (H₂O) 20 °C fast unlöslich
 (MeOH) 20 °C löslich
 (n-Hexan) 20 °C fast unlöslich

Analytische Daten:

UV-Maxima: 245 nm (ACN/H₂O)
 MS-Daten (EI): *m/z*: 67(30), 79(54), 124(51), 147(19),
 203(22), 228(13), 246(52),
 273(5), 288(100)

Etiocholan-3 α -ol-17-on (Etio)5 β -Androstan-3 α -ol-17-onC₁₉H₃₀O₂

CAS-Nr.: [53-42-9]

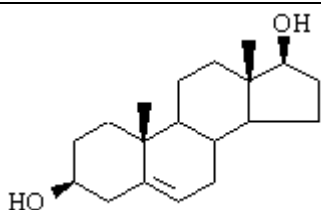
Xn R 40-48 S 22-24/25

Physikalische Eigenschaften:

Molare Masse: 290,44 g · mol⁻¹
 Schmelzpunkt: 151,5 – 152,3 °C
 Löslichkeit: (MeOH) 20 °C löslich
 (n-Hexan) 20 °C fast unlöslich

Analytische Daten:

UV-Maxima: ≤ 200 nm (ACN/H₂O)
 MS-Daten (EI): *m/z*: 67(53), 176(15), 215(21),
 257(49), 272(35), 290(100)

Androst-5-en-3 β ,17 β -diol (5-en- $\beta\beta$)C₁₉H₃₀O₂

CAS-Nr.: [521-17-5]

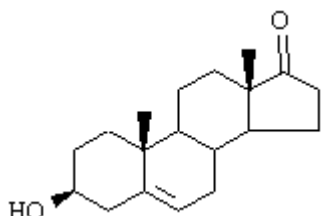
nicht vollständig geprüfter Stoff

Physikalische Eigenschaften:

Molare Masse: 290,4 g · mol⁻¹
 Schmelzpunkt: 184 °C
 [α]_D: -55° (2-Propanol)
 Löslichkeit: (MeOH) 20 °C löslich
 (n-Hexan) 20 °C fast unlöslich

Analytische Daten:

UV-Maxima: ≤ 200 nm (ACN/H₂O)
 MS-Daten (EI): *m/z*: 91(50), 107(29), 161(28),
 179(24), 205(60), 257(47),
 272(62), 290(100)

Dehydroepiandrosteron (DHEA)Androst-5-en-3 β -ol-17-onC₁₉H₂₈O₂

CAS-Nr.: [53-43-0]

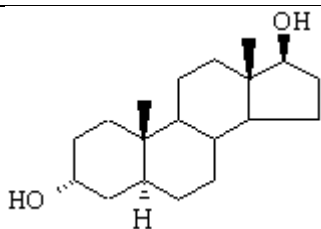
Xn R 36/37/38 S26-36

Physikalische Eigenschaften:

Molare Masse: 288,43 g · mol⁻¹
 Schmelzpunkt: 148 – 150 °C
 [α]_D: + 13° (EtOH)
 Löslichkeit: (MeOH) 20 °C löslich
 (n-Hexan) 20 °C fast unlöslich

Analytische Daten:

UV-Maxima: ≤ 200 nm (ACN/H₂O)
 MS-Daten (EI): *m/z*: 91(44), 119(14), 177(19),
 203(13), 237(10), 255(46),
 288(100)

Dihydroandrosteron (5 $\alpha\alpha\beta$)5 α -Androstan-3 α ,17 β -diolC₁₉H₃₂O₂

CAS-Nr.: [1852-53-5]

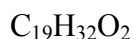
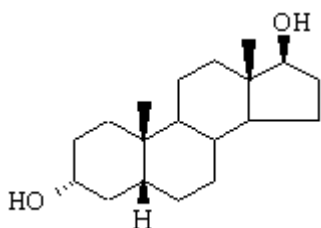
nicht vollständig geprüfter Stoff

Physikalische Eigenschaften:

Molare Masse: 292,5 g · mol⁻¹
 Löslichkeit: (MeOH) 20 °C löslich
 (n-Hexan) 20 °C fast unlöslich

Analytische Daten:

UV-Maxima: ≤ 200 nm (ACN/H₂O)
 MS-Daten (EI): *m/z*: 67(83), 81(47), 148(19),
 165(47), 201(12), 233(100),
 277(58), 292(100)

5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol (5 $\beta\alpha\beta$)

CAS-Nr.: [1851-23-6]

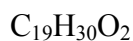
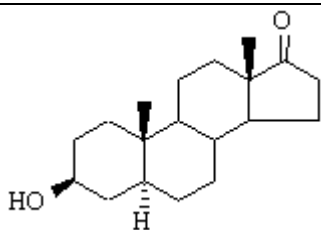
nicht vollständig geprüfter Stoff

Physikalische Eigenschaften:

Molare Masse: 292,5 g · mol⁻¹
 Schmelzpunkt: 121 - 122 °C/127 - 131 °C
 [α]_D: +186 - +192° (EtOH)
 Löslichkeit: (MeOH) 20 °C löslich
 (n-Hexan) 20 °C fast unlöslich

Analytische Daten:

UV-Maxima: ≤ 200 nm (ACN/H₂O)
 MS-Daten (EI): m/z: 67(85), 79(58), 147(22),
 201(34), 215(100), 241(53),
 256(90), 274(94), 292(13)

Epiandrosteron (EA)5 α -Androstan-3 β -ol-17-on

CAS-Nr.: [481-29-8]

Xn R40-48-60-61 S 22-24/25

Physikalische Eigenschaften:

Molare Masse: 290,44 g · mol⁻¹
 Schmelzpunkt: 172 - 174 °C
 [α]_D: 92° (25 °C, MeOH)

Analytische Daten:

UV-Maxima: < 200 nm (ACN/H₂O)
 MS-Daten (EI): m/z: 67(29), 93(12), 108(16),
 147(10), 215(7), 246(18),
 275(21), 290(100)

2.3 Biosynthese und Metabolismus

Die Biosynthese der Steroide, die in Abbildung 2-4 schematisch dargestellt ist, beginnt mit dem Cholesterol. Dieses wird bei rein pflanzlicher Ernährung entweder aus pflanzlichen Vorläufersubstanzen gebildet oder aus Acetyl-CoA synthetisiert. Der erste Schritt in der Biosynthese der Steroide ist die Abspaltung der Seitenkette des Cholesterols. Das daraus resultierende Pregnenolon kann dann über Progesteron und Androstendion (Δ^4 pathway: bevorzugt im Corpus luteum) oder über Dehydroepiandrosteron und Androstendiol (Δ^5 pathway: bevorzugt im Testis) zum Testosteron umgesetzt werden. Daneben wird Progesteron auch zu weiteren Metaboliten reduziert oder in Corticoide umgewandelt. Im

Zielgewebe kann Testosteron enzymatisch durch eine 5 α -Reduktase zu Dihydrotestosteron und über den Aromatasekomplex zu Estradiol metabolisiert werden.

Der Abbau der Steroidhormone und damit ihre Inaktivierung erfolgt hauptsächlich in der Leber. Das Testosteron wird über eine Reduktion der 3-oxo-4-en Struktur in Ring A, durch eine Bildung von 17-Ketosteroiden oder durch Konjugation mit Schwefelsäure oder Glucuronsäure inaktiviert. Für Testosteron sind beispielsweise 548 hypothetische Metaboliten berechnet worden [KOCHAKIAN CD (1990)].

Steroidkonzentrationen im Faeces zeigen ein vergleichbares Muster wie in Plasma, allerdings für Wiederkäuer etwa 12-24 h zeitverzögert [SCHWARZENBERGER F, ET AL (1996)].

Die Hauptausscheidungssteroiden im Faeces sind bei den Estrogenen das Estron sowie 17 α - und 17 β -Estradiol. Da Progesteron vor der Ausscheidung zu mehreren 5 α - oder 5 β -reduzierten Pregnandionen sowie hydroxylierten Pregnanen umgesetzt wird [SCHWARZENBERGER F, ET AL (1996) und SCHWARZENBERGER F, ET AL - 2 (1996)], unterscheiden sich die Konzentrationen hier von den Plasmakonzentrationen.

Die Hauptmetaboliten des Testosterons, die in Galle gefunden werden, sind neben Androstadiolen das 5 β -Androstan-3 α -ol-17-on (Etiocholanolon) und das 5 β -Androstan-3 β -ol-17-on (Androsteron) [SAMUELS TP, ET AL (1998)]

Nach einer Behandlung mit 17 β -Estradiolbenzoat und Testosteronestern beobachteten SCIPPO ML, ET AL (1994) eine Erhöhung der 17 β -Estradiol- und der Testosteron-Konzentration im Plasma von Färsen. Die Konzentration von 17 α -Testosteron stieg nur leicht an und die von 17 α -Estradiol fiel ab. Auf Androstendion- und Dehydroepiandrosteronkonzentrationen wurde kein Einfluss der Behandlung beobachtet. Bei männlichen Tieren fiel sowohl die Testosteron- als auch die Precursorkonzentration im Plasma nach einer Behandlung mit 17 β -Estradiolbenzoat und Testosteronestern ab.

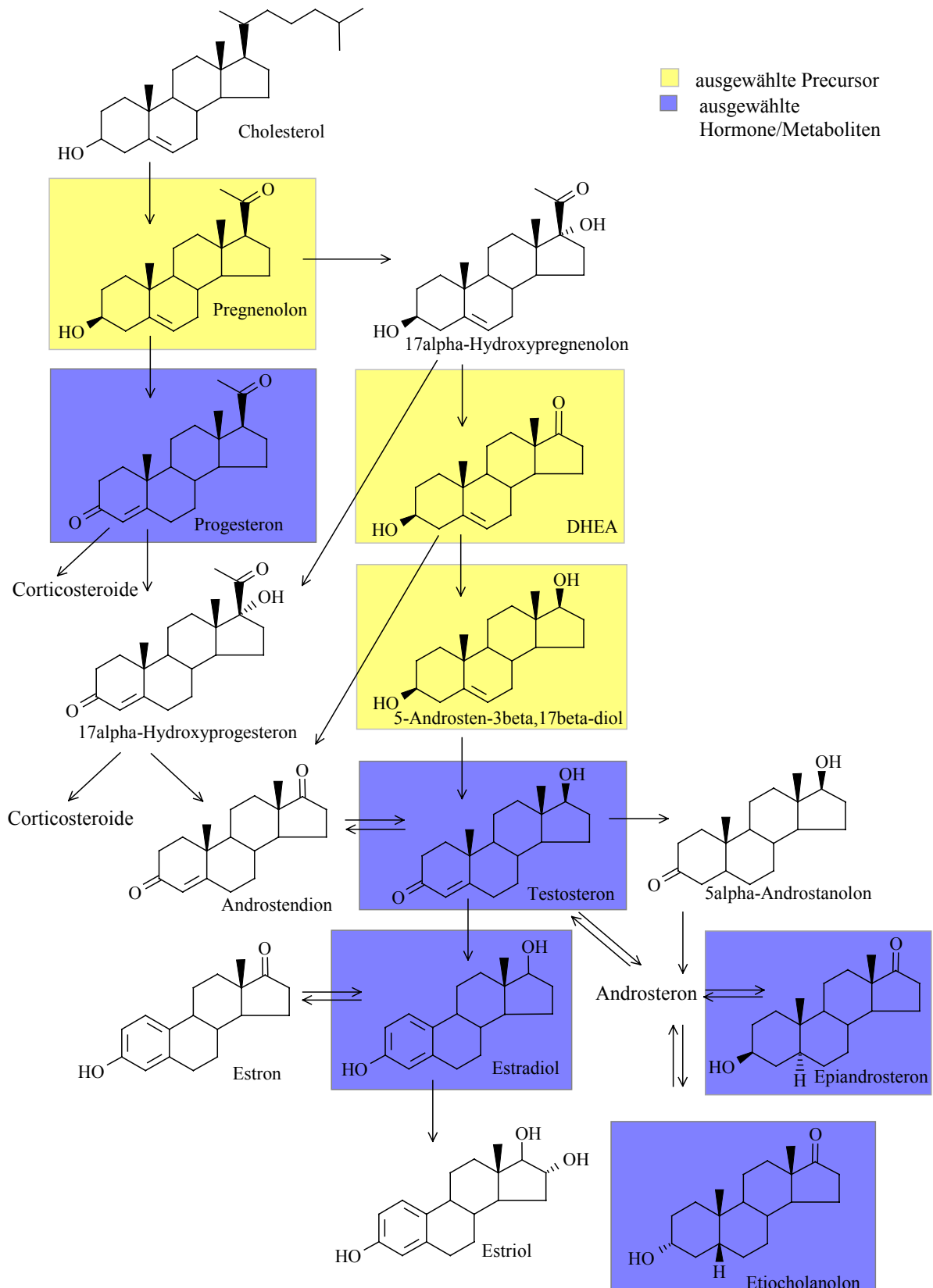


Abbildung 2-4. Biosynthese und Metabolismus der Steroide - [nach SHIMADA K, ET AL (2001), FORTH W, HENTSCHLER D, RUMMEL W (Hrsg.), Allgemeine und spezielle Toxikologie, 1987 und MAKIN HLJ (Hrsg.), Biochemistry of steroid hormones, 1984].

2.4 Isotopenverhältnisse und deren Messung

Die IRMS bestimmt Unterschiede in den Isotopenverhältnissen einzelner Elemente wie beispielsweise das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis. Angegeben wird dieses Verhältnis in der Regel als $\delta^{13}\text{C}$ -Wert bezogen auf eine Referenzsubstanz. Der internationale Standard für Kohlenstoff ist PDB, ein geologisches Calciumcarbonat aus der Pee Dee Formation in South Carolina, USA.

Gleichung 2-1. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis vsPDB:

$$\delta^{13}\text{C vsPDB [‰]} = \left(\frac{R_{\text{Sample}} - R_{\text{PDB}}}{R_{\text{PDB}}} \right) \times 1000$$

mit : R_{Sample} = Isotopenverhältnis der Probe

R_{PDB} = Isotopenverhältnis des PDB – Standards

Zur Berechnung von $\delta^{13}\text{C}$ werden nach der Verbrennung der organischen Komponenten die Massen der resultierenden $^{13}\text{CO}_2$ - und $^{12}\text{CO}_2$ -Moleküle gemessen. Studien zu verschiedenen Isotopenstandards für Kohlendioxid sowie zu nötigen Korrekturfaktoren für massenspektrometrische Kohlendioxidmessungen wurden hierzu von CRAIG H (1957) durchgeführt und diskutiert.

Die Entwicklung einer IRMS-Methode zum Nachweis einer Behandlung mit natürlichen Hormonen basiert auf der Annahme, dass das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis der durch das Tier biosynthetisierten von dem synthetisch hergestellter natürlicher Hormone abweicht.

Eine Verabreichung synthetisch hergestellter natürlicher Hormone an Tiere kann dann das Isotopenverhältnis der Hormone und das der Metaboliten dieser Hormone beeinflussen. Vorläufersubstanzen der verabreichten Substanz innerhalb des Biosyntheseweges bleiben hingegen unbeeinflusst [BECCHI M, ET AL (1994)]. Durch den direkten Vergleich der Isotopenverhältnisse von Hormonen beziehungsweise Metaboliten mit denen der Vorläufersubstanzen (Precursor) ist der Nachweis einer Verabreichung dieser Substanzen denkbar. Eine Voraussetzung für eine geeignete Vorläufersubstanz ist, dass sie nicht über Gleichgewichtsreaktionen mit den Hormonen beziehungsweise Metaboliten verbunden ist.

Da das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis durch die Fütterung und Haltung der Tiere beeinflusst wird, ist die Verwendung einer endogenen Referenzsubstanz als Bezugspunkt von großem Vorteil.

Bei Tieren mit vorwiegend pflanzlicher Ernährung sowie bei synthetisch hergestellten natürlichen Hormonen erfolgt die Synthese der Steroide aus pflanzlichen Vorläufersubstanzen.

Das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis einer Substanz pflanzlichen Ursprungs ist davon abhängig, über welchen Photosyntheseweg das Kohlendioxid der Luft durch die Pflanze fixiert wird. C3-Pflanzen, die das Kohlendioxid der Luft im Calvin-Zyklus über einen C₃-Körper fixieren, diskriminieren das ^{13}C -Isotop generell stärker als C4-Pflanzen, bei denen es im Hatch-Slack-Zyklus über das Malat, einen C₄-Körper, fixiert wird. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte liegen für C4-Pflanzen zwischen -10 und -20‰ und für C3-Pflanzen zwischen -22 und -33‰. CAM-Pflanzen (Crassulacean acid metabolism) nehmen eine Zwischenstellung ein, sie spielen als Futtermittel in der Tiermast aber keine Rolle [BENDER MM (1971)].

Synthetisch erzeugte natürliche Hormone werden aus Vorläufersubstanzen hergestellt, die bislang vorwiegend aus Soja gewonnen werden [FERCHAUD V, ET AL (2000) und SHACKLETON CHL, ET AL (1997)]. Soja gehört zu den C3-Pflanzen und hat daher ein vergleichsweise niedriges $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis ($\delta^{13}\text{C}$ etwa -30 ‰) [BENDER MM (1971)]. In der Rindermast dagegen dient als Nahrungsquelle größtenteils Mischfutter, das aus unterschiedlichen Pflanzen, zusammengesetzt ist. Der Unterschied der Isotopenverhältnisse von synthetisch hergestellten natürlichen Hormonen zu denen vom Tier selbst biosynthetisierten sollte daher um so deutlicher sein, je mehr C4-Pflanzenanteil im Mischfutter enthalten ist. Ein wichtiger Bestandteil vieler Mischfutter in der Tiermast ist Maissilage [DEUTSCHER VERBAND TIERNÄHRUNG E.V. (2004)]. Im Gegensatz zum Soja gehört Mais zu den C4-Pflanzen, das Mischfutter weist damit oft ein höheres $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis auf.

Regional abhängig gibt es auch Fütterungsarten, die bevorzugt auf C3-Pflanzen wie Gras basieren. [MASON MP, ET AL (1998)]. Es ist denkbar, dass eine Futterzusammenstellung, die überwiegend bis vollständig aus C3-Pflanzen besteht oder synthetische natürliche Hormone, die aus anderen Quellen als Soja stammen, eine Unterscheidung zwischen synthetischen und vom Tier biosynthetisierten natürlichen Hormonen über Isotopenmessungen nicht mehr zulassen.

2.5 Auswahl geeigneter Zielanalyten

Die Anforderungen der IRMS-Messungen an die Reinheit und Konzentration der Analyten in den zu messenden Extrakten haben einen hohen Einfluss auf die Auswahl geeigneter Zielanalyten. Zum Nachweis einer exogenen Herkunft natürlicher Steroide über den Vergleich der Isotopenverhältnisse von Precursorsubstanzen und Metaboliten, ist es

erforderlich, neben der Stellung der Steroide im Stoffwechsel auch ihre Konzentrationen in Faecesproben und die Möglichkeit ihrer Detektion während der Aufarbeitung zu berücksichtigen.

Rinderfaeces besteht aus teilweise zersetzten Pflanzenpartikeln, wobei deren genaue Zusammensetzung je nach Jahreszeit und Standort der Tiere wechseln kann. Änderungen in der Nahrungs- und Wasseraufnahme können daher neben den normalen physiologischen Schwankungen zu Schwankungen der Steroidkonzentrationen in Faeces führen [SCHWARZENBERGER F, ET AL (1996) und SCIPPO ML, ET AL (1994)]. Des weiteren enthält der Faeces mikrobielle und tierische Bestandteile, die ebenfalls je nach Tier und Zeit in ihrer Zusammensetzung variieren [PAYNE LD, ET AL (1995)]. Faeces ist ein heterogenes Material, das durch die Darmflora der Tiere stark beeinflusst wird. Die Zersetzung der Faecesbestandteile durch die umfangreiche Metabolisierung durch Mikroorganismen führt dazu, dass verabreichte Hormone im Faeces im Gegensatz zum Urin nur kurz nach der Behandlung nachweisbar sind. Metaboliten mit einer reduzierten 3-oxo-Gruppe und ungesättigten Doppelbindungen im A-Ring sind dagegen stabiler gegenüber dem mikrobiologischen Abbau und daher länger im Faeces nachweisbar [PUYMBROECK M VAN, ET AL (1998)].

Als Zielanalyten kommen besonders die Steroide in Frage, die in Faeces in hohen Konzentrationen vorliegen, denn die Menge an aufzuarbeitender Probe kann dadurch reduziert werden. Da die Reinheit der aufgearbeiteten Extrakte für die IRMS entscheidend ist, bedeutet ein höheres Analyt/Matrix-Verhältnis auch eine Verbesserung der Zuverlässigkeit der Messungen.

Bislang finden sich in der Literatur relativ wenig Studien zu Steroidgehalten in Rinderfaeces. Untersuchungen über Steroidgehalte in Faeces sind vorwiegend zur Reproduktionskontrolle von wild lebenden Tieren und Vieh durchgeführt worden. [MÖSTL E, ET AL, (1983); CHOI HS (1987); SCHWARZENBERGER F, ET AL - 2 (1996); PALME R, ET AL (1996); SCHWARZENBERGER F, ET AL (1996); SCHWARZENBERGER F, ET AL (1995) und GLATZL PS (1999)]. Ein weiterer Untersuchungsschwerpunkt liegt in der Belastung der Umwelt mit Sexualsteroiden durch die Viehwirtschaft [LANGE IG, ET AL (2002), SCHLENKER G, et al (1998) und SCHLENKER G, et al (1999)]. Da Androgengehalte für diese Untersuchungen nicht relevant sind, liegen über diese Stoffgruppe nur wenig Daten vor. Darüber hinaus sind differenzierte Bestimmungen von Einzelstoffen hierfür nicht notwendig. Zur Bestimmung der Gruppen von Steroiden werden daher vorwiegend immunologische

Verfahren ohne vorherige chromatographische Auftrennung der einzelnen Metaboliten angewendet. Die meisten Daten beziehen sich demnach auf Gesamtgehalte von Estrogenen und Gestagenen.

Um für ein detailliertes Screening eine geeignete Auswahl an Standardsubstanzen zusammenzustellen, sind vorhandene Daten über Steroidgehalte in Faeces [BAMBERG E und SCHWARZENBERGER F (1990), zitiert nach SCHLENKER G, ET AL (1998) und CHOI HS (1987)] zugrunde gelegt worden.

Ein weiterer Parameter, der zur Auswahl der Zielanalyten herangezogen wurde, ist die leichte Detektierbarkeit der Analyten während der Aufarbeitung. Um Verluste, ganz besonders aber mögliche Diskriminierungen schwerer oder leichter Isotope während der Aufreinigung beispielsweise durch zu eng gesetzte Fraktionsgrenzen zu vermeiden, ist es hilfreich, wenn nicht unerlässlich, beispielsweise während einer HPLC-Fraktionierung den Vorgang zu überwachen. In Tabelle 2-2 sind siebzehn Steroide, darunter auch Vorläufersubstanzen der Hormone mit den zur Auswahl wichtigen Kriterien aufgelistet. Nach den Kriterien Detektierbarkeit, Konzentration im Faeces und Stellung im Metabolismus wurden geeignete Zielanalyten für die Analytik ausgewählt. Diese sind in der Tabelle grau unterlegt.

Tabelle 2-2. Auswahlkriterien für Zielanalyten.

Substanz	UV-Max.	Konzentration Faeces	Bemerkungen
17 α -Estradiol	280 nm	Gesamtestrogen ¹ : Weibl. Tiere 10 μ g/kg, hochtragend bis 1000 μ g/kg	17 β -Estradiolmetabolit
17 β -Estradiol	280 nm		Wirksames Hormon
Estron	280 nm		17 β -Estradiolmetabolit
5 α -Androstan-17 β -ol-3-on	≤ 200 nm	Gestagene ² : Follikelphase 30–144 μ g/kg, Lutealphase 182–391 μ g/kg	Testosteronmetabolit
5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol	≤ 200 nm		Testosteronmetabolit
5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol	≤ 200 nm		Testosteronmetabolit
Androsteron	≤ 200 nm		Testosteronmetabolit
17 α -Testosteron	245 nm		Testosteronmetabolit
Etiocholan-3 α -ol-17-on	≤ 200 nm		Testosteronmetabolit
Testosteron	245 nm		Wirksames Hormon
Progesteron	245 nm		Wirksames Hormon
17 α -Hydroxyprogesteron	≤ 200 nm		Progesteronmetabolit
Cholesterol	≤ 200 nm		Vorläufersubstanz
5-Pregnen-3 β -ol-20-on	≤ 200 nm		Vorläufersubstanz
5-Androsten-3 β ,17 β -diol	≤ 200 nm		Vorläufersubstanz
5-Androsten-3 β ,17 α -diol	≤ 200 nm		Vorläufersubstanz
Dehydroepiandrosteron	≤ 200 nm		Vorläufersubstanz

¹[CHOI HS (1987)]

²[BAMBERG E, SCHWARZENBERGER F, (1990), zitiert nach SCHLENKER G, ET AL (1998)]

2.6 Strategien zur Probenaufarbeitung

Die Probenaufarbeitung muss den Ansprüchen der anschließenden GC-C-IRMS-Messung entsprechen. Dies bedingt ein hohes Maß an komplexer Probenaufreinigung und –konzentrierung, bei der es nicht zu einer Diskriminierung schwererer oder leichterer Kohlenstoffisotopen kommen darf.

Eine Grundvoraussetzung für vertrauenswürdige Ergebnisse, die nicht durch mit den Analyten coeluiierende Matrixkomponenten verfälscht werden, sind extrem saubere Probenextrakte. Bei der GC-C-IRMS werden nach der GC-Trennung alle organischen Bestandteile vollständig zu Kohlendioxid verbrannt, das anschließend mittels MS gemessen wird. Beim entstandenen Kohlendioxid kann nicht mehr unterschieden werden, aus welcher Ausgangssubstanz dieses gebildet wurde, so dass es wichtig ist, im Gaschromatographen zuvor eine Basislinientrennung der Analytenpeaks zu erhalten [MEIER-AUGENSTEIN W (2002)].

Derzeit werden für die IRMS-Analytik pro Injektion mindestens 10 ng je Analyt benötigt.

Aufgrund der benötigten hohen Mengen an Steroiden und der niedrigen natürlichen Konzentration der Steroide in Rinderfaeces im unteren µg/kg bis oberen ng/kg Bereich, ist es notwendig, große Probenmengen aufzuarbeiten.

Eine Abtrennung möglichst aller Matrixbestandteile, eine Konzentrierung der gesuchten Analyten und die Vermeidung einer Diskriminierung der ¹³C-Isotope sind die wichtigsten Aspekte unter denen die Probenaufreinigung erfolgen muss.

Neben der in der Rückstandsanalytik vielfach eingesetzten Festphasenextraktion wird bei biologischen Materialien vermehrt die präparative HPLC zur Probenaufreinigung verwendet. Für diese Verfahren sind Diskriminierungsvorgänge bekannt [BRAUNSDORF R, ET AL (1993) und MEIER-AUGENSTEIN W (2002)]. Es ist demnach sehr wichtig, bei einer Fraktionierung über eine HPLC immer den gesamten Peak herauszuschneiden, um sowohl die leichteren als auch die schwereren Isotopen in der gleichen Fraktion aufzufangen.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Aufreinigung der Extrakte besteht in der großen strukturellen Ähnlichkeit von Matrixkomponenten wie anderen Steroiden und Gallensäuren mit den Zielanalyten.

Zur Erarbeitung einer geeigneten Aufarbeitungsmethode wurden in der Literatur beschriebene Methoden zur Extraktion und Aufreinigung von Steroiden aus unterschiedlichen Matrices zugrunde gelegt [MOLDOVEANU SC, DAVID V, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY

Library-volume 65, 2002, TORRE X DE LA, ET AL (2001), FRITSCHÉ S, ET AL (1999), BECCHI M, ET AL (1994), PRÉVOST S, ET AL (2001), IMPENS S, ET AL (2002), APPELBLAD P und IRGUM K (2002), FERCHAUD V, ET AL (1998), CALVARESE S, ET AL (1994), LEVESQUE J-F, ET AL (2002), LOPEZ DE ALDA MJ und BARCELO D (2000), AGUILERA R, ET AL (1999), AGUILERA R, ET AL (1996), KURONEN P, ET AL (1998), MARCHAND P, ET AL (2000), UEKI M und OKANO M (1999), SAUER MJ, ET AL (1998), KOOLE A, ET AL (1999), GONZALO-LUMBRERAS R und IZQUIERDO-HORNILLOS R (2000), JOOS PE und RYCKEGHEM M VAN (1999), YAMADA H, ET AL (2002)]. Diese Methoden wurden für die bestehende Problematik der Herstellung von Faecesextrakten für die GC-C-IRMS-Analytik angepasst und optimiert.

2.7 Grundschemata der Aufarbeitungsmethode

Die Allgemeine Strategie, die bei der Aufarbeitung der Faecesextrakte zugrunde gelegt wird, ist in Abbildung 2-5 dargestellt.



Abbildung 2-5. Aufarbeitungsstrategie Rinderfaeces.

Zunächst werden die Zielanalyten mit einem geeigneten Lösungsmittel extrahiert. Zur Vorreinigung und Aufkonzentrierung der Extrakte kommen unterschiedliche Verfahren wie Festphasenextraktion oder Flüssig-Flüssig-Extraktion in Betracht. Eine Hydrolyse gegebenenfalls vorhandener Konjugate der Zielanalyten ist ebenfalls zu testen. Nach einer ersten Vorreinigung und Aufkonzentrierung erfolgt eine weitere Aufreinigung über unterschiedliche HPLC-Systeme. Vor der eigentlichen Analyse mittels IRMS werden die Steroide derivatisiert, um eine bessere Flüchtigkeit für die GC zu erreichen. Die Überprüfung der Reinheit der Extrakte sowie die Identifizierung der Analyten durch GC-MS im Scan-Modus ist vor der IRMS-Messung unbedingt erforderlich.

3 ERGEBNISSE

Bei Faecesproben ist aufgrund extrem hoher Matrixbelastungen und der erforderlichen großen Probenmengen vor einer analytischen Messung eine umfangreiche Aufarbeitung nötig, die pro Probe durchschnittlich eine Woche in Anspruch nimmt. Wenn nicht anders aufgeführt, wurden daher nur Einzelbestimmungen durchgeführt.

3.1 Extraktion

3.1.1 Extraktion nach Soxhlet

Zur Ermittlung eines geeigneten Lösungsmittels für die Extraktion von Steroiden aus Rinderfaeces wurden Methanol, Acetonitril, Aceton, Ethylacetat und n-Hexan verglichen.

Abbildung 3-1 zeigt die Extraktionsausbeuten von fünf Modell-Steroiden, die für Soxhlet-Extraktionen von dotierten Faecesproben mit unterschiedlichen Lösungsmitteln erhalten wurden.

Trotz einer generell sehr ähnlichen Struktur der Zielanalyten unterscheiden sich diese in ihrem Extraktionsverhalten. So werden je nach Steroid die besten Ergebnisse mit verschiedenen Lösungsmitteln erzielt. Progesteron aber auch die Estrogene, besonders 17α -Estradiol, zeigen die besten Ausbeuten nach einer Extraktion mit polaren Lösungsmitteln wie Methanol. Je unpolarer die Extraktionsmittel sind, desto geringer ist die Extraktionsausbeute für die Estrogene. So wird für 17α -Estradiol mit Methanol eine Ausbeute erreicht, die 46% des dotierten Standards entspricht, dagegen wird mit n-Hexan nur eine Ausbeute von 5% erzielt. Bei den Androgenen Dehydroepiandrosteron und Androst-5-en- 3β , 17β -diol hingegen zeigt sich eine geringe Abhängigkeit der Extraktionsausbeute von der Polarität des Lösungsmittels. Für Dehydroepiandrosteron beträgt die Ausbeute nach einer Extraktion mit Methanol 7 %, für Androst-5-en- 3β , 17β -diol 16 % des dotierten Standards. Bei einer Extraktion mit n-Hexan ist die Ausbeute beim Dehydroepiandrosteron mit 17 % des dotierten Standards höher als bei einer Extraktion mit Methanol und beim Androst-5-en- 3β , 17β -diol bleibt sie mit 19 % des dotierten Standards vergleichbar hoch.

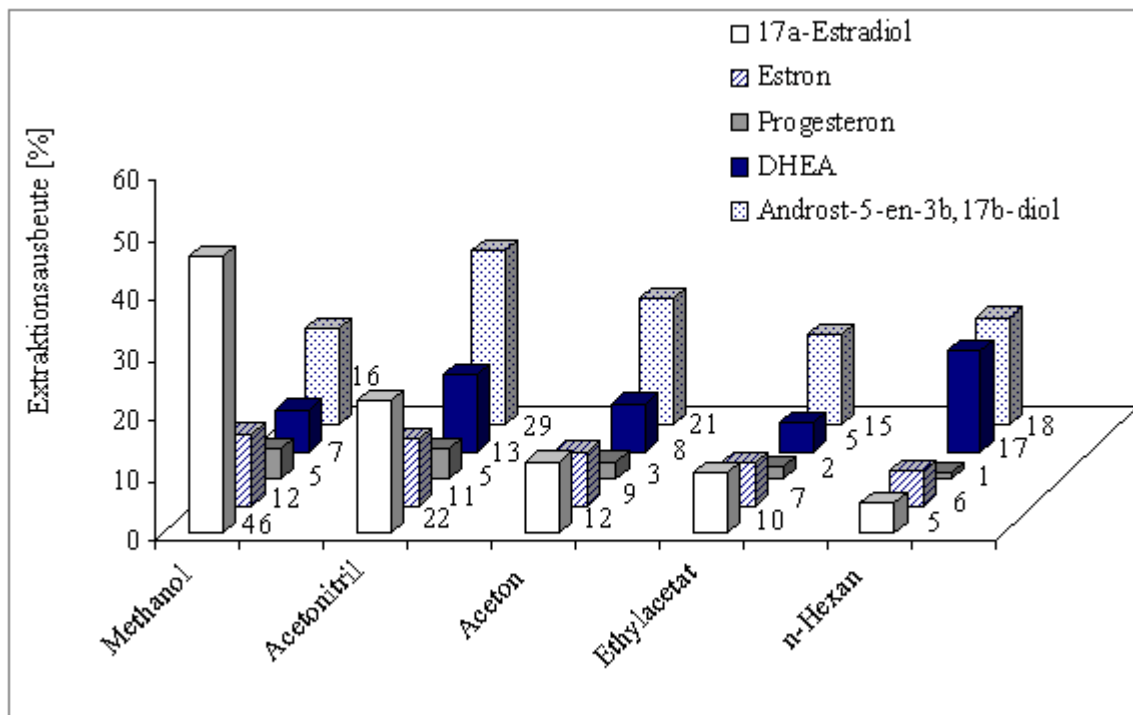


Abbildung 3-1. Extraktionsausbeute verschiedener Steroide nach Soxhlet-Extraktion von dotierten Faecesproben mit unterschiedlichen Lösungsmitteln.

Generell ist die Extraktionsausbeute mit unter 50% bezogen auf den dotierten Standard für alle getesteten Lösungsmittel sehr niedrig.

Betrachtet man alle getesteten Steroide, werden die besten Ergebnisse hinsichtlich der Extraktionsausbeute mit Methanol und Acetonitril erreicht. Für 17 α -Estradiol, Estron und Progesteron wird mit Methanol die höchste Ausbeute erreicht und auch für Dehydroepiandrosteron und Androst-5-en-3 β ,17 β -diol liefert Methanol im Vergleich zu den anderen Lösungsmitteln akzeptable Extraktionsausbeuten.

n-Hexan liefert für 17 α -Estradiol, Estron und Progesteron nur sehr schlechte Ausbeuten. Mit Blick auf die in Faeces vorhandenen Sulfatkonjugate der Steroide, die sehr polare Eigenschaften besitzen und zur Erhöhung der Gesamtausbeute unbedingt miterfasst werden sollten, ist n-Hexan wegen seiner sehr unpolaren Eigenschaften als Extraktionsmittel ungeeignet.

Ethylacetat und Aceton zeigen vergleichbare Ausbeuten, die bis auf die von Dehydroepiandrosteron und Androst-5-en-3 β ,17 β -diol etwas schlechter als die von Methanol sind.

Die wenigsten Störkomponenten wurden durch n-Hexan mitextrahiert. Aceton und Ethylacetat liefern Extrakte, die vergleichbar mit denen des Acetonitrils sind. Im direkten Vergleich zwischen Methanol und Acetonitril führt eine Extraktion mit Acetonitril zu deutlich saubereren Extrakten.

Im Hinblick auf ebenfalls zu extrahierende Konjugate der Steroide ist Methanol, aufgrund seines polareren Charakters im Vergleich zum Acetonitril, das geeignetere Extraktionsmittel.

3.1.2 Optimierung einer beschleunigten Lösemittlextraktion

Für die beschleunigte Lösemittlextraktion (ASE) wurden Temperatur und Zellfüllung als weitere Parameter für eine Extraktion von Steroiden aus Rinderfaeces bei gleichzeitig möglichst geringer Coextraktion von Matrixkomponenten optimiert.

Ein Vermengen der zu extrahierenden Probe mit Diathomeenerde als Füllmittel wurde getestet und hat je nach eingesetzter Menge Diathomeenerde unterschiedliche Auswirkungen auf die Extraktion.

Ist das Massenverhältnis Probe zu Diathomeenerde in den Extraktionszellen 1 : 1 oder kleiner, kann zu wenig Probe in die Zellen eingefüllt werden, um eine für die GC-C-IRMS-Messung ausreichende Menge Analyt zu extrahieren. Ist das Verhältnis Probe zu Diathomeenerde dagegen 4 : 1 oder größer, verklebt die Probe in den Zellen durch Aufquellung, so dass es zu Verstopfungen der Zellen kommt.

Als optimal hat sich eine Zellfüllung mit einem Verhältnis von Probe zu Diathomeenerde von 2 : 1 erwiesen.

Die statische Extraktionszeit mit 5 Minuten sowie das Lösungsmittel Methanol sind nicht variiert worden.

Zur Optimierung der Temperatur wurden dotierte Teilproben bei 40°C, 60°C, 80°C und 100°C extrahiert.

Abbildung 3-2 zeigt den Verlauf der Extraktionsausbeuten von 17 α -Estradiol, Dehydroepiandrosteron, 17 α -Testosteron, Pregnenolon und Progesteron in Abhängigkeit von der Temperatur.

Für 17α -Estradiol, Progesteron und Pregnenolon steigt die auf den dotierten Standard bezogene Extraktionsausbeute mit zunehmender Temperatur kontinuierlich an. Von 40% bei 40°C steigt sie für das 17α -Estradiol auf 95% bei 100°C und von etwa 25% bei 40°C auf 45% bei 100°C für Progesteron und Pregnenolon. Für Dehydroepiandrosteron mit 85 % und 17α -Testosteron mit 60 % erreicht die Extraktionsbeute dagegen bei 60°C ein Plateau.

Der Unterschied in den Ausbeuten zwischen 40°C und 60°C ist für Dehydroepiandrosteron, 17α -Testosteron und 17α -Estradiol deutlich zu erkennen, wohingegen er bei Progesteron und Pregnenolon eher gering ist.

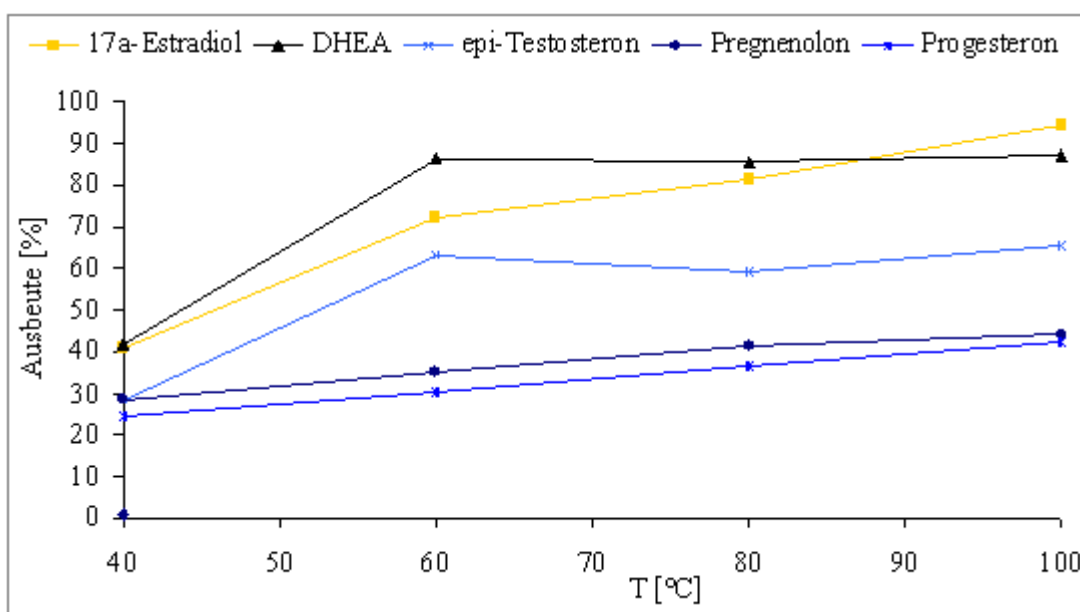


Abbildung 3-2. Temperaturabhängigkeit der Extraktionsausbeute einzelner Steroide.

Die beste Ausbeute wurde für die Zielanalyten bei einer Extraktionstemperatur von 100°C erreicht.

Allerdings ist auch die Menge der mitextrahierten Matrixkomponenten deutlich von der Temperatur abhängig. Wie in Abbildung 3-3 zu erkennen ist, ist bei höherer Extraktionstemperatur auch die Menge an Matrixkomponenten im Extrakt deutlich höher.

Um eine möglichst hohe Ausbeute aller Zielanalyten unter Mitextraktion von möglichst wenig Matrixkomponenten zu erzielen, sollte die Extraktion bei 80°C durchgeführt werden.

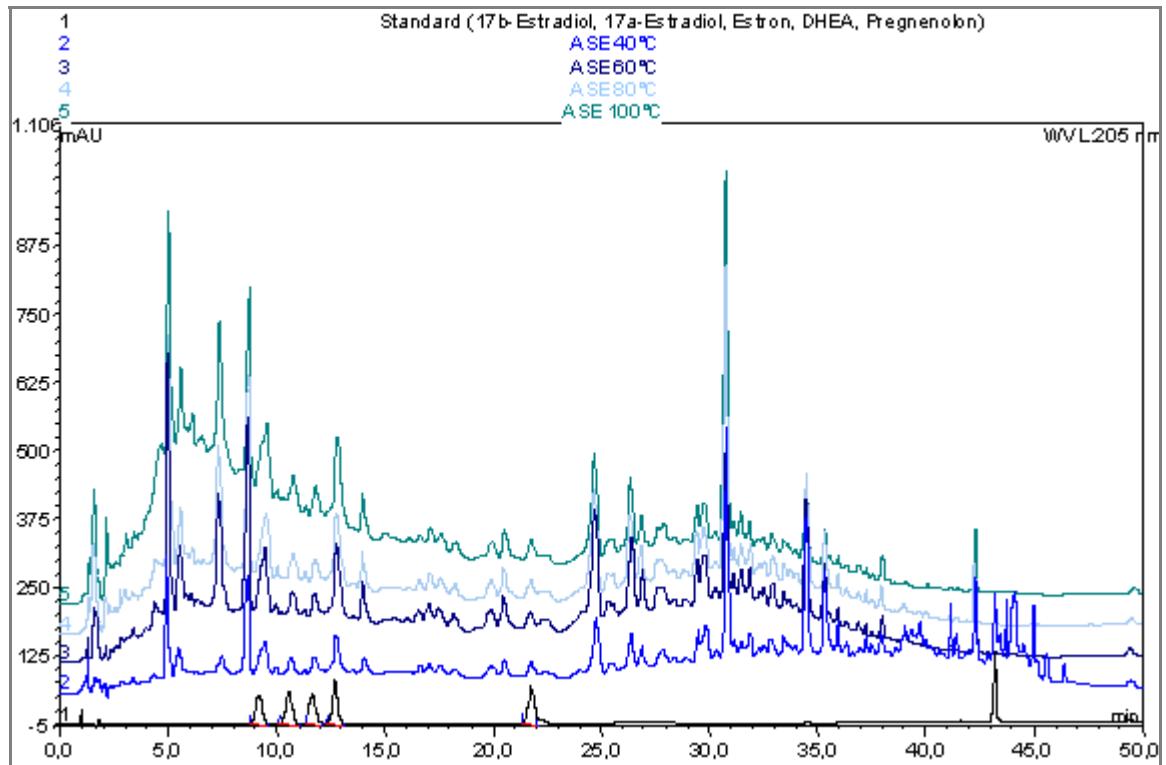


Abbildung 3-3. RP-HPLC-Chromatogramme der ASE Extrakte der Temperaturoptimierung – Nucleosil C8; 150 x 4,6 mm; 5 μ m, 60°C, Acetonitril/Wasser – Gradient.

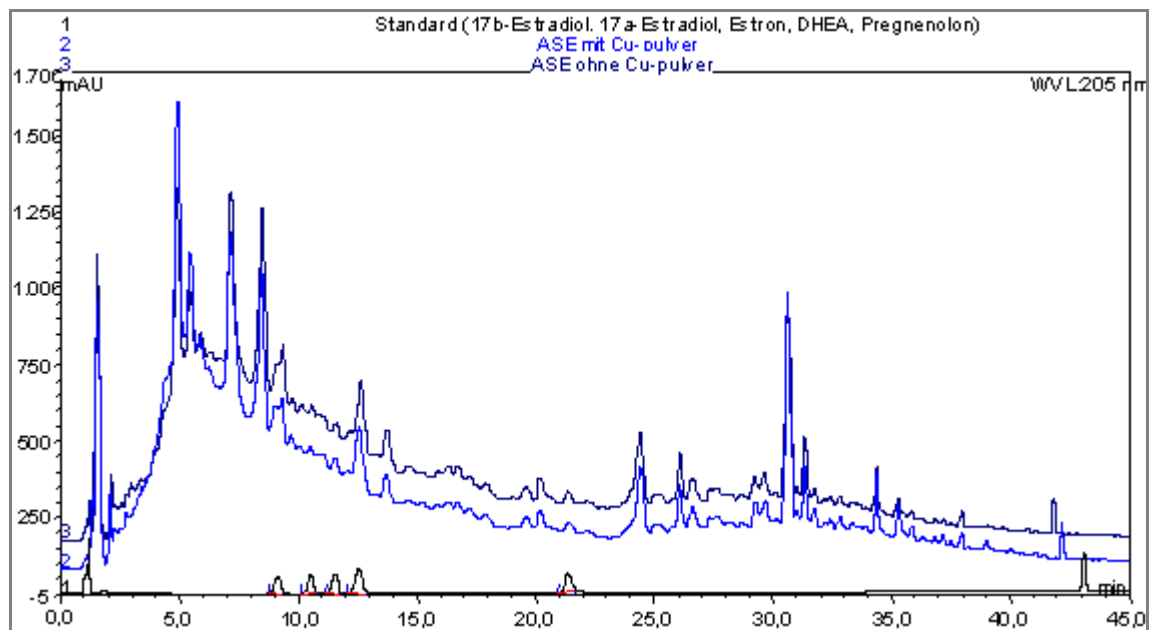


Abbildung 3-4. RP-HPLC Chromatogramme der ASE Extrakte bei Extraktion mit und ohne Kupferbett – Nucleosil C8; 150 x 4,6 mm; 5 μ m, 60°C, Acetonitril/Wasser – Gradient.

Des weiteren wurden an dotierten Teilproben Bettfüllungen aus Kupferpulver getestet.

Bei Extraktionen kann, wie Abbildung 3-4 und Abbildung 3-5 zeigen, durch ein Kupferbett als Zellfüllung keine Verbesserung der Reinheit der Extrakte im Vergleich zu Zellfüllungen ohne Bett erreicht werden. Bei der Verwendung eines Kupferbetts ist stattdessen für die Zielanalyten, außer für Progesteron, eine geringfügig schlechtere Ausbeute zu beobachten.

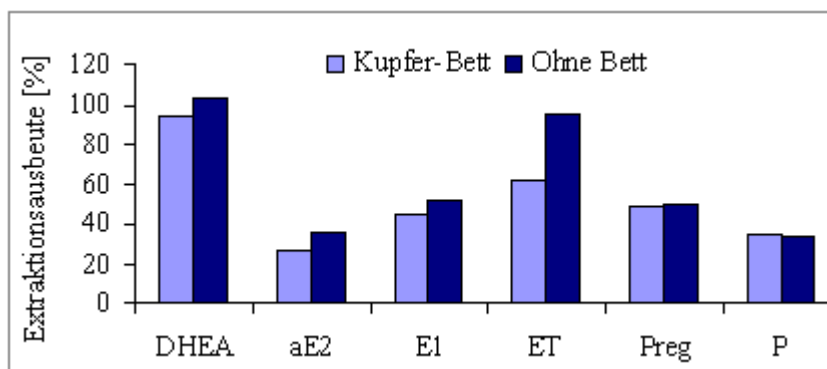


Abbildung 3-5. Vergleich der Extraktionsausbeuten einzelner Steroide bei Zellfüllungen mit und ohne Kupferpulver.

Optimal ist für eine Methanolextraktion mittels ASE das Vermischen des Probenmaterials mit Diathomeenerde im Verhältnis 2 : 1 sowie eine Extraktionstemperatur von 80 °C.

3.2 Hydrolyse gebundener Steroide

Es wurde untersucht, ob ein Hydrolyseschritt zur Spaltung gebundener Steroide bei Faecesproben zu höheren Steroidgehalten in den Extrakten führt.

Eine gefriergetrocknete Faecesprobe unbehandelter Tiere wurde mit Methanol extrahiert. Der Extrakt wurde mittels SPE über Polymerphasenmaterial aufgereinigt und in zwei Teilproben unterteilt. Eine Teilprobe wurde mit Schwefelsäure in Ethylacetat eine Stunde bei 55°C hydrolysiert, die andere nicht. Beide Teilproben wurden zusätzlich über HPLC aufgereinigt und anschließend mittels GC-MS analysiert.

Für Androst-5-en-3 β ,17 β -diol, Estron, 17 α -Estradiol, Dehydroepiandrosteron, Epiandrosteron und 17 α -Testosteron waren die ermittelten Gehalte in der hydrolysierten Teilprobe um das zwei- bis dreifache höher verglichen mit den Gehalten dieser Analyten in der nicht hydrolysierten Teilprobe. Für Etiocholanolon, Pregnenolon und Progesteron waren die Gehalte mit und ohne Hydrolyse vergleichbar hoch. In Abbildung 3-6 sind die

Ergebnisse mit und ohne Hydrolyse dargestellt. In Teil a sind die Analyten mit Konzentrationen bis $400 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, in Teil b die Analyten mit Konzentrationen bis $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ aufgeführt.

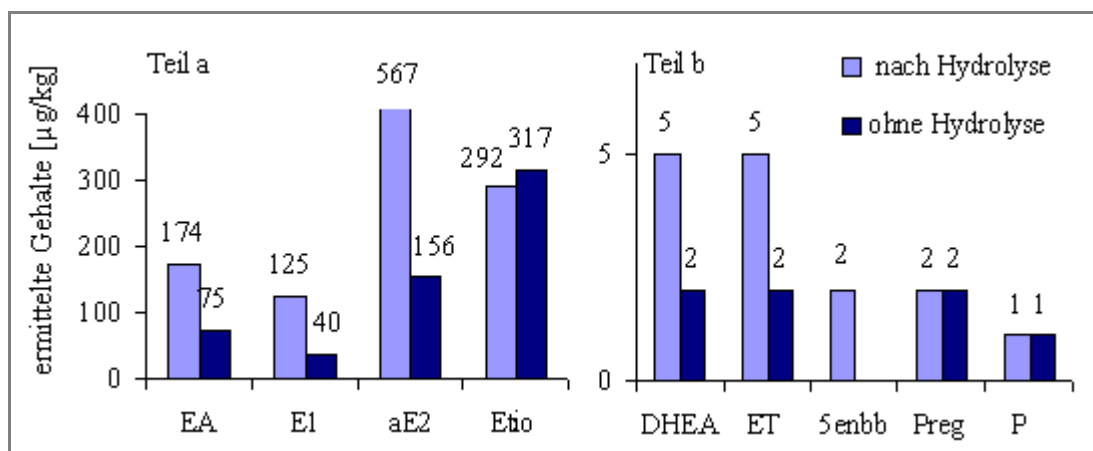


Abbildung 3-6. Vergleich der ermittelten Gehalte einzelner Steroide in einer hydrolysierten und einer nicht hydrolysierten Teilprobe.

Nach einer Hydrolyse sind die ermittelten Konzentrationen an Analyten in den Extrakten deutlich höher als ohne Hydrolyse, so dass dieser Schritt in die Aufarbeitungsmethode aufgenommen werden muss.

3.3 Festphasenextraktion

3.3.1 Vergleich verschiedener Materialien

Zur Auswahl eines geeigneten Festphasenmaterials wurden SPE-Kartuschen verschiedener Größe und von unterschiedlichen Herstellern anhand von Standardlösungen ausgewählter Analyten verglichen. Die getesteten Materialien waren Aminopropylphasen sowie Umkehrphasen auf Kieselgel- und auf Polymerbasis. In diesem Schritt wurden die verschiedenen Materialien anhand einer Elution der Steroide mit Methanol/Wasser-Mischungen direkt auf ihre Polarität und ihr damit zusammenhängendes Retentionsverhalten gegenüber den Steroiden verglichen. Pro 500 mg Phasenmaterial wurden 100 μL einer methanolischen Lösungen der Zielanalyten ($c = 10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ für 17α -Estradiol, Progesteron, 17α -Testosteron und 17β -Testosteron bzw. $c = 100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ für die übrigen Analyten) in eine 2 – 5 mL Wasservorlage dotiert und auf die Säulen aufgegeben. Es wurde mit Methanol/Wasser-Mischungen eluiert. Die Eluate wurden mittels HPLC-DAD analysiert.

3.3.1.1 Elutionsmuster

Zwischen den vergleichbaren Materialien unterschiedlicher Hersteller sind deutliche Unterschiede in den Elutionsmustern der Analyten zu erkennen. Dies ist für die Aminopropylphasen in Abbildung 3-7, für die Umkehrphasen auf Kieselgelbasis in Abbildung 3-8 und für die Umkehrphasen auf Polymerbasis in Abbildung 3-9 am Beispiel des Dehydroepiandrosterons dargestellt.

Von allen getesteten Aminophasen eluieren außer dem Etiocholanolon und dem Epiandrosteron, die von einigen Materialien in nur ein bis zwei 5 mL-Fractionen eluieren, alle getesteten Steroide über mindestens vier 5 mL-Fractionen. Unabhängig vom Material kann das Pregnenolon in allen aufgefangenen Fraktionen nachgewiesen werden.

Für das OnGuardII-P-Material, ein Polymer, das zu den Aminopropylmaterialien vergleichbare Retentionseigenschaften für Steroide besitzt, ist die Elution der Analyten auf zwei bis fünf 5 mL-Fractionen verteilt.

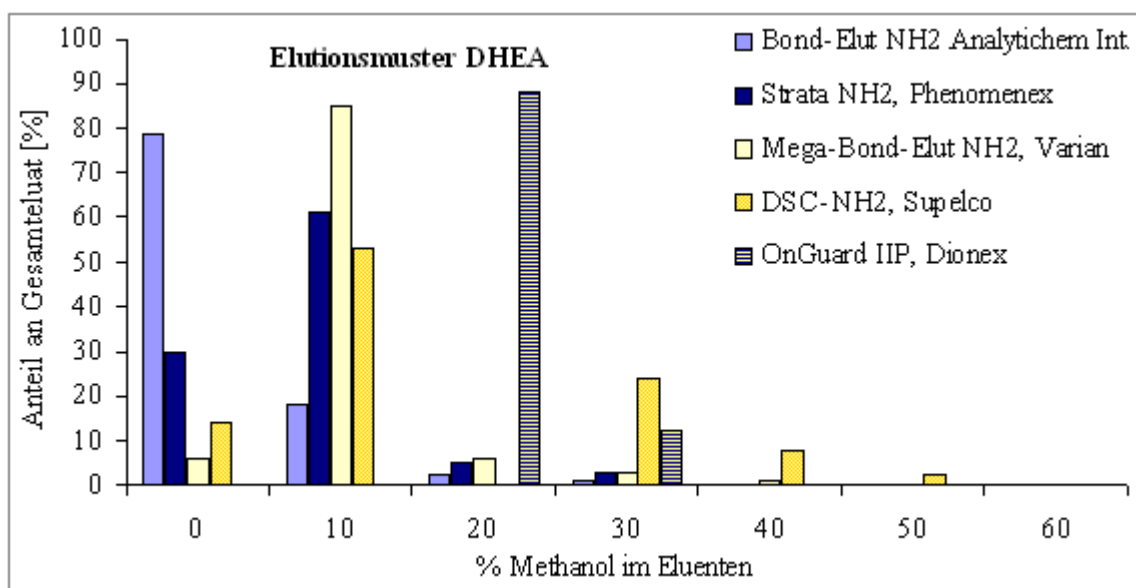


Abbildung 3-7. Elutionsmuster DHEA von Aminopropylmaterialien.

Bei den Umkehrphasenmaterialien auf Kieselgelbasis werden die Steroide von dem speziell für polare Proben empfohlenen C-18 Hydra Material von Macherey-Nagel und dem C-18 Material von Waters, die beide kein Endcapping besitzen, bereits mit einer Mischung Methanol/Wasser 60 + 40 (v/v) eluiert. Besonders deutlich ist dies am Beispiel des Dehydroepiandrosterons in Abbildung 3-8 für das C18-Material von Waters zu sehen, das

bei dieser Eluentenzusammensetzung bereits zu 75% eluiert. Auch für das C18-Hydra-Material kommt es beim Dehydroepiandrosteron mit einer Mischung Methanol/Wasser 60 + 40 (v/v) bereits zu einer Elution von 7% der gesamten eluierten Menge. Das C18-E Material von Phenomenex mit Endcapping und das ODS Material von Baker verhalten sich etwas unpolarer und nur die polaren Steroide, Estrogene sowie Diole, eluieren bereits bei einer Eluentenzusammensetzung Methanol/Wasser 60 + 40 (v/v). Von den anderen beiden Materialien, dem MFC18 von IST und dem CEC1812M15 von SDS werden die Steroide erst mit Mischungen aus Methanol/Wasser 70 + 30 (v/v) eluiert.

Dehydroepiandrosteron zeigt für alle Materialien eine scharfe Elution in zwei bis vier 5 mL Fraktionen. Nur das MFC18-Material von IST eluiert für alle Analyten schärfer in nur zwei 5 mL Fraktionen. Mit Ausnahme der Elution von dem C18-Material von Waters, werden dabei über 90% des Dehydroepiandrosterons in einer Fraktion eluiert.

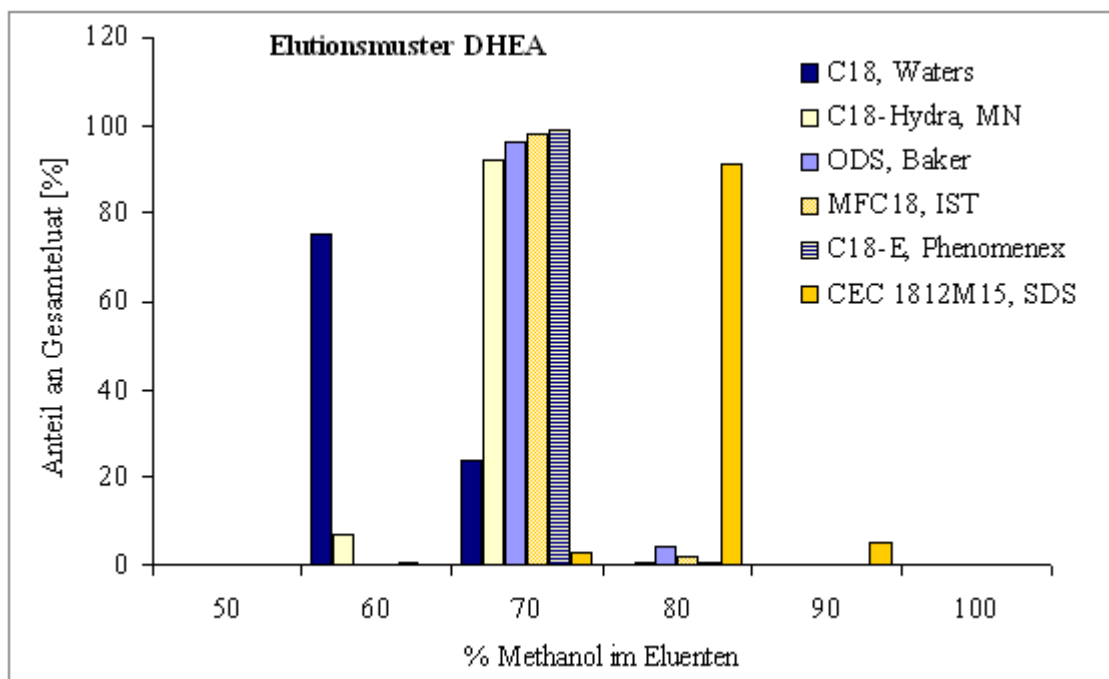


Abbildung 3-8. Elutionsmuster DHEA von Umkehrphasenmaterialien auf Kieselgelbasis.

Von Umkehrphasen auf Polymerbasis eluieren die Steroide von Strata X Material von Phenomenex mit dem geringsten Anteil an organischem Lösungsmittel im Eluenten. Die meisten der untersuchten Steroide eluieren von diesem Material bereits mit Mischungen aus Methanol/Wasser 60 + 40 (v/v). Nur Epiandrosteron und Progesteron eluieren erst mit Mischungen Methanol/Wasser 80 + 20 (v/v). Von Oasis HLB Material von Waters wird von

den verwendeten Zielanalyten nur das Androstendiol bereits mit einer Mischung Methanol/Wasser 60 + 40 (v/v) und nur in Spuren eluiert. Wie in Abbildung 3-9 zu sehen ist, ist das Polymermaterial, das von den getesteten Materialien die unpolarsten Eigenschaften zeigt, das OnGuardII-RP-Material von Dionex. Das OnGuardII-RP-Material hat eine hohe Retentionskraft für die Zielanalyten auch bei hohen Methanolanteilen im Elutionsmittel. Die Zielanalyten eluieren von diesem Material ab einer Eluentenzusammensetzung Methanol/Wasser 80 + 20 (v/v).

Dabei eluieren die Analyten von dem OnGuardII-RP-Material in zwei bis drei, von dem Oasis HLB Material in durchschnittlich drei und vom Strata X-Material in durchschnittlich vier 5 mL-Fractionen.

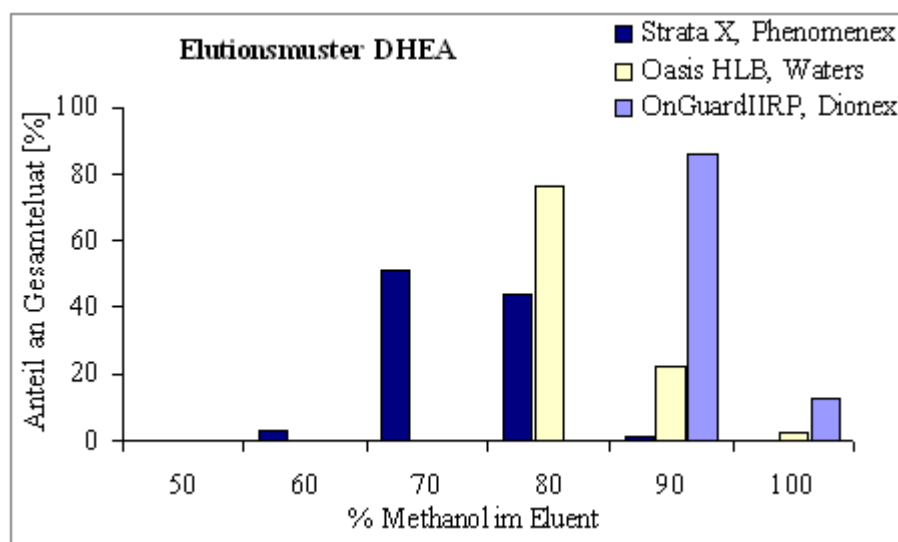


Abbildung 3-9. Elutionsmuster DHEA von Umkehrphasenmaterialien auf Polymerbasis.

Das OnGuardII-RP-Material zeigt in Bezug auf seine Phaseneigenschaften wie pH-Stabilität sowie die Elutionseigenschaften der Analyten von allen getesteten Materialien die besten Eigenschaften zur Aufarbeitung von Faecesproben. In weiteren Schritten wurden daher Elutionsmittel und Waschschrte für dieses Material optimiert (siehe Kapitel 3.3.2).

3.3.1.2 Wiederfindungen für Standardlösungen

Für die untersuchten SPE-Materialien wurden neben den Elutionsmustern der Analyten auch deren Gesamtwiederfindungen aller Eluate bestimmt.

Die Umkehrphasenmaterialien auf Kieselgelbasis zeigen in den Wiederfindungen der Zielanalyten große Unterschiede. Wie in Abbildung 3-10 zu sehen ist, zeigen nur das CEC-Material, das C18-Hydra-Material und das C18-E-Material von Phenomenex für alle Analyten Wiederfindungen über 80%. Die Eluate des MFC-18-Materials weisen mit unter 65 % schlechte Wiederfindungen für die Estrogene auf. Alle anderen getesteten Analyten werden zu über 100 % wiedergefunden. Die schlechtesten Wiederfindungen werden für die Eluate des C18-Materials von Waters ermittelt, hier liegen nur die Wiederfindungen von Estron, 17 α -Estradiol, 17 α -Testosteron und Progesteron über 80%.

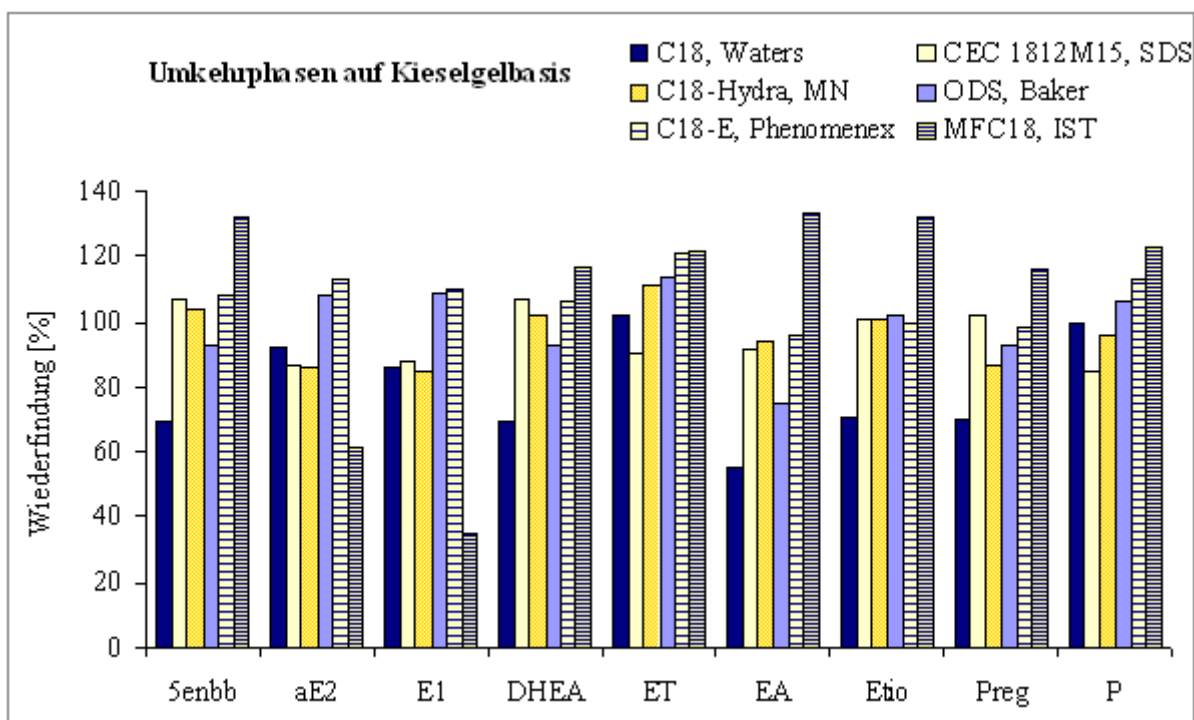


Abbildung 3-10. Wiederfindungen einzelner Steroide nach SPE an Umkehrphasenmaterialien auf Kieselgelbasis.

Abbildung 3-11 zeigt die Wiederfindungen ausgewählter Analyten für Umkehrphasen auf Polymerbasis. Sie sind für alle Analyten auf den getesteten Materialien mit über 80% zufriedenstellend. Für das OnGuardII-RP-Material, das die besten Eigenschaften in Bezug auf die Retentions- und Elutionseigenschaften der Steroide zeigt, können die Wiederfindungen zudem durch eine Elution mit Ethylacetat, einem weniger polaren Lösungsmittel als Methanol, noch erhöht werden. Die Wiederfindungen der Analyten in den Eluaten des OnGuardII-RP-Materials, die mit Ethylacetat als Elutionsmittel erreicht werden,

liegen zwischen 98 % und 124 %. Dies ist eine deutliche Verbesserung im Vergleich zu den Wiederfindungen mit Methanol als Elutionsmittel, zwischen 83 % und 103 %.

Das OnGuardII-RP-Material zeigt in Bezug auf die Wiederfindung der Analyten in Standardlösungen gute Ergebnisse.

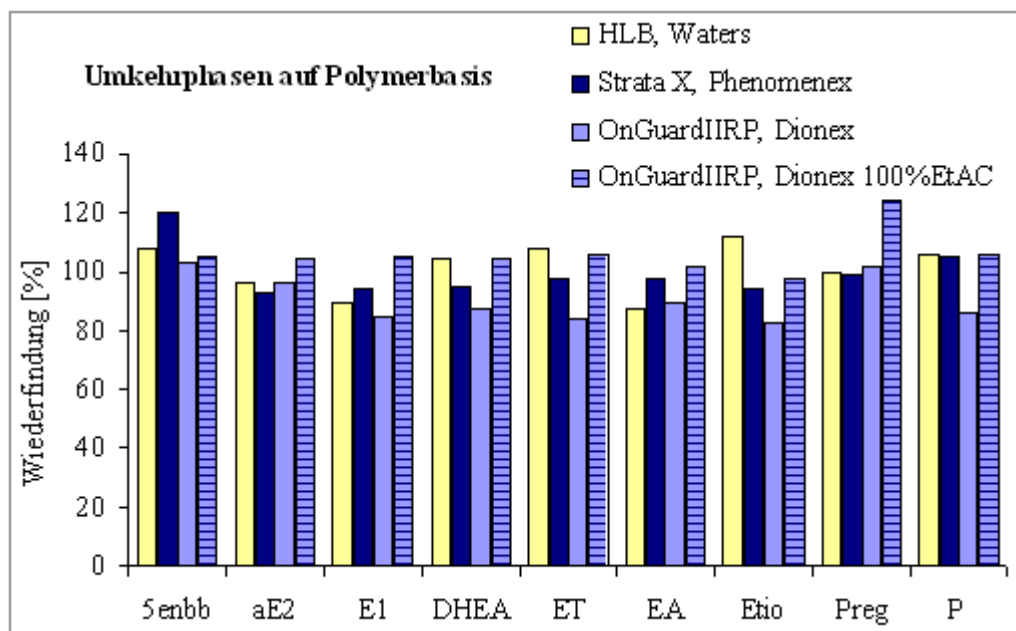


Abbildung 3-11. Wiederfindungen einzelner Steroide nach SPE an Umkehrphasenmaterialien auf Polymerbasis.

Für Aminophasen zeigt das Strata NH₂ Material mit 42 – 83 % die schlechtesten Wiederfindungen für die getesteten Zielanalyten. Lediglich Pregnenolon und Androst-5-en-3 β ,17 β -diol werden zu über 80% wiedergefunden. Die Wiederfindungen waren für die anderen drei getesteten Materialien vergleichbar, für Pregnenolon und Androst-5-en-3 β ,17 β -diol ebenfalls über 79 %, für 17 α -Estradiol, Estron und Dehydroepiandrosteron im Bereich 64 – 75% und für 17 α -Testosteron, Epiandrosteron, Etiocholanolon und Progesteron zwischen 48 und 78 %. Die Wiederfindungen für die meisten Zielanalyten sind damit bei allen getesteten Aminophasenmaterialien eher gering. Aus diesem Grund eignet sich Aminopropylmaterial nicht als stationäres Phasenmaterial zur Aufreinigung dieser Steroide über SPE.

Das OnGuardII-P-Material verhält sich in Bezug auf die Retention der Analyten vergleichbar zu Aminokartuschen, es ist daher in Abbildung 3-12 zusammen mit den Aminopropylmaterialien aufgeführt. Die Wiederfindungen in den Eluatn des OnGuardII-P-

Materials sind deutlich besser als bei den getesteten Aminopropylmaterialien und liegen für alle getesteten Steroide über 90%.

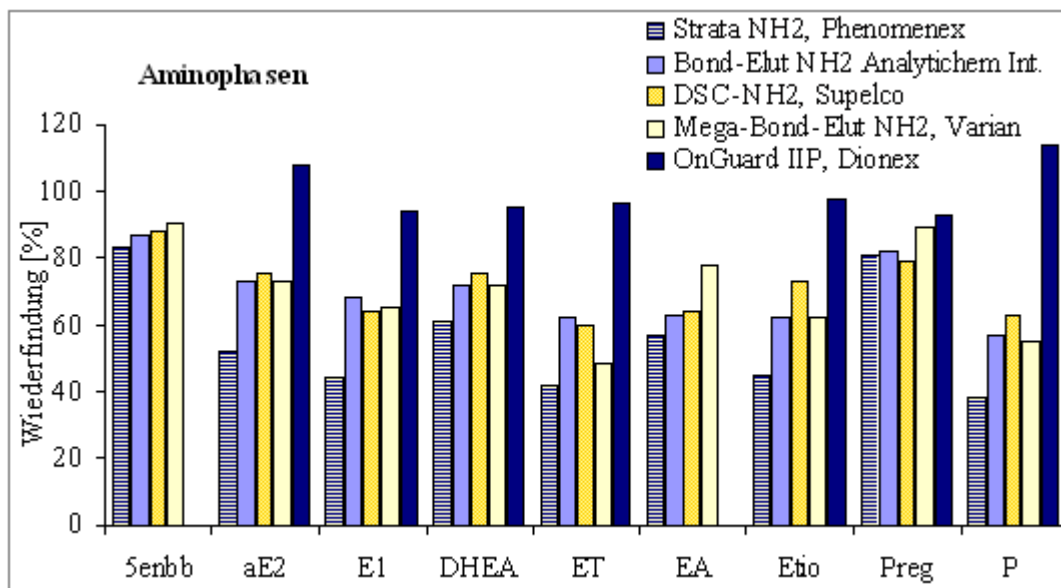


Abbildung 3-12. Wiederfindungen einzelner Steroide nach SPE an Aminopropylmaterialien.

3.3.2 Aufreinigungsverhalten verschiedener Materialien

Für die Versuche mit Standardlösungen zeigten das OnGuardII-P- und OnGuardII-RP-Material die besten Ergebnisse. Diese Materialien wurden daraufhin an Matrixproben auf die Leistungsfähigkeit ihres Aufreinigungsverhaltens getestet.

3.3.2.1 OnGuardII-P-Material

Eine dotierte, gefriergetrocknete Faecesmischprobe unbehandelter Tiere wurde mit Methanol extrahiert. Der Extrakt wurde mit einer Mischung aus mehreren Zielanalyten dotiert und auf OnGuardII-P-Kartuschen aufgegeben. Die Eluate wurden direkt gesammelt und mittels HPLC-DAD analysiert. Das erhaltene Chromatogramm wurde mit einem Chromatogramm eines Methanolextraktes einer dotierten Faecesprobe verglichen, der nicht über SPE aufgereinigt wurde.

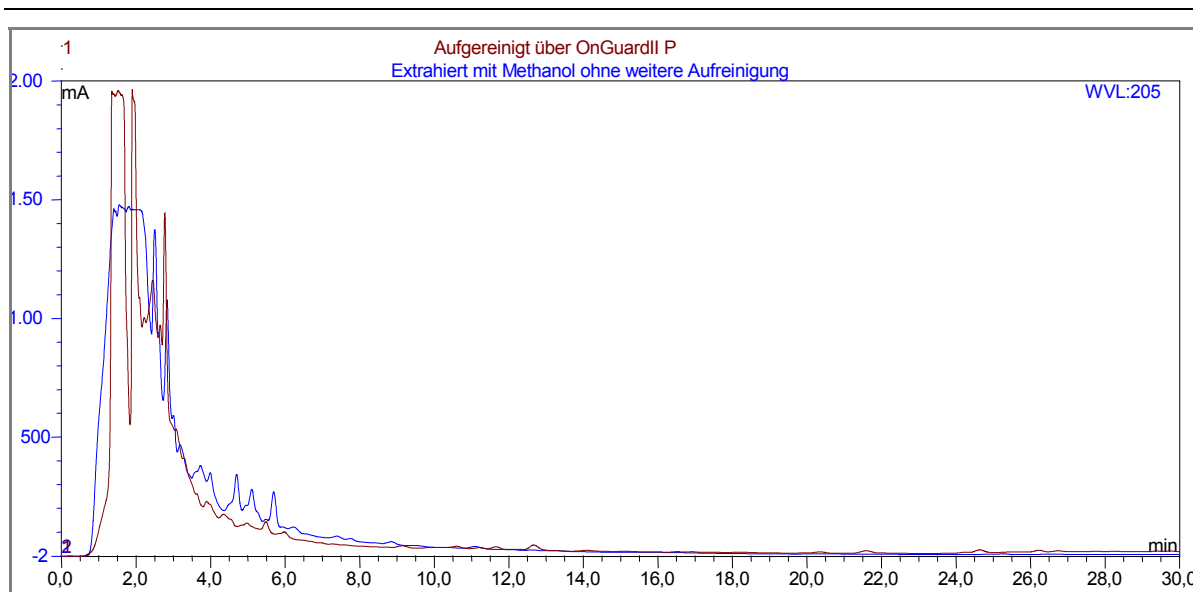


Abbildung 3-13. Vergleich Chromatogramme nicht aufgereinigter Methanolextrakt (blau) mit Methanolextrakt, aufgereinigt über OnGuardII-P-Kartusche (braun) – Nucleosil C8; 150 x 4,6 mm; 5 µm, 60°C, Acetonitril/Wasser - Gradient.

Die Chromatogramme in Abbildung 3-13 zeigen eine über OnGuardII-P aufgereinigte Probe im Vergleich zu einem nicht aufgereinigten Extrakt. Verglichen mit dem reinen Methanolextrakt, ist für die Eluate der OnGuardII-P-Kartuschen keine Verbesserung der Reinheit zu erkennen. Dieses Material eignet sich unter den getesteten Bedingungen somit nicht zur Abtrennung der Analyten von Matrixkomponenten für eine Aufreinigung der Faecesextrakte.

3.3.2.2 Waschschritte für OnGuardII-RP-Material

Zur Erarbeitung eines Waschschrittes auf dem ausgewählten Polymermaterial wurde eine dotierte, gefriergetrocknete Faecesprobe unbehandelter Tiere mit Methanol extrahiert. Der Extrakt wurde in vier gleiche Teilproben unterteilt und jede Teilprobe wurde mit 5 µg 17α-Estradiol, Estron und Progesteron, sowie 50 µg Dehydroepiandrosteron und Pregnenolon dotiert. Alle Teilproben wurden durch SPE über OnGuardII-RP-Material aufgereinigt. Dabei wurde für jede Teilprobe ein anderer Waschschritt eingesetzt. Als Waschlösungen wurden Natronlauge ($c = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Phosphorsäure ($c = 0,33 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), n-Hexan und eine Mischung Methanol/Wasser 70 + 30 (v/v) miteinander verglichen. Danach wurde mit Methanol eluiert. Die verschiedenen Eluate und Waschfraktionen der Polymerphase wurden mittels HPLC-DAD analysiert.

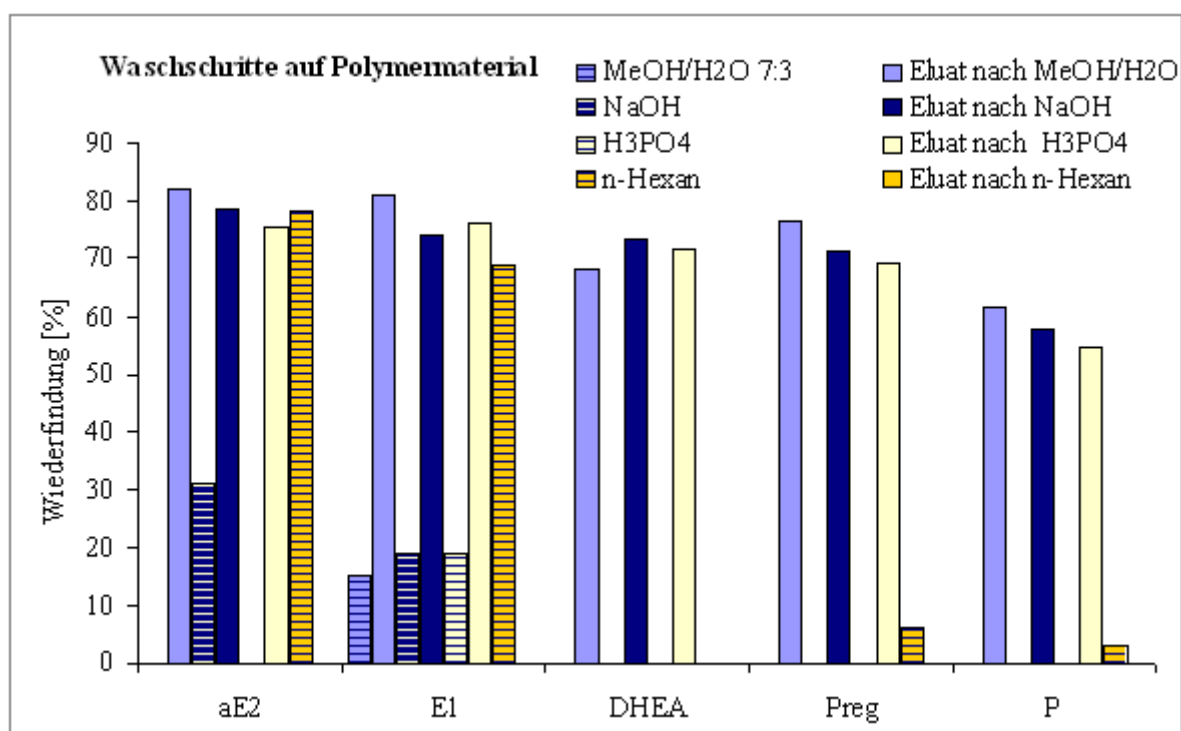


Abbildung 3-14. Vergleich der Wiederfindungen einzelner Steroide nach verschiedenen Waschschritten auf OnGuardII-RP-Material.

Für diesen Versuch war es nicht erforderlich, eine nahezu 100%ige Wiederfindung zu erreichen. Es wurde von einer Reproduzierbarkeit der Wiederfindungsraten der einzelnen Analyten unter vergleichbaren Elutionsbedingungen ausgegangen. Wichtig war der direkte Vergleich der Wiederfindungen in den verschiedenen Waschlösungen, um Verluste durch das Waschen zu erkennen. Zum Vergleich mit den Waschschritten mit Natronlauge und Phosphorsäure wurde mit einer Mischung aus Methanol/Wasser 70 + 30 (v/v) gewaschen. Die vorherigen Versuche an Standardlösungen zeigten für diese Eluentenzusammensetzung noch keine Elution von Zielanalyten, so dass dieser Waschschritt als eine Art Blindwert ohne Waschen zu betrachten ist.

Wie in Abbildung 3-14 zu sehen ist, sind die Wiederfindungen von 17 α -Estradiol, Estron, Dehydroepiandrosteron, Pregnenolon und Progesteron in den Methanoleluaten nach Waschschritten mit Natronlauge, Phosphorsäure und einer Mischung aus Methanol/Wasser vergleichbar. Die schlechtesten Wiederfindungen werden dabei für Progesteron mit etwa 60 % erreicht.

Nach einem Waschschritt mit n-Hexan können dagegen keine Analyten im Methanoleluat nachgewiesen werden. Die Analyten werden bereits in der n-Hexan Fraktion eluiert.

Dehydroepiandrosteron kann bei diesem Waschschrift in keiner der Fraktionen nachgewiesen werden. Auch Progesteron und Pregnenolon werden ausschließlich in der n-Hexanfraktion und in dieser nur zu unter 10 % wiedergefunden.

In den Waschfraktionen der Teilproben, die mit Natronlauge, Phosphorsäure oder nur einer Mischung aus Methanol/Wasser gewaschen wurden, wird das Estron im Bereich unter 20 % wiedergefunden. 17 α -Estradiol wird mit 30 % nur in der Waschfraktion der Natronlauge wiedergefunden.

Ob es bei einem geringen Verlust an Analyten auch zu einer Diskriminierung von Isotopen kommt, muss in speziellen Experimenten geklärt werden.

Die beste Aufreinigung wird bei vergleichbaren Wiederfindungen in den Eluatn mit einem Waschschrift mit Natronlauge erreicht. Waschschrift mit Phosphorsäure oder nur einer Mischung aus Methanol/Wasser 70 + 30 (v/v) führen zu etwas schlechteren Ergebnissen in Bezug auf die Reinheit der Extrakte.

Die beste Aufreinigung und Konzentrierung wird mit OnGuardII-RP-Material erreicht, wenn die Kartuschen vor einer Elution der Steroide mit Ethylacetat mit Natronlauge gewaschen werden.

3.4 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion ist eine weitere Möglichkeit der Aufreinigung von Faecesextrakten. Ihr Aufreinigungsverhalten wurde ebenfalls untersucht.

Eine dotierte, gefriergetrocknete Faecesprobe unbehauelter Tiere wurde mit Methanol extrahiert und der Extrakt durch SPE über Polymerphasen aufgereinigt. Zunächst wurden die Sulfat-Konjugate der Zielanalyten eluiert und solvolysiert, danach wurden die freien Steroide eluiert und mit dem solvolysierten Eluat vereinigt. Die Probe wurde in zwei gleiche Teilproben unterteilt. Eine Teilprobe wurde weiter über einen SPE-Schrift auf Aminopropylmaterial aufgereinigt. Für die andere Teilprobe wurde dieser Schrift durch einen Flüssig-Flüssig-Waschschrift mit Natronlauge ($c = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) ersetzt. Danach folgte für beide Teilproben eine identische Aufreinigung über HPLC und die Analyse mittels GC-MS.

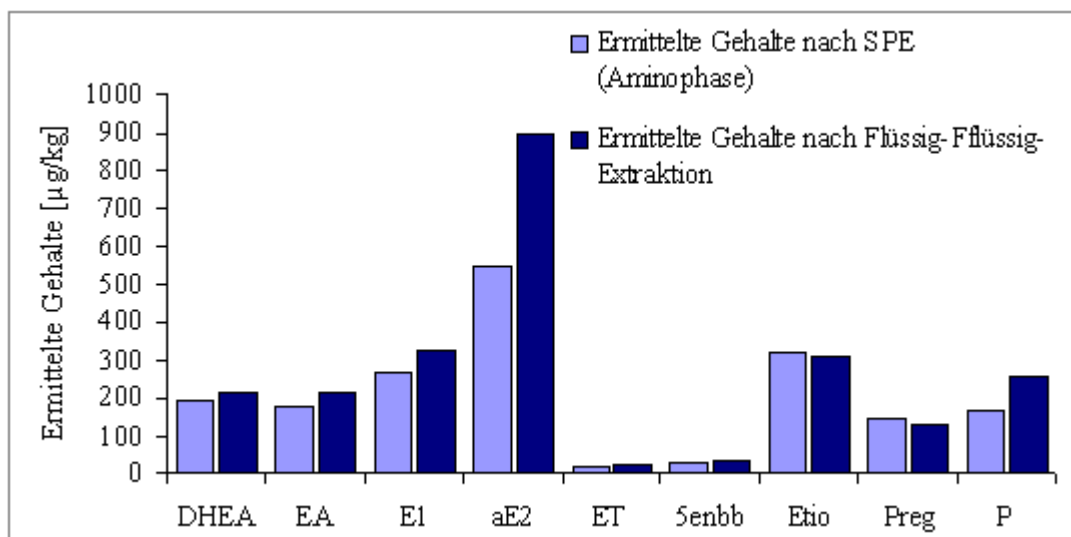


Abbildung 3-15. Vergleich der ermittelten Gehalte einzelner Steroide nach Aminophasen-SPE und Flüssig-Flüssig-Extraktion.

In Abbildung 3-15 sind die ermittelten Gehalte an Analyten für die zwei unterschiedlichen Aufarbeitungen, einmal über eine SPE an Aminopropylmaterial und einmal über einen Flüssig-Flüssig-Waschschritt mit Natronlauge, gegenübergestellt. Die Teilprobe, in der der SPE-Schritt an Aminopropylmaterial durch einen Flüssig-Flüssig-Waschschritt mit Natronlauge ausgetauscht wurde, zeigt für einige Analyten etwas bessere Wiederfindungen, die Wiederfindungen für andere Zielanalyten bleiben unverändert. Für 17 α -Estradiol führt der Flüssig-Flüssig-Extraktionsschritt zu deutlich höheren Gehalten im Extrakt. Für die anderen Analyten kommt es nur zu geringen beziehungsweise keinen Verbesserungen.

Die Aufreinigung der Extrakte ist nach einem Flüssig-Flüssig-Waschschritt zudem deutlich besser als nach einer SPE an Aminopropylmaterial. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion ist daher einem SPE-Schritt an Aminopropylmaterial vorzuziehen.

3.5 HPLC

Zur Ermittlung eines geeigneten HPLC-Systems zur weiteren Aufreinigung der Faecesextrakte wurden verschiedene Säulenmaterialien, Elutionsmittelgemische und Temperaturen im analytischen Maßstab an Standardlösungen und Matrixproben getestet.

3.5.1 Phasenmaterialien und Fließmittel

Es wurden ein RP8-, ein Cyanopropyl-, ein Diol- und ein Aminopropylmaterial getestet. Als Fließmittel wurden bei der Umkehrphase Acetonitril/Wasser- und bei den Normalphasen 2-Propanol/n-Hexan-Gemische unterschiedlicher Zusammensetzung verglichen.

Abbildung 3-16 zeigt die Retentionszeiten verschiedener Steroide auf einer Umkehrphase in Abhängigkeit vom Acetonitrilanteil des Fließmittels. Bei Acetonitrilanteilen, die niedriger sind als in einer Mischung Acetonitril/Wasser 40 + 60 (v/v), sind die Retentionszeiten für Progesteron und Pregnenolon bereits höher als 25 Minuten. Bei Acetonitrilanteilen, die höher sind als in einer Mischung Acetonitril/Wasser 60 + 40 (v/v), liegen die Retentionszeiten für alle untersuchten Analyten unter 10 Minuten. Testosteron und 17 α -Estradiol werden mit allen getesteten Gemischen schlecht getrennt und ihre Elutionsreihenfolge kehrt sich bei einer Fließmittelzusammensetzung Acetonitril/Wasser 40 + 60 (v/v) um.

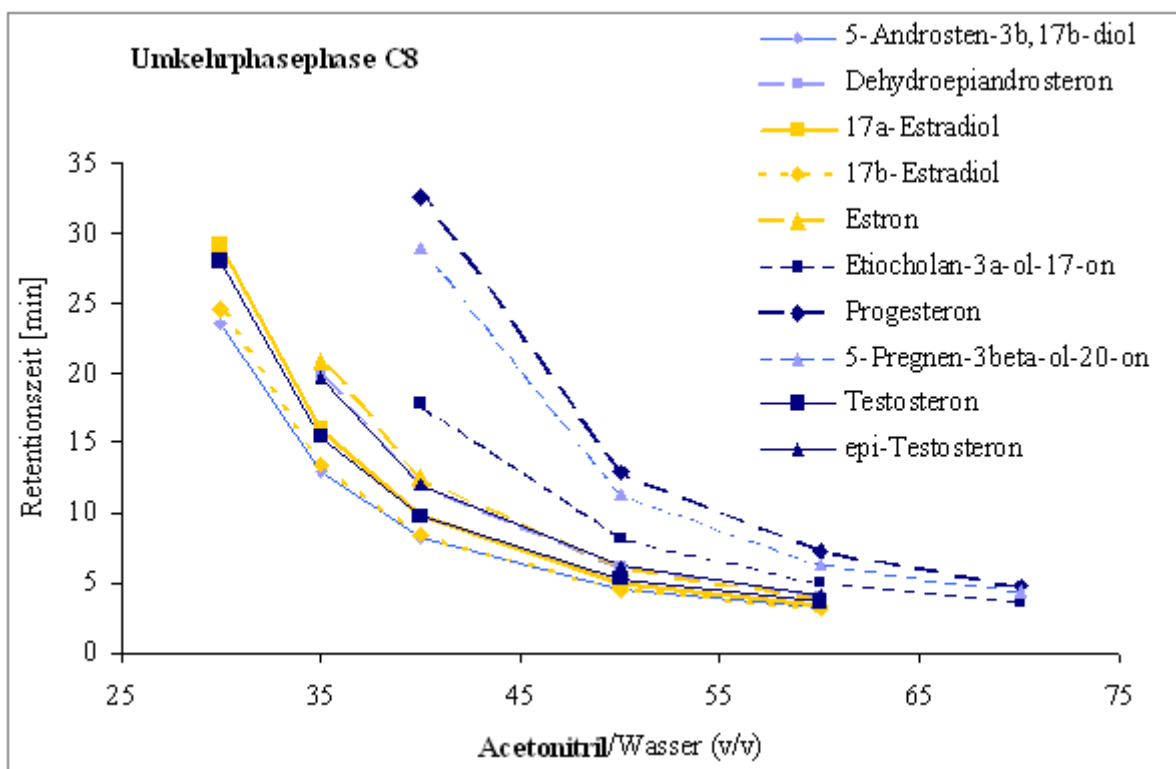


Abbildung 3-16. Retentionszeiten einzelner Steroide in Abhängigkeit von der Fließmittelzusammensetzung – Nucleosil C8; 150 x 4,6 mm; 5 μ m, 60°C.

Außerdem wurden für das C8-Umkehrphasenmaterial unterschiedliche Gradientenprogramme verglichen. In Abbildung 3-17 sind für die in Tabelle 3-1

aufgelisteten Gradientensysteme die Retentionszeiten einzelner Steroide im Vergleich dargestellt. Für die Gradienten 1 und 3 steigt der Acetonitrilanteil steil an, wobei aber für Gradient 3 mit einem niedrigeren Anteil Acetonitril begonnen wurde. Gradient 2 hat am Anfang einen steilen Anstieg des Acetonitrilanteils. Danach wird der Anteil Acetonitril zwölf Minuten konstant gehalten und darauf folgt erneut ein steiler Anstieg des Acetonitrilgehaltes. Der Acetonitrilanteil in Gradient 4 steigt 20 Minuten erst langsamen an, dann folgt ein steilerer Anstieg des Acetonitrilanteils.

Tabelle 3-1. Gradientensysteme für Umkehrphasenmaterialien.

Gradient	T	
1	5°C	
	20°C	
	40°C	Zeit [min] 0 30 45 47 52
	60°C	Acetonitril/Wasser (v/v) 30+70 95+ 5 95+ 5 30+70 30+70
2	40°C	Zeit [min] 0 8 20 40 55 57 62
		Acetonitril/Wasser (v/v) 30+70 45+55 45+55 95+5 95+ 5 30+70 30+70
3	60°C	Zeit [min] 0 35 45 47 52
		Acetonitril/Wasser (v/v) 20+80 95+ 5 95+ 5 20+80 20+80
4	60°C	Zeit [min] 0 20 40 50 52 57
		Acetonitril/Wasser (v/v) 35+65 45+55 95+ 5 95+ 5 35+65 35+65

Vergleicht man die Retentionszeiten der Steroide für die Gradienten 1, 3 und 4 mit einer Säulentemperatur von 60°C, ist die Trennung der Analyten mit Gradient 4 etwas besser als mit Gradient 1 und 3. Die Gradienten 1 und 3 unterscheiden sich nicht in ihrer Trennleistung, mit Gradient 1 werden jedoch deutlich niedrige Retentionszeiten erreicht. Die Retentionszeiten der analysierten Steroide liegen bis auf die des 17 β -Estradiol, für Gradient 4 zwischen denen der Gradienten 1 und 3.

Vergleicht man Gradient 1 und 2 mit einer Säulentemperatur von 40°C, ist die Trennung mit Gradient 2 etwas besser als mit Gradient 1 und die Retentionszeiten mit Gradient 2 sind etwas höher als mit Gradient 1.

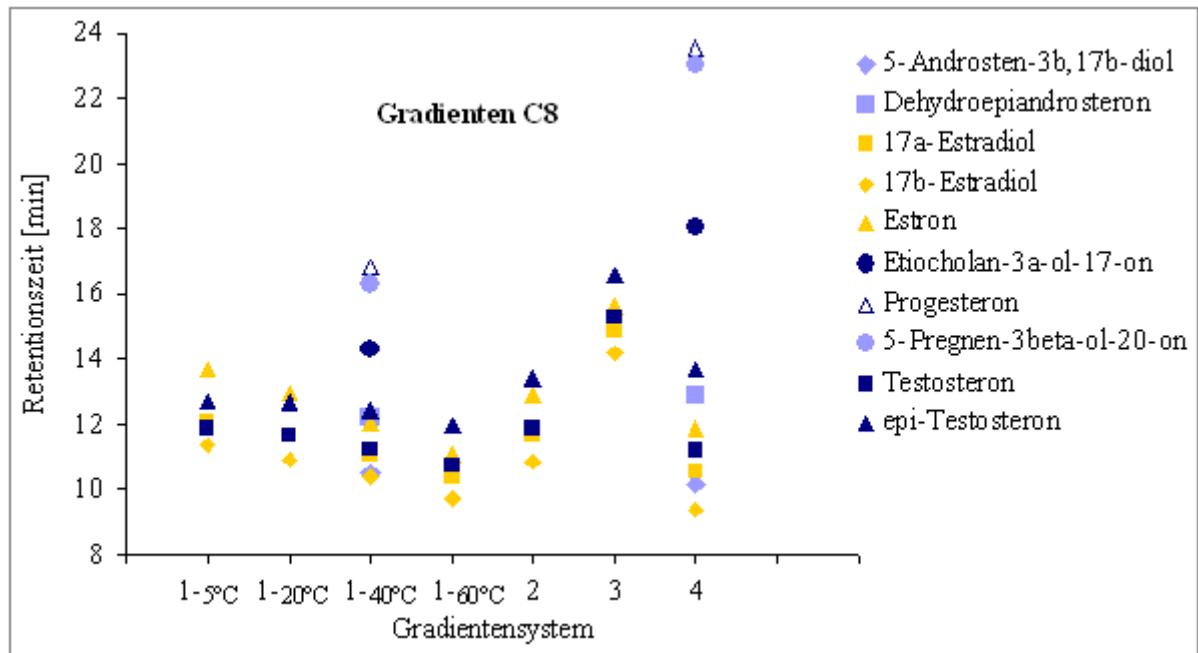


Abbildung 3-17. Retentionszeiten einzelner Steroide für unterschiedliche Gradientensysteme – Nucleosil C8; 150 x 4,6 mm; 5 µm.

Um den Einfluss der Temperatur auf die Trennung der Steroide zu verdeutlichen, sind in Abbildung 3-18 die Auflösungen von 17 α -Estradiol/17 β -Estradiol sowie 17 α -Testosteron/17 β -Testosteron gegen die Temperatur aufgetragen.

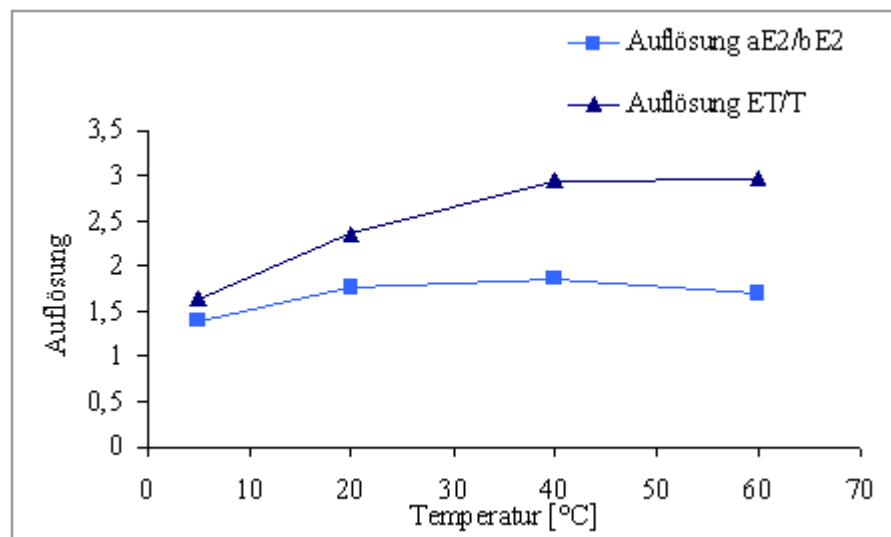


Abbildung 3-18. Einfluss der Säulentemperatur auf die Auflösung von 17 α -Estradiol/17 β -Estradiol beziehungsweise 17 α -Testosteron/17 β -Testosteron.

Die Auflösung für die beiden Analytpaarungen steigt mit der Temperatur, sie ist für 17 α -Estradiol/17 β -Estradiol bei 60°C am besten. Für das Analytenpaar 17 α -Testosteron/17 β -Testosteron ist die Auflösung bei 40°C am größten und fällt bei 60°C wieder etwas ab. Betrachtet man alle untersuchten Analyten, wird insgesamt die beste Trennung bei 60°C erreicht.

Die Elutionsreihenfolge der untersuchten Steroide auf einem Cyanopropylmaterial, das unter Normalphasenbedingungen betrieben wird, ist erwartungsgemäß umgekehrt gegenüber der RP-Chromatographie.

In Abbildung 3-19 sind die Retentionszeiten einzelner Steroide für eine Cyanopropyl-Säule in Abhängigkeit von dem 2-Propanolanteil im Fließmittel dargestellt.

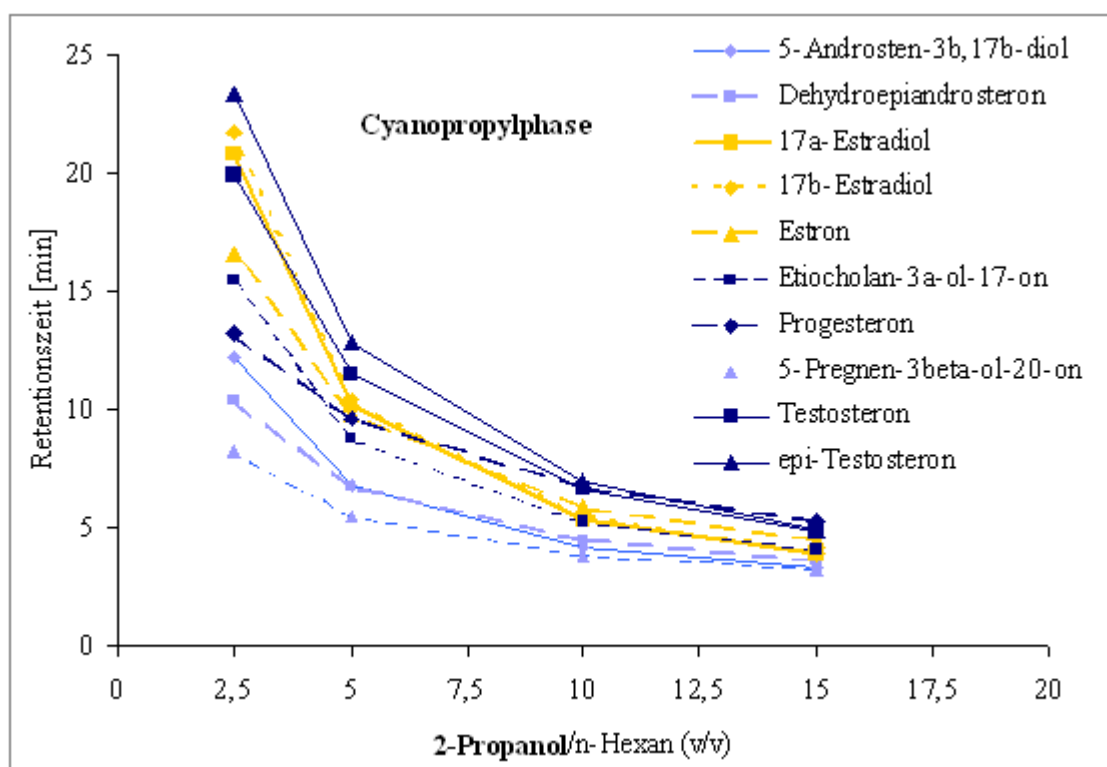


Abbildung 3-19. Retentionszeiten einzelner Steroide auf CN-Material in Abhängigkeit von der Fließmittelzusammensetzung – Luna CN; 150 x 4,6 mm; 5 μ m.

Je höher der 2-Propanolanteil des Fließmittels ist, desto niedriger sind die Retentionszeiten der Steroide auf diesem Phasenmaterial. Für eine Zusammensetzung 2-Propanol/n-Hexan 15 + 85 (v/v) liegen die Retentionszeiten aller untersuchter Steroide deutlich unter 10 Minuten. Für eine Zusammensetzung 2-Propanol/n-Hexan 2,5 + 97,5 (v/v) eluiert das Steroid mit der längsten Retentionszeit, das 17 α -Testosteron, erst nach 23,4 Minuten. Für viele

Analytpaarungen kommt es außerdem zu einer Umkehrung der Elutionsreihenfolge, beispielsweise eluiert Etiocholanolon bei einer Zusammensetzung des Fließmittels 2-Propanol/n-Hexan 2,5 + 97,5 (v/v) nach Progesteron, bei einer Zusammensetzung 2-Propanol/n-Hexan 5 + 95 (v/v) aber vor Progesteron.

Die Retentionszeiten für eine Cyanopropylphase werden durch steigende Temperaturen verringert, wobei die Veränderung bei längeren Retentionszeiten deutlich größer ist. Die besten Ergebnisse für diese Phase wurden jedoch bei Raumtemperatur erzielt, da die verwendeten erhöhten Säulentemperaturen einen ungünstigen Einfluss auf die Trennung der Analyten haben.

Bei Matrixversuchen mit einem RP8- und einem CN-Phasen-System zeigt sich, dass die Aufreinigungskapazität des Umkehrphasensystems deutlich höher ist als die des CN-Phasen-Systems.

3.5.2 Peakparameter

Für mehrere Säulenmaterialien, die unter Normalphasenbedingungen betrieben wurden, wurden Standardlösungen von 17α -Estradiol und 17β -Testosteron mit unterschiedlichen Systemen analysiert. Für die Peaks dieser Analyten wurden die Parameter Peakbreite, Asymmetrie und Bodenzahl bestimmt. Anhand dieser Parameter wurden die verschiedenen Säulenmaterialien verglichen.

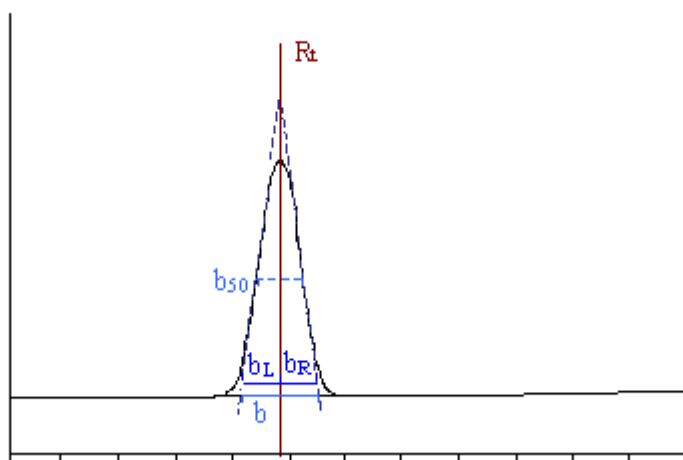


Abbildung 3-20. Variablen zur Bestimmung der Peakparameter.

Die Basisbreite ist dabei definiert als der zeitliche Abstand der Schnittpunkte der Wendepunkt tangentialen von ansteigender und abfallender Flanke des Peaks mit der Basislinie.

Als Maß für ein Fronting oder Tailing von Peaks dient die Asymmetrie. In der Theorie wird dabei die Form eines Peaks einer Gauß-Verteilung gleichgesetzt. Nach dem EUROPÄISCHEN ARZNEIBUCH (2002) berechnet sie sich nach Gleichung 3-1, wobei eine Asymmetrie von 1 der Idealform entspricht. Asymmetrien < 1 zeigen ein Fronting, Asymmetrien > 1 ein Tailing des Peaks an.

Gleichung 3-1. Asymmetrie:

$$A = \frac{b_L + b_R}{2 \cdot b_L}$$

mit : A = Asymmetrie

b_L = Linke Peakbreite in 5% der Peakhöhe

b_R = Rechte Peakbreite in 5% der Peakhöhe

Die theoretische Bodenzahl ist ein Maß für die Trennleistung einer Säule. Sie berechnet sich aus der Peakbreite und der dazugehörigen Retentionszeit des Peaks. Nach dem EUROPÄISCHEN ARZNEIBUCH (2002) ist sie definiert als:

Gleichung 3-2. Theoretische Böden:

$$TB = 5,54 \cdot \left(\frac{R_t}{b_{50}} \right)^2$$

mit : TB = theoretische Böden

R_t = Retentionszeit des Peaks

b = Basisbreite des Peaks in 50% der Höhe

Diese Peakparameter sind in Tabelle 3-2 für drei Säulen gegenübergestellt. Bei den Normalphasen-Systemen zeigt die Aminosäule Asymmetrien von über 1,5 und damit ein sehr starkes Tailing für die Peaks von 17 α -Estradiol und 17 β -Testosteron. Diol- und Cyanophasen dagegen zeigen deutlich bessere Peaksymmetrien, wobei die besten mit 1,01 und 1,00 mit der Luna CN-Säule erreicht werden.

ERGEBNISSE

Tabelle 3-2. Peakparameter für unterschiedliche Säulenmaterialien unter Normalphasen-Bedingungen.

Säule [*]	2-Propanol in n-Hexan [%]	Injizierte Menge [µg]	Injiziertes Volumen [µL]	R _t ¹ [min]	b ² [min]	Asymm. ³	Böden ⁴
17α-Estradiol (205 nm)							
Luna CN	5	0.15	1	10,1	0.41	1.01	10090
SphereClone NH2	5	0.15	1	26,3	1.95	1.72	4235
	10	0.15	1	10,0	0.64	1.75	4061
Spherex Diol, 50°C	5	0.30	2	11,1	0.51	1.23	7675
Testosteron (240 nm)							
Luna CN	5	0.13	1	11,5	0.49	1.00	10989
SphereClone NH2	5	0.13	1	9,6	0.66	2.58	3005
	10	0.13	1	4,8	0.41	1.37	1871
Spherex Diol, 50°C	5	0.13	1	10,0	0.49	1.2	7375

* Säulendimensionen: 150 x 4.6mm, 5µm; Temperatur: 25°C, Flussrate: 1 mL · min⁻¹

¹ Retentionszeit

² Basisbreite: zur Bestimmung siehe Abbildung 3-20

³ Asymmetrie: zur Berechnung siehe Gleichung 3-1

⁴ theoretischen Böden: zur Berechnung der siehe Gleichung 3-2

Die Bedingungen wurden so gewählt, dass die Retentionszeiten der Peaks vergleichbar sind, für die NH2-Säule wurde daher auch mit einer Eluentenzusammensetzung 2-Propanol/n-Hexan 10 + 90 (v/v) gearbeitet. Da die drei verglichenen Säulen die gleichen Säulendimensionen besitzen, sind die ermittelten Bodenzahlen direkt vergleichbar. Je höher die Bodenzahl ist, desto besser ist die Trennleistung der Säule zu bewerten. Die Bodenzahl für die Luna CN-Säule ist mit etwa 10.000 theoretischen Böden deutlich höher als die der SphereClone NH2 und der Spherex Diol Säule mit etwa 4.000 beziehungsweise 7.000 theoretischen Böden.

Die Umkehrphase zeigte gute Ergebnisse für die Peakparameter der Zielanalyten. Die Basisbreiten der Peaks lagen bei vergleichbaren Retentionszeiten und gleichen injizierten Mengen bei 0,5 Minuten.

3.5.3 Detektierbarkeit/Nachweisgrenzen

Die UV-Aktivität der untersuchten Steroide ist abhängig von ihrer Struktur. Androstandiole zeigen kaum UV-Aktivität und sind mit gebräuchlichen UV-Detektoren im gegebenen Konzentrationsbereich nicht detektierbar. Androstendiole, Androsterone, Etiocholanolon,

Pregnenolon und Dehydroepiandrosteron haben aufgrund einer Doppelbindung oder Ketogruppe in Acetonitril/Wasser-Mischungen ein UV-Maximum ≤ 200 nm und können mit UV-Detektoren, allerdings mit schlechter Empfindlichkeit detektiert werden. Gut detektierbar in Acetonitril/Wasser-Mischungen sind aufgrund ihres aromatischen Rings die Estrogene mit einem Maximum bei 205 nm und Progesteron und Testosteron aufgrund der α/β - ungesättigten Ketogruppe im Ring A bei 240 nm.

Zur Abschätzung der Nachweisgrenzen reiner Standardlösungen wurde das Signal/Rausch-Verhältnis von verdünnten Standardlösungen mit einem DAD-Detektor bestimmt. Als Nachweisgrenze wurde hierbei ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3 : 1 zugrunde gelegt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst. Zur Detektion wurde dabei jeweils die Wellenlänge mit der höchsten Absorption für den jeweiligen Analyten gewählt.

Tabelle 3-3. Signal/Rauschverhältnis verschiedener Steroide bei der Wellenlänge mit der höchsten Absorption (Nucleosil 100 C8, 5 μ m, 150*4,6 mm).

Steroid	Inj. Menge [ng]	λ [nm]	Signal/Rauschen
Testosteron	2,02	240	15
	1,01		5
17 α -Testosteron	1,74	240	9
	0,87		5
DHEA	20,0	205	27
	10,0		18
Estron	1,92	205	22
	0,96		11
17 α -Estradiol	2,04	205	25
	1,02		14
17 β -Estradiol	1,9	205	25
	0,9		17
Progesteron	5,45	240	19
	2,18		7
Pregnenolon	1,09	205	4
	18,6		12
	9,3		8

Die untersuchten Analyten sind in reinen Standardlösungen bei einer Injektion von 1 ng mit dem DAD-Detektor nachweisbar, lediglich Dehydroepiandrosteron und Pregnenolon sind erst bei einer Injektion von 10 ng nachweisbar.

3.5.4 Fraktionierung

Die Schnittzeiten für die Fraktionierung von Gruppen sowie auch einzelnen Analyten wurden anhand der Peakparameter Basisbreite und Asymmetrie festgelegt.

Zur Berechnung der Schnittzeiten wurde folgende Formel verwendet:

Gleichung 3-3. Fraktionsanfang:

$$t_{\text{Anfang}} = R_t (\text{des ersten Peaks der Fraktion}) - 1,5b (\text{des ersten Peaks}) + T$$

Gleichung 3-4. Fraktionsende:

$$t_{\text{Ende}} = R_t (\text{des letzten Peaks der Fraktion}) + 1,5b (\text{des letzten Peaks}) + T$$

mit:

R_t	= Retentionszeit des Peaks in min
b	= Basisbreite des Peaks in min
T	= Totzeit zwischen Detektor und Fraktionssammler in min

Bei Matrixproben ist eine Detektion der Analyten in dem gegebenen Konzentrationsbereich für Faecesextrakte aufgrund der hohen Matrixbelastung nicht möglich. Ein interner Standard zur Festlegung der Fraktionsgrenzen müsste vergleichbare Retentionseigenschaften wie die gesuchten Analyten besitzen. Hierfür in Frage kommende Substanzen unterliegen aber den gleichen Matrixeinflüssen wie die Zielanalyten. Da durch die Matrixbelastung auch das Signal eines internen Standards zu stark überlagert wird, ist eine Festlegung der Schnittzeiten anhand eines internen Standards während der Fraktionierung nicht möglich. Die Festlegung der Schnittzeiten kann daher nur über externe Standards erfolgen.

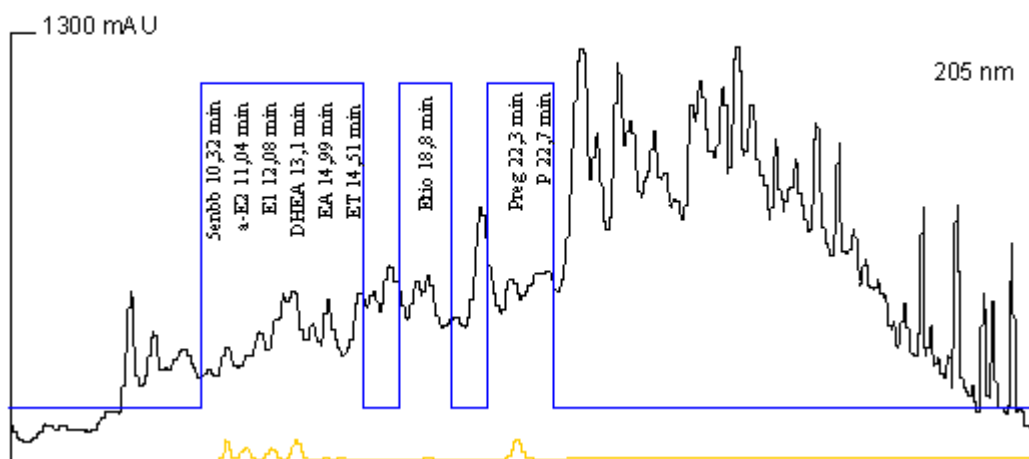


Abbildung 3-21. Fraktionierung eines Standards (gelb) und einer Matrixprobe (schwarz) auf RP8-Material - Nucleosil C8; 150 x 4,6 mm; 5 μ m, 60°C, Acetonitril/Wasser – Gradient.

3.5.5 Restricted Access Material-Vorsäule

Für die HPLC-Aufreinigung wurde Restricted Access Material (RAM) als Vorsäule getestet. Restricted Access Materialien sind Kombinationen aus Ausschluss- und Umkehrphasenmaterialien, die zur Abtrennung hochmolekularer Matrixkomponenten bei gleichzeitiger Anreicherung der Analyten entwickelt wurden.

Um eine Aufreinigung mit einer RAM-Vorsäule zu optimieren, sind für diese Vorsäule verschiedene Waschschrte getestet worden. Dazu wurde eine Standardlösung einer Markersubstanz auf die Vorsäule injiziert. Die Vorsäule wurde dann unterschiedlich lang und mit unterschiedlichen Mischungen an Acetonitril/Wasser gewaschen. Als Markersubstanz wurde 5-Androsten-3 β ,17 β -diol, der Zielanalyt mit der niedrigsten Retentionszeit auf dem Umkehrphasensystem, gewählt.

Nach dem Waschschrte wurde der Analyt im Back-flush Modus auf die analytische Säule überführt und mit dem für die RP-HPLC ausgewählten Gradienten analysiert. Die Peakflächen der 5-Androsten-3 β ,17 β -diol Peaks nach den unterschiedlichen Waschschrten wurden mit denen ohne Vorsäule verglichen.

Abbildung 3-22 zeigt die Wiederfindung von Androst-5-en-3 β ,17 β -diol nach unterschiedlichen Waschzeiten der Vorsäule.

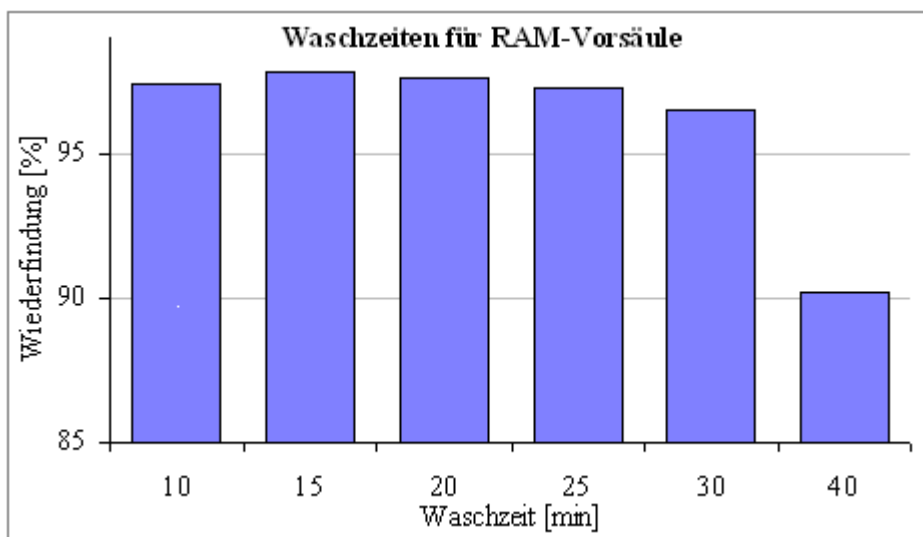


Abbildung 3-22. Wiederfindung des Androst-5-en-3β,17β-diols nach unterschiedlich langen Waschzeiten auf einer RAM-Vorsäule – Eluent: Acetonitril/Wasser 90 + 10 (v/v).

Wie in Abbildung 3-22 zu sehen ist, wird die Wiederfindung für das Androstendiol deutlich geringer, wenn über 30 Minuten mit einer Mischung aus Acetonitril/Wasser 10 + 90 (v/v) gewaschen wird. Bereits ab Waschzeiten von 25 Minuten zeigen sich geringe Verschlechterungen der Wiederfindung des Androstendiols. Diese können aber nicht eindeutig von den Standardabweichungen der Messwerte unterschieden werden.

Wird mit einer Mischung aus Acetonitril/Wasser 12,5 + 87,5 (v/v) gewaschen, kommt es nach 10 Minuten zu einer Verschlechterung der Wiederfindung des Androst-5-en-3β,17β-diols auf 10 %.

Für die RAM-Vorsäule ist ein Waschschrift von 15 Minuten mit einer Mischung aus Acetonitril/Wasser 90 + 10 (v/v) bei einem Fluss von $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ohne Verluste von Analyten möglich.

Zur Untersuchung des Einflusses von Matrixkomponenten auf die Anreicherung der Analyten an einer RAM-Vorsäule wurden Versuche mit dotierten, gefriergetrockneten Faecesproben unbehandelter Tiere durchgeführt. Um die Analyten in den Matrixproben detektieren zu können, wurde, mit im Vergleich zu den natürlichen Gehalten, extrem hohen Mengen dotiert (1 – 10 µg Analyt pro 100 g Probenmaterial). Die Proben wurden extrahiert und aufgearbeitet. Der RP-HPLC-Schritt wurde dabei nach den oben genannten Bedingungen durch eine RAM-Vorsäule erweitert. Es wurden verschiedene Mengen Matrixprobe auf die Vorsäule injiziert. Dabei wurden anhand der Chromatogramme die

Matrixbelastung der Extrakte, die Peakflächen sowie die Retentionszeiten der Analyten verglichen.

Tabelle 3-4. Retentionszeiten und Flächen verschiedener Steroide nach Injektion unterschiedlicher Mengen einer Matrixprobe auf eine RAM-Vorsäule.

Zielanalyten	Injiziertes Volumen									
	1x 20 μL	2x20 μL	3x20 μL	4x20 μL	5x20 μL	1x 20 μL	2x20 μL	3x20 μL	4x20 μL	5x20 μL
	Retentionszeit [min]					Fläche [mAU · min ⁻¹]				
Androst-5-en-3β,17β-diol	28,3	28,3	28,4	28,1	28,0	12,71	22,98	37,41	26,81	29,28
17α-Estradiol	29,1	29,1	29,1	29,2	29,1	9,12	16,27	21,99	23,51	22,45
Estron	29,7	29,7	29,8	29,8	29,7	10,52	20,12	30,38	24,79	32,62
DHEA	31,0	31,1	31,1	31,1	31,1	24,86	44,84	51,02	58,06	56,37
Epiandrosteron	32,3	32,3	32,4	32,4	32,3	9,96	21,47	26,03	22,98	14,02
Progesteron	40,3	40,1	40,1	40,1	40,0	10,69	21,48	31,58	34,81	44,97

Wie aus Tabelle 3-4 ersichtlich wird, haben unterschiedliche Injektionsmengen auf die Retentionszeiten der Analyten keinen Einfluss.

Je nach Matrixbelastung der Extrakte ist aber ein negativer Einfluss der Injektionsmenge auf die Peakflächen einzelner Analyten zu beobachten. Schon bei einer Injektion von 3 mal 20 μL Extrakt (etwa 1/8 des Gesamtvolumens) wird bei sehr belasteten Proben ein Verlust an 17α-Estradiol und Dehydroepiandrosteron deutlich.

Für die Aufarbeitung mit einer RAM-Vorsäule nach den oben genannten Bedingungen können für 500 μL Extrakt aus 200 g Faeces höchstens drei mal 20 μL auf die Vorsäule injiziert werden, ohne Analyten zu verlieren. Wird weniger Probenmaterial aufgearbeitet, sind auch Injektionen von vier mal 20 μL möglich.

3.5.6 Acetate

Da Steroidacetate sehr stabil sind, ist eine Möglichkeit der weiteren Aufreinigung der Extrakte eine HPLC-Fraktionierung der bereits für die GC derivatisierten Steroide.

Zur Untersuchung der Trenneigenschaften eines Umkehrphasenmaterials für Steroidacetate wurden Standardlösungen der ausgewählten Zielanalyten mit Acetanhydrid acetyliert. Die

acetylierten Steroide wurden dann mit dem oben ausgewählten RP-HPLC-System analysiert. Die Retentionszeiten der acetylierten und nicht acetylierten Steroide wurden verglichen.

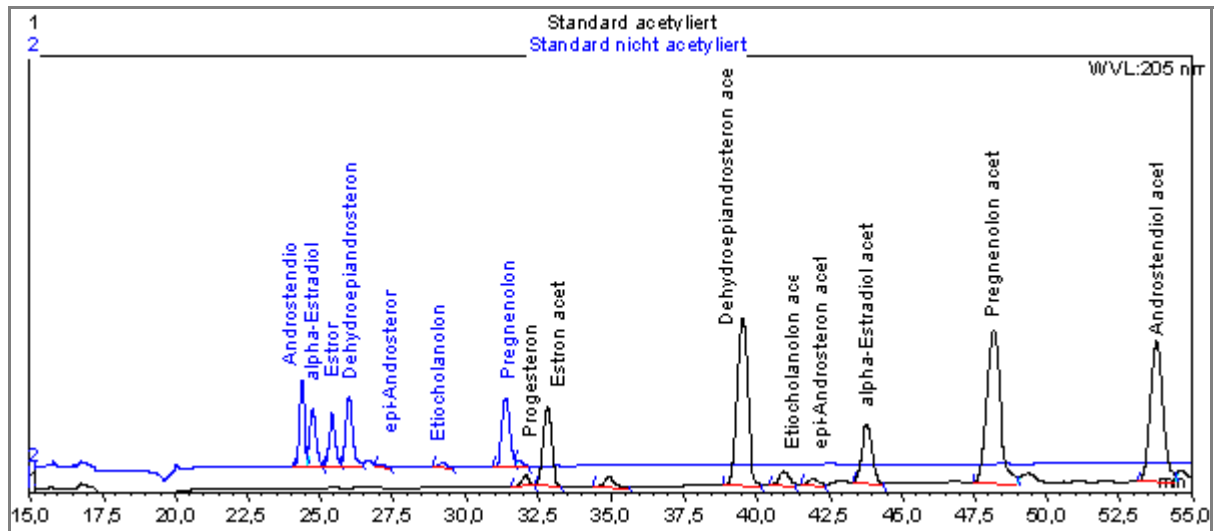


Abbildung 3-23. Vergleich HPLC-Chromatogramme acetylierter und nicht acetylierter Standardsubstanzen – Nucleosil C8; 150 x 4,6 mm; 5 µm, 60°C, Acetonitril/Wasser - Gradient.

Abbildung 3-23 zeigt eine klare Verschiebung in den Retentionszeiten der derivatisierten gegenüber den underivatisierten Steroiden. Die acetylierten Steroide eluieren zwischen 33 und 55 Minuten, die nicht acetylierten Steroide eluieren bereits zwischen 24 und 33 Minuten. Progesteron wird als reines Keton nicht acetyliert, daher bleibt die Retentionszeit dieses Analyten durch die Acetylierung unbeeinflusst.

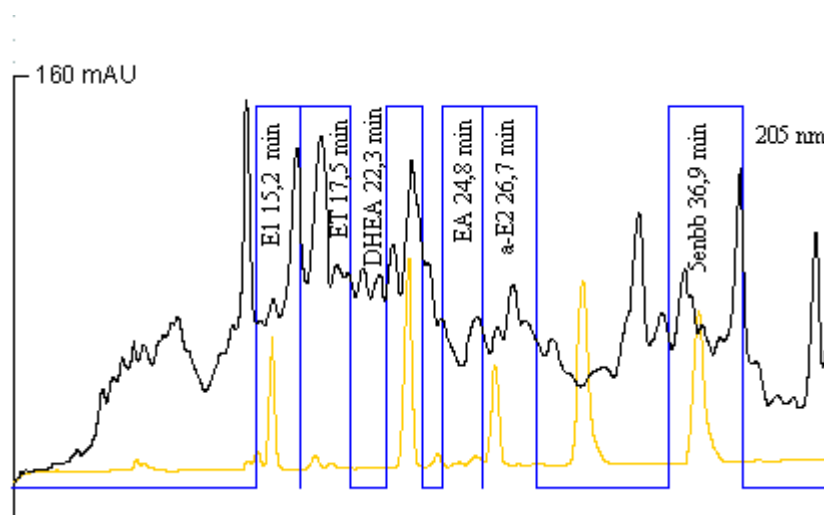


Abbildung 3-24. Fraktionierung eines Standards (gelb) und einer Matrixprobe (schwarz) auf RP8-Material nach Acetylierung – Nucleosil C8; 150 x 4,6 mm; 5 µm, 60°C, Acetonitril/Wasser - Gradient.

Außerdem ist, verglichen mit den freien Steroiden, eine verbesserte Trennung der Acetate voneinander zu erkennen, so dass ein Fraktionieren der Einzelstoffe (Abbildung 3-24) möglich wird.

Um zu untersuchen, ob durch eine HPLC-Fraktionierung der Acetate auf Umkehrphasenmaterial eine Aufreinigung vergleichbar mit einer HPLC-Fraktionierung der freien Steroide auf einer CN-Phase erreicht wird, wurden Matrixversuche durchgeführt. Eine gefriergetrocknete Faecesprobe unbehandelter Tiere wurde aufgearbeitet und nach der Fraktionierung über eine Umkehrphasen-HPLC in zwei gleiche Teilproben (a - 1 und a - 2) unterteilt. Eine Teilprobe (a - 2) wurde weiter über eine Cyanopropylphasen-HPLC fraktioniert und direkt vor der GC-MS acetyliert. Die andere Teilprobe (a - 1) wurde zuerst acetyliert und danach über eine zweite RP-HPLC fraktioniert. Beide Teilproben wurden über GC-EI-MS analysiert und verglichen.

Eine weitere gefriergetrocknete Faecesproben unbehandelter Tiere wurde aufgearbeitet und wie die zweite Teilprobe des ersten Versuchs nach der Derivatisierung über Umkehrphasen-HPLC fraktioniert. Nach der zweiten HPLC-Fraktionierung wurden die Fraktionen in zwei Teilproben (b - 1 und b - 2) unterteilt. Die eine Serie (b - 2) wurde zur Trockene eingengt und in Hexan aufgenommen, die zweite (b - 1) wurde vor dem vollständigen Einengen zur Trockene mit n-Hexan ausgeschüttelt.

Eine dritte gefriergetrocknete Faecesprobe wurde aufgearbeitet wie die erste Teilprobe des ersten Versuches. Nach der Derivatisierung wurden die Fraktionen in zwei Teilproben (c - 1 und c - 2) unterteilt. Die erste Serie (c - 2) wurde direkt analysiert, bei der zweiten Serie (c - 1) wurden die Acetate vor der Analyse noch über ein drittes HPLC-System fraktioniert.

Abbildung 3-25 zeigt die ermittelten Gehalte nach unterschiedlichen HPLC-Aufreinigungen am Beispiel von Dehydroepiandrosteron, Epiandrosteron, Etiocholanolon und Pregnenolon.

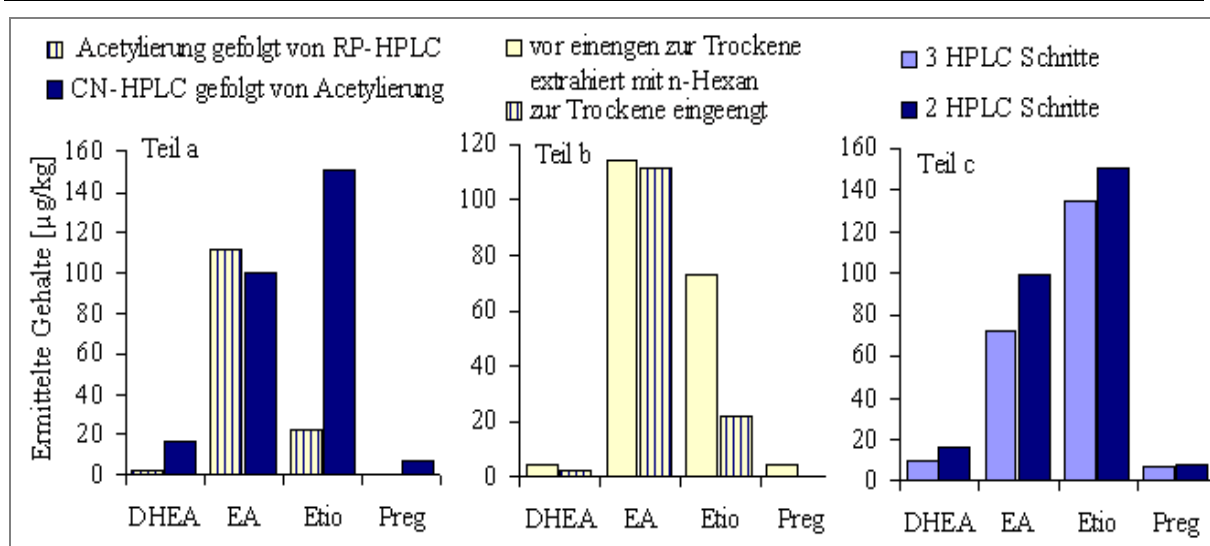


Abbildung 3-25. Ermittelte Steroidgehalte nach unterschiedlichen HPLC-Aufarbeitungen.

Die Wiederfindungen der untersuchten Analyten waren mit Ausnahme der des Epiandrosterons nach Acetylierung und nachfolgender RP-HPLC deutlich niedriger als nach CN-Phasen HPLC gefolgt von einer Acetylierung (Teil a, Abbildung 3-25).

Für die meisten Analyten konnte jedoch eine Verbesserung der Wiederfindung um mindestens 100 % erreicht werden, wenn die Fraktionen nach der zweiten Umkehrphasen-HPLC-Aufreinigung vor dem Einengen zur Trockene auf 1 – 2 mL eingengt und mit dem gleichen Volumen an n-Hexan ausgeschüttelt wurden. Für Epiandrosteron war keine Veränderung erkennbar (Teil b, Abbildung 3-25).

Die Reinheit der Extrakte nach der Aufreinigung über eine CN-Phase ist noch nicht zufriedenstellend. Zusätzlich zu einem Ersatz der CN-Phase durch eine Aufreinigung der Acetate über eine Umkehrphase ist auch die Erweiterung der Methode durch die Aufreinigung der Acetate über die Umkehrphase als drittem HPLC-Schritt untersucht worden. Teil c der Abbildung 3-25 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches. Für drei HPLC-Schritte waren die Wiederfindungen für die meisten Analyten 10 – 50 % geringer als nach zwei HPLC Schritten. Für Pregnenolon konnten keine Unterschiede in den ermittelten Gehalten nach zwei oder drei HPLC-Schritten beobachtet werden. Die Extrakte, die nach einer dritten HPLC-Aufreinigung erhalten wurden, waren allerdings deutlich sauberer als die Extrakte nach zwei HPLC-Aufreinigungen.

3.6 Steroidprofile

3.6.1 Qualitative Messungen

Um zu analysieren, welche Steroide in Faecesproben vorhanden sind, wurden gefriergetrocknete Faecesproben unbehandelter Tiere extrahiert und aufgearbeitet.

Zwei Proben, jeweils eine von einem männlichen und eine von einem trächtigen Tier, wurden silyliert, zwei wurden acetyliert. Alle Proben wurden nach der Derivatisierung mittels GC-MS im Scan-Modus analysiert.

Bei beiden Derivatisierungen konnten in den Proben 17α -Estradiol, Dehydroepiandrosteron, Etiocholanolon und Epiandrosteron detektiert werden. In den acetylierten Proben wurden zusätzlich Progesteron, Pregnenolon und Androst-5-en- 3β , 17β -diol detektiert.

Diese Substanzen wurden daraufhin semi-quantitativ in Proben von behandelten und unbehandelten männlichen und weiblichen Tieren bestimmt.

Tabelle 3-5. Retentionszeiten und MS-Daten einzelner Steroide (GC-MS- Systeme 3 und 4).

		Silylierung	Acetylierung
α E2	Standard	18,62 min 416	28,70 min 314 , 254 (13), 356 (10)
	Probe männlich	-	-
	Probe weiblich	18,72 min 416	28,77 min 314 , 254 (15), 356 (9)
Etio	Standard	15,00 min 419	22,67 min 272 , 257 (54), 228 (28), 332 (20)
	Probe männlich	15,15 min 419	23,09 min 272 , 257 (58), 228 (26), 332 (21)
	Probe weiblich	15,20 min 419	23,18 min 272 , 257 (56), 228 (27), 332 (20)
DHEA	Standard	16,64 min 432	23,68 min 270 , 255 (23), 237 (7), 199 (10)
	Probe männlich	16,71 min 432	23,67 min 270 , 255 (23), 237 (9), 199 (11)
	Probe weiblich	16,75 min 432	23,76 min 270 , 255 (24), 237 (8), 199 (11)
5enbb	Standard		26,34 min 314 , 239 (23), 299 (12)
	Probe männlich		26,38 min 314 , 239 (20), 299 (8)
	Probe weiblich		26,82 min 314 , 239 (21), 299 (12)
EA	Standard	16,91 min 419	24,43 min 272 , 257 (39), 201 (51), 218 (50)
	Probe männlich	16,95 min 419	24,77 min 272 , 257 (39), 201 (48), 218 (48)
	Probe weiblich	17,01 min 419	25,10 min 272 , 257 (42), 201 (50), 218 (47)
Preg	Standard		29,17 min 298 , 283 (20), 213 (12), 255 (8)
	Probe männlich		29,18 min 298 , 283 (20), 213 (14), 255 (8)
	Probe weiblich		29,21 min 298 , 283 (20), 213 (11), 255 (6)
P	Standard		31,16 min 314 , 272 (85), 229 (76), 244 (24)
	Probe männlich		-
	Probe weiblich		31,16 min 314 , 272 (83), 229 (77), 244 (21)

3.6.2 Semi-quantitative Messungen

Anhand von Messungen gefriergetrockneter Faecesproben unbehandelter und behandelter Tiere beiderlei Geschlechts wurden die zu erwartenden Steroidgehalte der ausgewählten Analyten im Rinderfaeces bestimmt.

Die Proben wurden aufgearbeitet und mittels GC-EI-MS analysiert. Zur Identifizierung der Analyten sind die Ionenverhältnisse des Targetions mit drei Qualifiern berechnet worden. Als zulässige Abweichung für eine positive Identifizierung sind die Vorgaben aus der Entscheidung der Kommission 2002/657/EG als Orientierung genommen worden. Geringe Überschreitungen der dort festgelegten Toleranzen für Abweichungen wurden in den durchgeführten Experimenten toleriert.

Quantifiziert wurde über eine externe Standardisierung mit den jeweiligen Zielanalyten.

Die in den Extrakten detektierten Gehalte an Dehydroepiandrosteron, Pregnenolon und 5-androsten-3 β ,17 β -diol lagen für alle untersuchten Proben im Bereich unter 10 ng $\cdot$ g⁻¹. Für Progesteron lagen die detektierten Gehalte der unbehandelten Tiere ebenfalls unter 10 ng $\cdot$ g⁻¹, bei männlichen Tieren ist, im Gegensatz zu weiblichen Tieren, nach einer Behandlung mit Estradiol/Progesteron ein deutlicher Anstieg in dem ermittelten Progesterongehalt auf 250 ng $\cdot$ g⁻¹ zu erkennen. Das gleiche gilt auch für die ermittelten Gehalte an 17 α -Estradiol. Sie liegen für unbehandelte Tiere unter 10 ng $\cdot$ g⁻¹. Bei behandelten Tieren steigen die ermittelten Gehalte auf 40 – 80 ng $\cdot$ g⁻¹.

Die detektierten Gehalte an Etiocholanolon lagen in Bereichen von unter 1 ng $\cdot$ g⁻¹ bis 50 ng $\cdot$ g⁻¹, wobei aufgrund der Gehalte keine Unterscheidung zwischen behandelten und unbehandelten Tieren getroffen werden kann. Beim Epiandrosteron ist aufgrund der ermittelten Gehalte ebenfalls keine Unterscheidung zwischen behandelten und unbehandelten Tieren möglich, die in den Extrakten ermittelten Gehalte für das Epiandrosteron liegen dabei bis auf einen Wert unter 10 ng $\cdot$ g⁻¹.

In Abbildung 3-26 sind die ermittelten Gehalte der Vorläufersubstanzen Dehydroepiandrosteron und Pregnenolon, sowie die Gehalte des Metaboliten 17 α -Estradiol vor und nach einer Behandlung im Vergleich dargestellt. Als Kontrolle sind unbehandelte Vergleichstiere mit aufgeführt.

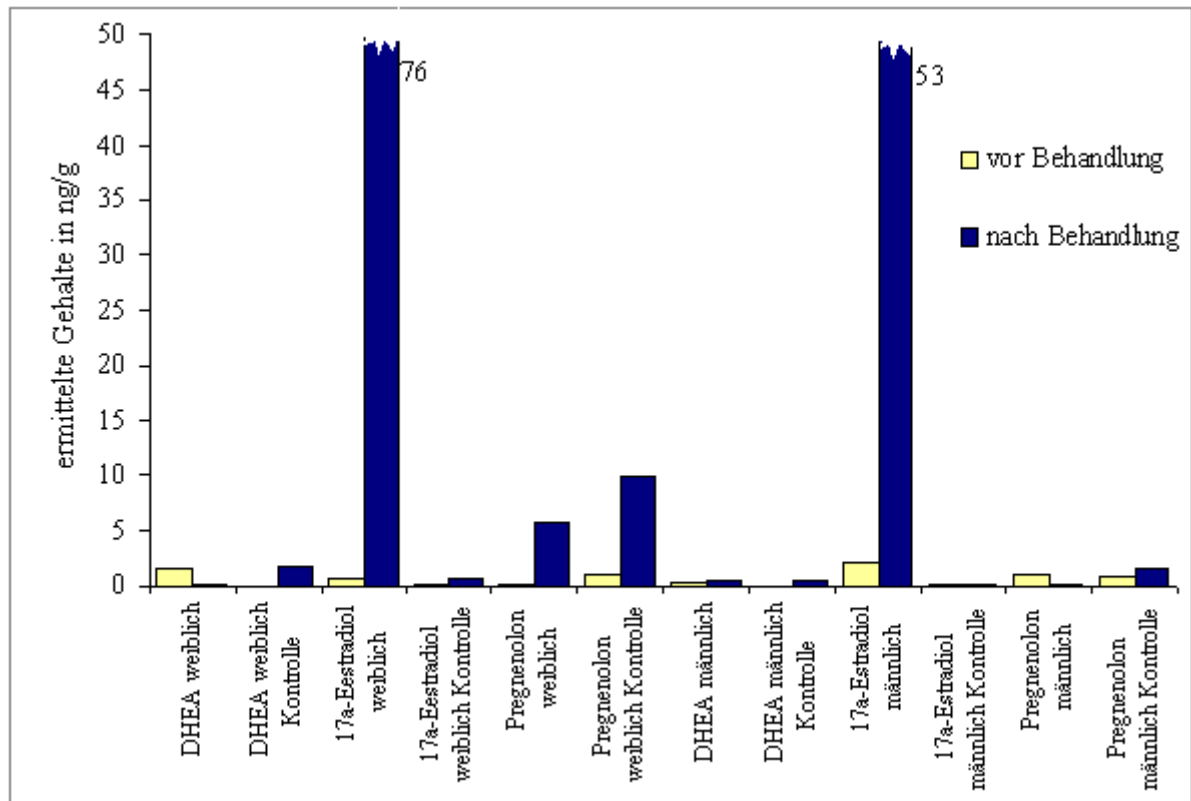


Abbildung 3-26. Ermittelte Gehalte einzelner Steroide bei weiblichen und männlichen Tieren vor und nach einer Behandlung mit Estradiol.

Für die Validierungsstudie wurden 17α-Estradiol, Progesteron, Etiocholanolon, Epiandrosteron, Dehydroepiandrosteron, Pregnenolon und Androst-5-en-3β,17β-diol als Zielanalyten ausgewählt.

3.7 Validierung

Die entwickelte Methode ist in Abbildung 3-27 als Fließschema dargestellt. Zur Validierung wurden die Wiederfindungen der Analyten und die Wiederholbarkeit der Methode bestimmt sowie Versuche zur Isotopendiskriminierung durchgeführt.

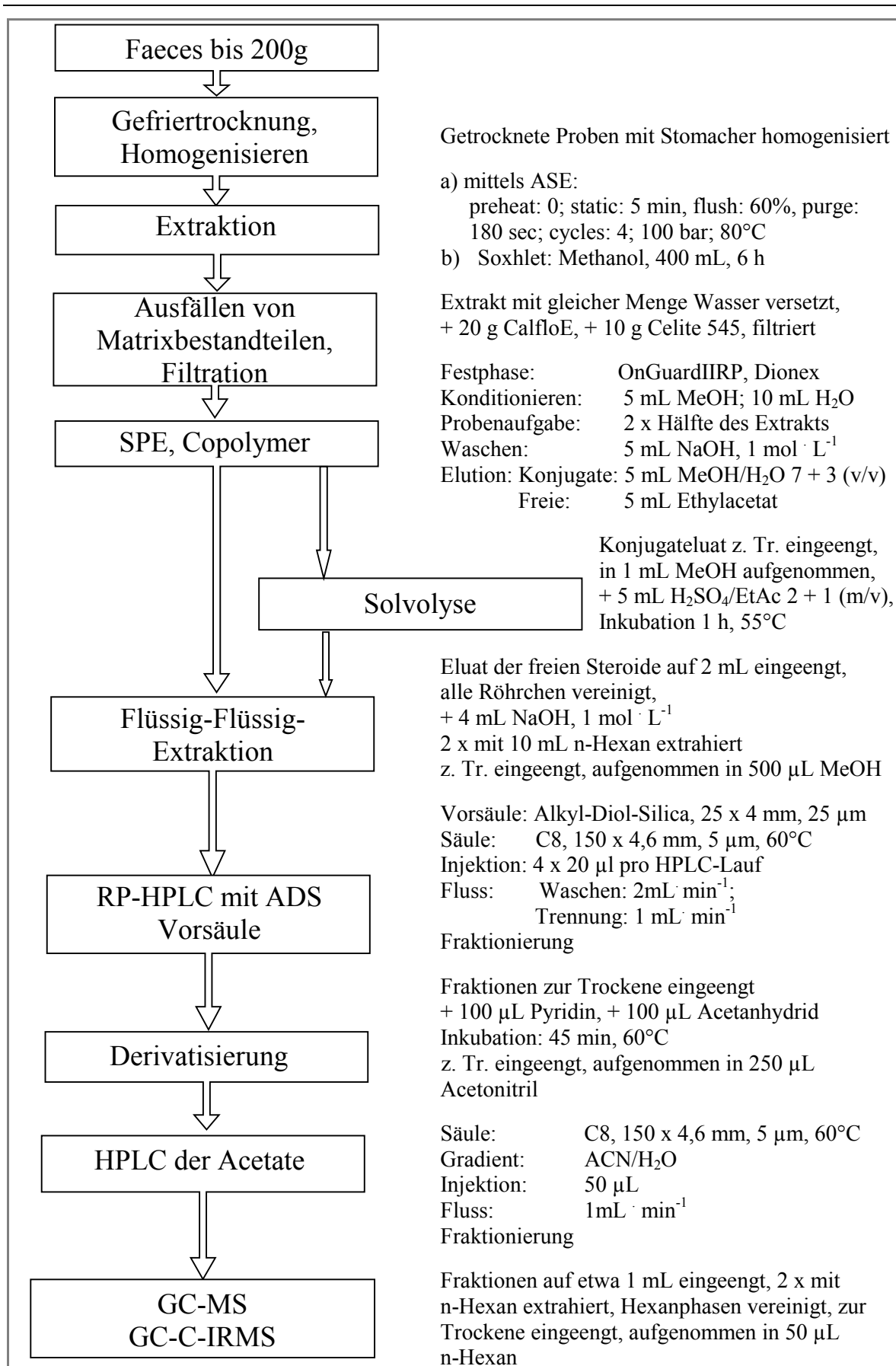


Abbildung 3-27 Fließschema Aufarbeitung Rinderfaeces für die GC-C-IRMS-Analytik

3.7.1 Wiederfindungen

Um die Wiederfindung der Methode zu bestimmen wurden Versuche mit Standardlösungen sowie mit Matrixproben jeweils als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Bei den Standardlösungen wurde Diathomeenerde mit 500 ng Dehydroepiandrosteron, Androst-5-en-3 β ,17 β -diol, Pregnenolon, Epiandrosteron, Etiocholanolon, 17 α -Estradiol und Progesteron je Extraktionszelle dotiert und mit Methanol über ASE extrahiert. Die Extrakte wurden mit Wasser versetzt und filtriert. Die Filtrate wurden weiter nach der erarbeiteten Methode aufgereinigt (siehe Abbildung 3-27).

Für die Matrixproben wurde Faeces eines unbehandelten männlichen Tieres gefriergetrocknet. Die homogenisierte Probe wurde in vier Teilproben unterteilt. Drei Teilproben wurden mit jeweils 500 ng Dehydroepiandrosteron, Androst-5-en-3 β ,17 β -diol, Pregnenolon, Epiandrosteron, Etiocholanolon, 17 α -Estradiol und Progesteron dotiert. Eine Teilprobe wurde nicht dotiert. Die Proben wurden analog zu den Standardlösungen aufgearbeitet.

Die Quantifizierung erfolgte mittels GC-MS im SIM-Modus anhand eines externen Standards.

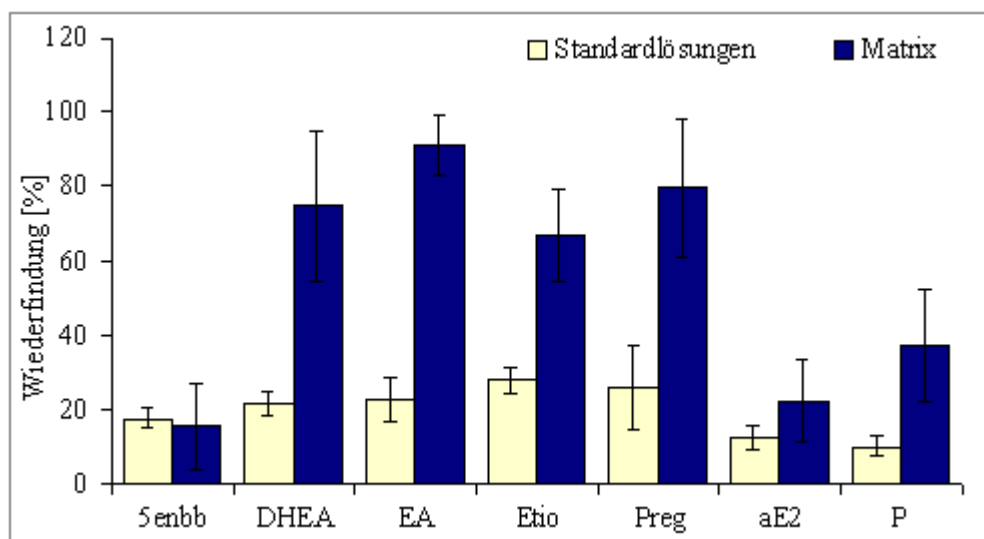


Abbildung 3-28. Wiederfindungen der Zielanalyten in aufgearbeiteten Standardlösungen und dotierten Matrixproben.

Abbildung 3-28 zeigt die Wiederfindung der einzelnen Analyten nach einer Aufarbeitung von Standardlösungen und dotierten Matrixproben. Es sind jeweils die Mittelwerte einer

Dreifachbestimmung angegeben. Bei den Matrixproben wurde jeweils der anhand der undotierten Teilprobe ermittelte endogene Gehalt des Analyten vor der Berechnung der Wiederfindung abgezogen. Die Standardabweichungen der Einzelwerte sind für die Analyten als Fehlerbalken gekennzeichnet.

In Abbildung 3-28 ist zu sehen, dass die Wiederfindungen, außer der des Androst-5-en-3 β ,17 β -diols, in Matrix deutlich höher sind als in den aufgearbeiteten Standardlösungen. Die Wiederfindungen der Steroide in den aufgearbeiteten Standardlösungen liegen zwischen 10 % für Progesteron und 28 % für Etiocholanolon. In den aufgearbeiteten Matrixproben zeigt das Androst-5-en-3 β ,17 β -diol mit 15 % die schlechteste Wiederfindung aller getesteten Analyten, 17 α -Estradiol, Progesteron und Etiocholanolon werden im mittleren Bereich mit 23 %, 37 % und 67 % wiedergefunden. Dehydroepiandrosteron, Epiandrosteron und Pregnenolon zeigen eine Wiederfindung über 75 %.

3.7.2 Isotopendiskriminierung

Es wurde überprüft, ob es während der Aufarbeitung zu einer Diskriminierung einzelner Isotopen kommt. Hierzu wurden die Fraktionen der aufgearbeiteten Standardlösungen aus den Wiederfindungsversuchen sowie nicht aufgearbeitete Standardlösungen der Zielanalyten mittels GC-C-IRMS gemessen und einander gegenübergestellt. Als Fehlerbalken in Abbildung 3-29 ist für den Mittelwert ($n = 3$) des jeweiligen nichtaufgearbeiteten Standards eine Abweichung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von ± 1 ‰ eingezeichnet.

Für die Analyten Dehydroepiandrosteron, Epiandrosteron, 17 α -Estradiol, Androst-5-en-3 β ,17 β -diol, Etiocholanolon und Progesteron kommt es nicht zu einer Diskriminierung einzelner Isotopen. Für Pregnenolon kann eine Diskriminierung nicht ausgeschlossen werden.

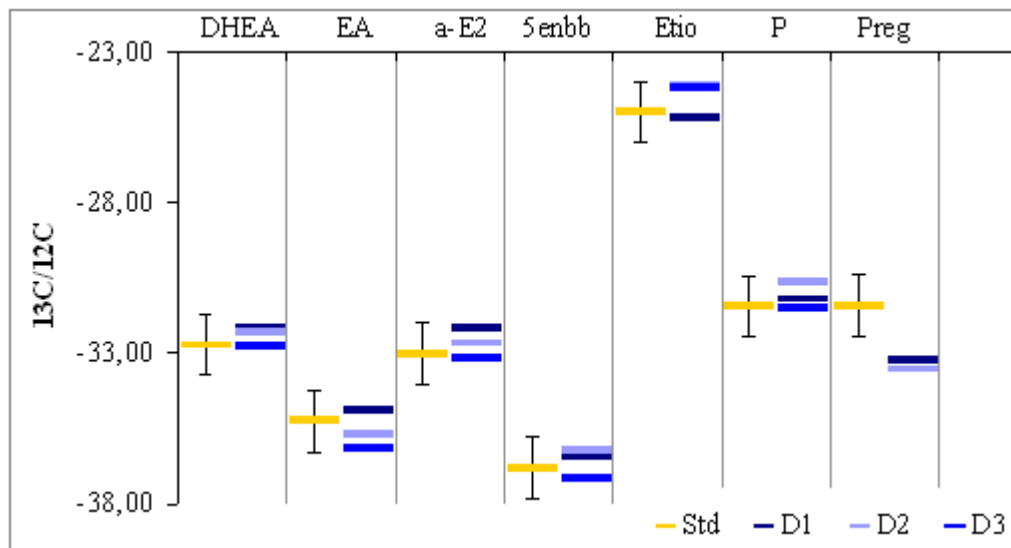


Abbildung 3-29. $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Diskriminierungsversuche (D1 bis D3) – Fehlerbalken: Mittelwert des Standards $\pm 1\%$

3.7.3 Wiederholbarkeit

Zur Bestimmung der Wiederholbarkeit der erarbeiteten Methode wurde die Aufarbeitung in zwei Serien und innerhalb jeder Serie unter Wiederholbedingungen durchgeführt. Das bedeutet, eine Probe eines trächtigen weiblichen Tieres (ISOSTER-F-04-1) wurde gefriergetrocknet und von der homogenisierten Probe wurden von zwei Personen jeweils sechs Teilproben von 10 g aufgearbeitet.

Die Proben wurden mit 5 μg 17α -Estradiol, Progesteron, Dehydroepiandrosteron, Androst-5-en-3 β ,17 β -diol, Pregnenolon, Epiandrosteron und Etiocholanolon in der einen Serie und 0,5 μg dieser Analyten in der anderen Serie dotiert.

Es wurde nach der erarbeiteten Methode aufgearbeitet. Eine Serie wurde durch ASE, die andere durch Soxhlet extrahiert.

Die relativen Ionenintensitäten dreier Qualifier-Ionen bezogen auf das Targetion sind für die zwölf untersuchten Proben in Tabelle 3-6 zusammen mit den zulässigen Abweichung für eine positive Identifizierung aus der Entscheidung der Kommission 2002/657/EG zusammengefasst.

ERGEBNISSE

Tabelle 3-6. Relative Ionenintensitäten.

		Probe 04-1								Probe 04-1							
		Serie 1 (dotiert mit 5 µg)								Serie 2 (dotiert mit 0,5 µg)							
	Ionen (m/z)	Std	Toleranz	1	2	3	4	5	6	Std	Toleranz	1	2	3	4	5	6
DHEA	270	100								100							
	255	24	20 - 28	24	26	26	25	25	26	25	21 - 29	25	24	24	24	24	24
	237	7	4 - 10	7	7	7	7	7	7	7	4 - 10	7	7	7	7	7	7
	199	10	5 - 15	10	11	11	10	11	11	11	9 - 13	10	10	10	10	10	10
EA	272	100								100							
	257	49	42 - 56	41	42	41	41	41	42	40	34 - 46	42	41	41	42	42	41
	201	63	54 - 72	32	49	49	51	49	49	48	41 - 55	50	49	49	49	49	49
	218	58	52 - 64	47	48	47	48	48	47	48	42 - 55	48	48	48	48	47	49
aE2	314	100								100							
	254	14	11 - 17	15	14	15	13	16	15	14	11 - 17	14	14	14	14	14	14
	356	9	4 - 14	10	10	11	9	11	10	9	4 - 14	10	10	10	10	10	10
	213	5	2 - 8	5	5	5	5	6	5	5	2 - 8	5	5	5	5	5	5
5enbb	314	100								100							
	239	24	20 - 28	26	26	26	24	26	26	25	21 - 29	26	26	25	25	26	26
	299	13	10 - 16	13	14	14	12	14	13	13	10 - 16	13	12	13	12	12	12
	254	8	4 - 12	9	9	9	9	9	9	9	4 - 13	8	8	8	8	8	8
Etio	272	100								100							
	257	60	54 - 66	59	59	59	59	62	59	61	55 - 67	59	59	58	59	59	58
	228	28	24 - 32	25	26	26	26	27	26	28	24 - 32	25	26	25	25	26	26
	332	17	14 - 20	18	18	18	18	16	14	19	15 - 23	18	19	18	18	18	14
P	314	100								100							
	272	85	76 - 94	93	96	92	94	95	95	95	86 - 104	95	90	89	93	91	91
	229	76	68 - 84	76	80	82	79	82	83	89	80 - 98	81	81	81	84	77	80
	244	16	13 - 19	25	25	26	28	26	27	29	25 - 33	24	23	25	25	26	25
Preg	298	100								100							
	283	21	18 - 24	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	21	23	20 - 26	20	21	22	22	21	21
	213	21	18 - 24						15	15	12 - 18	14	14	14	14	14	14
	255	9	4 - 14						10	10	5 - 15	8	9	9	9	9	9

In Abbildung 3-30 sind am Beispiel von Dehydroepiandrosteron, Etiocholanolon und Androst-5-en-3 β ,17 β -diol die relativen Ionenintensitäten der Qualifierionen in Prozent des

Targetions für einen Standard sowie jeweils eine Probe der Serien 1 und 2 aus Tabelle 3-5 graphisch dargestellt. Die zulässige Abweichung für eine positive Identifizierung wurde in Abbildung 3-30 als Fehlerbalken in der Standardreihe dargestellt.

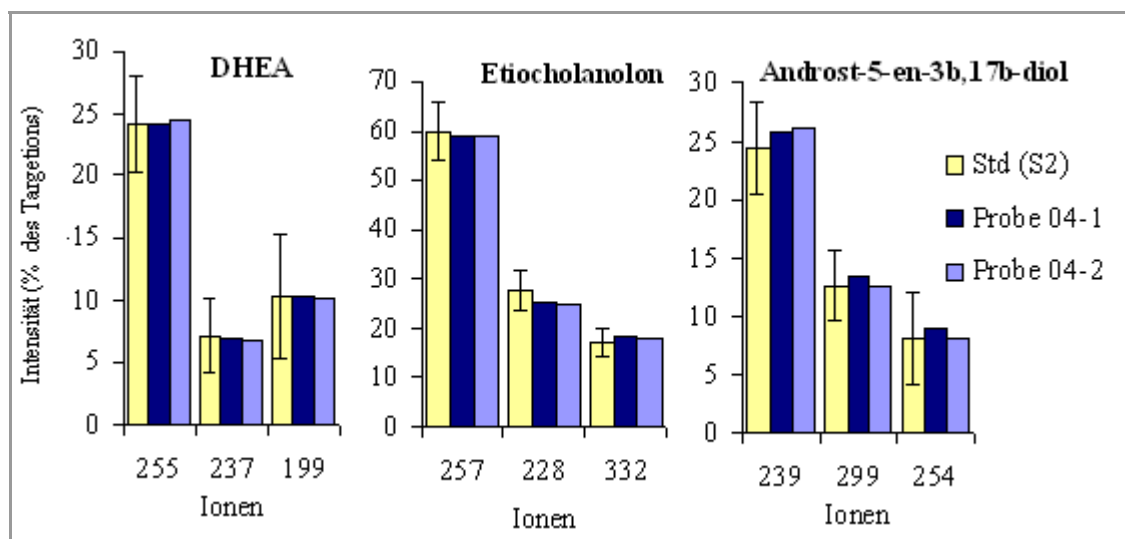


Abbildung 3-30. Relative Intensitäten der Qualifierionen – in % des Targetions von einem Standard und jeweils einer Probe einer Serie am Beispiel von Dehydroepiandrosteron, Etiocholanolon und Androst-5-en-3β,17β-diol.

Die Ionenverhältnisse liegen für alle Analyten und untersuchten Proben innerhalb der zulässigen Grenzen. Damit wurden alle Zielanalyten in den aufgearbeiteten Proben positiv identifiziert. In den Proben 1 bis 4 der ersten Serie konnte allerdings kein Pregnenolon detektiert werden.

Für Androst-5-en-3β,17β-diol ist im Scan (Abbildung 3-31) für alle untersuchten Proben eine Überlagerung mit einem deutlich intensiveren zweiten Peak zu erkennen. Trotz einer positiven Identifizierung kann für diesen Analyt daher kein zuverlässiges Isotopenverhältnis über GC-C-IRMS bestimmt werden. Alle anderen Analyten zeigen keine Überlagerungen mit anderen Peaks. Dies ist in Abbildung 3-32 am Beispiel von zwei Chromatogrammen, einem des Precursors Dehydroepiandrosteron und einem des Metaboliten 17α-Estradiol gezeigt.

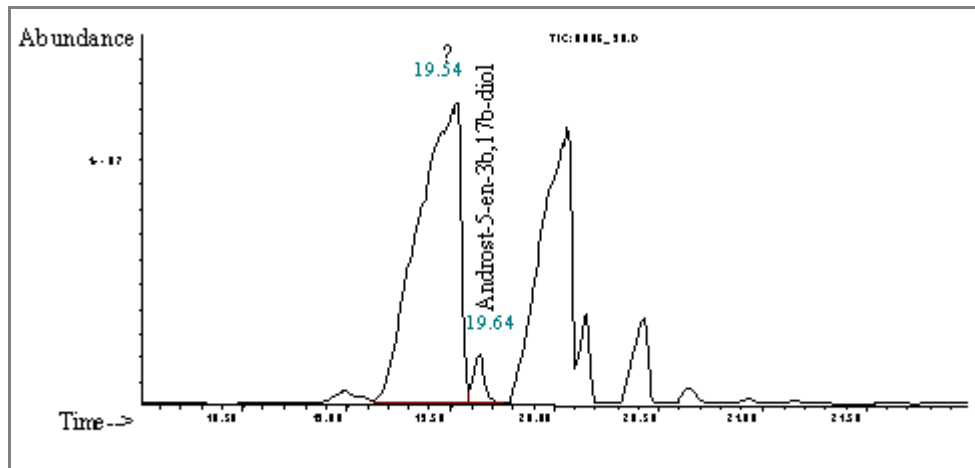


Abbildung 3-31. GC-MS Chromatogramm der Androst-5-en-3 β ,17 β -diol-Fraktion – HP-5MS, 5% Phenyl-methyl-siloxan Kapillarsäule, 30 m x 250 μ m, Filmdicke: 0,25 μ m, EI, Scan-Modus.

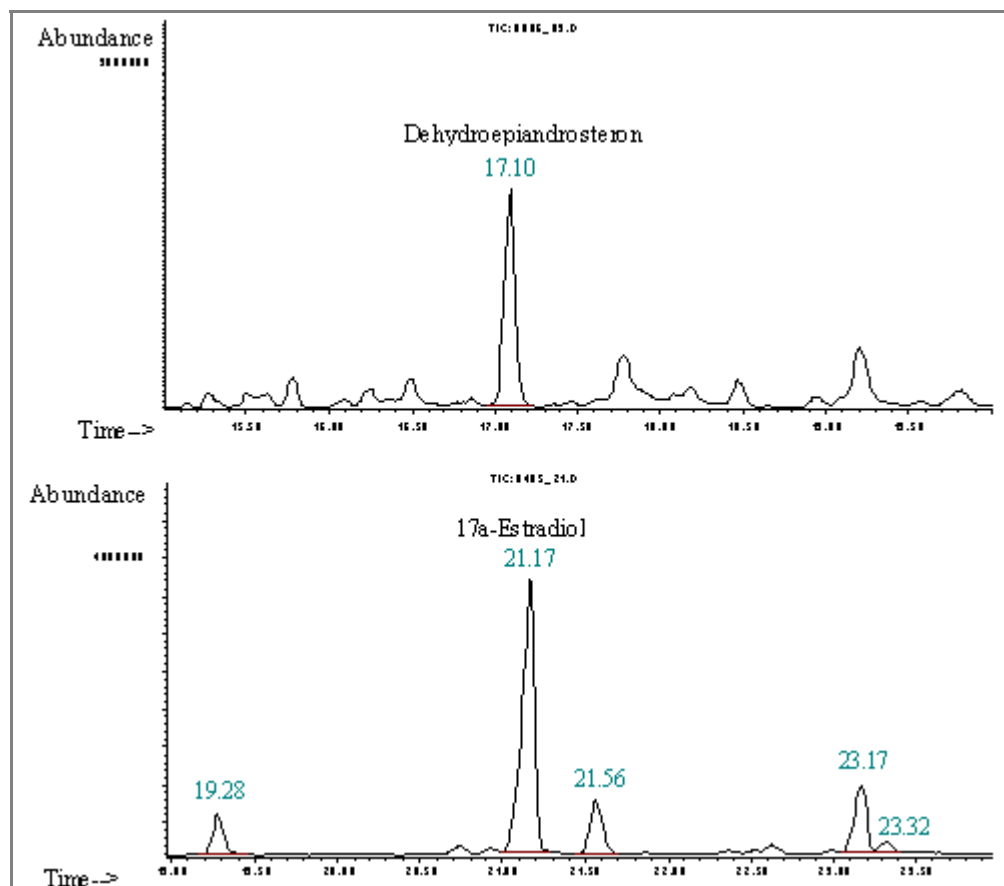


Abbildung 3-32. GC-MS Chromatogramme der Dehydroepiandrosteron- und 17 α -Estradiol-Fraktion – HP-5MS, 5% Phenyl-methyl-siloxan Kapillarsäule, 30 m x 250 μ m, Filmdicke: 0,25 μ m, EI, Scan-Modus.

Die Proben wurden mittels GC-C-IRMS gemessen. In Abbildung 3-33 ist das GC-C-IRMS-Chromatogramm der DHEA-Fraktion dargestellt.

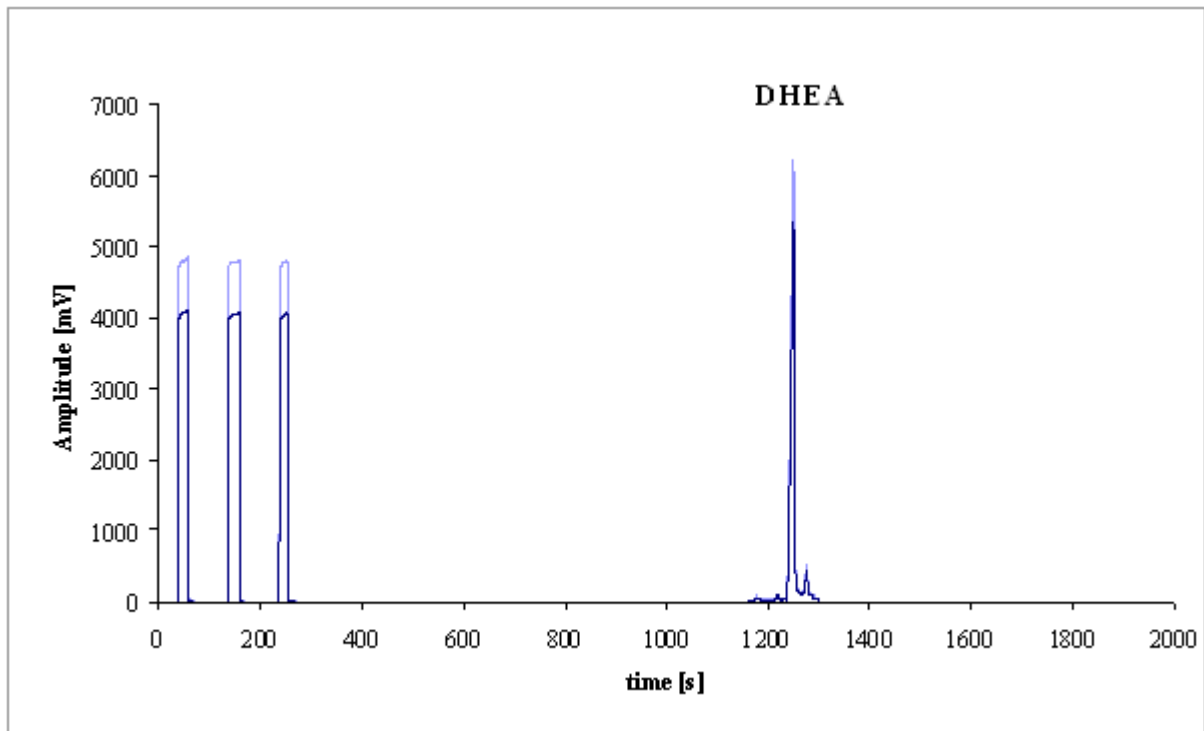


Abbildung 3-33. GC-C-IRMS-Chromatogramm DHEA-Fraktion – dunkelblau: Masse 44 (verstärkt um Faktor 3×10^8); hellblau: Masse 45 (verstärkt um Faktor 3×10^{10}).

Die in Abbildung 3-34 dargestellten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Analyten sind in Tabelle 3-7 mit den zugehörigen Mittelwerten und Standardabweichungen für die zwei Aufarbeitungsserien sowie acetylierte Standardsubstanzen aufgelistet.

Die Standardabweichung s einer Stichprobe aus einer Grundgesamtheit wurde nach Gleichung 3-5 berechnet.

Gleichung 3-5. Standardabweichung:

$$s = \sqrt{\frac{n \sum_{i=1}^n (x_i^2) - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2}{n(n-1)}}$$

mit: n = Anzahl der Einzelmesswerte

x_i = Einzelmesswert

ERGEBNISSE

Tabelle 3-7. Wiederholbarkeitsversuche: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte, Mittelwerte und Standardabweichung.

Analyt	Serie 1 (dotiert mit 5 μg)			Serie 2 (dotiert mit 0,5 μg)			Standard		
	$\delta^{13}\text{C}$	Mittelwert	Stabw	$\delta^{13}\text{C}$	Mittelwert	Stabw	$\delta^{13}\text{C}$	Mittelwert	Stabw
DHEA	-30,63			-24,07			-32,72		
	-30,82			-24,72			-32,77		
	-31,14	-30,59	0,767	-23,05	-24,28	0,755	-32,91	-32,61	0,495
	-31,38			-25,31			-32,88		
	-29,20			-24,11			-32,76		
	-30,39			-24,44			-31,61		
EA	-27,43			-23,35			-35,47		
	-27,70			-23,85			-35,17		
	-27,56	-27,36	0,443	-23,40	-23,81	0,355	-35,21	-35,36	0,414
	-27,66			-24,05			-34,94		
	-26,51			-24,18			-36,13		
	-27,29			-24,04			-35,26		
αE2	-29,47			-25,25			-33,02		
	-27,97			-24,99			-33,21		
	-28,93	-28,60	0,624	-24,97	-24,98	0,140	-33,72	-33,17	0,533
	-28,37			-24,85			-32,21		
	-27,91			-24,96			-33,57		
	-28,99			-24,88			-33,28		
Etio	-23,19			-23,04			-25,79		
	-24,21			-22,57			-25,64		
	-24,37	-23,83	0,456	-22,98	-22,90	0,317	-24,63	-25,18	0,479
	-23,90			-23,41			-24,77		
	-23,92			-22,86			-24,92		
	-23,41			-22,57			-25,35		
P	n.n.			-25,59			-26,35		
	-26,06			-27,14			-27,70		
	-27,43	-27,00	0,842	-26,42	-26,51	0,599	-27,36	-27,25	0,764
	-27,67			-26,61			-27,06		
	-27,72			-27,14			-28,43		
	-26,11			-26,15			-26,57		
Preg	-31,30			-24,74			-32,51		
	-31,73			-23,88			-31,06		
	-30,25	-30,68	0,708	-24,23	-24,57	0,614	-31,29	-31,55	0,505
	-30,66			-24,59			-31,44		
	-29,86			-24,31			-31,60		
	-30,29			-25,67			-31,39		

Die Standardabweichungen der sechsfach Bestimmung einer Serie liegen für alle untersuchten Analyten unter 1‰. Sie liegen damit im gleichen Bereich wie Standardabweichungen von Sechsfachbestimmung unaufgearbeiteter Standardlösungen.

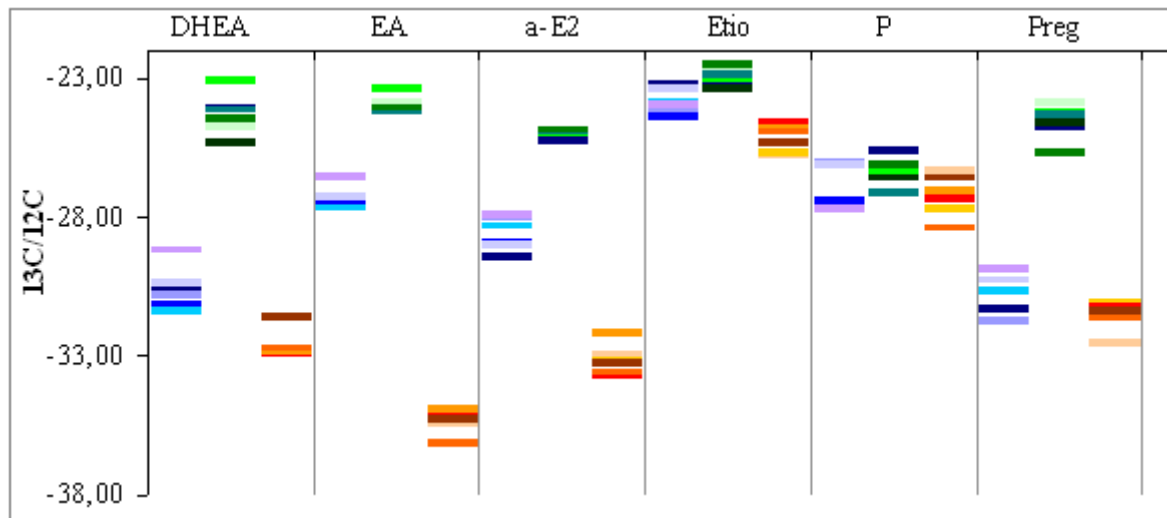


Abbildung 3-34. $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Wiederfindungsversuche – blau: Serie 1, grün: Serie 2, gelb: Standard, nicht aufgearbeitet

In Abbildung 3-34 ist deutlich zu erkennen, dass die Aufarbeitung innerhalb einer Serie für alle Analyten wiederholbare Ergebnisse liefert.

Es ist ebenfalls zu erkennen, dass bei einer Dotierung der Proben mit einer größeren Menge Standardsubstanz der Einfluß dieser Standardsubstanz auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im Vergleich zum endogenen Gehalt dieses Analyten deutlich zunimmt. Der gemessene $\delta^{13}\text{C}$ -Wert nähert sich dem des reinen Standards an.

4 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

4.1 Extraktion

Der erste Schritt in der Probenaufarbeitung ist die Extraktion der Analyten aus den Faecesproben. Dabei ist es für die weitere Analytik entscheidend, die Analyten mit hoher Ausbeute zu extrahieren, gleichzeitig aber möglichst wenig Matrixkomponenten mit zu erfassen.

Es gibt eine Reihe verschiedener Extraktionstechniken, die in der Literatur beschrieben sind [MOLDOVEANU SC, DAVID V, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY Library-volume 65, 2002]. Die Wahl einer geeigneten Extraktionstechnik richtet sich nach der Art der zu extrahierenden Probe und den zu extrahierenden Analyten. Bei gefriergetrocknetem Rinderfaeces handelt es sich um festes Probenmaterial. Es kommen demnach Fest-Flüssig- und Fest-Gasförmige Extraktionstechniken in Betracht. Da die nachfolgende Aufreinigung in flüssiger Matrix vorgenommen wird und die Analyten eine geringe Flüchtigkeit besitzen, wurde die Fest-Flüssig-Extraktion gewählt.

Bei der Fest-Flüssig-Extraktion kommen verschiedene Verfahren in Betracht, auch Heißextraktionstechniken sind möglich, da die Steroide hitzestabil sind. Mögliche Extraktionsverfahren sind Ultraschallextraktion, Soxhletextraktion oder einfache Lösungsmittlextraktion. Die Soxhletextraktion ist ein weit verbreitetes Fest-Flüssig-Extraktionsverfahren, das aufgrund einer Mehrfachextraktion der Probe in der Regel gute Extraktionsausbeute liefert.

Eine Alternative zur herkömmlichen Extraktion nach Soxhlet ist die beschleunigte Lösemittlextraktion (ASE). Da die ASE oberhalb der Raumtemperatur und, durch Anlegen eines Drucks von 100 bar, auch bei Temperaturen oberhalb des Siedepunktes der Lösungsmitteln durchgeführt werden kann, ist diese Methode schneller und effizienter als eine Extraktion nach Soxhlet. Die Desorption der Analyten von der Matrix sowie der Lösungsprozess verlaufen bei erhöhter Temperatur schneller als bei Raumtemperatur, da die Aktivierungsenergie, die zur Desorption nötig ist, herabgesetzt wird. Bei einer Temperaturerhöhung um 10°C erhöht sich die Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor zwei bis drei (RGT-Regel). Mit zunehmender Temperatur sinkt die Viskosität des Lösungsmittels, das durch den erhöhten Druck in der flüssigen Phase gehalten wird. Das Lösungsmittel kann durch die niedrigere Viskosität besser in die Poren der Probenmatrix

eindringen und der Kontakt zwischen Probe und Lösungsmittel wird erhöht. Die über die Temperatur zugeführte thermische Energie dient der Desorption der Analyten von der Matrix und beschleunigt die Diffusion der Analyten aus der Matrix in das Extraktionsmittel. Zudem hat die Extraktionstemperatur über den Diffusionskoeffizienten einen deutlichen Einfluss auf die Kinetik und somit auch auf die Ausbeuten der Extraktion [RICHTER BE, ET AL (1996)]. In der Literatur ist beispielsweise eine Extraktion von Corticosteroiden in Leber durch ASE beschrieben [DRAISCI R, ET AL (2001)].

Als Extraktionstechnik wurde neben der leistungsfähigen ASE auch die Soxhlet-Extraktion aufgrund ihrer weiten Verbreitung und des geringen apparativen Aufwandes ausgewählt und beide wurden optimiert.

Für eine effiziente Extraktion ist es wichtig ein Lösungsmittel zu wählen, das den Analyten gut, Matrixkomponenten dagegen schlecht löst. Auch sollte ein geeignetes Lösungsmittel mit der nachfolgenden Aufreinigung der Extrakte und der späteren Analytik kompatibel sein.

Steroide sind in Alkoholen und anderen mittelpolaren Lösungsmitteln gut löslich. Die meisten Steroide dagegen zeigen schlechtere Löslichkeiten in sehr unpolaren Lösungsmitteln, wie beispielsweise n-Hexan und sehr polaren Lösungsmitteln, wie beispielsweise Wasser [O'NEIL MJ (HRSO.), The Merck Index, 2001].

Wie der Vergleich unterschiedlicher Lösungsmittel zeigt, unterscheiden sich die Steroide trotz ihrer sehr ähnlichen Struktur in ihrem Extraktionsverhalten.

Für die Entwicklung einer Aufarbeitungsmethode, die eine große Anzahl verschiedener Steroide gleichermaßen erfasst, ist es notwendig ein Lösungsmittel zu finden, das trotz ihrer unterschiedlichen Lösungseigenschaften für alle Analyten zu akzeptablen Ausbeuten führt.

Mit Blick auf die in Faeces vorhandenen polareren Konjugate der Steroide, die zur Erhöhung der Gesamtausbeute unbedingt miterfasst werden sollten, sind Lösungsmittel wie n-Hexan aufgrund ihrer sehr unpolaren Eigenschaften als Extraktionsmittel ungeeignet.

Methanol wurde, aufgrund des polareren Charakters im Vergleich zum Acetonitril sowie aus Gesichtspunkten des Umweltschutzes, für die weiteren Versuche ausgewählt, obwohl Acetonitril deutlich sauberere Extrakte liefert.

Um schwefelorganische Komponenten aus Bodenproben und Klärschlämmen schon während der Extraktion zu entfernen, werden Schwermetalle, besonders auch Kupferpulver, zum Ausfällen verwendet. [USEPA METHOD 3660 B (1996) und GOERLITZ DF und LAW LM (1971)]

Die Anwendung eines Kupferbetts ergab keine Verbesserung der Reinheit der Faeces-Extrakte. Dieser Ansatz wurde daher nicht weiter verfolgt.

Ein Vermengen der zu extrahierenden Probe mit Diathomeenerde bei einer Extraktion durch ASE ist dagegen sinnvoll, um ein Aufquellen der Probe in den Extraktionszellen und ein Verkleben von Probenteilen zu vermeiden. Dies hat neben einer Verstopfung der Zellen auch eine Verschlechterung der Wechselwirkung von Extraktionsmittel mit Probe zur Folge, da das Lösungsmittel die Zellen nicht mehr optimal durchströmen kann und einige Regionen innerhalb der Zellen nicht mehr vom Lösungsmittel erreicht werden [HÖFLER F, Beschleunigte Lösemittelextraktion, 2000].

4.2 Hydrolyse

In der Literatur [PALME R, ET AL (1996), GROH H ET AL (1993)] ist beschrieben, dass intestinale Mikroorganismen Steroidkonjugate hydrolysieren können. Im Urin liegen die Steroide oft als Sulfate oder Glucuronide vor, da diese Stoffe durch eine bessere Wasserlöslichkeit leichter über den Urin ausgeschieden werden. Steroide liegen im Faeces hauptsächlich in der freien Form vor, da die Konjugate über die Galle in den Darmtrakt gelangen, wo sie von der Darmflora der Rinder hydrolysiert werden.

Um auch geringe Mengen an vorhandenen Konjugaten der Steroide im Faeces mitzuerfassen, wurde eine Hydrolyse an Faecesproben getestet.

Es gibt verschiedene Verfahren der Hydrolyse. Eine Möglichkeit ist eine Hydrolyse der Sulfate beziehungsweise Glucuronide mit Hilfe von Enzymen. Eine Enzymlösung aus *Helix pomatia* zeigt, im Gegensatz zu einer aus *E. coli*, sowohl Glucuronidase- wie auch Sulfatase-Aktivität. [HOUGHTON E, ET AL (1992)]. Am C-17 sulfatierte Androgene sind allerdings inert gegen eine Hydrolyse mit Enzymzubereitungen aus *Helix Pomatia*. [HOUGHTON E, ET AL (1992), WEIDOLF LOG und HENION JD (1987) und SHACKLETON CHL, ET AL (1968)] Desweiteren ist für Enzymzubereitungen aus *Helix Pomatia* eine 3β -HSD/ Δ^{5-4} -

Isomerase Aktivität bekannt, durch die Androstendiol in Testosteron konvertiert werden kann [HOUGHTON E, ET AL (1992) und VANLUCHENE E, ET AL (1982)].

Anstelle der enzymatischen ist auch eine chemische Hydrolyse möglich. Für diese sind ebenfalls mehrere Techniken möglich, beispielsweise eine basische Hydrolyse mit Kalilauge oder eine saure Hydrolyse mit Schwefelsäure oder Salzsäure unter Sieden. Das Chloridion hat dabei nach KJELD, ET AL (1978) eine stärkere hydrolytische Wirkung als das Sulfation. Hierbei kann aber eine Degeneration der Steroide durch die extremen Bedingungen während der Hydrolyse eintreten. Das Kochen mit Salzsäure wurde bereits für einige Steroide als ungeeignet beschrieben [ROBARDS K und TOWERS P (1990)]. Es kann beispielsweise bei Dehydroepiandrosteron zu einem Abbau des Steroids kommen.

Um Isomerisierungs- oder Abbauvorgänge der vorhandenen Steroide während der Hydrolyse zu vermeiden wurde eine milde Technik mit einer Mischung aus konzentrierter Schwefelsäure und Ethylacetat bei 55°C [TORRE X DE LA, ET AL (2001)] zur sauren Hydrolyse verwendet.

Da eine Degeneration der Steroide aber auch unter diesen mildereren Bedingungen nicht auszuschließen ist, wird die Hydrolyse nur in Extrakten durchgeführt, in denen keine freien Steroide mehr vorliegen.

Nach einer Hydrolyse mit einer Mischung aus konzentrierter Schwefelsäure/Ethylacetat 2 + 250 (v/v) bei 55°C sind die ermittelten Gehalte für die meisten untersuchten Analyten mindestens doppelt so hoch wie ohne Hydrolyse. Lediglich bei Pregnenolon, Progesteron und Etiocholanolon bleiben die Gehalte mit und ohne Hydrolyse vergleichbar hoch. Eine Hydrolyse ist bei Faecesproben zur Erhöhung der Gesamtausbeute für einige Analyten wie Dehydroepiandrosteron, 17 α -Testosteron und teilweise auch 17 α -Estradiol unerlässlich.

4.3 Festphasenextraktion

Zur Vorreinigung der Extrakte für eine HPLC-Fraktionierung wird die Festphasenextraktion (SPE) verwendet. Diese Technik ermöglicht eine Aufreinigung der Extrakte bei gleichzeitiger Aufkonzentrierung der Zielanalyten. Die Analyten werden dazu reversibel an eine stationäre Phase gebunden, während möglichst viele Matrixbestandteile in der mobilen Phase verbleiben und nicht retardiert werden. Durch den gezielten Einsatz des stationären

Phasenmaterials in Verbindung mit einem Lösungsmittel, das eine auf die Problematik abgestimmte Elutionsstärke besitzt, wird die Aufreinigungsleistung des SPE-Schrittes optimiert. Eine weitere Anreicherung der Zielanalyten wird hierbei erreicht, da zur Elution der an das Phasenmaterial gebundenen Analyten ein deutlich geringeres Lösungsmittelvolumen erforderlich ist, als zur Probenaufgabe verwendet wird.

Kieselgele, Aminopropyl- und Polymermaterialien, die unter Normalphasenbedingungen verwendet werden, zeigen in Bezug auf die Steroide nur bei sehr unpolaren Elutionsmitteln eine Retention, sie kommen daher nur begrenzt für eine Aufkonzentrierung dieser Komponenten in Frage. Die extrem unpolaren Bedingungen, die nötig sind um die Analyten auf dem Phasenmaterial zu retardieren, erlauben zudem nur eingeschränkte Waschschrte. Eine Abtrennung von Matrixbestandteilen ist aber trotzdem möglich [FRITSCH S, ET AL (1999), BECCHI M, ET AL (1994), PRÉVOST S, ET AL (2001), IMPENS S, ET AL (2002)]. Normalphasenbedingungen eignen sich dabei besonders, wenn die aufzureinigenden Extrakte in extrem unpolaren Lösungsmitteln vorliegen, die mit einer Normalphase direkt kompatibel sind. Muss man die Extrakte vor einer SPE zur Trockene einengen und in einem geeigneten Lösungsmittel aufnehmen, treten Verluste durch nicht mehr lösliche Matrixkomponenten, die die gesuchten Analyten zurückhalten, auf. Für einige Steroide ist außerdem bekannt, dass sie an Glasoberflächen binden können [APPELBLAD P und IRGUM K (2002)].

Sehr gute Retentionseigenschaften für Steroide in wässrigen Lösungen mit geringen Anteilen organischer Lösungsmittel zeigen Copolymere auf Polydivinylbenzol-Basis. Ebenfalls gute Eigenschaften in Bezug auf das Retentionsverhalten haben Umkehrphasenmaterialien auf Kieselgelbasis. Auf diesen Phasen werden die Steroide aus überwiegend wässrigen Lösungen gut retardiert und sie sind mit organischen Lösungsmitteln wie beispielsweise Methanol leicht zu eluieren. Aufgrund dieser guten Eigenschaften sind Probenaufarbeitungen mit diesen SPE-Materialien in der Literatur zur Steroidanalytik häufig beschrieben [APPELBLAD P und IRGUM K (2002), FERCHAUD V, ET AL (1998), CALVARESE S, ET AL (1994), LEVESQUE J-F, ET AL (2002), LOPEZ DE ALDA MJ und BARCELO D (2000), FRITSCH S, ET AL (1999), AGUILERA R, ET AL (1999), AGUILERA R, ET AL (1996), KURONEN P, ET AL (1998), BECCHI M, ET AL (1994), PRÉVOST S, ET AL (2001)].

Für die Zuverlässigkeit der nachfolgenden IRMS-Messungen ist es wichtig, eine Diskriminierung einzelner Isotopen während der Aufarbeitung zu verhindern. Durch ein sehr breites Elutionsverhalten und eine mögliche unvollständige Elution der Analyten von dem Festphasenmaterial entsteht die Gefahr einer Isotopen-Diskriminierung. Für die Flüssigchromatographie ist von BRAUNSDORF R, ET AL (1993) beschrieben, dass die schwereren Isotope unter Umkehrphasenbedingungen etwas später als die leichteren eluieren. Unter Normalphasenbedingungen ist dies umgekehrt. Da es sich bei der Festphasenextraktion um ein der Flüssigchromatographie verwandtes Verfahren handelt, ist eine Diskriminierung bei unvollständiger Extraktion einzelner Analyten denkbar.

Zwischen vergleichbaren Materialien unterschiedlicher Hersteller sind bei kieselgelbasierten Umkehrphasen, Aminopropyl- und Polymerphasen Unterschiede in den Elutionsmustern der Analyten zu erkennen.

Die Wiederfindungen für die Zielanalyten sind bei allen getesteten Aminophasenmaterialien sehr gering. Zusammen mit dem schleppenden Elutionsverhalten der Analyten auf diesen Materialien deutet dies darauf hin, dass die Analyten sehr fest an diese Materialien gebunden werden.

Die Aminopropylmaterialien sind für Aufreinigungen von Faecesextrakten für anschließende IRMS-Messungen wegen der schlechten Wiederfindungen und des breiten Elutionsverhaltens ungeeignet.

Ein Polymermaterial, auf dem das Elutionsverhalten der Steroide dem auf Aminopropylphasen ähnelt, das aber deutlich bessere Wiederfindungen für die Analyten aufweist, ist das OnGuardII-P-Material. Es handelt sich bei diesem Material um ein Polyvinylpyrrolidon Polymer, das eine hohe Selektivität für Phenole, aromatische Aldehyde, aromatische Carboxysäuren und Substanzen mit Azo-Gruppen hat [DIONEX, Manuals and Literature (2000)]. Dieses Material hat allerdings kaum Aufreinigungskapazität für Faecesproben, die Zielanalyten werden von den übrigen Matrixbestandteilen nicht abgetrennt.

Für die Umkehrphasenmaterialien auf Kieselgelbasis gibt es weitere Unterteilungen der Materialien in solche mit und ohne Endcapping. Bei Materialien ohne Endcapping kann es an den ungeschützten Silanol-Gruppen zu sekundären Interaktionen kommen. Dies kann je nach Fragestellung Vor- oder Nachteile bieten. Das MFC18 Material von IST ist

beispielsweise ein monofunktionales Octadecylsilan, das kein Endcapping besitzt. Des Weiteren bieten einige Hersteller spezielle Materialien an. Das getestete Hydra Material von Macherey-Nagel ist speziell für polare Proben geeignet.

Die getesteten Umkehrphasenmaterialien auf Polymerbasis sind im Gegensatz zu den kieselgelbasierten Materialien extrem pH-stabil. Auf Polymerphasen ist daher ein zusätzlicher Waschschrift mit Säuren oder Basen möglich. Durch die Polymerstruktur sind diese Materialien resistent gegen Dekonditionierung und bieten durch eine große Oberfläche in Vergleich zu kieselgelbasierten Materialien eine hohe Kapazität [DIONEX, Manuals and Literature (2000)]. Das OnGuardII-RP-Material von Dionex und das HLB-Material von Waters sind Divinylbenzolpolymere.

Das Polymermaterial, das von den getesteten Materialien die unpolarsten Eigenschaften zeigt, ist das OnGuardII-RP-Material von Dionex. Es besitzt auch bei hohen Methanolanteilen im Elutionsmittel eine hohe Retentionskraft für die Zielanalyten. Diese Eigenschaft erlaubt es, nach der Probenaufgabe mit höheren Anteilen an organischem Lösungsmittel große Mengen an Matrixkomponenten durch einen Waschschrift abzutrennen.

Je höher der Anteil an Methanol im Waschschrift gewählt werden kann, desto besser werden unpolarere Matrixkomponenten in diesem Schritt abgetrennt. Im Gegensatz zu in der Literatur [LEVESQUE J-F, ET AL (2002)] beschriebenen Waschschriften mit n-Hexan für eine Divinylbenzol-Polymerphase und kieselgelbasierte RP-Materialien ist ein Waschen des OnGuardII-RP-Material von Dionex mit n-Hexan aufgrund seines sehr unpolaren Charakters nicht möglich.

Die Wiederfindungen der Analyten bei den Umkehrphasen auf Polymerbasis sind für alle getesteten Materialien gut. Auch alle getesteten Umkehrphasenmaterialien auf Kieselgelbasis, außer den Sep-pak C-18 Kartuschen, zeigen akzeptable Wiederfindungen für die Zielanalyten.

Das OnGuardII-RP-Material zeigt in Bezug auf das Elutionsverhalten der Analyten von allen getesteten Materialien die besten Eigenschaften zur Aufarbeitung von Faecesproben. Es wird daher als Material für die Vorreinigung von Faecesextrakten über einen SPE Schritt eingesetzt. Als Lösungsmittel zur Elution der freien Steroide von dieser Polymerphase wird Ethylacetat gewählt. Es ist unpolarer als Methanol und hat eine bessere Elutionskraft für die Analyten.

Die beste Aufreinigung von Matrixproben wird mit OnGuardII-RP-Material erreicht, wenn die Kartuschen vor der Elution der Steroide mit Natronlauge gewaschen werden.

Es wird in den Versuchen zur SPE deutlich, dass der Hersteller des Festphasenmaterials für eine optimierte Methode nicht gewechselt werden darf, ohne den SPE-Schritt zu überprüfen und gegebenenfalls neu zu optimieren, da große Unterschiede in den Elutionsmustern der Steroide von Kartuschen des gleichen Materials aber unterschiedlichen Herstellern auftreten.

4.4 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Zu Beginn der Steroidanalytik war die Flüssig-Flüssig-Extraktion die vorherrschende Technik zur Extraktion der Steroide aus biologischen Matrices, die dann mehr und mehr durch leistungsfähigere Techniken wie beispielsweise SPE ergänzt wurde [APPELBLAD P und IRGUM K (2002)].

Das Prinzip der Flüssig-Flüssig-Extraktion, Substanzen durch Verteilung zwischen zwei nicht mischbaren Phasen zu extrahieren, wird hierbei verwendet, um Matrixbestandteile aus der n-Hexanphase in die wässrige Phase zu überführen und so abzutrennen.

Da sich Aminopropylmaterialien für eine Aufreinigung von Steroiden aus Faeces als nicht geeignet erwiesen haben, aber eine weitere Aufreinigung der Eluate der Polymerphase vor einer HPLC-Aufreinigung unbedingt erforderlich ist, wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion als weiterer Aufreinigungsschritt der Extrakte getestet.

Ein Flüssig-Flüssig-Waschschritt der Eluate der OnGuardII-RP-Kartuschen mit Natronlauge [FERCHAUD V, ET AL (1998)] stellt eine Alternative zu einem weiteren SPE-Schritt über Aminopropylmaterialien dar.

Bei einem Flüssig-Flüssig-Waschschritt mit Natronlauge ist es wichtig darauf zu achten, dass der pH-Wert der wässrigen Phase nicht über 13 liegt, da sonst die Estrogene in der Phenolatform in die wässrige Phase übergehen [MARCHAND P, ET AL (2000)].

Ein direkter Vergleich einer SPE an Aminopropylmaterial mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion zeigt für einige Analyten bessere Wiederfindungen nach einem Flüssig-Flüssig-Waschschritt, die Wiederfindungen für andere Zielanalyten bleiben unverändert.

Aufbauend auf in der Literatur beschriebenen Methoden aus der Steroidanalytik [FRITSCH S, ET AL (1999), BECCHI M, ET AL (1994), PRÉVOST S, ET AL (2001),

IMPENS S, ET AL (2002)] wurde in den ersten Experimenten mit einem SPE-Schritt an Aminopropylmaterial gearbeitet. Da eine gute Aufreinigung der Extrakte ebenfalls durch die Flüssig-Flüssig Extraktion erzielt wird, wird der SPE-Schritt über eine Aminopropylphase durch einen Flüssig-Flüssig-Waschschritt mit Natronlauge ersetzt.

4.5 HPLC

Die erarbeitete HPLC-Methode dient der weiteren Abtrennung von Matrixkomponenten und einer Auftrennung der Zielanalyten für eine anschließende GC-C-IRMS-Messung.

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bietet sich durch ihre hohe Trennleistung als Aufreinigungsschritt für eine möglichst weitgehende Abtrennung der Zielanalyten von Matrixkomponenten, sowie eine Trennung der Analyten untereinander an. Diese Technik ermöglicht auch eine Trennung strukturell ähnlicher Komponenten.

Zur Trennung einzelner Steroide voneinander wurden unterschiedliche Säulen und Fließmittel verglichen. HPLC an Umkehrphasen ist bei kleineren, schwer flüchtigen Verbindungen aufgrund der sehr hohen Trennleistungen dieser Säulen die dominierende Technik [APPELBLAD P und IRGUM K (2002), UEKI M und OKANO M (1999), LOPEZ DE ALDA MJ und BARCELO D (2000), AGUILERA R, ET AL (1996), SAUER MJ, ET AL (1998), KOOLE A, ET AL (1999), GONZALO-LUMBRERAS R und IZQUIERDO-HORNILLOS R, (2000), GONZALO-LUMBRERAS R und IZQUIERDO-HORNILLOS R - 2 (2000), JOOS PE und RYCKEGHEM M VAN (1999), KURONEN P, ET AL (1998), YAMADA H, ET AL (2002), BECCHI M, ET AL (1994)]. In der Steroidanalytik werden aber auch Normalphasen häufig angewendet [APPELBLAD P und IRGUM K (2002), FERCHAUD V, ET AL (1998), PRÉVOST S, ET AL (2001)].

Die Auswahl eines geeigneten Systems für die Aufreinigung von Steroiden aus Rinderfaeces basiert auf mehreren Parametern. Kriterien für die Auswahl waren keine Isotopendiskriminierung durch die HPLC und damit verbunden gute Peaksymmetrien sowie die Detektionsmöglichkeiten während des Laufs, eine möglichst weitreichende Abtrennung von Störstoffen, eine gute Trennung der Einzelkomponenten und geringe Analysenzeiten.

Zu Diskriminierungsvorgängen ist in der Literatur [BRAUNSDORF R, ET AL (1993), SHEPARD AT, ET AL (1976), FETZER JC, ET AL (1980)] für chromatographische

Verfahren eine unterschiedliche Verteilung einzelner Isotope innerhalb eines Peaks beschrieben. Leichtere Isotope sammeln sich bei der Flüssigkeitschromatographie an Umkehrphasen im vorderen Teil eines Peaks, schwerere im hinteren, wobei dieser Effekt mit zunehmender Molekülmasse und sinkender Polarität abnimmt [BRAUNSDORF R, ET AL (1993)]. Da wegen der anschließenden IRMS-Messungen eine Diskriminierung einzelner Isotopen während der Aufarbeitung unbedingt vermieden werden muss, ist es bei einer Fraktionierung über die HPLC wichtig, die gesamte Analytfraktion zu sammeln.

Weisen Peaks der Zielanalyten für Parameter wie die Asymmetrie Werte auf, die sich deutlich von 1 unterscheiden bedeutet dies bei Werten < 1 ein Fronting oder bei Werten > 1 ein Tailing des Peaks. Bei starkem Tailing oder Fronting ist präzises Schneiden der Gesamtfraktion eines Analyten erschwert, da die genauen Grenzen für Peakanfang und -ende durch die sehr langsam abfallende Steigung des Peaks nur schwer bestimmt werden können. Des weiteren führen extrem breite Peaks dazu, dass die gesammelten Fraktionsvolumina größer werden müssen und damit auch die Menge an coeluierenden Matrixkomponenten in der gesammelten Fraktion erhöht wird. Um bei der Fraktionierung den gesamten Peak sammeln zu können, sind schmale, symmetrische Peaks zu bevorzugen.

Nur wenn die Analyten auch während der HPLC-Schritte detektiert werden können, ist es möglich, die Fraktionierung direkt zu überwachen und Verluste beim Schneiden zu vermeiden. Die Detektion erfolgt während der HPLC-Schritte mittels UV, da im UV-Detektor, besonders wenn bei mehreren Wellenlängen gleichzeitig gemessen werden kann, mehr von den Begleitsubstanzen, die abgetrennt werden sollen sichtbar ist, als beispielsweise bei einer MS-Detektion. Daher sind als Zielanalyten bevorzugt Steroide geeignet, die UV-aktiv sind.

Da die meisten Steroide nur geringe UV-Aktivitäten aufweisen, ist es wichtig, ein Fließmittel für die HPLC zu wählen, das unter 210 nm UV-durchlässig ist. Sowohl Wasser und Acetonitril als auch n-Hexan sind anwendbar.

Lediglich die Steroide, die eine α,β -ungesättigte Ketofunktion besitzen, wie beispielsweise Testosteron und Progesteron, zeigen durch $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge ein Absorptionsmaximum bei 240 nm, die aromatischen Estrogene zeigen neben einer Absorption bei 205 nm eine weitere bei 280 nm [APPELBLAD P und IRGUM K (2002), KURONEN P, ET AL (1998)].

Eine direkte Detektion der Analyten in dem gegebenen Konzentrationsbereich ist in Faecesproben aufgrund der hohen Matrixbelastung dennoch nicht möglich. Die Festlegung der Schnittzeiten für eine Fraktionierung kann in diesem Fall daher nur über externe Standards erfolgen.

Zur Verkürzung der Retentionszeiten und verbesserten Trennung der Analyten im HPLC-Schritt wurde bei der Umkehrphase mit erhöhten Temperaturen bei 60°C gearbeitet [KURONEN P, ET AL (1998)].

Um auf RP-Materialien eine bessere Trennung ohne Verschlechterung der Peakform in akzeptablen Zeiten zu erreichen, sind Gradientensysteme vorteilhaft. Zur Trennung der Analyten untereinander können niedrigere Anteile an organischem Lösungsmittel im Fließmittel gewählt werden. Außerdem wird nach der Elution der Analyten durch eine Erhöhung des Anteils an organischem Lösungsmittel im Fließmittel eine schnelle Elution der noch auf der Säule retardierten Matrixkomponenten gewährleistet. Dies regeneriert die Kapazität der Säule für die nächsten Läufe.

Durch einen Gradienten, der bis auf eine Fließmittelzusammensetzung Acetonitril/Wasser 90 + 10 (v/v) ansteigt, ist ein effektives Spülen der Säule möglich, so dass trotz der extrem hohen Matrixbelastung eine lange Lebensdauer der Säule erreicht wird. Das ausgewählte Umkehrphasensystem mit einer Gradientenelution hat eine deutlich höhere Aufreinigungskapazität als Normalphasensysteme. Es wird daher als erster HPLC-Schritt eingesetzt, um möglichst viel Matrix abzutrennen.

Für Normalphasensysteme kommt aufgrund längerer Äquilibrierungszeiten bei Wechseln in der Fließmittelzusammensetzung eine Gradientenelution nur bedingt in Betracht.

Die Trennung der Analyten kann auf einem Umkehrphasenmaterial mit Gradientenelution zunächst nur in Gruppen erfolgen und auch die Aufreinigungsleistung dieses Systems ist noch nicht ausreichend. Ein zweites System zur Trennung der Einzelkomponenten und weiteren Aufreinigung der gesammelten Fraktionen ist daher notwendig.

Für eine zweite HPLC-Auftrennung der Steroide in Einzelfractionen mit zusätzlicher Aufreinigungskapazität kann entweder die Polarität der stationären Phase oder die der Analyten verändert werden. Es kommen damit sowohl Normalphasensysteme für die freien Steroide als auch Umkehrphasensysteme für die zuvor acetylierten Steroide in Betracht.

Für die nachfolgenden GC-MS und GC-C-IRMS-Messungen ist eine Derivatisierung der Analyten aufgrund der polaren Gruppen im Molekül und der niedrigen Flüchtigkeit der Steroide empfehlenswert [APPELBLAD P und IRGUM K (2002)]. Gängige Derivatisierungstechniken in der Steroidanalytik sind die Silylierung [APPELBLAD P und IRGUM K (2002), TERNES TA, ET AL (2002), FERCHAUD V, ET AL (1998), PRÉVOST S, ET AL (2001)] und die Acetylierung [UEKI M und OKANO M (1999), FERCHAUD V, ET AL (1998), SHACKLETON CHL, ET AL (1997), AGUILERA R, ET AL (1999), AGUILERA R, ET AL (1996), BECCHI M, ET AL (1994)]. Silylierte Verbindungen hydrolysieren leicht, während Acetate stabil sind [APPELBLAD P und IRGUM K (2002); AGUILERA R, ET AL (1996), AGUILERA R, ET AL – 2 (1996), BECCHI M, ET AL (1994)]. Sie sind daher für eine weitere HPLC-Aufreinigung geeignet.

Um eine Vereinfachung der Methode zu erreichen, ist es von Vorteil, die Zielanalyten nicht über ein Normalphasensystem, sondern nach einer Acetylierung erneut über eine Umkehrphase zu reinigen. Die klare Verschiebung in den Retentionszeiten der derivatisierten gegenüber den underivatisierten Steroiden ermöglicht es, durch eine zweite Umkehrphasen-HPLC, mit dem gleichen System aber nach Acetylierung, weitere Matrixkomponenten abzutrennen. Dies wird erreicht, da die vor der Acetylierung zur gleichen Zeit wie die Zielanalyten eluierenden Matrixkomponenten entweder nicht acetyliert werden und so ihre Retentionszeit unverändert bleibt oder sie nach der Acetylierung andere Retentionseigenschaften besitzen als die Analyten. Die Möglichkeit einer erneuten Fraktionierung über eine Umkehrphase vermeidet dabei die Notwendigkeit, das System auf Normalphasenbedingungen umzustellen beziehungsweise ein zweites System unter Normalphasenbedingungen zu betreiben.

Ein weiterer Vorteil dieses Schrittes ist, dass die Acetylierungsreagenzien, die die GC-Säule angreifen können, vor der GC-MS Analytik durch einen HPLC-Schritt abgetrennt werden. Auf diese Weise kann die GC-Säule deutlich geschont werden.

Die Wiederfindung der Analyten ist nach einer Acetylierung und nachfolgenden Umkehrphasen-HPLC niedriger als nach Cyanopropylphasen-HPLC gefolgt von einer Acetylierung.

Eine mögliche Ursache hierfür ist ein Verlust der leichter flüchtigen Acetate beim Einengen der HPLC-Fractionen zur Trockene. Da in diesem Schritt Wasser zur Trockene eingeeengt

werden muss, das bei 20°C einen Dampfdruck von 23 hPa hat, sind extreme Bedingungen erforderlich. Weil n-Hexan mit einem Dampfdruck von 160 hPa bei 20°C deutlich flüchtiger ist als Wasser, können die Bedingungen zum Einengen von Hexanextrakten deutlich schonender gewählt werden. Werden die Fraktionen vor einem Einengen zur Trockene zunächst mit n-Hexan extrahiert, erhöht sich die Wiederfindung der Analyten deutlich. Dieser Extraktionsschritt nach der HPLC ermöglicht eine Umkehrphasen-HPLC-Fraktionierung der Steroidacetate, ohne die Gesamt-Wiederfindung zu stark herabzusetzen.

Alternativ zu einem Ersatz der Cyanophase durch eine Aufreinigung der Acetate über eine Umkehrphase ist die Aufreinigung der Acetate über die Umkehrphase als drittem HPLC-Schritt nach einer Fraktionierung der freien Steroide auf einer Cyanophase möglich. Die Unterschiede in den Wiederfindungen zwischen zwei und drei HPLC Schritten sind dabei nicht so groß, dass diese Möglichkeit auszuschließen ist. Aufgrund der extrem verlängerten Aufarbeitungszeiten durch eine dritte HPLC und der Notwendigkeit, ein HPLC-System unter Normalphasenbedingungen zu betreiben, ist diese Möglichkeit allerdings unvorteilhaft, trotz einer verbesserten Sauberkeit der Extrakte.

Da in Faecesproben nicht nur die ausgewählten Zielanalyten, sondern auch eine große Menge anderer Steroide und Substanzen mit ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften aus dem Metabolismus vorliegen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich in den Fraktionen noch andere Substanzen finden. Besonders die Steroide, die im Metabolismus ausser den Zielanalyten vorkommen, sind diesen in ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften so ähnlich, dass sie nur sehr schlecht abgetrennt werden können. Androst-5-en-3 β ,17 β -diol kann beispielsweise nicht mit GC-C-IRMS gemessen werden, da GC-MS Messungen belegen, dass es nicht von einer Störsubstanz abgetrennt werden kann. Die Massenspektren dieser Substanz lassen darauf schliessen, dass es sich hierbei wahrscheinlich um ein Androstandiol handelt, ein weiteres Steroid aus dem Hormonmetabolismus.

Die Menge der Matrixprobe, die pro Lauf in ein HPLC-System injiziert werden kann hängt stark von der Menge an Begleitkomponenten in der einzelnen Probe ab. Bei größeren Injektionsmengen kann es zur Überladung der analytischen Säule und damit einer deutlichen Verschiebungen der Retentionszeiten sowie Verschlechterungen der Peakparameter

kommen. Eine Verschlechterung der Peakparameter bedeutet dabei auch eine Verschlechterung der Trennleistung. Dies ist unbedingt zu vermeiden, da dadurch ein Schneiden einzelner Gruppen beziehungsweise der Einzelstoffe schwieriger wird und sich wie schon erläutert die Gefahr einer Diskriminierung einzelner Isotope ergibt.

Muss eine Probe dagegen in vielen Teilportionen injiziert und fraktioniert werden, bedeutet dies einen erheblich erhöhten Zeitaufwand und Lösungsmittelverbrauch.

Da die Kapazität einer analytischen RP-Säule begrenzt ist und präparative Säulen einen zu hohen Lösungsmittelverbrauch bedingen, soll eine weitere semipräparative Vorreinigung der Extrakte nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Konzentrierung der Analyten durch eine spezielle Vorsäule online mit der Umkehrphasen-HPLC erreicht werden. Das Phasenmaterial dieser Vorsäule ist Alkyldiolsilica, ein Restricted Access Material (RAM). Es handelt sich bei dem RAM-Material um eine Kombination aus Größenausschluss- und Umkehrphasen-Material. Poren eines definierten Durchmessers von 60Å enthalten im Inneren Oberflächen mit Umkehrphaseneigenschaften. Der definierte Porendurchmesser erlaubt es dabei nur kleineren Analyten die inneren Regionen zu erreichen, in denen das Umkehrphasenmaterial lokalisiert ist, das diese Analyten zurückhalten kann. Größere Moleküle wie beispielsweise Proteine können nicht in die Poren eindringen und werden daher nicht retardiert [MERCK KGAA, Manual (2001), YU Z, ET AL (1997) und BOOS KS und GRIMM CH (1997)]. Dadurch trennt die RAM-Säule hochmolekulare Matrixbestandteile, polare Verunreinigungen und anorganische Salze gut ab [PETROVIC M, ET AL (2002)]. Dieses Material wurde speziell zur Aufreinigung biologischer Materialien wie Urin oder Serum im online Modus mit einer anschließenden HPLC-Analytik entwickelt. Es sind eine Reihe von Applikationen für diese Matrices mit RAM-Material beschrieben [MERCK KGAA, Application Guide and Manual, (2001), APPELBLAD P und IRGUM K (2002), HOEVEN RAM VAN DER, ET AL (1997), SCHAFFER C und LUBDA D (2001)].

Die RAM-Säule ermöglicht neben der Injektion mehrerer Teilportionen einer Probe einen anschließenden Waschschriff. So können vor der analytischen Säule weitere Matrixbestandteile abgetrennt und die Analyten auf der Vorsäule konzentriert werden. Die Menge an Probe, die pro Lauf auf die analytische Säule aufgegeben und fraktioniert wird, kann erhöht werden, da die Kapazität der analytischen Säule weniger durch Matrixkomponenten beeinträchtigt wird.

Des weiteren ermöglicht die wiederholte Injektion mehrerer kleiner Teilproben auf die Vorsäule ein Aufnehmen der Probe in reinem Methanol. Reines Methanol ist ein sehr gutes Lösungsmittel für Steroide, das Verluste an Analyt durch schlechte Löslichkeit vermeidet. Durch die Injektion eines großen Volumens einer rein methanolischen Probelösung direkt auf die analytische Säule wäre die Elutionskraft des Methanols so groß, dass die Analyten schlechter retardierten. Durch die Injektion mehrerer kleiner Teilproben ist der Verdünnungseffekt des Fließmittels für jede Einzelinjektion jedoch groß genug, die Analyten auf der Vorsäule zu retardieren und gesammelt im Back-flush-Modus auf die analytische Säule zu transferieren.

4.6 Untersuchungen von Steroidmustern in Faecesproben mittels GC-MS

Die Ergebnisse der Messungen von je zwei gefriergetrockneten Mischproben Faeces unbehandelter männlicher und unbehandelter trächtiger Tiere bilden die Grundlage für die Auswahl der Zielanalyten für spätere GC-C-IRMS Messungen.

Die Hauptkriterien für die Auswahl geeigneter Zielanalyten sind in erster Linie ihre zu erwartende Konzentration in Faecesproben und des weiteren ihre Detektierbarkeit während der Aufarbeitung, die bereits diskutiert wurde. In der Literatur [BAMBERG E, SCHWARZENBERGER F, (1990), zitiert nach SCHLENKER G, ET AL (1998) und CHOI HS (1987)] werden für Rinderfaeces Steroidgehalte im oberen $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ bis unteren $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Bereich angegeben.

Aufgrund dieser Kriterien wurden in Kombination mit den Ergebnissen der vier untersuchten Proben Pregnenolon, 5-Androsten-3 β ,17 β -diol und Dehydroepiandrosteron als Precursor und die Hormone beziehungsweise Metaboliten Etiocholanolon, Epiandrosteron, 17 α -Estradiol und Progesteron als mögliche Zielanalyten in Faecesproben ausgewählt.

Zur endgültigen Auswahl der Zielanalyten in Faeces wurden gefriergetrocknete Faecesproben unbehandelter und behandelter Tiere beiderlei Geschlechts aufgearbeitet und mittels GC-EI-MS analysiert.

Besonders bei der Einschätzung der Konzentrationsbereiche der Steroide in Proben von weiblichen Tieren müssen zyklusabhängige Schwankungen in den Hormonhaushalten der Tiere berücksichtigt werden.

Die detektierten Gehalte an Progesteron, Pregnenolon, Epiandrosteron, Dehydroepiandrosteron, 17α -Estradiol und Androst-5-en- $3\beta,17\beta$ -diol lagen für unbehandelte Tiere bei allen untersuchten Proben unter $10 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$. Die ermittelten Gehalte für Etiocholanolon in Proben unbehandelter Tiere streuten bis $50 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$. Damit stimmen die ermittelten Gehalte auch unter Berücksichtigung der Wiederfindung mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.

Nach einer Behandlung mit Estradiol konnten für 17α -Estradiol in den entsprechenden Proben Gehalte um die $50 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ detektiert werden. Nach einer Behandlung mit Progesteron konnten bei männlichen Tieren sogar Progesterongehalte über $200 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ermittelt werden.

Die für Etiocholanolon in Proben von behandelten und unbehandelten Tieren sowie für 17α -Estradiol in Proben von Tieren nach einer Behandlung mit Estradiol detektierten Gehalte sind für GC-C-IRMS-Messungen ausreichend.

Die detektierten Gehalte für Dehydroepiandrosteron, Epiandrosteron, Pregnenolon, Progesteron und 5-Androsten- $3\beta,17\beta$ -diol sind dagegen niedriger. Da Dehydroepiandrosteron, Pregnenolon und 5-Androsten- $3\beta,17\beta$ -diol die einzigen untersuchten Steroide sind, die sich als Precursor für einen Nachweis einer Behandlung eignen, ist es gegebenenfalls nötig, die Ausgangsmenge von 50 g auf 200 g Rinderfaeces zu erhöhen, um für GC-C-IRMS Messungen genügend Analyten in den Extrakten zu erhalten. Aufgrund apparativer Grenzen ist dies nicht in einem Schritt möglich. Es müssen hierfür zwei bis vier Proben von 50 g parallel aufgearbeitet und vor der Messung vereinigt werden.

4.7 Validierung

Die durchgeführten GC-MS Messungen zur Quantifizierung dienen zur Abschätzung des Konzentrationsbereichs der Analyten. Diese Abschätzung zeigt, ob die Konzentrationen der Analyten in den Extrakten für die GC-C-IRMS-Messungen ausreichen und im linearen Bereich für die IRMS-Messungen zu liegen. Aus diesem Grund ist eine Validierung der quantitativen Messungen nicht notwendig. Auf die Verwendung eines internen Standards für die GC-MS-Messungen musste verzichtet werden, da bei der IRMS eine Verwendung isotope markierter interner Standards nicht möglich ist. Nach der Verbrennung zu Kohlendioxid ist der isotope markierte Standard nicht mehr von dem Analyten zu

unterscheiden, beeinflusst aber durch die Coelution mit diesem den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert. Andere Steroide haben oft abweichende Eigenschaften im Vergleich zu den Zielanalyten und sind daher ebenfalls nicht als interne Standards geeignet.

Es wurden Wiederfindungsversuche durchgeführt, um einen ersten Hinweis auf eventuell auftretende Isotopendiskriminierungen durch Verluste an Analyten zu erhalten. Des weiteren sind die Wiederfindungsraten dazu geeignet, in Verbindung mit den Literaturangaben über natürliche Gehalte an Steroiden im Faeces, die tatsächlich aufzuarbeitenden Probenmengen festzulegen.

Im Vergleich sind die Wiederfindungen in dotierten aufgearbeiteten Matrixproben deutlich besser als in aufgearbeiteten Standardlösungen. Dies deutet auf einen positiven Matrixeffekt während der Aufarbeitung hin, der allerdings nicht eindeutig erklärt werden kann. Es ist beispielsweise möglich, dass durch eine Inaktivierung von Oberflächen durch die Matrixbestandteile während der Aufarbeitung negative Wechselwirkungen mit den Analyten unterdrückt werden. Außer für Dehydroepiandrosteron, Epiandrosteron und Pregnenolon liegen die Wiederfindungen unter 75 %. Für GC-C-IRMS-Messungen sind die Wiederfindungen akzeptabel, es muss aber unbedingt gezeigt werden, dass der Verlust an Analyten nicht zu einer Isotopendiskriminierung führt.

Die dazu durchgeführten Versuche ergaben außer bei Pregnenolon für die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte Unterschiede zwischen aufgearbeiten und nicht aufgearbeiteten Standards von weniger als 1‰. Betrachtet man die Spannweiten der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte bei einer Dreifachinjektionen von durchschnittlich 0,7 ‰, ist dies noch im Rahmen der Messunsicherheit einzuordnen. Die Abweichungen der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des aufgearbeiteten Pregnenolons mit 1,8 und 2 ‰ sind dagegen bereits als kritisch zu betrachten. Eine Diskriminierung einzelner Isotopen dieses Analyten während der Aufarbeitung kann nicht ausgeschlossen werden, er kommt daher als Zielanalyt nicht länger in Frage. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass die Methode in Bezug auf die Isotopenzusammensetzung der anderen Analyten nicht diskriminiert. Auch in der Literatur [MEIER-AUGENSTEIN W (2002), BRAUNSDORF R, ET AL (1993)] beziehen sich Aussagen über Diskriminierungen in der Regel auf Abweichungen über 2 ‰. CAIMI RJ und BRENNAN JT (1997) geben für die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte eines Methylpalmitat-Peaks in einem RP-HPLC-Chromatogramm Differenzen von bis zu 7 ‰ zwischen Peakanfang und Peakende an, wobei der Diskriminierungseffekt am Peakanfang deutlich höher ist als am Peakende.

Diskriminierungsversuche in Matrixproben sind nicht durchführbar, da keine hormonfreien Faecesproben hergestellt werden können, die eine Beeinflussung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte durch natürliche Gehalte ausschließen und gleichzeitig das natürliche Matrixumfeld der Analyten während der Aufarbeitung wiedergeben.

Um vertrauenswürdige Isotopenmessungen der Analyten in den aufgereinigten Extrakten durchführen zu können, ist es wichtig, dass die Peaks im GC-Chromatogramm von anderen noch in den Extrakten vorhandenen Komponenten basisliniengetrennt sind. Dies wird mit der entwickelten Methode außer für Androst-5-en-3 β ,17 β -diol erreicht. Eine Basislinientrennung auch dieser Substanz wäre durch eine weitere Optimierung des GC-Laufes denkbar. Da mit Dehydroepiandrosteron eine weitere Vorläufersubstanzen die geforderten Bedingungen erfüllt, wurde darauf verzichtet.

Zur Einschätzung der Wiederholbarkeit der Methode sind in zwei Serien jeweils sechs dotierte Matrixteilproben aufgearbeitet worden. Die Ergebnisse innerhalb einer Serie sind gut wiederholbar, die berechneten Standardabweichungen ($n = 6$) liegen für alle untersuchten Analyten unter 1 % und für Epiandrosteron und Etiocholanolon in beiden Serien sogar unter 0,5 %.

Betrachtet man die Standardabweichungen der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Standardlösungen ($n = 6$), die nicht aufgearbeitet wurden, mit 0,4 % für Epiandrosteron bis zu 0,8 % für Progesteron, liegen diese in einem vergleichbaren Bereich zu denen der Aufarbeitungsserien.

Da in den zwei Aufarbeitungsserien mit unterschiedlichen Mengen an Standardkomponenten dotiert wurde, ist das Verhältnis natürlicher Gehalt zu dotiertem Gehalt und somit auch das Isotopenverhältnis der Analyten für die beiden Serien unterschiedlich. Durch einen höheren Anteil der dotierten Standardsubstanz an der Gesamtmenge des Analyten, nähert sich der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Analyten in diesen Proben dem des reinen Standards an.

Zusammenfassend ist die entwickelte Methode für die Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte mit GC-C-IRMS von Dehydroepiandrosteron, Epiandrosteron, 17 α -Estradiol, Etiocholanolon, und Progesteron in Rinderfaeces geeignet und nicht diskriminierend.

5 EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Faecesproben

Tabelle 5-1. Codierung der Faecesproben.

Probennummer	Proben- menge	Tier- Nr.	Art der Probe
ISOSTER-F-02-1-4	251,6 g	-	Mischprobe Bullen, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-02-1-5	246,0 g	-	Mischprobe Bullen, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-02-1-7	243,6 g	-	Mischprobe Bullen, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-02-1-8	245,3 g	-	Mischprobe Bullen, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-02-1-10	212,7 g	-	Mischprobe Bullen, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-02-1-11	203,5 g	-	Mischprobe Bullen, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-02-1-13	256,9 g	-	Mischprobe Bullen, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-02-2-4	249,7 g	-	Mischprobe tragende Färsen, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-02-2-5	253,6 g	-	Mischprobe tragende Färsen, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-02-2-6	260,4 g	-	Mischprobe tragende Färsen, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-02-2-8	235,9 g	-	Mischprobe tragende Färsen, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-02-2-9	192,2 g	-	Mischprobe tragende Färsen, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-02-2-10	198,0 g	-	Mischprobe tragende Färsen, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-02-2-11	179,3 g	-	Mischprobe tragende Färsen, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-02-5-1	202 g	773	Bulle, unbehandelt, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-45-1	200 g	304	Weibliches Tier, unbehandelt, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-46-1	200 g	305	Weibliches Tier, unbehandelt, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-47-1	200 g	306	Weibliches Tier, unbehandelt, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-48-1	200 g	303	Weibliches Tier, behandelt mit Testosteron, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-49-1	200 g	304	Weibliches Tier, behandelt mit Estradiol und Progesteron, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-50-1	200 g	305	Weibliches Tier, unbehandelt, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-51-1	200 g	306	Weibliches Tier, behandelt mit Estradiol, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-52-1	200 g	303	Weibliches Tier, behandelt mit Testosteron, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-54-1	200 g	305	Weibliches Tier, unbehandelt, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-55-1	200 g	306	Weibliches Tier, behandelt mit Estradiol, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-56-1	200 g	303	Weibliches Tier, behandelt mit Testosteron, Grasfütterung, gefriergetrocknet

EXPERIMENTELLER Teil

Probennummer	Proben- menge	Tier- Nr.	Art der Probe
ISOSTER-F-03-57-1	200 g	304	Weibliches Tier, behandelt mit Estradiol und Progesteron, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-64-1	200 g	699	Männliches Tier, unbehandelt, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-65-1	200 g	773	Männliches Tier, unbehandelt, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-66-1	200 g	696	Männliches Tier, unbehandelt, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-67-1	200 g	697	Männliches Tier, unbehandelt, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-68-1	200 g	699	Männliches Tier, behandelt mit Estradiol, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-69-1	200 g	773	Männliches Tier, behandelt mit Testosteron, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-70-1	200 g	696	Männliches Tier, unbehandelt, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-71-1	200 g	697	Männliches Tier, behandelt mit Estradiol und Progesteron, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-72-1	200 g	699	Männliches Tier, behandelt mit Estradiol, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-73-1	200 g	773	Männliches Tier, behandelt mit Testosteron, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-74-1	200 g	696	Männliches Tier, unbehandelt, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-03-75-1	200 g	697	Männliches Tier, behandelt mit Estradiol und Progesteron, Grasfütterung, gefriergetrocknet
ISOSTER-F-04-1	1200 g	265	Trächtiges Tier, unbehandelt, gefriergetrocknet

Alle Faecesproben wurden vor der Aufarbeitung gefriergetrocknet und homogenisiert.

5.2 Reagenzien

Tabelle 5-2. Standardsubstanzen.

Steroide	CAS	Hersteller	Katalog Nr.	Charge
17 α -Estradiol	[57-91-0]	Sigma	E 8750	Lot 20K4017
17 α -Ethinylestradiol	[57-63-6]	Fluka	46263	Lot 1065X
17 α -Methyltestosteron	[58-18-4]	Fluka	46444	Lot 9158X
17 β -Estradiol	[50-28-2]	Fluka	46550	Lot 9251X
5 α -Androstan-17 β -ol-3-on	[521-18-6]	Fluka	46024	Lot 9162X
5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol	[1852-53-5]	Sigma	A 7755	Lot 50K4121

Steroide	CAS	Hersteller	Katalog Nr.	Charge
Androst-5-en-3 β ,17 β -diol	[521-17-5]	Sigma	A 8755	Lot 31H36791
5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol	[1851-23-6]	Sigma	A 7880	Lot 93H4008
Androsteron	[53-41-8]	Fluka	46041	Lot 0014X
Dehydroepiandrosteron	[53-43-0]	Sigma	D 4000	Lot 038H1362
17 α -Testosteron	[481-30-1]	Sigma	E 5878	Lot 80K0954
Estron	[53-16-7]	Fluka	46573	Lot 0167X
Etiocholan-3 α -ol-17-on	[53-42-9]	Fluka	46280	Lot 0059X
Epiandrosteron	[481-29-8]	Aldrich	23,440-0	Lot 05903HS-063
5-Pregnen-3 β -ol -20-on	[145-13-1]	Sigma	P 9129	Lot 46H0477
Progesteron	[57-83-0]	Fluka	46665	Lot 1051X
Testosteron	[58-22-0]	Fluka	46923	Lot 0256X

Tabelle 5-3. Standardlösungen in Methanol.

Standardlösung 1:	Cholesterol	117 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
	Dehydroepiandrosteron	100 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
	Etiocholanolon	93 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
	17 α -Testosteron	9 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
	17 β -Testosteron	10 ng $\cdot$ μ L ⁻¹

Standardlösung 2:	Cholesterol	94 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
	Dehydroepiandrosteron	105 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
	17 α -Estradiol	10 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
	17 β -Estradiol	9 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
	Estron	10 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
	Progesteron	11 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
	Pregnenolon	93 ng $\cdot$ μ L ⁻¹

Standardlösung 3 (HPLC): Von den Standardsubstanzen der einzelnen Steroide wurden Stammlösungen in Methanol angesetzt, die bei Bedarf verdünnt wurden.

5 α -Androstan-17 β -ol-3-on	202 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
Androst-5-en-3 β ,17 β -diol	98 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
Androsteron	389 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
Cholesterol	195 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
Cortison	117 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
Dehydroepiandrosteron	98 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
17 α -Estradiol	149 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
17 β -Estradiol	210 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
Estron	508 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
Hydrocortison	181 ng $\cdot$ μ L ⁻¹
17 α -Hydroxyprogesteron	107 ng $\cdot$ μ L ⁻¹

EXPERIMENTELLER Teil

	Pregnenolon	104 ng · μL^{-1}
	Progesteron	369 ng · μL^{-1}
	Testosteron	884 ng · μL^{-1}
	17 α -Testosteron	125 ng · μL^{-1}
	Etiocholan-3 α -ol-17-on	254 ng · μL^{-1}
Standardlösung 4 (S1):	17 α -Estradiol	100 ng · μL^{-1}
	Estron	100 ng · μL^{-1}
	17 α -Testosteron	100 ng · μL^{-1}
	Progesteron	100 ng · μL^{-1}
Standardlösung 4 (S2):	17 α -Estradiol	10 ng · μL^{-1}
	Estron	10 ng · μL^{-1}
	17 α -Testosteron	10 ng · μL^{-1}
	Progesteron	10 ng · μL^{-1}
Standardlösung 5 (S1):	Epiandrosteron	100 ng · μL^{-1}
	Dehydroepiandrosteron	100 ng · μL^{-1}
	Androst-5-en-3 β ,17 β -diol	100 ng · μL^{-1}
	Etiocholanolon	100 ng · μL^{-1}
	Pregnenolon	100 ng · μL^{-1}
Standardlösung 5 (S2):	Epiandrosteron	10 ng · μL^{-1}
	Dehydroepiandrosteron	10 ng · μL^{-1}
	Androst-5-en-3 β ,17 β -diol	10 ng · μL^{-1}
	Etiocholanolon	10 ng · μL^{-1}
	Pregnenolon	10 ng · μL^{-1}

Tabelle 5-4. Reagenzien und Lösungsmittel - Wenn nicht anders aufgeführt, entsprechen die Reagenzien mindestens der Qualitätsstufe p.A.

Acetanhydrid

Acetonitril, (LiChrosolv, gradient grade, Merck)

Diathomeenerde

Ethylacetat

Methanol

Mischung aus Methanol und Wasser 70+30 (v/v)

Mischung aus Schwefelsäure und Ethylacetat,

250 mL Ethylacetat werden mit 10 Tropfen Schwefelsäure versetzt

Natriumhydroxid-Plätzchen

Natronlauge, $c = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 4 g Natriumhydroxid werden mit Wasser zu 100 mL gelöst

n-Hexan

n-Hexan, (LiChrosolv, Merck)

Pyridin

Schwefelssäure, min 98%ig
Stickstoff
Wasser, Ultrapur

5.3 Geräteparameter

Tabelle 5-5. Verwendete Geräte.

	Hersteller	Typ	Serien-Nr.
Lab Blender	Seaward	Stomacher 400	36450
ASE-Extraktor	Dionex	ASE 300	
100 mL Extraktionszellen	Schleicher und Schuell	Ref. No. 10350315	
Hülsen für 100 mL Zellen	Dionex		
Lösungsmittelmodul	Dionex		
SPE-Block	Seartis GmbH	VacMaster-10	3388
SPE-Säulen:			
RP-Polymerphase	Dionex	OnGuardII-RP, 1cc.	variiert
Eindampfstation	Zymark	TurboVapLV	TV0245N11290
Vortex-Mixer	Gemmy Industrial Corp.	VM300	1337
Analysenwaage	Mettler	AE166	33680
Ultraschallbad	Bandelin	RK106	30.600.001.061.226
HPLC-Probengeber	Dionex	ASI 100	1990110
HPLC-Pumpe	Dionex	P580A LPG	1520106
Motorschaltventil	Dionex	MSV-6	1470110
Säulenofen	Dionex	STH585	110556
HPLC-Säulen:			
Vorsäule:	Merck	LiChrospher RP-ADS, variiert	
Alkyldiolsilica (ADS)		25 x 4 mm, 25 µm	
Analytische Säule:	Macharey-Nagel	Nucleosil RP8 HD, variiert	
Umkehrphase		150 x 4,6 mm, 5 µm	
Analytische Säule:	Phenomenex	Luna CN, 150 x 4,6 mm, 5 µm	variiert
Cyanopropylphase			
Diodenarraydetektor	Dionex	UVD340 S	1570105
Fraktionssammler	Gilson	202	150D1031
Software	Dionex	Chromeleon	Vers. 6.20

EXPERIMENTELLER Teil

	Hersteller	Typ	Serien-Nr.
GC-MS I:			
ALS Injektor	Agilent	6890	CN13720557
Gaschromatograph	Agilent	HP 6890	DE-0002374
Säulen		Siehe GC-Systeme	
Massenselektiver Detektor	Agilent	MSD 5973	US-63810168
Software	Agilent	MS Chemstation Rev. C 00.00	
GC-MS II:			
Probengeber	Gerstel	KAS 4 Plus	74950802
Gaschromatograph	Agilent	HP 6890 plus	US10128030
Säulen		Siehe GC-Systeme	
Massenselektiver Detektor	Agilent	MSD 5973 N P	US10461016
Software	Agilent	Performance Turbo EI MS Chemstation G1701CA Rev. C 00.00	BN2DBD8A06
IRMS:			
Gaschromatograph	Agilent	HP 6890 N	
Säulen		Siehe IRMS-System	
Interface	Thermo Finnigan	GC-Combustion III	
Massenspektrometer	Thermo Finnigan	MAT 253	
Software		Isodat NT 1.5 Isodat NT 2.0	

ASE-Systeme:

ASE-System 1:

Lösungsmittel:	Methanol
Druck:	150 bar
Static t:	5 min
Flushvolume:	60%
Purge t:	300 sec
Verhältnis Probe : Diathomeenerde:	2:1

ASE-System 2:

Lösungsmittel:	Methanol
Druck:	100 bar
Temperatur:	100°C
Static t:	5 min
Flushvolume:	60%
Purge t:	300 sec
Verhältnis Probe : Diathomeenerde:	2:1

ASE-System 3:

Lösungsmittel:	Methanol
Druck:	100 bar
Temperatur:	80°C
Static t:	5 min
Cycles:	2
Flushvolume:	60%
Purge t:	300 sec
Verhältnis Probe : Diathomeenerde:	2:1

ASE-System 4:

Lösungsmittel:	n-Hexan/Ethylacetat 9 + 1 (v/v)
Druck:	140 bar
Temperatur:	100°C
Static t:	5 min
Cycles:	4
Flushvolume:	100%
Purge t:	180 sec
Verhältnis Probe : Diathomeenerde:	2:1

HPLC-Systeme:

HPLC-System 1:

Säule:	Nucleosil C8; 150 x 4,6 mm; 5 µm, 60°C	
Gradient:	0 min	Acetonitril/Wasser 32,5 + 67,5 (v/v)
	20 min	Acetonitril/Wasser 45,0 + 55,0 (v/v)
	40 min	Acetonitril/Wasser 95,0 + 5,0 (v/v)
	50 min	Acetonitril/Wasser 95,0 + 5,0 (v/v)
	52 min	Acetonitril/Wasser 32,5 + 67,5 (v/v)
	57 min	Acetonitril/Wasser 32,5 + 67,5 (v/v)
Fluss:	1 mL · min ⁻¹	
Detektion:	UV;	Messwellenlängen: 205 nm und 240 nm

HPLC-System 2:

Säule:	Nucleosil C8; 150 x 4,6 mm; 5 µm, 60°C	
Gradient:	0 min	Acetonitril/Wasser 32,5 + 67,5 (v/v)
	20 min	Acetonitril/Wasser 45,0 + 55,0 (v/v)
	40 min	Acetonitril/Wasser 95,0 + 5,0 (v/v)
	50 min	Acetonitril/Wasser 95,0 + 5,0 (v/v)
	52 min	Acetonitril/Wasser 32,5 + 67,5 (v/v)
	57 min	Acetonitril/Wasser 32,5 + 67,5 (v/v)
Fluss:	1 mL · min ⁻¹	
Detektion:	UV;	Messwellenlängen: 205 nm und 240 nm
Fraktionierung:	Schnittzeiten festgelegt anhand von Gleichung 3-3 und 3-4	

Gleichung 3-3. Fraktionsanfang:

$$t_{\text{Anfang}} = R_t (\text{des ersten Peaks der Fraktion}) - 1,5b (\text{des ersten Peaks}) + T$$

Gleichung 3-4. Fraktionsende:

$$t_{\text{Ende}} = R_t (\text{des letzten Peaks der Fraktion}) + 1,5b (\text{des letzten Peaks}) + T$$

mit: R_t = Retentionszeit des Peaks in min
 b = Basisbreite des Peaks in min (Zeitachsenabschnitt zwischen Wendepunkt tangentialen)
 T = Totzeit zwischen Detektor und Fraktionssammler in min

HPLC-System 3:

Säule: Nucleosil C8; 150 x 4,6 mm; 5 μ m, 60°C
 Gradient:
 0 min Acetonitril/Wasser 32,5 + 67,5 (v/v)
 20 min Acetonitril/Wasser 45,0 + 55,0 (v/v)
 25 min Acetonitril/Wasser 57,5 + 42,5 (v/v)
 32 min Acetonitril/Wasser 32,5 + 67,5 (v/v)
 37 min Acetonitril/Wasser 32,5 + 67,5 (v/v)
 Fluss: 1 mL · min⁻¹
 Detektion: UV; Messwellenlängen: 205 nm und 240 nm
 Fraktionierung: Schnittzeiten festgelegt anhand von Gleichung 3-3 und 3-4

HPLC-System 4:

Vorsäule: LiChrospher RP- Alkyl-Diol-Silica, 25 x 4 mm; 25 μ m
 Säule: Nucleosil C8; 150 x 4,6 mm; 5 μ m, 60°C
 Waschschrift: 15 min Acetonitril/Wasser 10,0 + 90,0 (v/v); 2 mL · min⁻¹
 Gradient:
 0 min Acetonitril/Wasser 10,0 + 90,0 (v/v)
 1 min Acetonitril/Wasser 32,5 + 67,5 (v/v)
 21 min Acetonitril/Wasser 45,0 + 55,0 (v/v)
 41 min Acetonitril/Wasser 95,0 + 5,0 (v/v)
 51 min Acetonitril/Wasser 95,0 + 5,0 (v/v)
 53 min Acetonitril/Wasser 32,5 + 67,5 (v/v)
 57 min Acetonitril/Wasser 32,5 + 67,5 (v/v)
 Fluss: 1 mL · min⁻¹
 Detektion: UV; Messwellenlängen: 205 nm und 240 nm
 Fraktionierung: Schnittzeiten festgelegt anhand von Gleichung 3-3 und 3-4

HPLC-System 5:

Säule:	Nucleosil C8; 150 x 4,6 mm; 5 µm, 60°C	
Gradient:	0 min	Acetonitril/Wasser 35,0 + 65,0 (v/v)
	20 min	Acetonitril/Wasser 45,0 + 55,0 (v/v)
	40 min	Acetonitril/Wasser 95,0 + 5,0 (v/v)
	50 min	Acetonitril/Wasser 95,0 + 5,0 (v/v)
	52 min	Acetonitril/Wasser 35,0 + 65,0 (v/v)
	57 min	Acetonitril/Wasser 35,0 + 65,0 (v/v)
Fluss:	1 mL · min ⁻¹	
Detektion:	UV;	Messwellenlängen: 205 nm und 240 nm

HPLC-System 6:

Säule:	Luna CN; 150 x 4,6 mm; 5 µm, 25°C	
Fließmittel:	n-Hexan/2-Propanol 97,5 + 2,5 (v/v)	
Fluss:	1 mL · min ⁻¹	
Detektion:	UV;	Messwellenlängen: 205 nm und 240 nm

HPLC-System 7:

Säule:	Nucleosil C8; 150 x 4,6 mm; 5 µm, 60°C	
Gradient:	0 min	Acetonitril/Wasser 40,0 + 60,0 (v/v)
	30 min	Acetonitril/Wasser 60,0 + 40,0 (v/v)
	45 min	Acetonitril/Wasser 80,0 + 20,0 (v/v)
	50 min	Acetonitril/Wasser 80,0 + 20,0 (v/v)
	52 min	Acetonitril/Wasser 40,0 + 60,0 (v/v)
	57 min	Acetonitril/Wasser 40,0 + 60,0 (v/v)
Fluss:	1 mL · min ⁻¹	
Detektion:	UV;	Messwellenlängen: 205 nm und 240 nm
Fraktionierung:	Schnittzeiten festgelegt anhand von Gleichung 3-3 und 3-4	

GC-MS-Systeme:

GC-MS-System 1:

Säule:	HP-5MS, 5% Phenyl-methyl-siloxan Kapillarsäule, 30 m x 250 µm, Filmdicke: 0,25µm	
Trägergas:	Helium, 0,6 mL · min ⁻¹	
Injektion:	pulsed splitless, 2 µl	
Temperatur:	Injektor: 230°C	
	Ofen: 70°C (1 min), 20°C · min ⁻¹ → 220°C (1 min), 1°C · min ⁻¹ → 240°C (0 min), 0,5°C · min ⁻¹ → 250°C (0 min), 25°C · min ⁻¹ → 300°C (0 min)	
Ionisierung:	PCI mit Methan	
Scan Modus		

GC-MS-System 2:

Säule: HP-5MS, 5% Phenyl-methyl-siloxan Kapillarsäule,
30 m x 250 μm , Filmdicke: 0,25 μm
 Trägergas: Helium, 0,9 mL $\cdot$ min⁻¹
 Injektion: pulsed splitless, 2 μl
 Temperatur: Injektor: 30°C (KAS)
 Ofen: 50°C (1,5 min), 20°C $\cdot$ min⁻¹ $\rightarrow$ 270°C (0 min), 0,5°C $\cdot$ min⁻¹
 $\rightarrow$ 280°C (1,0 min), 30°C $\cdot$ min⁻¹ $\rightarrow$ 300°C (1,0 min)
 Ionisierung: EI
 Scan Modus

GC-MS-System 3:

Säule: MN δ 3, Kapillarsäule,
30 m x 250 μm , Filmdicke: 0,25 μm
 Trägergas: Helium, 1,0 mL $\cdot$ min⁻¹
 Injektion: pulsed splitless, 2 μl
 Temperatur: Injektor: 270°C
 Ofen: 120°C (1 min), 20°C $\cdot$ min⁻¹ to 235°C (0 min), 1°C $\cdot$ min⁻¹ to
 240°C (8 min), 5°C $\cdot$ min⁻¹ to 300°C (2 min), 20°C $\cdot$ min⁻¹ to
 320°C (2 min)
 Ionisierung: EI
 Scan Modus

GC-MS-System 4:

Säule: MN optima δ 3, Methylphenylpolysiloxan, Kapillarsäule,
30 m x 250 μm , Filmdicke: 0,25 μm
 Trägergas: Helium
 Injektion: 5 μl
 Temperatur: Injektor: 270°C
 Ofen: 50°C (1,5 min), 25°C $\cdot$ min⁻¹ to 270°C (0 min), 1°C $\cdot$ min⁻¹ to
 275°C (0 min), 0,5°C $\cdot$ min⁻¹ to 285°C (1 min), 30°C $\cdot$ min⁻¹
 to 315°C (9 min)
 Ionisierung: EI
 Scan Modus

GC-MS-System 5:

Säule:	HP-5MS, 5% Phenyl-methyl-siloxan Kapillarsäule, 30 m x 250 µm, Filmdicke: 0,25µm		
Trärgas:	Helium, 0,9 mL · min ⁻¹		
Injektion:	pulsed splitless, 2 µl		
Temperatur:	Injektor: 250°C Ofen: 70°C (1,0 min), 20°C · min ⁻¹ to 250°C (0 min), 0,5°C · min ⁻¹ to 255°C (1 min), 30°C · min ⁻¹ to 300°C (4 min)		
Ionisierung:	EI		
SIM Modus:	Gruppe 1: 0 – 17,5 min	Dwell time: 75	Ionen: 228, 257, 272, 332
	Gruppe 2: 17,5 – 18,7 min	Dwell time: 36	Ionen: 199, 201, 218, 237, 255, 257, 270, 272
	Gruppe 3: 18,7 – 19,8 min	Dwell time: 36	Ionen: 213, 228, 242, 270, 288, 312, 330, 333
	Gruppe 4: 19,8 – 21,0 min	Dwell time: 25	Ionen: 213, 216, 228, 231, 239, 254, 288, 291, 299, 314, 330, 333
	Gruppe 5: 21,0 – 25,0 min	Dwell time: 75	Ionen: 213, 254, 314, 356

GC-MS-System 6:

Säule:	HP-5MS, 5% Phenyl-methyl-siloxan Kapillarsäule, 30 m x 250 µm, Filmdicke: 0,25µm		
Trärgas:	Helium, 0,9 mL · min ⁻¹		
Injektion:	pulsed splitless, 2 µl		
Temperatur:	Injektor: 250°C Ofen: 70°C (1,0 min), 20°C · min ⁻¹ to 250°C (0 min), 0,5°C · min ⁻¹ to 255°C (1 min), 30°C · min ⁻¹ to 300°C (4 min)		
Ionisierung:	EI		
SIM Modus:	Gruppe 1: 10,0 – 20,6 min	Dwell time: 50	Ionen: 216, 231, 291, 298, 314, 333
	Gruppe 2: 20,6 – 25,0 min	Dwell time: 36	Ionen: 213, 229, 244, 255, 272, 283, 298, 314

GC-MS-System 7:

Säule:	HP-5MS, 5% Phenyl-methyl-siloxan Kapillarsäule, 30 m x 250 µm, Filmdicke: 0,25µm		
Trärgas:	Helium, 1,5 mL · min ⁻¹		
Injektion:	pulsed splitless, 2 µl		
Temperatur:	Injektor: 250°C Ofen: 105°C (1,0 min), 40°C · min ⁻¹ to 220°C (0 min), 2°C · min ⁻¹ to 260°C (1 min), 20°C · min ⁻¹ to 300°C (1 min)		
Ionisierung:	EI		
Scan Modus			

IRMS-System

Säule:	DB5MS, 30 m x 250 μ m, Filmdicke: 0,25 μ m
Vorsäule:	5 m x 250 μ m, Fused Silica
Trärgas:	Helium, 1,5 mL $\cdot$ min ⁻¹
Injektion:	splitless, 1 – 4 μ l
Temperatur:	Injektor: 250°C
	Ofen: 60°C (1,5 min), 40°C $\cdot$ min ⁻¹ to 220°C (0 min), 2°C $\cdot$ min ⁻¹ to 260°C (0 min), 20°C $\cdot$ min ⁻¹ to 295°C (1 min)
	Oxidationsofen: 940°C
	Reduktionsofen: 650°C

5.4 Durchführung der Experimente

5.4.1 Extraktion

5.4.1.1 Extraktionsmittel

198 g einer Mischprobe Faeces mehrerer trächtiger Färsen (ISOSTER-F-02-2-10) wurde mit je 20 μ g 17 α -Estradiol, 17 β -Estradiol, Estron und Progesteron, sowie je 200 μ g Dehydroepiandrosteron und Pregnenolon dotiert. Die gefriergetrocknete Probe wurden in 6 Teilproben (A – G) von je 5 g unterteilt und jede dieser Teilproben wurde nochmals mit jeweils 500 ng 17 α -Estradiol, Estron, 17 α -Testosteron und Progesteron sowie je 5 μ g 5-Androsten-3 β ,17 β -diol, Dehydroepiandrosteron, Epiandrosteron, Etiocholanolon und Pregnenolon dotiert.

Mit einer Soxhlet-Apparatur wurden die einzelnen Teilproben mit 100 mL von unterschiedlichen Lösungsmitteln 4 Stunden extrahiert.

Teilprobe A: Methanol

Teilprobe B: Aceton

Teilprobe C: Acetonitril

Teilprobe D: n-Hexan

Teilprobe E: Ethylacetat

Teilprobe F: 2-Propanol

Die Extrakte wurden zur Trockene eingengt und die Rückstände in jeweils 2 mL Methanol aufgenommen. Die Lösungen wurden nach einer Membranfiltration (Porengröße 0,45 µm) erneut zur Trockene eingengt und danach in 0,5 mL einer Mischung aus Acetonitril/Wasser 3 : 7 (v/v) aufgenommen. Die Proben wurden nochmals membranfiltriert (Porengröße 0,45 µm) und mittels HPLC-System 1 analysiert. Es wurden jeweils 10 µL injiziert.

5.4.1.2 ASE: Temperatur

204 g einer Mischprobe Faeces mehrerer unbehandelter männlicher Tiere (ISOSTER-F-02-1-11) wurde mit je 5 µg 17α-Estradiol, 17α-Testosteron und Progesteron sowie 50 µg Pregnenolon und 100 µg Dehydroepiandrosteron dotiert.

Viermal 8 g des getrockneten Probenmaterials wurden mit Diathomeenerde im Verhältnis 2 : 1 vermischt und in Extraktionszellen eingefüllt. Die vier Teilproben wurden mit ASE System 1 bei unterschiedlichen Temperaturen extrahiert.

- a 40°C
- b 60°C
- c 80°C
- d 100°C

Die ASE-Extrakte wurden mit der gleichen Menge Wasser versetzt, im Kühlschrank über Nacht zum Ausfällen gebracht, filtriert und danach über OnGuardII-RP-Kartuschen aufgereinigt. Die OnGuardII-RP-Kartuschen wurden vor der Probenaufgabe mit 5 mL Methanol gefolgt von 10 mL Wasser konditioniert. Nach der Probenaufgabe wurde mit 10 mL einer Mischung aus Methanol/Wasser 70 + 30 (v/v) gewaschen. Die Analyten wurden dann mit 5 mL Methanol eluiert. Das Eluat wurde über eine Aminophase (Strata NH₂, 500 mg/3mL) gereinigt. Die Aminophase wurde vor der Aufgabe mit 3 mL Wasser gefolgt von 3 mL Methanol konditioniert. Das Eluat wurde direkt gesammelt und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 0,5 mL Methanol aufgenommen, 20 µL davon wurden über HPLC-System 1 analysiert. Danach wurden 24 x 20 µL über HPLC-System 2 fraktioniert.

Fraktion 1: Dehydroepiandrosteron, 17 α -Testosteron, Estron, 17 α -Estradiol, 17 β -Estradiol, 17 β -Testosteron

Fraktion 2: Etiocholanolon

Fraktion 3: Pregnenolon, Progesteron

Für GC-MS-Messungen wurden die Teilproben drei und vier weiter bearbeitet. Die Fraktionen wurden eingeeengt und in 2 Tropfen 2-Propanol gelöst. Es wurden 500 μ L n-Hexan zugegeben und eine zweite HPLC-Fraktionierung mit HPLC-System 6 wurde angeschlossen. Hierzu wurden 8 x 50 μ L injiziert und fraktioniert.

Fraktion 1-1: Dehydroepiandrosteron

Fraktion 1-2: 17 α -Estradiol, 17 β -Estradiol, Estron

Fraktion 1-3: 17 α -Testosteron, 17 β -Testosteron

Fraktion 2-1: Etiocholanolon

Fraktion 3-1: Pregnenolon

Fraktion 3-2: Progesteron

Die einzelnen Fraktionen wurden zur Trockene eingeeengt, mit 100 μ L Pyridin und 100 μ L Acetanhydrid versetzt und zur Derivatisierung eine Stunde bei 60°C inkubiert. Danach wurden die einzelnen Fraktionen zur Trockene eingeeengt, in 100 μ L iso-Hexan aufgenommen und mittels GC-MS-System 1 analysiert.

5.4.1.3 Zellfüllung

257 g einer Mischprobe Faeces mehrerer unbehandelter männlicher Tiere (ISOSTER-F-02-1-13) wurde mit je 5 μ g 17 α -Estradiol, 17 β -Estradiol, Estron, 17 α -Testosteron, 17 β -Testosteron und Progesteron, 50 μ g Etiocholanolon und Pregnenolon sowie 100 μ g Dehydroepiandrosteron dotiert.

Zweimal 10 g des getrockneten Probenmaterials wurden mit Diathomeenerde im Verhältnis 2 : 1 vermischt und in Extraktionszellen eingefüllt. Eine Extraktionszelle wurde vor dem Befüllen mit Probe mit einem Bett aus 12 g aktiviertem Kupferpulver versehen. Die beiden Teilproben wurden mit ASE-System 2 extrahiert.

A Bett 12 g Kupferpulver

B keine Bettfüllung

Eine weitere Teilproben von 8 g wurde mit Diathomeenerde im Verhältnis 4 : 1 vermischt und ebenfalls mit ASE-System 2 extrahiert.

Die Extrakte wurden auf ein Volumen von jeweils 20 mL eingengt und mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt. Zum Ausfällen von Matrixkomponenten wurden die Extrakte über Nacht im Kühlschrank gelagert und danach filtriert. Das Filtrat wurde über OnGuardII-RP-Kartuschen aufgereinigt. Die OnGuardII-RP-Kartuschen wurden vor der Probenaufgabe mit 5 mL Methanol gefolgt von 10 mL Wasser konditioniert. Nach der Probenaufgabe wurde mit 10 mL einer Mischung aus Methanol/Wasser 70 + 30 (v/v) gewaschen. Die Analyten wurden mit 5 mL Methanol eluiert. Auf einer zuvor mit 5 mL Wasser gefolgt von 5 mL Methanol konditionierten Aminophase (Strata NH₂, 500 mg/3mL) wurden die Eluate der Polymerphase weiter aufgereinigt. Dabei wurden die Eluate direkt gesammelt. Sie wurden zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 0,5 mL Methanol aufgenommen und 20 µL davon wurden über HPLC-System 1 analysiert. Weitere 25 x 20 µL wurden über HPLC-System 2 fraktioniert

Fraktion 1: Dehydroepiandrosteron, 17α-Testosteron, Estron, 17α-Estradiol, 17β-Estradiol, 17β-Testosteron

Fraktion 2: Etiocholanolon

Fraktion 3: Pregnenolon, Progesteron

Die Fraktionen wurden eingengt und in 2 Tropfen 2-Propanol gelöst. Es wurden 500 µL n-Hexan zugegeben. 20 µL davon wurden mit HPLC-System-7 analysiert.

5.4.2 Hydrolyse

250 g einer Mischprobe Faeces mehrerer unbehandelter trächtiger Färsen (ISOSTER-F-02-2-4) wurden aufgearbeitet. Die gemahlene und homogenisierte Probe wurde 8 h (etwa 24 Entleerungen) mit Methanol nach Soxhlet extrahiert. Der Extrakt wurde auf ein Volumen von etwa 200 mL eingengt, mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt und über Nacht im Kühlschrank zum Ausfällen gebracht. Der Rückstand wurde über ein Faltenfilter abgetrennt

und die Filtrate wurden weiter über eine Polymerphase aufgereinigt. Die Probe wurde vor dem SPE-Schritt in zwei gleich Teilproben geteilt.

Die OnGuardII-RP-Kartuschen wurden vor der Probenaufgabe mit 5 mL Methanol gefolgt von 10 mL Wasser konditioniert. Das Filtrat jeder Teilprobe wurde auf vier Kartuschen aufgeteilt und nach der Probenaufgabe wurden die Kartuschen 3 bis 5 min. bei starkem Vakuum getrocknet, danach wurde mit 5 mL Natronlauge ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) gewaschen. Die Konjugate wurden zunächst mit 10 mL einer Mischung aus Methanol/Wasser 70 + 30 (v/v) eluiert. Die Eluate einer Teilprobe wurden vereinigt und zur Trockene eingengt. Die freien Steroide wurden dann für beide Teilproben mit 5 mL Methanol eluiert. Die Eluate der freien Steroide wurden für jede Teilprobe vereinigt und auf etwa 2 mL eingengt.

Der Rückstand des Konjugateluates wurde in 2 mL Methanol aufgenommen und mit 10 mL einer Schwefelsäure/Ethylacetat-Mischung versetzt. Es wurde 1 h bei 55°C inkubiert. Der Solvolyseextrakt wurde mit 3,5 mL Natronlauge ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) versetzt und zweimal mit 12,5 mL n-Hexan ausgeschüttelt. Die beiden organischen Phasen wurden vereinigt und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 5 mL Methanol aufgenommen.

Das Eluat der freien Steroide und der Solvolyseextrakt wurden über jeweils eine Aminophase (Strata NH2, 500 mg/3mL) gereinigt. Die Aminophase wurde vor der Aufgabe mit 5 mL Wasser gefolgt von 5 mL Methanol konditioniert. Die Eluate wurde direkt gesammelt und zur Trockene eingengt. Das Eluat des Solvolyseextraktes und das der freien Steroide der ersten Teilprobe wurden zuvor vereinigt. Der Rückstand wurde in 250 µL Methanol aufgenommen und über HPLC-System 2 fraktioniert. Es wurden 12 x 20 µL injiziert und fraktioniert.

Fraktion 1: Dehydroepiandrosteron, 17α-Testosteron, Estron, 17α-Estradiol, Epiandrosteron, Androst-5-en-3β,17β-diol

Fraktion 2: Etiocholanolon

Fraktion 3: Pregnenolon, Progesteron

Die Fraktionen wurden eingengt und in 2 Tropfen 2-Propanol gelöst. Es wurden 250 µL n-Hexan zugegeben und eine zweite HPLC-Fraktionierung mit HPLC-System 6 wurde angeschlossen. Je 7 x 30 µL wurden injiziert und fraktioniert.

Fraktion 1-1: Dehydroepiandrosteron

Fraktion 1-2: 17beta-Estradiol, Estron

Fraktion 1-3: 17 α -Testosteron

Fraktion 2-1: Etiocholanolon

Fraktion 3-1: Pregnenolon

Fraktion 3-2: Progesteron

Die einzelnen Fraktionen wurden zur Trockene eingeeengt, mit 100 μ L Pyridin und 100 μ L Acetanhydrid versetzt und zur Derivatisierung eine Stunde bei 60°C inkubiert. Danach wurde erneut zur Trockene eingeeengt, in 100 μ L iso-Hexan aufgenommen und mittels GC-MS-System 2 analysiert.

5.4.3 SPE

5.4.3.1 Vergleich verschiedener Materialien, Elutionsmuster, Wiederfindungen

Zur Ermittlung eines geeigneten Festphasenmaterials wurden unterschiedliche Phasenmaterialien verglichen.

Umkehrphasen:

C18, Waters

C18-E, Phenomenex

C18-Hydra, MN

ODS, Baker

MFC18, IST

CEC 1812M15, SDS

Strata X, Phenomenex

HLB, Waters

OnGuardII-RP, Dionex

OnGuardII-P, Dionex

Aminophasen:

Bond-Elut NH2 Analytichem Int.

Mega-Bond-Elut NH2, Varian

DSC-NH2, Supelco

Strata NH2, Phenomenex

Pro 500 mg Phasenmaterial wurde je 100 µL methanolische Standardlösung 4 (S2) und Standardlösung 5 (S1) auf die Kartuschen aufgegeben. Vor der Aufgabe der Standardlösungen wurden die Kartuschen mit 5 mL Methanol gefolgt von 10 mL Wasser konditioniert. Zur Aufgabe wurden 2 mL des ersten Elutionsmittels in das Lösungsmittelreservoir der Kartuschen vorgelegt und die Standardlösungen zupipettiert. Es wurde nacheinander mit 5 mL unterschiedlicher Mischungen aus Methanol/Wasser eluiert. Der prozentuale Anteil des Methanols wurde dazu in 10% Schritten angehoben. Die Einzelnen SPE-Eluate wurden zur Trockene eingengt und der Rückstand wurde in dem gleichen Volumen Methanol aufgenommen, dass zuvor auf die Kartuschen aufgegeben wurde. 20 µL davon wurden mittels HPLC System 3 auf ihre Steroidgehalte untersucht.

Für das OnGuardII-RP-Material wurde zusätzlich ein Vergleichsversuch mit Methanol und Ethylacetat als Elutionsmittel durchgeführt. Dazu wurde auf zwei Kartuschen je 100 µL methanolische Standardlösung 4 (S2) und Standardlösung 5 (S1) aufgegeben. Vor der Aufgabe der Standardlösungen wurden die Kartuschen mit 5 mL Methanol gefolgt von 10 mL Wasser konditioniert. Zur Aufgabe wurden 5 mL Wasser in das Lösungsmittelreservoir der Kartuschen vorgelegt und die Standardlösungen wurden zupipettiert. Die Kartuschen wurden mit 5 mL Natronlauge ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) gefolgt von 5 mL einer Mischung aus Methanol/Wasser 70 + 30 (v/v) gewaschen. Eine Kartusche wurde mit 5 mL Methanol, die andere mit 5 mL Ethylacetat eluiert. Die Eluate wurden zur Trockene eingengt und der Rückstand wurde in 100 mL Methanol aufgenommen, davon wurden je 20 µL mittels HPLC-System 3 auf ihre Steroidgehalte untersucht.

5.4.3.2 Aufreinigungsverhalten

5.4.3.2.1 OnGuardII-P

213 g einer Mischprobe Faeces mehrerer unbehandelter männlicher Tiere (ISOSTER-F-02-1-10) wurde mit je 20 µg 17β-Testosteron und 17α-Testosteron und je 200 µg Dehydroepiandrosteron und Etiocholanolon dotiert. Einmal 7 und einmal 5 g der gefriergetrockneten Probe wurde mit ASE-System 3 mit Methanol extrahiert. Der Extrakt wurde auf ein Volumen von etwa 25 mL eingeeengt, mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt und über Nacht im Kühlschrank zum Ausfällen gebracht. Der Rückstand wurde über ein Faltenfilter abgetrennt. Die zweite Teilprobe (5 g) wurde nicht weiter aufgearbeitet. Das Filtrat der ersten Teilprobe wurde mit je 5 µg Progesteron, 17α-Estradiol, 17β-Estradiol und Estron und 50 µg Dehydroepiandrosteron und Pregnenolon dotiert. Die Probe wurde weiter über eine Polymerphase aufgereinigt. Die OnGuardII-P-Kartuschen wurden vor der Probenaufgabe mit 5 mL Methanol gefolgt von 10 mL Wasser konditioniert. Das Filtrat wurde komplett auf die Kartusche aufgegeben und direkt gesammelt. Das Eluat wurde zur Trockene eingeeengt und der Rückstand wurde in 0,5 mL Methanol aufgenommen. Je 20 µL wurden über HPLC System 1 analysiert.

5.4.3.2.2 OnGuardII-RP

213 g einer Mischprobe Faeces mehrerer unbehandelter männlicher Tiere (ISOSTER-F-02-1-10) wurden mit 20 µg Testosteron und 17α-Testosteron und 200 µg Dehydroepiandrosteron und Etiocholanolon dotiert. Dreimal 7 g der gefriergetrocknete Matrixproben wurden mit je 180 mL Methanol in einer Soxhlet-Apparatur 8 Stunden extrahiert (entspricht etwa 24 Entleerungen). Die Extrakte wurden vereinigt, auf 50 mL eingeeengt und mit der gleichen Menge Wasser versetzt. Der Extrakt wurde zum Ausfällen von Matrixkomponenten über Nacht im Kühlschrank gelagert und danach filtriert. Der filtrierte Extrakt wurde in vier gleiche Teilproben (A – D) unterteilt und jede Teilprobe wurde mit je 5 µg Progesteron, 17α-Estradiol, 17β-Estradiol und Estron sowie 50 µg Dehydroepiandrosteron und Pregnenolon dotiert. Polymerphasen-Kartuschen (OnGuardII-RP, Divinylbenzol, 1cc, Dionex) wurden mit 5 mL Methanol gefolgt von 10 mL Wasser konditioniert. Auf jeweils eine Kartusche wurde eine Teilprobe aufgegeben. Die Kartuschen wurden dann unterschiedlich gewaschen:

- A 10 mL Phosphorsäure ($0,33 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) gefolgt von
10 mL einer Mischung aus Methanol/Wasser 7 : 3 (v/v)
- B 10 mL Natronlauge ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) gefolgt von
10 mL einer Mischung aus Methanol/Wasser 7 : 3 (v/v)
- C 10 mL n-Hexan gefolgt von
10 mL einer Mischung aus Methanol/Wasser 7 : 3 (v/v)
- D zweimal 10 mL einer Mischung aus Methanol/Wasser 7 : 3 (v/v)

Die Kartuschen wurden nach jedem Waschschrift unter starkem Vakuum getrocknet. Die einzelnen Waschfraktionen wurden gesammelt, wenn nötig mit Salzsäure beziehungsweise Natronlauge auf einen pH von 6 – 7 eingestellt und zur Trockene eingengt. Die Rückstände wurden in jeweils 5 mL Methanol aufgenommen. Die Steroide wurden mit 5 mL Methanol eluiert. Die Waschfraktionen sowie die Eluate wurden danach jeweils noch über Amino-Kartuschen (Strata NH₂, 500 mg/3 mL), die mit 5 mL Wasser gefolgt von 10 mL Methanol konditioniert waren, aufgereinigt. Die Eluate der Amino-Kartusche wurden direkt gesammelt und zur Trockene eingengt. Die Rückstände wurden in 0,5 mL Methanol aufgenommen und mittels HPLC-System 1 analysiert.

5.4.4 Flüssig-Flüssig-Extraktion

179 g einer Mischprobe Faeces unbehandelter trächtiger Färsen (ISOSTER-F-02-2-11) wurde mit je 20 µg 17α-Estradiol, 17β-Estradiol, Estron, und Progesteron und je 200 µg Dehydroepiandrosteron und Pregnenolon dotiert. Die gemahlene und homogenisierte Probe wurde 8 h (etwa 24 Entleerungen) mit Methanol nach Soxhlet extrahiert. Der Extrakt wurde auf ein Volumen von etwa 200 mL eingengt, mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt und über Nacht im Kühlschrank zum Ausfällen gebracht. Der Rückstand wurde über ein Faltenfilter abgetrennt und das Filtrat wurde weiter über eine Polymerphase aufgereinigt. Die Probe wurde in zwei gleiche Teilproben geteilt. Jede Teilprobe wurde mit 2,5 µg 17α-Testosteron dotiert. Die OnGuardII-RP-Kartuschen wurden vor der Probenaufgabe mit 5 mL Methanol gefolgt von 10 mL Wasser konditioniert. Das Filtrat jeder Teilprobe wurde auf vier Kartuschen aufgeteilt und nach der Probenaufgabe wurden die Kartuschen 3 bis 5 min. bei

starkem Vakuum getrocknet. Danach wurde mit 5 mL Natronlauge ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) gewaschen. Die Konjugate wurden zunächst mit 10 mL einer Mischung aus Methanol/Wasser 70 + 30 (v/v) eluiert. Die freien Steroide wurden dann mit 5 mL Ethylacetat eluiert. Die Konjugateluete jeder Teilprobe wurden vereinigt und zur Trockene eingengt. Die Eluate der freien Steroide wurden ebenfalls für jede Teilprobe vereinigt und auf etwa 2 mL eingengt. Die Rückstände des Konjugateluates wurden in 2 mL Methanol aufgenommen und mit 10 mL einer Schwefelsäure/Ethylacetat-Mischung versetzt. Es wurde 1 h bei 55°C inkubiert.

Der Solvolyseextrakt der einen Teilprobe wurde mit 3,5 mL Natronlauge ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) versetzt und zweimal mit 12,5 mL n-Hexan ausgeschüttelt. Die beiden organischen Phasen wurden vereinigt und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 5 mL Methanol aufgenommen. Das Eluat der freien Steroide und der Solvolyseextrakt dieser Teilprobe wurden über jeweils eine Aminophase (Strata NH₂, 500 mg/3mL) gereinigt. Die Aminophase wurde vor der Aufgabe mit 5 mL Wasser gefolgt von 5 mL Methanol konditioniert. Die Eluate wurden direkt gesammelt und zur Trockene eingengt.

Das Eluat der freien Steroide und der Solvolyseextrakt der zweiten Teilprobe wurden nach der Inkubation des Solvolyseextraktes vereinigt und mit 7 mL Natronlauge ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) versetzt. Es wurde zweimal mit 25 mL n-Hexan ausgeschüttelt. Die beiden organischen Phasen wurden vereinigt und zur Trockene eingengt. Die Rückstände beider Teilproben wurden jeweils in 250 μL Methanol aufgenommen. Die Extrakte wurden dann über HPLC-System 2 fraktioniert. Es wurden 12 x 20 μL injiziert und fraktioniert.

Fraktion 1: Dehydroepiandrosteron, 17α -Testosteron, Estron, 17α -Estradiol, Epiandrosteron, Androst-5-en- 3β , 17β -diol

Fraktion 2: Etiocholanolon

Fraktion 3: Pregnenolon, Progesteron

Die Fraktionen wurden eingengt und in 2 Tropfen 2-Propanol gelöst. Es wurden 250 μL n-Hexan zugegeben und eine zweite HPLC-Fraktionierung mit System 6 wurde angeschlossen. Es wurden je 7 x 30 μL injiziert und fraktioniert.

Fraktion 1-1: Dehydroepiandrosteron, Epiandrosteron

Fraktion 1-2: Androst-5-en- 3β , 17β -diol

Fraktion 1-3: Estron

Fraktion 1-4: 17 α -Estradiol

Fraktion 1-5: 17 α -Testosteron

Fraktion 2-1: Etiocholanolon

Fraktion 3-1: Pregnenolon

Fraktion 3-2: Progesteron

Die Einzelnen Fraktionen der Proben wurden zur Trockene eingengt, mit 100 μ L Pyridin und 100 μ L Acetanhydrid versetzt und zur Derivatisierung eine Stunde bei 60°C inkubiert. Danach wurden die einzelnen Fraktionen zur Trockene eingengt, Fraktionen 1-1; 1-3 und 1-4 wurden in 100 μ L iso-Hexan, die restlichen Fraktionen in 50 μ L iso-Hexan aufgenommen und mittels GC-MS System 2 analysiert.

5.4.5 HPLC

Die HPLC-Anlage besteht aus einer analytische Niederdruck-Gradientenpumpe, einem Probengeber, einem Motorschaltventil zur RAM-Vorsäule, der analytischen Säule mit Ofen, einem DAD-Detektor und dem Fraktionssammler.

5.4.5.1 Phasenmaterialien und Fließmittel

Die Standardlösungen 3 wurden mit unterschiedlichen Säulen und Fließmitteln chromatographiert. Für die Normalphasensysteme wurden die Standardlösungen zur Trockene eingengt und in demselben Volumen einer Mischung n-Hexan/2-Propanol 97,5 + 2,5 (v/v) aufgenommen.

CN-Säule (Luna CN, 5 μ m, 150 x 4,6 mm)

Es wurden isokratische Läufe mit den Eluentenzusammensetzungen n-Hexan/2-Propanol 97,5 + 2,5 (v/v); 95 + 5 (v/v); 90 + 10 (v/v); 85 + 15 (v/v) und 80 + 20 (v/v) durchgeführt. Die Flussrate war für alle Läufe konstant (1 mL $\cdot$ min⁻¹) bei einer Säulentemperatur von 25 °C. Die injizierten Volumina wurden, sofern es die Nachweisbarkeit der Analyten zuließ, auf 1 beziehungsweise 2 μ L reduziert. Für Etiocholanolon wurde eine neue Untersuchungslösungen hergestellt: 4,29 mg Ethiocholan-3 α -ol-17-on in 0,5 ml 2-Propanol gelöst, mit n-Hexan zu 10,0 ml aufgefüllt.

C8-Säule (Nucleosil 100 C8, 5 µm, 150 x 4,6 mm)

Es wurden isokratische Läufe mit den Eluentenzusammensetzungen Wasser/Acetonitril 75 + 25 (v/v); 70 + 30 (v/v); 60 + 40 (v/v); 50 + 50 (v/v) und 40 + 60 (v/v) durchgeführt. Des weiteren wurden Gradienten-Läufe nach den in Tabelle 5-6 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die Flussrate war für alle Läufe konstant ($1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) bei einer Säulentemperatur von 25 °C bei den isokratischen und variablen Temperaturen bei den Gradientensystemen. Die injizierten Volumina wurden, sofern es die Nachweisbarkeit der Analyten zuließ, auf 1 bis 4 µl reduziert.

Tabelle 5-6 Gradientensysteme für Umkehrphasenmaterialien

Gradient	T [°C]									
1	40°C	Zeit [min]	0	30	45	47	52			
		Acetonitril/Wasser (v/v)	30+70	95+5	95+5	30+70	30+70			
2	40°C	Zeit [min]	0	8	20	40	55	57	62	
		Acetonitril/Wasser (v/v)	30+70	45+55	45+55	95+5	95+5	30+70	30+70	
3	20°C	Zeit [min]	0	30	45	47	52			
		Acetonitril/Wasser (v/v)		95+5	95+5	30+70	30+70			
			30+70							
4	5°C	Zeit [min]	0	30	45	47	52			
		Acetonitril/Wasser (v/v)	30+70	95+5	95+5	30+70	30+70			
5	60°C	Zeit [min]	0	30	45	47	52			
		Acetonitril/Wasser (v/v)	30+70	95+5	95+5	30+70	30+70			
6	60°C	Zeit [min]	0	35	45	47	52			
		Acetonitril/Wasser (v/v)	20+80	95+5	95+5	20+80	20+80			
7	60°C	Zeit [min]	0	20	40	50	52	57		
		Acetonitril/Wasser (v/v)	35+65	45+55	95+5	95+5	35+65	35+65		

Aminosäule (SpereClone NH₂, 5 µm, 150 x 4,6 mm)

Es wurden isokratische Läufe mit den Eluentenzusammensetzungen n-Hexan/2-Propanol 97,5 + 2,5 (v/v); 95 + 5 (v/v); 90 + 10 (v/v); 80 + 20 (v/v), 70 + 30 (v/v), 60 + 40 (v/v) und 50 + 50 (v/v) durchgeführt. Die Flussrate war für alle Läufe konstant ($1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) bei einer Säulentemperatur von 25 °C. Die injizierten Volumina wurden, sofern es die Nachweisbarkeit der Analyten zuließ auf 1 bzw. 2 µl reduziert. Für Etiocholanolon wurde eine neue

Untersuchungslösungen hergestellt: 4,29 mg Ethiocholan-3 α -ol-17-on in 0,5 ml 2-Propanol gelöst, mit n-Hexan zu 10,0 ml aufgefüllt.

Diol-Säule (Spherex Diol, 5 μ m, 150*4,6 mm)

Es wurden isokratische Läufe mit den Eluentenzusammensetzungen n-Hexan/2-Propanol 97,5 + 2,5 (v/v); 95 + 5 (v/v); 90 + 10 (v/v) und 80 + 20 (v/v) durchgeführt. Die Flussrate war für alle Läufe konstant (1 mL $\cdot$ min⁻¹) bei einer Säulentemperatur von 50°C. Die injizierten Volumina wurden, sofern es die Nachweisbarkeit der Analyten zuließ auf 1 bzw. 2 μ l reduziert.

5.4.5.2 Peakparameter

In den Chromatogrammen der Versuche zu Säulen und Fließmitteln wurden die Peakparameter der einzelnen Analyten über die HPLC-Software ermittelt.

5.4.5.3 Detektion/Nachweisgrenzen

Standardmischung 1 und 2 wurden mit HPLC-System 5 analysiert. Es wurden zwischen 5 und 200 μ L injiziert. Für die Detektion ist von 205 nm und 240 nm prinzipiell die Wellenlänge mit der höchsten Absorption gewählt worden. Die Abschätzung der Nachweisgrenzen der Standardsubstanzen erfolgte anhand der Signal/Rausch-Verhältnisse.

5.4.5.4 Fraktionierung

Standardlösung 4 (S2) und Standardlösung 5 (S1) wurde mittels HPLC-System 2, 4, 7 und 8 analysiert. Für die Analytpeaks wurden die Retentionszeiten, Asymmetrien und Basisbreiten ermittelt und anhand von Gleichung 3-3 und 3-4 wurden die Schnittzeiten für die Fraktionierung berechnet. Dieser Schritt wurde für jede folgende Fraktionierung neu durchgeführt.

5.4.5.5 Waschzeiten und Eluenten für RAM-Vorsäule

6 x 15 μ L einer Standardlösung des 5-Androsten-3 β ,17 β -diols (100 ng $\cdot$ μ L⁻¹) wurde auf eine RAM-Vorsäule (LiChrospher RP- Alkyl-Diol-Silica, 25 x 4 mm; 25 μ m) aufgegeben und

mittels HPLC-System 4 analysiert. Für den Waschschrift wurden dabei unterschiedliche Fließmittel und Waschzeiten (siehe Tabelle 5-7) verglichen.

Tabelle 5-7. Waschzeiten und Fließmittelzusammensetzung für RAM-Vorsäule.

Waschzeit in min	Fließmittelzusammensetzung Acetonitril/Wasser (v/v)
20	12,5 + 87,5
10	10 + 90
15	10 + 90
20	10 + 90
25	10 + 90
30	10 + 90
40	10 + 90

5.4.5.6 Matrixversuche mit ADS

192 g einer Mischprobe Faeces unbehandelter trächtiger Färsen (ISOSTER-F-02-2-9) wurde mit je 20 µg 17α-Estradiol, 17β-Estradiol, Estron und Progesteron und je 200 µg Dehydroepiandrosteron und Pregnenolon dotiert. Die gemahlene und homogenisierte Probe wurde mit je 100 µL Standardmischung 4 und Standardmischung 5 dotiert und 8 h (etwa 24 Entleerungen) mit 600 mL Methanol nach Soxhlet extrahiert. Der Extrakt wurde auf ein Volumen von etwa 200 mL eingengt, mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt und über Nacht im Kühlschrank zum Ausfällen gebracht. Der Rückstand wurde über ein Faltenfilter abgetrennt und das Filtrat wurde weiter über eine Polymerphase aufgereinigt. Die OnGuardII-RP-Kartuschen wurden vor der Probenaufgabe mit 5 mL Methanol gefolgt von 10 mL Wasser konditioniert. Das Filtrat der Probe wurde auf acht Kartuschen aufgeteilt und nach der Probenaufgabe wurden die Kartuschen 3 bis 5 min. bei starkem Vakuum getrocknet. Danach wurde mit 5 mL Natronlauge ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) gefolgt von 5 mL einer Mischung aus Methanol/Wasser 70 + 30 (v/v) gewaschen. Es wurde mit 5 mL Methanol eluiert. Je vier Eluate wurden vereinigt, auf 5 mL eingengt und weiter über eine Aminophase (Strata NH₂, 500 mg/3mL) gereinigt. Die Aminophase wurde vor der Aufgabe mit 5 mL Wasser gefolgt von 5 mL Methanol konditioniert. Die Eluate wurden direkt gesammelt, vereinigt, zur Trockene eingengt und in 0,5 mL Methanol aufgenommen. Der Extrakt wurde membranfiltriert (Porenweite 0,45 µm) und über HPLC-System 4 fraktioniert. Dazu wurden unterschiedliche Mengen Probe auf die Vorsäule injiziert.

- a: 1 x 20 μL
- b: 2 x 20 μL
- c: 3 x 20 μL
- d: 4 x 20 μL
- e: 5 x 20 μL

5.4.5.7 Trennung der Acetate auf C8-Material

100 μL Standardlösung der einzelnen Steroide (17α -Testosteron, Progesteron, Estron und 17α -Estradiol: $c = 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ in Methanol; Dehydroepiandrosteron, Etiocholanolon, Pregnenolon, Androst-5-en- $3\beta,17\beta$ -diol, Epiandrosteron: $c = 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ in Methanol) sowie der Standardlösungen 4 (S2) und 5 (S1) wurden zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 100 μL Pyridin und 100 μL Acetanhydrid gelöst und zum Derivatisieren 1 Stunde bei 60°C inkubiert. Die acetylierten Standards wurden zur Trockene eingengt, in 100 μL Acetonitril aufgenommen und mittels HPLC System 1 analysiert. Es wurden jeweils 10 μL injiziert.

5.4.5.8 Matrixversuche mit Acetaten

254 g einer Mischprobe Faeces mehrerer unbehandelter trächtiger Färsen (ISOSTER-F-02-2-5) wurde mit je 20 μg 17α -Estradiol, 17β -Estradiol, Estron, und Progesteron und je 200 μg Dehydroepiandrosteron und Pregnenolon dotiert.

244 g und 245 g einer Mischprobe Faeces unbehandelter männlicher Tiere (ISOSTER-F-02-1-7 und ISOSTER-F-02-1-8) wurde mit je 20 μg 17α -Testosteron und 17β -Testosteron und je 200 μg Dehydroepiandrosteron und Etiocholanolon dotiert.

Die gemahlenen und homogenisierten Probe wurde 8 h (etwa 24 Entleerungen) mit 600 mL Methanol nach Soxhlet extrahiert. Die Extrakte wurden auf ein Volumen von etwa 200 mL eingengt, mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt und über Nacht im Kühlschrank zum Ausfällen gebracht. Der Rückstand wurde über ein Faltenfilter abgetrennt und die Filtrate wurden über eine Polymerphase aufgereinigt. Die OnGuardII-RP-Kartuschen wurden vor der Probenaufgabe mit 5 mL Methanol gefolgt von 10 mL Wasser konditioniert. Das Filtrat jeder

Probe wurde auf acht Kartuschen aufgeteilt und nach der Probenaufgabe wurden die Kartuschen 3 bis 5 min. bei starkem Vakuum getrocknet. Danach wurde mit 5 mL Natronlauge ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) gewaschen. Die Konjugate wurden zunächst mit 10 mL einer Mischung aus Methanol/Wasser 70 + 30 (v/v) eluiert. Die freien Steroide wurden dann mit 5 mL Ethylacetat eluiert. Jeweils zwei Konjugateluatate wurden vereinigt und zur Trockene eingengt, je zwei Eluate der freien Steroide wurden ebenfalls vereinigt und auf etwa 2 mL eingengt. Die Rückstände der Konjugateluatate wurden in 2 mL Methanol aufgenommen und mit 10 mL einer Schwefelsäure/Ethylacetat-Mischung versetzt. Es wurde 1 h bei 55°C inkubiert. Der Solvolysseextrakt und das SPE-Eluat der freien Steroide wurden für die drei Proben jeweils vereinigt und mit 16 mL Natronlauge ($c = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) versetzt. Es wurde zweimal mit 35 mL n-Hexan ausgeschüttelt. Die beiden organischen Phasen wurden vereinigt und zur Trockene eingengt. Die Rückstände wurden in 0,5 mL Methanol aufgenommen und über HPLC-System 4 fraktioniert. Es wurden $24 \times 20 \mu\text{L}$ injiziert und fraktioniert

Fraktion 1: Dehydroepiandrosteron, Estron, 17α -Estradiol, 17α -Testosteron, Epiandrosteron, Androst-5-en- $3\beta,17\beta$ -diol

Fraktion 2: Etiocholanolon

Fraktion 3: Pregnenolon, Progesteron

Die Fraktionen der Proben ISOSTER-F-02-1-7 und ISOSTER-F-02-1-8 wurden eingengt und in 2 Tropfen 2-Propanol gelöst. Es wurden $500 \mu\text{L}$ n-Hexan zugegeben und die Fraktionen der Probe ISOSTER-F-02-1-7 wurden in zwei gleiche Teilproben unterteilt. Jede Teilprobe wurde mit $2,5 \mu\text{g}$ 17α -Testosteron dotiert. Eine Teilprobe sowie die gesamte Probe ISOSTER-F-02-1-8 wurde über HPLC-System 6 weiterbearbeitet. Es wurden dazu $8 \times 30 \mu\text{L}$ injiziert und fraktioniert.

Fraktion 1-1: Dehydroepiandrosteron, Epiandrosteron

Fraktion 1-2: Androst-5-en- $3\beta,17\beta$ -diol

Fraktion 1-3: Estron

Fraktion 1-4: 17α -Estradiol

Fraktion 1-5: 17α -Testosteron

Fraktion 2-1: Etiocholanolon

Fraktion 3-1: Pregnenolon

Fraktion 3-2: Progesteron

Die einzelnen Fraktionen wurden zur Trockene eingengt, mit 100 µL Pyridin und 100 µL Acetanhydrid versetzt und zur Derivatisierung eine Stunde bei 60°C inkubiert. Danach wurden die Fraktionen zur Trockene eingengt und in 50 beziehungsweise 100 µL iso-Hexan aufgenommen. Die Fraktionen der Probe ISOSTER-F-02-1-8 wurden in zwei gleiche Teilproben unterteilt und zur Trockene eingengt.

Die Fraktionen der zweiten Teilprobe von Probe ISOSTER-F-02-1-7 und die gesamte Probe ISOSTER-F-2-5 wurden jeweils zur Trockene eingengt, mit 100 µL Pyridin und 100 µL Acetanhydrid versetzt und zur Derivatisierung eine Stunde bei 60°C inkubiert. Danach wurden die Fraktionen zur Trockene eingengt. Die derivatisierten Fraktionen der Probe ISOSTER-F-02-1-7 und einer Teilprobe von ISOSTER-F-02-1-8 wurden in 250 µL Acetonitril, die der Probe ISOSTER-F-02-2-5 in 500 µL Acetonitril aufgenommen und danach mit HPLC-System 7 fraktioniert. Es wurden 12 x 20 µL beziehungsweise 24 x 20 µL injiziert und fraktioniert.

Fraktion 1-1: Estron

Fraktion 1-2: 17 α -Testosteron

Fraktion 1-3: 17 α -Estradiol

Fraktion 1-4: Dehydroepiandrosteron

Fraktion 1-5: Epiandrosteron

Fraktion 1-6: Androst-5-en-3 β ,17 β -diol

Fraktion 2-1: Etiocholanolon

Fraktion 3-1: Progesteron

Fraktion 3-2: Pregnenolon

Die Fraktionen der Probe ISOSTER-F-02-1-7 und ISOSTER-F-02-1-8 wurden zur Trockene eingengt und in 100 µL n-Hexan aufgenommen.

Die Fraktionen der Probe ISOSTER-F-02-2-5 wurden in zwei gleiche Teilproben unterteilt. Eine Teilprobe wurde zur Trockene eingengt und in 100 µL n-Hexan aufgenommen. Die zweite Teilprobe wurde auf 1 – 2 mL eingengt und zweimal mit dem gleichen Volumen

n-Hexan extrahiert. Die Hexanphasen wurden vereinigt, zur Trockene eingengt und in 100 µL n-Hexan aufgenommen.

Alle Fraktionen der jeweils zwei Teilproben wurden mittels GC-MS System 2 analysiert.

5.4.6 Steroidprofile

5.4.6.1 Qualitative Versuche

Es wurde vier Proben aufgearbeitet. 252 g und 246 g einer Mischprobe Faeces mehrerer unbehandelter männlicher Tiere (ISOSTER-F-02-1-4, ISOSTER-F-02-1-5) sowie 236 g und 260 g einer Mischprobe Faeces mehrerer unbehandelter trächtiger Färsen (ISOSTER-F-02-2-8, ISOSTER-F-02-2-6) wurden eingewogen. Die gemahlenen und homogenisierten Proben wurde mit Methanol mittels ASE-System 2 (Proben ISOSTER-F-02-1-4 und ISOSTER-F-02-2-8) beziehungsweise 8 Stunden mit 600 mL über Soxhlet-Extraktion (Proben ISOSTER-F-02-1-5 und ISOSTER-F-02-2-6) extrahiert. Die Extrakte wurden auf ein Volumen von etwa 50 mL eingengt, mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt und über Nacht im Kühlschrank zum Ausfällen gebracht. Der Rückstand wurde über ein Faltenfilter abgetrennt und die Filtrate wurden weiter über eine Polymerphase aufgereinigt. Die OnGuardII-RP-Kartuschen wurden vor der Probenaufgabe mit 5 mL Methanol gefolgt von 10 mL Wasser konditioniert. Das Filtrat jeder Probe wurde auf sechs Kartuschen aufgeteilt und nach der Probenaufgabe wurden die Kartuschen 3 bis 5 min. bei starkem Vakuum getrocknet. Danach wurde mit 5 mL Natronlauge ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) gefolgt von 5 mL einer Mischung aus Methanol/Wasser 70 + 30 (v/v) gewaschen. Es wurde mit 5 mL Methanol eluiert und jedes Eluat direkt über eine Aminophase (Strata NH2, 500 mg/3mL) gereinigt. Die Aminophase wurde vor der Aufgabe mit 5 mL Wasser gefolgt von 5 mL Methanol konditioniert. Die Eluate wurden direkt gesammelt. Alle Eluate einer Probe wurden vereinigt und zur Trockene eingengt. Die Rückstände wurden in jeweils in 0,5 mL Methanol aufgenommen und über HPLC-System 2 fraktioniert. Es wurden 20 x 25 µL injiziert und fraktioniert.

Fraktion 1: Dehydroepiandrosteron, 17 α -Testosteron, Estron, 17 α -Estradiol,
Epiandrosteron, Androst-5-en-3 β ,17 β -diol

Fraktion 2: Etiocholanolon

Fraktion 3: Pregnenolon, Progesteron

Die Fraktionen für die Silylierung wurden mit 20 μL Ethinyltestosteron ($c = 10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) als internem Standard dotiert und zur Trockene eingengt. Es wurden 20 μL MSTFA/DTE/ NH_4I /MeCN (1000:0.25:5:100 (v/m/v/v)) zugegeben und die Gefäße gut verschlossen. Danach wurde 40 min bei 60°C inkubiert und anschließend mittels GC-MS System 3 analysiert.

Die Fraktionen für die Acetylierung wurden zur Trockene eingengt und in 2 Tropfen 2-Propanol gelöst. Es wurden 500 μL n-Hexan zugegeben. Eine zweite HPLC-Fraktionierung mit HPLC-System 6 wurde angeschlossen. Es wurden $9 \times 50 \mu\text{L}$ injiziert und fraktioniert.

Fraktion 1-1: 6.3 – 10.3 min

Fraktion 1-2: 10.3 – 15.3 min

Fraktion 1-3: 15.3 – 20.0 min

Fraktion 1-4: 20.0 – 27.0 min

Fraktion 2-1: 6.3 – 10.3 min

Fraktion 2-2: 10.3 – 15.3 min

Fraktion 2-3: 15.3 – 20.0 min

Fraktion 2-4: 20.0 – 27.0 min

Fraktion 3-1: 6.3 – 10.3 min

Fraktion 3-2: 10.3 – 15.3 min

Fraktion 3-3: 15.3 – 20.0 min

Fraktion 3-4: 20.0 – 27.0 min

Die einzelnen Fraktionen der Proben wurden zur Trockene eingengt, mit 100 μL Pyridin und 100 μL Acetanhydrid versetzt und zur Derivatisierung eine Stunde bei 60°C inkubiert. Danach wurden die einzelnen Fraktionen zur Trockene eingengt, in 100 μL iso-Hexan aufgenommen und mittels GC-MS System 4 analysiert.

5.4.6.2 Semi-Quantitative Versuche

Es wurden mehrere Proben behandelter und unbehandelter männlicher (ISOSTER-F-03-64 bis ISOSTER-F-03-75) und weiblicher Tiere (Proben ISOSTER-F-03-45 bis ISOSTER-F-03-57)

aufgearbeitet. 8 – 10 g der gemahlenen und homogenisierten Proben wurden mit Methanol mittels ASE System 3 extrahiert. Die Extrakte wurden mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt und über Nacht im Kühlschrank zum Ausfällen gebracht. Der Rückstand wurde über ein Faltenfilter abgetrennt und die Filtrate wurden weiter über eine Polymerphase aufgereinigt. Die OnGuardII-RP-Kartuschen wurden vor der Probenaufgabe mit 5 mL Methanol gefolgt von 10 mL Wasser konditioniert. Das Filtrat jeder Probe wurde auf zwei Kartuschen aufgeteilt und nach der Probenaufgabe wurden die Kartuschen 3 bis 5 min. bei starkem Vakuum getrocknet. Danach wurde mit 5 mL Natronlauge ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) gewaschen. Die Konjugate wurden zunächst mit 5 mL einer Mischung aus Methanol/Wasser 70 + 30 (v/v), die freien Steroide dann mit 5 mL Ethylacetat eluiert. Die Konjugateluete wurden vereinigt und zur Trockene eingeeengt, die Eluate der freien Steroide wurden ebenfalls vereinigt und auf etwa 2 mL eingeeengt. Der Rückstand des Konjugateluates wurde in 1 mL Methanol aufgenommen und mit 5 mL einer Schwefelsäure/Ethylacetat-Mischung versetzt. Es wurde 1 h bei 55°C inkubiert. Der Solvolyssextrakt und das Eluat der freien Steroide wurden vereinigt, mit 4 mL Natronlauge ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) versetzt und zweimal mit 10 mL n-Hexan extrahiert. Die beiden organischen Phasen wurden vereinigt und zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in 0,5 mL Methanol aufgenommen. Die Extrakte wurden über HPLC System 4 fraktioniert. Es wurden hierzu $20 \times 25 \mu\text{L}$ injiziert.

Fraktion 1: Dehydroepiandrosteron, 17α -Testosteron, Estron, 17α -Estradiol, Epiandrosteron, Androst-5-en- 3β , 17β -diol

Fraktion 2: Etiocholanolon

Fraktion 3: Pregnenolon, Progesteron

Die einzelnen Fraktionen der Proben wurden zur Trockene eingeeengt, mit $100 \mu\text{L}$ Pyridin und $100 \mu\text{L}$ Acetanhydrid versetzt und zur Derivatisierung 45 Minuten bei 60°C inkubiert. Danach wurden die Fraktionen zur Trockene eingeeengt. Die Rückstände wurden in $250 \mu\text{L}$ Acetonitril gelöst und mittels HPLC System 7 erneut fraktioniert. Es wurden $5 \times 50 \mu\text{L}$ injiziert.

Fraktion 1-1: Dehydroepiandrosteron

Fraktion 1-2: Epiandrosteron

Fraktion 1-3: 17α -Estradiol

Fraktion 1-4: Androst-5-en-3 β ,17 β -diol

Fraktion 2-1: Etiocholanolon

Fraktion 3-1: Progesteron

Fraktion 3-2: Pregnenolon

Die Fraktionen wurden auf 1 – 2 mL eingengt und zweimal mit der gleichen Menge n-Hexan extrahiert. Die n-Hexanextrakte wurden vereinigt und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 50 μ L n-Hexan aufgenommen. Die Fraktionen die Dehydroepiandrosteron, Androst-5-en-3 β ,17 β -diol, 17 α -Estradiol und Etiocholanolon enthalten wurden mit GC-MS-System 5 analysiert, die Fraktionen die Progesteron und Pregnenolon enthalten wurden mit GC-MS-System 6 analysiert. Die Analyten wurden über die Ionenverhältnisse der Targetionen mit drei Qualifierionen identifiziert, es wurde extern standardisiert.

5.4.7 Validierung

5.4.7.1 Wiederfindung und Diskriminierung

Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Extraktionshülsen für die ASE wurden mit je 4 g Diathomeenerde gefüllt und mit 50 μ L Standardlösung 4 (S2) und Standardlösung 5 (S2) dotiert. Die Hülsen wurden mit Methanol mittels ASE System 3 extrahiert. Die Extrakte wurden mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt und über Nacht im Kühlschrank zum Ausfällen gebracht. Der Rückstand wurde über ein Filter abgetrennt und die Filtrate wurden weiter über eine Polymerphase aufgereinigt. Die OnGuardII-RP-Kartuschen wurden vor der Probenaufgabe mit 5 mL Methanol gefolgt von 10 mL Wasser konditioniert. Das Filtrat jeder Probe wurde auf zwei Kartuschen aufgeteilt und nach der Probenaufgabe wurden die Kartuschen 3 bis 5 min. bei starkem Vakuum getrocknet. Danach wurde mit 5 mL Natronlauge (1 mol $\cdot$ L⁻¹) gewaschen. Die Konjugate wurden zunächst mit 5 mL einer Mischung aus Methanol/Wasser 70 + 30 (v/v), die freien Steroide dann mit 5 mL Ethylacetat eluiert. Die Konjugateluatate wurden vereinigt und zur Trockene eingengt, die Eluate der freien Steroide wurden ebenfalls vereinigt und auf etwa 2 mL eingengt. Der Rückstand des Konjugateluates wurden in 1 mL Methanol aufgenommen und mit 5 mL einer Schwefelsäure/Ethylacetat-Mischung versetzt. Es wurde 1 h bei 55°C

inkubiert. Der Solvolyseextrakt und das Eluat der freien Steroide wurden mit 4 mL Natronlauge ($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) versetzt und zweimal mit 10 mL n-Hexan ausgeschüttelt. Die beiden organischen Phasen wurden vereinigt und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 250 μL Methanol aufgenommen. Die Extrakte wurden dann über HPLC System 4 fraktioniert. Es wurden 12 x 20 μL injiziert.

Fraktion 1: Dehydroepiandrosteron, 17 α -Estradiol, Epiandrosteron, Androst-5-en-3 β ,17 β -diol

Fraktion 2: Etiocholanolon

Fraktion 3: Pregnenolon, Progesteron

Die einzelnen Fraktionen wurden zur Trockene eingengt, mit 100 μL Pyridin und 100 μL Acetanhydrid versetzt und zur Derivatisierung 45 Minuten bei 60°C inkubiert. Danach wurden die einzelnen Fraktionen erneut zur Trockene eingengt. Die Proben wurden in 150 μL Acetonitril aufgenommen und mittels HPLC System 7 fraktioniert.

Fraktion 1-1: Dehydroepiandrosteron

Fraktion 1-2: Epiandrosteron

Fraktion 1-3: 17 α -Estradiol

Fraktion 1-4: Androst-5-en-3 β ,17 β -diol

Fraktion 2-1: Etiocholanolon

Fraktion 3-1: Progesteron

Fraktion 3-2: Pregnenolon

Die Fraktionen wurden auf 1 – 2 mL eingengt und zweimal mit der gleichen Menge n-Hexan ausgeschüttelt. Die n-Hexanextrakte wurden vereinigt und zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 50 μL n-Hexan aufgenommen und mittels GC-MS-System 7 analysiert.

Zur Bestimmung der Wiederfindung in Matrix wurde Faeces eines unbehandelten männlichen Tieres (ISOSTER-F-02-5-1) aufgearbeitet. Die homogenisierte Probe wurde in vier Teilproben von 8 g unterteilt. Drei der Teilproben wurde mit 50 μL Standardlösung 4 (S2) und 50 μL Standardlösung 5 (S2) dotiert. Die Proben wurden analog zu den Versuchen mit

Standardlösungen aufgearbeitet. Die Differenzen der Gehalte der dotierten und undotierten Proben wurden bestimmt und mit denen nicht aufgearbeiteter Standardlösungen verglichen.

5.4.7.2 Wiederholbarkeit

Eine Probe eines trächtigen Tieres (ISOSTER-F-04-1) wurde aufgearbeitet. Die homogenisierte Probe wurde in zwölf Teilproben von 10 g unterteilt. Sechs der Teilproben wurden mit 5 µg 17α-Estradiol, Progesteron, Dehydroepiandrosteron, Androst-5-en-3β,17β-diol, Pregnenolon, Epiandrosteron und Etiocholanolon dotiert und mit Methanol durch ASE extrahiert. Matrixbestandteile wurden danach mit Wasser ausgefällt und mit CalfloE und Celite als Filtrierhilfsmittel abfiltriert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog den Bedingungen des Wiederfindungsversuchs an Standardlösungen.

Sechs weitere Teilproben wurden von einer zweiten Person in derselben Weise aufgearbeitet. Abweichend wurden die Proben hierbei mit 500 ng 17α-Estradiol, Progesteron, Dehydroepiandrosteron, Androst-5-en-3β,17β-diol, Pregnenolon, Epiandrosteron und Etiocholanolon dotiert und anstelle durch ASE sechs Stunden nach Soxhlet mit 200 mL Methanol extrahiert.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zum Nachweis eines Mißbrauchs natürlicher Hormone wie beispielsweise des Testosterons in der Rinderhaltung wird seit einigen Jahren die Stabilisotopenanalyse getestet. Sie beruht auf der Messung der durch eine Verabreichung geänderten Isotopenverhältnisse des Hormons und seiner Metaboliten im Vergleich zum durch eine Behandlung nicht beeinflussten Isotopenverhältnis einer Vorläufersubstanz.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Ausarbeitung einer Methode zur Bestimmung der $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse von Steroidhormonen, deren Metaboliten und Vorläufersubstanzen in Rinderfaeces mit Hilfe der GC-C-IRMS. Dabei ist besonders die Entwicklung einer leistungsstarken Probenaufarbeitung wichtig, da zur Analyse mit GC-C-IRMS hochreine Probenextrakte und eine hohe Konzentration des Analyten (10 ng/Injektion) erforderlich sind.

Messungen mit GC-MS ergeben, dass die Konzentrationen je nach Analyt im unteren $\mu\text{g}/\text{kg}$ -bis oberen ng/kg -Bereich liegen.

Daraus ergibt sich, dass hohe Mengen Probenmaterial von mindestens 100 g aufgearbeitet werden müssen, um eine ausreichende Menge Analyten für IRMS-Messungen zu erhalten.

Unter Berücksichtigung dieser Voraussetzungen wurde eine Methode entwickelt, die zuverlässige Stabilisotopenmessungen von 17α -Estradiol, Progesteron, Epiandrosteron, Etiocholanolon und Dehydroepiandrosteron in Rinderfaeces erlaubt.

Vorversuche an Faecesproben zeigen eine große Zahl an unterschiedlichen Matrixkomponenten. Hinzu kommt, dass Faeces unter anderem eine Reihe verschiedener Steroide und andere Stoffe wie beispielsweise Gallensäuren enthält, die in ihrer Struktur und ihrem chemisch-physikalischen Verhalten den Zielanalyten sehr ähnlich sind. Dadurch ist der Einsatz hochleistungsfähiger Aufreinigungsschritte zur Abtrennung der Matrixkomponenten von den Zielanalyten erforderlich.

Als erster Schritt werden die Zielanalyten über eine beschleunigte Lösemittlextraktion oder nach Soxhlet extrahiert, wobei zugunsten der Ausbeuten auf eine hohe Reinheit der Extrakte verzichtet wird. Die Vorreinigung und Aufkonzentrierung der Extrakte erfolgt dann an Polymer-SPE-Materialien und über eine Flüssig-Flüssig-Extraktion. Nach einem Solvolyseschritt zur Spaltung gebundener Steroide erhöht sich die Menge an messbaren Analyten deutlich.

Die Abtrennung chemisch sehr ähnlicher Matrixkomponenten von den Zielanalyten erfolgt über eine mehrschrittige HPLC. Nach einer Anreicherung der Analyten und einer Abtrennung großer Mengen an Matrixkomponenten an einer RAM-Vorsäule erfolgt eine Fraktionierung der Extrakte auf einem Umkehrphasenmaterial. Die in Gruppen aufgetrennten Steroide werden dann acetyliert und erneut über RP-HPLC weiter aufgetrennt.

Die anschließend durchgeführten GC-MS-Messungen zeigen, dass die resultierenden Eluate nach dieser Aufarbeitung eine Reinheit aufweisen, die GC-C-IRMS-Messungen von 17α -Estradiol, Progesteron, Epiandrosteron, Etiocholanolon und Dehydroepiandrosteron zulässt. Androst-5-en- $3\beta,17\beta$ -diol kann durch diese Aufarbeitung nicht vollständig von anderen Komponenten abgetrennt werden. Bei Pregnenolon kann eine mögliche Diskriminierung während der Aufreinigung nicht ausgeschlossen werden. Diese beiden Steroide sind daher als Zielanalyten nicht geeignet.

Mit der entwickelten Methode sind Aufarbeitungen von Rinderfaecesproben für zuverlässige GC-C-IRMS-Messungen möglich. Inwieweit Stabilisotopenmessungen den Nachweis einer Behandlung der Tiere mit natürlichen Steroiden erlauben, kann nun durch weiterführende Tierversuche untersucht werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- AGUILERA R, BECCHI M, CASABIANCA H, ET AL, (1996)**, Improved Method of Detection of Testosterone Abuse by Gas Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry Analysis of Urinary Steroids, *J Mass Spectrom*, 31, 169 - 176
- AGUILERA R, BECCHI M, GRENOT C, CASABIANCA H, HATTON CK, (1996) - 2**, Detection of testosterone misuse: comparison of two chromatographic sample preparation methods for gas chromatographic – combustion/isotope ratio mass spectrometric analysis, *J Chromatogr B*, 687, 43 – 53
- AGUILERA R, CATLIN DH, BECCHI M, ET AL, (1999)**, Screening urine for exogenous testosterone by isotope ratio mass spectrometric analysis of one pregnanediol and two androstanediols, *J Chromatogr B*, 727, 95 – 105
- APPELBLAD P, IRGUM K, (2002)**, Separation and detection of neuroactive steroids from biological matrices, *J Chromatogr A*, 955 (2), 151 – 182
- BAMBERG E, SCHWARZENBERGER F, (1990)**, Fecal steroid assay for monitoring of estrous cycle and pregnancy, *Proc 14th Congr Int Soc Anim Clin Biochem*, Davis California, 95 – 99
- BAYRHUBER H, KULL U, BÄBLER U, DANZER A (HRSG.), LINDER BIOLOGIE**, 20. Auflage; J. B. Metzlersche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, **1991**
- BECCHI M, AGUILERA R, FARIZON Y, FLAMENT M-M, CASABIANCA H, JAMES P, (1994)**, Gas Chromatography/Combustion/Isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 8, 304 – 308
- BENDER MM, (1971)**, Variations in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratios of Plants in Relation to the Photosynthetic Carbon Dioxide Fixation, *Phytochem*, 10, 1239 - 1244
- BOOS KS, GRIMM CH, (1999)**, High-performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings, *Trends Anal Chem* 18, 175 - 180
- BRAUNSDORF R, HENER U, PRZIBILLA G, PIECHA S, MOSANDL A, (1993)**, Analytische und technologische Einflüsse auf das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis von Orangenöl-Komponenten, *Z Lebensm Unters Forsch*, 197, 24 – 28
- CAIMI RJ, BRENNAN JT, (1997)**, Quantitative evaluation of carbon isotopic fractionation during reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A*, 757, 307 - 310
- CALVARESE S, RUBINI P, URBANI G, FERRI N, RAMAZZA V, ZUCCHI M, (1994)**, Experimental administration of 19-nortestosterone and dexamethasone in cattle: elimination of the two drugs in different biological matrices, *Analyst*, 119, 2611 – 2615
- CHOI HS, (1987)**, Immunologische Bestimmung von Sexualsteroiden zur Fertilitätskontrolle bei Rind, Schwein und Pferd, *Wien Tierärztl Mschr*, 74, 14 – 22 und 47 – 56
- CRAIG H, (1957)**, Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide, *Geochim Cosmochim Acta*, 12, 133 - 149
- DEUTSCHER VERBAND TIERNÄHRUNG E.V., 14.04.2004**,
URL: <http://www.dvtiernahrung.de>
- DIONEX**, Consumables/Instrumentation, Manuals and Literature, **2000**

DRAISCI R, MARCHIAFAVA C, PALLESCHI L, CAMMARATA P, CAVALLI S, (2001), Accelerated solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantitation of corticosteroid residues in bovine liver, *J Chromatogr B*, 753 (2), 217-223

EUROPÄISCHE KOMMISSION, ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION 2002/657/EG VOM 12.08.2002 zur Umsetzung der RL 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysenmethoden und die Auswertung von Ergebnissen, Abl. L221/8, 17.8.2002

EUROPÄISCHE KOMMISSION, PRESSEMITTEILUNG IP/02/604 VOM 22.04.2002, Wachstumsfördernde Hormone gefährden die Verbrauchergesundheit bestätigt wissenschaftlicher EU-Ausschuss,

URL: http://europa.eu.int/comm/food/dyna/press_rel/press_rel_ff_en.cfm

EUROPÄISCHE KOMMISSION, SCVPH opinion on the potential risks to human health from hormone residues in bovine meat products of 30/04/99, URL: http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/hormones/sci_opinion_en.htm

EUROPÄISCHE KOMMISSION, Review of specific documents Relating to the SCVPH opinion of 30 April 99 on the potential risks to human health from hormone residues in bovine meat products, adopted 03/05/2000, URL: http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/hormones/sci_opinion_en.htm

EUROPÄISCHE KOMMISSION, European Commission: Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to public health on Review of previous SCVPH opinion of 30 April 1999 and 03/05/2000 on the potential risks to human health from hormone residues in bovine meat products, adopted 10/04/2002, URL: http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/hormones/sci_opinion_en.htm

EUROPÄISCHES ARZNEIBUCH, AMTLICHE DEUTSCHE AUSGABE, GRUNDWERK 2002, Band 1, Allgemeiner Teil, 4.00/2.02.46.00 Chromatographische Trennmethode, 4. Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Govi-Verlag-Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn, 2002

FERCHAUD V, LEBIZEC B, MONTEAU F, ANDRÉ F, (1998), Determination of the Exogenous Character of Testosterone in Bovine Urine by Gas Chromatography – Combustion – Isotope Ratio Mass Spectrometry, *Analyst*, 123, 2617 - 2620

FERCHAUD V, LEBIZEC B, MONTEAU F, ANDRÉ F, (2000), Characterization of exogenous testosterone in livestock by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: influence of feeding and age, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 14, 652 -656

FETZER JC, BLOXHAM PA, ROGERS LB, (1980), Gas Chromatographic Fractionations of the Carbon and Oxygen Isotopes of Carbon Monoxide, *Sep Sci*, 15, 49 - 56

FORTH W, HENTSCHLER D, RUMMEL W (HRS.G.), ALLGEMEINE UND SPEZIELLE TOXIKOLOGIE, 5. Auflage., Wissenschaftsverlag, Mannheim, 1987

FRITSCH S, SCHMIDT G, STEINHART H, (1999), Gas chromatographic - mass spectrometric determination of natural profiles of androgens, progestogens, and glucocorticoids in muscle tissue of male cattle, *Eur Food Res Technol*, 209, 393 – 399

GLATZL PS, (1999), Feasibility of detecting steroid hormones in cattle feces for monitoring ovarian function, *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 27 (1), 36 - 40

GONZALO-LUMBRERAS R, IZQUIERDO-HORNILLOS R, (2000), High-performance liquid chromatographic optimization study for the separation of natural and synthetic anabolic steroids. Application to urine and pharmaceutical samples, *J Chromatogr B*, 742, 1 – 11

- GONZALO-LUMBRERAS R, IZQUIERDO-HORNILLOS R, (2000) - 2**, Optimization of the high-performance liquid chromatographic separation of a complex mixture containing urinary steroids, boldenone and bolasterone: application to urine samples, *J Chromatogr B*, 742, 47 – 57
- GROH H, SCHADE K, HÖRHOLD-SCHUBERT C, (1993)**, Steroid metabolism with intestinal microorganisms, *J Basic Microbiol*, 33, 59 – 72
- HOEVEN RAM VAN DER, HOFTE AJP, FRENAY M, ET AL, (1997)**, Liquid chromatography –mass spectrometry with on-line solid-phase extraction by a restricted-access C₁₈ precolumn for direct plasma and urine injection, *J Chromatogr A*, 762, 193 – 200
- HÖFLER F**, Beschleunigte Lösemittelextraktion (ASE), 1. Auflage, Dionex GmbH, Idstein, 2000
- HOUGHTON E, GRAINGER L, DUMASIA MC, TEALE P, (1992)**, Application of Gas Chromatography/Mass Spectrometry to Steroid Analysis in Equine Sports: Problems with Enzyme Hydrolysis, *Org Mass Spectrom*, 27, 1061 - 1070
- IMPENS S, WASCH K DE, CORNELIS M, BRABANDER HF DE, (2002)**, Analysis on residues of estrogens, gestagens and androgens in kidney fat and meat with gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 970 (1-2), 235-247
- JOOS PE, RYCKEGHEM M VAN, (1999)**, Liquid chromatography – Tandem Mass Spectrometry of Some Anabolic Steroids, *Anal Chem*, 71, 4701 – 4710
- KJELD JM, PUAH CM, JOPLIN GF, (1978)**, Synthetic and endogenous testosterone conjugates: Acid hydrolysis studied by radioimmunoassay, *Clin Chim Acta*, 86, 235 – 243
- KOCHAKIAN CD, (1990)**, Metabolites of testosterone: significance in the vital economy, *Steroids*, 55, 92 - 97
- KOOLE A, FRANKE J-P, ZEEUW RA DE, (1999)**, Multi-residue analysis of anabolics in calf urine using high-performance liquid chromatography with diode-array detection, *J Chromatogr B*, 724, 41 – 51
- KURONEN P, VOLIN P, LAITALAINEN T, (1998)**, Reversed-phase high-performance liquid chromatographic screening method for serum steroids using retention index and diode-array detection, *J Chromatogr B*, 718, 211 - 224
- LANGE IG, DAXENBERGER A, SCHIFFER B, WITTERS H, IBARRETA D, MEYER HHD, (2002)**, Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment, *Anal Chim Acta*, 473 (1-2), 27-37
- LEVESQUE J-F, GAUDREAU M, HOULE R, CHAURET N, (2002)**, Evaluation of human hepatocyte incubation as a new tool for metabolism study of androstenedione and norandrostenedione in a doping control perspective, *J Chromatogr B*, 780 (1), 145-153
- LOPEZ DE ALDA MJ, BARCELO D, (2000)**, Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disruptors in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 892 (1 – 2), 391 - 406
- MAKIN J, TRAFFORD DJH, NOLAN J (HRSG.), MASS SPECTRA AND GC DATA OF STEROIDS – ANDROGENS AND ESTROGENS**, Wiley-VCH, Weinheim, 1998

- MAKIN HLJ (HRSG.)**, BIOCHEMISTRY OF STEROID HORMONES, 2. Auflage, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London **1984**
- MARCHAND P, LEBIZEC B, GADE C, MONTEAU F, ANDRÉ F, (2000)**, Ultra trace detection of a wide range of anabolic steroids in meat by gas chromatography coupled to mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 867, 219 – 233
- MASON MP, HALL SE, GILMOUR I, HOUGHTON E, PILLINGER C, SEYMOUR MA, (1998)**, The Use of Stable Carbon Isotop Analysis to Detect the Abuse of Testosterone in Cattle, *Analyst*, 123, 2405 - 2408
- MEIER-AUGENSTEIN W, (2002)**, Stable isotope analysis of fatty acids by gas chromatography – isotope ratio mass spectrometry, *Anal Chim Acta*, 465, 63 – 79
- MERCK KGAA**, LiChrospher ADS Application Guide, Darmstadt **2001**
- MERCK KGAA**, LiChrospher ADS Manual, Darmstadt **2001**
- MÖSTL E, CHOI HS, WURM W, BAMBERG E, (1983)**, Trächtigkeitsdiagnose beim Rind mittels Östrogenbestimmung im Kot, *Wien Tierärztl Mschr*, 70, 60 - 61
- MOLDOVEANU SC, DAVID V, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY Library-volume 65: Sample preparation in chromatography**, 1. Auflage, Elsevier, Amsterdam, **2002**
- NOZAKI O, (2001)**, Steroid analysis for medical Diagnosis, Review, *J Chromatogr A*, 935, 267 – 278
- O'NEIL MJ (HRSG.)**, THE MERCK INDEX: AN ENCYCLOPEDIA OF CHEMICALS, DRUGS, AND BIOLOGICALS, 13. Auflage, Merck Sharp and Dohme Research Laboratories NJ, Whitehouse Station NJ, **2001**
- PALME R, FISCHER P, SCHILDORFER H, ISMAIL MN, (1996)**, Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock, *Animal Reproduction Science*, 43, 43 - 63
- PAYNE LD, HICKS MB, WEHNER TA, (1995)**, Determination of Abamectin and/or Ivermectin in Cattle Feces at Low Parts per Billion Levels Using HPLC with Fluorescence Detection, *J Agric Food Chem*, 43, 1233 – 1237
- PETROVIC M, TAVAZZI S, BARCELO D, (2002)**, Column-switching system with restricted access pre-column packing for an integrated sample cleanup and liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of alkylphenolic compounds and steroid sex hormones in sediment, *J Chromatogr A*, 971 (1-2), 37-45
- PRÉVOST S, NICOL T, MONTEAU F, ANDRÉ F, LEBIZEC B, (2001)**, Gas Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry to control the misuse of androgens in breeding animals: ,new derivatisation method applied to testosterone metabolites and precursors in urine samples, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 15, 2509 – 2514
- PUYMBROECK M VAN, LEYSSENS L, VANDERZANDE D, GELAN J, RAUS J, (1998)**, Metabolites in faeces can be important markers for the abuse of anabolic steroids in cattle, *Analyst*, 123 (12), 2449-2452
- RICHTER BE, JONES BA, EZZELL JL, PORTER NL, AVDALOVIC N, POHL C, (1996)**, *Anal Chem*, 68, 1033 – 1039
- RICHTLINIE 2003/74/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES VOM 22.10.2003** zur Änderung der RL 96/22/EG des Rates über das Verbot der

Verwendung bestimmter Stoffe mit hormonaler bzw. thyreostatischer Wirkung und β -Agonisten in der tierischen Erzeugung, Abl. L262/17, 14.10.2003

RICHTLINIE 96/22/EG DES RATES VOM 29.04.1996 über das Verbot der Verwendung bestimmter Stoffe mit hormonaler bzw. thyreostatischer Wirkung und β -Agonisten in der tierischen Erzeugung, Abl. L125/3, 23.05.1996

ROBARDS K, TOWERS P, (1990), Chromatography as a Reference Technique for the Determination of Clinically Important Steroids, *Biomed Chromatogr*, 4 (1), 1 - 19

SAMUELS TP, NEDDERMAN A, SEYMOR MA, HOUGHTON E, (1998), Study of the metabolism of testosterone, nandrolone and estradiol in cattle, *Analyst*, 123 (12), 2401-2404

SAUER MJ, SAMUELS TPW, HOWELLS LG, ET AL, (1998), Residues and metabolism of 19-nortestosterone laurate in steers, *Analyst*, 123, 2653 - 2660

SCHÄFER C, LUBDA D, (2001), Alkyl diol silica: restricted access pre-column packings for fast liquid chromatography-integrated sample preparation of biological fluids, *J Chromatogr A*, 909 (1), 73-78

SCHLENKER G, BIRKELBACH C, GLATZEL PS, (1999), Verlaufsuntersuchungen zum Temperatureinfluss auf die Stabilität von Sexualsteroiden im Kot von. (Analysis of the influence of temperature on the stability of sex steroids in cow feces), *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 112, 459 - 464

SCHLENKER G, MUELLER W, GLATZEL P, (1998), Verlaufsuntersuchungen zur Stabilität von Sexualsteroiden im Kot von Kühen über 12 Wochen. (Continuing studies on the stability of sex steroids in the feces of cows over 12 weeks), *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 111, 248 - 252

SCHWARZENBERGER F, MOSTL E, PALME R, BAMBERG E, (1996), Fecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductiv status in farm, wild and zoo animals, *Animal Reproduction Science*, 42, 515 - 526

SCHWARZENBERGER F, SON CH, PRETTING R, ARBEITER K, (1996) - 2, Use of group-specific antibodies to detect fecal progesterone metabolites during the estrous cycle of cows, *Theriogenology*, 46, 23 - 32

SCHWARZENBERGER F, SPECKBACHER G, BAMBERG E, (1995), Plasma and fecal progestagen evaluations during and after the breeding season of the female vicuna, *Theriogenology*, 43, 625 - 634

SCIPPO ML, DEGAND G, DUYCKAERTS A, MAGHUIN-ROGISTER G, DELAHAUT P, (1994), Control of illegal administration of natural steroid hormones in the plasma of bulls and heifers, *Analyst*, 119, 2639 - 2644

SHACKLETON CHL, LIVINGSTONE JRB, MITCHELL FL, (1968), The conjugated 17-hydroxy epimers of Δ^5 -androstene-3 β -17-diol in infant and adult urine and umbilical cord plasma, *Steroids*, 11, 299 - 311

SHACKLETON CHL, PHILLIPS A, CHANG T, LI Y, (1997), Confirming testosterone administration by isotope ratio mass spectrometric analysis of urinary androstanediols, *Steroids*, 62, 379 - 387

SHEPARD AT, DANIELSON ND, PAULS RE, MAHLE NH, TAYLOR PJ, ROGERS LB, (1976), Gas-Chromatographic Fractionations of Stable Isotopes of Carbon and Oxygen in Carbon Dioxide, *Sep Sci*, 11, 279 - 292

- SHIMADA K, MITAMURA K, HIGASHI T, (2001)**, Gas chromatography and high performance liquid chromatography of natural steroids, Review, *J Chromatogr A*, 935, 141 – 172
- TAYLOR W, (1971)**, The Excretion of Steroid Hormone Metabolites in Bile and Feces, *Vitam Horm*, 29, 201 - 285
- TERNES TA, ANDERSEN H, GILBERG D, BONERZ M, (2002)**, Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS, *Anal Chim Acta*, 74, 3498 - 3504
- TORRE X DE LA, GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ JC, PICHINI S, SEGURA J, (2001)**, 13C/12C Isotope ratio MS analysis of testosterone, in chemicals and pharmaceutical preparations, *J Pharm Biomed Anal*, 24 (4), 645 – 650
- UEKI M, OKANO M, (1999)**, Analysis of Exogenous Dehydroepiandrosterone Excretion in Urine by Gas Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 13, 2237 – 2243
- USEPA METHOD 3660 B, Sulfur Cleanup, Revision 2, U. S. GPO: Washington DC 1996**
- VANLUCHENE E, EECHAUTE W, VANDEKERCKHOVE D, (1982)**, Conversion of free 3 β -Hydroxy-5-ene-Steroids by Incubation with *Helix Pomatia*, *J Steroid Biochem*, 16, 701 - 703
- WEIDOLF LOG, HENION JD, (1987)**, Liquid-Solid Extraction Conditions Predicted by Liquid Chromatography for Selective Isolation of Sulfoconjugated Steroids from Equine Urine, *Anal Chem*, 59, 1980 - 1984
- WITORSCH RJ, (2002)**, Low-dose in utero effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans: an analytical review of the literature, *Food and Chem Tox*, 40 (7), 905 - 912
- YAMADA H, YOSHIZAWA K, HAYASE T, (2002)**, Sensitive determination method of estradiol in plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J Chromatogr B*, 775 (2), 209-213
- YU Z, WESTERLUND D, BOOS K S, (1997)**, Evaluation of liquid chromatographic behavior of restricted-access media precolumns in the course of direct injection of large volumes of plasma samples in column-switching systems, *J Chromatogr B*, 704 (1-2), 53-62

ANHANG**Steroide: Methode zur Aufarbeitung von Rinderfaeces für die GC-C-IRMS-Analytik****1. Zweck und Anwendungsbereich**

Die Methode beschreibt die Probenaufarbeitung von Rinderfaeces für die anschließende GC-MS bzw. GC-C-IRMS-Messung natürlicher Steroide.

Die Probenaufarbeitung setzt sich zusammen aus einer Extraktion durch beschleunigte Lösemittlextraktion (ASE) bzw. Soxhlet-Extraktion und anschließender Filtration gefolgt von einer Aufreinigung der Extrakte über Festphasenextraktion (SPE), Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) und HPLC.

2. Definitionen

ASE: (accelerated solvent extraction) Beschleunigte Lösemittlextraktion

SPE: (solid phase extraction) Festphasenextraktion

HPLC: (high performance liquid chromatography)
Hochleistungsflüssigchromatographie

RP: (reversed phase) Umkehrphase

GC-MS: Kopplung Gas Chromatographie-Massenspektrometrie

GC-C-IRMS: (Gas chromatography-Combustion-Isotope ratio mass spectrometry)
Kopplung Gas Chromatographie-Isotopenmassenspektrometrie

RAM: (restricted access material)

3. Prinzip

Die gefriergetrockneten, homogenisierten Faecesproben werden durch Soxhlet oder ASE mit Methanol extrahiert. Matrixkomponenten werden mit Wasser ausgefällt und abfiltriert.

Die weitere Aufreinigung der ASE- beziehungsweise Soxhlet-Extrakte erfolgt mit Hilfe eines SPE-Schrittes (Copolymer-Material). Die Sulfat-Konjugate werden durch Solvolyse

hydrolysiert und die SPE-Eluate/Solvolyseextrakte werden mit Natronlauge gewaschen. Zur weiteren Aufreinigung schließen sich zwei HPLC-Fraktionierungen an, die erste über eine Umkehrphase mit vorheriger Anreicherung der Analyten auf einer Restricted Access Material Vorsäule.

Anschließend werden die aufgereinigten Steroid-Fractionen für die GC-Messungen acetyliert. Nach der Acetylierung folgt die zweite HPLC-Fraktionierung, erneut über eine Umkehrphase.

4. Reagenzien

Wenn nicht anders aufgeführt, entsprechen die Reagenzien mindestens der Qualitätsstufe p.A.

4.1 Standards

4.1.1 Androst-5-en-3 β ,17 β -diol

4.1.2 Androst-5-en-3 β -ol-17-on (Dehydroepiandrosteron)

4.1.3 5 α -Androstan-3 β -ol-17-on (Epiandrosteron)

4.1.4 1,3,5[10]-Estratrien-3,17 α -diol (17 α -Estradiol)

4.1.5 5-Pregnen-3 β -ol-20-on (Pregnenolon)

4.1.6 4-Pregnen-3,20-dion (Progesteron)

4.1.7 5 β -Androstan-3 α -ol-17-on (Etiocholanolon)

Von den Standardsubstanzen werden jeweils methanolische Lösungen von 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ angesetzt.

4.2 Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische

4.2.1 Methanol

4.2.2 Wasser, Ultrapur

4.2.3 Mischung aus Methanol (4.2.1) und Wasser (4.2.2) 70+30 (v/v)

4.2.4 Ethylacetat

4.2.5 n-Hexan

4.2.6 Acetonitril, (LiChrosolv, gradient grade, Merck)

4.2.7 n-Hexan, (LiChrosolv, Merck)

4.2.8 Pyridin

4.2.9 Acetanhydrid

4.3 Reagenzien und Lösungen

4.3.1 Diathomeenerde

4.3.2 Natriumhydroxid-Plätzchen

4.3.3 Natronlauge, $c = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

4 g Natriumhydroxid (4.3.2) werden mit Wasser (4.2.2) zu 100 mL gelöst.

4.3.4 Schwefelsäure, min 98%ig

4.3.5 Mischung aus Schwefelsäure und Ethylacetat

250 mL Ethylacetat (4.2.4) werden mit 10 Tropfen Schwefelsäure (4.3.4) versetzt

4.3.6 CalfloE, PESTANAL[®], Riedel-de Haën

4.3.7 Celite 545

4.4 Gase

4.4.1 Stickstoff

5. Geräte und Hilfsmittel

5.1 LabBlender (z. B. Stomacher 400)

5.1.1 Homogenisationsbeutel passend für Stomacher

5.2 ASE-Extraktor mit Lösungsmittelmodul

5.2.1 ASE-Extraktor (z. B. ASE 300, Dionex)

5.2.2 Lösungsmittelmodul

5.2.3 100 mL Extraktionszellen

5.2.4 200 mL Flaschen

5.2.5 Extraktionshülsen passend für 100 mL Zellen, (z. B. 25 x 150 mm, Cellulose, Ref. Nr. 10350315, Schleicher & Schuell)

5.2.6 Rundfilter für Extraktionszellen ASE 300, Ø 30 mm, Grade D28

5.3 Soxhlet-Apparatur

5.3.1 Soxhlet-Extraktionsaufsatz 200 mL

5.3.2 Faltenfilter, (z. B. Ø 385 mm, Schleicher und Schuell)

5.3.3 Rundkolben, 1 L

5.3.4 Heizpilz, passend für Rundkolben

5.3.5 Siedeperlen oder Magnetrührer mit Rührkern

5.4 Rundfilter

(z. B. Ø 110 mm, Schleicher und Schuell)

5.5 Glasgeräte

5.5.1 Büchnerfilter, passend für Rundfilter mit Ø 110 mm

5.5.2 Erlenmeyerkolben, 500 mL

5.5.3 Bechergläser, 600 mL

5.5.4 Scheidetrichter, 100 mL

5.6 SPE-Apparatur

5.6.1 SPE-Extraktionsblock (z. B. VacMaster[®], IST) mit Wasserstrahlpumpe

5.6.2 Einmalspritzen, Polyethylen: 50 mL

5.6.3 SPE-Kartuschen

RP Polymerphase (Dionex – OnGuardII-RP (1cc.))

5.6.4 Sammelgefäße, (z. B. 100 x 16 mm, Glas)

5.7 Eindampfvorrichtung

(z.B. Eindampfstation vom Typ TurboVap LV[®], Zymark)

5.8 HPLC Anlage

5.8.1 Autosampler

5.8.2 Pumpe

5.8.3 Säulenthermostat

5.8.4 HPLC-Säulen

5.8.4.1 Umkehrphase (z. B. Nucleosil RP8, HD, endcapped, Macharey-Nagel),

150 x 4,6 mm, 5 µm

5.8.4.2 Alkyl-Diol-Silica (z. B. LiChrospher RP-8 ADS, Merck), 25 x 4 mm, 25 µm

5.8.5 UV-Detektor

5.8.6 Fraktionssammler

5.8.7 Sammelgefäße, passend für Fraktionssammler

5.8.8 0,9 mL Vials, konischer Boden

5.9 Vortex-Mixer

5.10 Pipetten

5.11 Trockenschrank

5.12 Derivatisierungsröhrchen

(Ø passend zu Eindampfstation, konisch mit Schliff und Stopfen)

5.13 Vials

(z. B.: 2 mL mit 100 µL Mikroinsert und Alukappen mit Septen)

6. Durchführung

6.1 Homogenisieren

50 g Rinderfaeces werden in Aluschalen eingewogen und gefriergetrocknet (entspr. etwa 10 g Trockenmasse). Die getrockneten Proben werden in Homogenisationsbeutel (5.1.1) gefüllt und mit Hilfe eines Lab-Blenders (5.1) homogenisiert.

Standardproben werden mit jeweils 50 µL der einzelnen Standardlösungen (4.1) dotiert.

6.2 Extraktion

a) Mittels ASE:

Für eine Extraktion mittels ASE werden 10 g der homogenisierten Probe (6.1) im Verhältnis Probe : Diathomeenerde 2:1 mit Diathomeenerde (4.3.1) vermischt.

6.2.1 Vorbereitung der Zellen

Die mit Diathomeenerde vermischte Probe wird in Extraktionshülsen (5.2.5) eingefüllt, so dass die Hülsen möglichst hoch gefüllt sind und dann mit Diathomeenerde (4.3.1) aufgefüllt. Die Extraktionshülsen werden in die Zellen (5.2.3) eingesetzt und mit einem Rundfilter (5.2.6) bedeckt. Die Zellen werden handfest verschraubt und in die ASE (5.2.1) eingehängt. Für jede Zelle wird eine Flasche für den Extrakt (5.2.4) in das Karussell eingesetzt.

6.2.2 ASE-Parameter

preheat:	0
static:	5 min
flush:	60 %
purge:	300 sec
cycles:	2
pressure:	100 bar
temperature:	80°C

6.2.3 ASE-Extraktion

Die Zellen werden nacheinander mit der oben angegebenen Methode (6.2.2) extrahiert. Zwischen den Extraktionen wird jeweils mit 5 mL Lösungsmittel gespült.

b) Soxhlet-Extraktion:

Alternativ zur ASE ist auch eine Extraktion nach Soxhlet möglich.

Die gemahlene und homogenisierte Probe (6.1) wird hierzu in ein großes Faltenfilter (5.3.2) eingefüllt und in einen 200 mL Soxhletaufsatz (5.3.1) eingesetzt. Der Aufsatz wird zweimal

bis zum Überlauf mit Methanol (4.2.1) aufgefüllt. Es wird 6 h extrahiert (etwa 20 Entleerungen).

6.2.4 Die ASE- bzw. Soxhlet-Extrakte werden mit dem gleichen Volumen Wasser (4.2.2) versetzt. Es werden 20 g CalfloE (4.3.6) und 10 g Celite 545 (4.3.7) dazugegeben und gut vermischt. Der Rückstand wird über einen Büchnerfilter (5.4) abgetrennt, die Filtrate werden weiter aufgereinigt.

6.3 Festphasenextraktion

6.3.1 Konditionieren:

wichtig : die Kartusche darf während dieses Schrittes nicht trocken laufen, ansonsten ist das Konditionieren zu wiederholen.

Zwei SPE-Kartuschen (5.6.3) werden auf den SPE-Extraktionsblock (5.6.1) aufgesteckt, mit Einmalspritzen (5.6.2) als Lösungsmittelreservoir versehen und nacheinander zunächst mit je 5 mL Methanol (4.2.1), dann mit 10 mL Wasser (4.2.2) konditioniert.

6.3.2 Probenaufgabe:

Pro Kartusche wird etwa die Hälfte des filtrierten Extraktes (6.2.4) in das Reservoir aufgegeben und mittels Vakuum über die Kartusche gegeben.

6.3.3 Trocknen der Kartuschen:

Die Kartuschen (6.3.2) werden nach der Probenaufgabe 3 bis 5 min. bei starkem Vakuum getrocknet.

6.3.4 Waschen:

Die Kartuschen werden zunächst mit 5 mL Natronlauge (4.3.3) gewaschen, und nach dem Waschschrift 3 bis 5 min. bei starkem Vakuum getrocknet.

6.3.5 Elution der Konjugate:

In den SPE-Block werden die Sammelgefäße (5.6.4) für die Eluate eingesetzt. Die Konjugate werden mit 5 mL des Lösungsmittelgemisches Methanol/Wasser 70 + 30 (v/v) (4.2.3) eluiert.

Die Eluate werden vereinigt und unter Stickstoff (4.4.1) bei 40 ($\pm$ 5)°C bis zur Trockene eingengt.

6.3.6 Elution der freien Analyten:

Danach werden neue Sammelgefäße (5.6.4) in den SPE-Block eingesetzt und die freien Analyten werden mit 5 mL Ethylacetat (4.2.4) eluiert.

Die Eluate werden vereinigt und unter Stickstoff (4.4.1) bei $40 (\pm 5) ^\circ\text{C}$ auf ein Volumen von etwa 2 mL eingeeengt.

6.4 Solvolyse

Das Methanol/Wasser Eluat der Konjugate (6.3.5) wird in 1 mL Methanol (4.2.1) aufgenommen und mit 5 mL der Schwefelsäure/Ethylacetat- Mischung (4.3.5) versetzt. Es wird 1 h bei 55°C inkubiert.

6.5 Waschschrift mit Natronlauge

Das Solvolysat (6.4) und das SPE-Eluat der freien Steroide (6.3.6) werden in einem Scheidetrichter vereinigt (5.5.4) und mit 4 mL Natronlauge (4.3.3) versetzt. Es wird mit 10 mL n-Hexan (4.2.5) ausgeschüttelt.

Die org. Phase wird abgenommen und die wässrige Phase erneut mit 10 mL n-Hexan (4.2.5) ausgeschüttelt. Die beiden organischen Phasen werden vereinigt und bei $40 (\pm 5) ^\circ\text{C}$ unter einem Stickstoffstrom (4.4.1) zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wird in 0,5 mL Methanol (4.2.1) aufgenommen und in Vials (5.8.8) umgefüllt.

6.6 HPLC-Aufreinigung

6.6.1 Chromatographische Bedingungen:

Vorsäule:	Alkyl-Diol-Silica (z. B. LiChrospher RP-8 ADS, Merck), 25 x 4 mm, 25 μm (5.8.4.2)
Säule:	Umkehrphase (z. B. Nucleosil RP8, HD, endcapped, Macharey-Nagel), 150 x 4,6 mm, 5 μm (5.8.4.1)
Fließmittel:	A: Wasser (4.2.2) B: Acetonitril (4.2.6)

Konditionieren:	Konditionierung der Vorsäule (nur bei erster Injektion)	
Probenaufgabe:	4 x 20 µL	
Waschen:	(nur bei letzter Injektion): 15 min, 10 % B, 2 mL · min ⁻¹	
Gradient:	Trennung auf der analytischen Säule (nur bei letzter Injektion):	
	0 min	32,5 % B
	20 min	45,0 % B
	40 min	95,0 % B
	50 min	95,0 % B
	52 min	32,5 % B
	57 min	32,5 % B
Flussrate:	1 mL · min ⁻¹	
Detektion:	205 nm und 240 nm	
Fraktionierung:	Die Fraktionierung erfolgt anhand der Zeiten, die aus einer Standardlösung der gesuchten Analyten ermittelt werden.	
	<i>Dieser Standardlauf muss mindestens arbeitstäglich vor der Fraktionierung erfolgen!</i>	
	t_r =	Retentionszeit des Peaks
	b =	Basisbreite des Peaks (Zeitachsenabschnitt zwischen Wendepunkt tangente)
	Fraktionsanfang:	
	$t_{\text{Anfang}} = t_r (\text{erster Peak der Fraktion}) - 2b (\text{erster Peak}) + \text{Totzeit zwischen Detektor und Fraktionssammler}$	
	Fraktionsende:	
	$t_{\text{Ende}} = t_r (\text{letzter Peak der Fraktion}) + 2b (\text{letzter Peak}) + \text{Totzeit zwischen Detektor und Fraktionssammler}$	
	Für Peaks mit einer Asymmetrie > 1,2 wird mit 3 x b gearbeitet.	

Fraktion 1:	Androst-5-en-3 β ,17 β -diol , 17 α -Estradiol, Dehydroepiandrosteron, Epiandrosteron
Fraktion 2:	Etiocholanolon
Fraktion 3:	Pregnenolon, Progesteron

6.6.2 Bearbeitung der Proben:

Es werden 6 Läufe durchgeführt. Pro Lauf werden dabei 80 μ L Probelösung auf die analytische Säule gegeben und fraktioniert.

Die einzelnen Fraktionen 1, 2 bzw. 3 werden jeweils vereinigt und bei 40 ($\pm$ 5) °C unter einem Stickstoffstrom (4.4.1) auf etwa 1 mL eingengt.

6.7 Derivatisierung

Die eingengten HPLC-Fraktionen (6.6.2) werden in Derivatisierungsröhrchen (5.12) umgefüllt und in diesen bei 40 ($\pm$ 5) °C unter einem Stickstoffstrom (4.4.1) zur Trockene eingengt. Die Rückstände werden mit 100 μ L Pyridin (4.2.8) und 100 μ L Acetanhydrid (4.2.9) versetzt, verschlossen und mit einem Vortex-Mixer (5.9) gemischt.

Die Röhrchen werden 45 min bei 60°C im Trockenschrank (5.11) inkubiert und danach bei 40 ($\pm$ 5) °C unter einem Stickstoffstrom (4.4.1) zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 250 μ L Acetonitril (4.2.6) aufgenommen.

6.8 HPLC-Fraktionierung der Acetate

6.8.1 Chromatographische Bedingungen:

Säule:	Umkehrphase (z. B. Nucleosil RP8, HD, endcapped, Macharey-Nagel), 150 x 4,6 mm, 5 μ m (5.8.4.1)
Fließmittel:	A: Wasser (4.2.2) B: Acetonitril (4.2.6)

Gradient:	0 min	40,0 % B
	30 min	60,0 % B
	45 min	80,0 % B
	50 min	80,0 % B
	52 min	40,0 % B
	57 min	40,0 % B
Probenaufgabe:	5 x 50 µL	
Flussrate:	1 mL · min ⁻¹	
Detektion:	205 nm und 240 nm	
Fraktionierung:	Die Fraktionierung erfolgt anhand der Zeiten, die aus einer Standardlösung der gesuchten Analyten ermittelt werden.	
	<i>Dieser Standardlauf muss mindestens arbeitstäglich vor der Fraktionierung erfolgen!</i>	
	t_r = Retentionszeit des Peaks	
	b = Basisbreite des Peaks (Zeitachsenabschnitt zwischen Wendepunkt tangente)	
	Fraktionsanfang:	
	$t_{\text{Anfang}} = t_r (\text{erster Peak der Fraktion}) - 2b (\text{erster Peak}) + \text{Totzeit zwischen Detektor und Fraktionssammler}$	
	Fraktionsende:	
	$t_{\text{Ende}} = t_r (\text{letzter Peak der Fraktion}) + 2b (\text{letzter Peak}) + \text{Totzeit zwischen Detektor und Fraktionssammler}$	
	Für Peaks mit einer Asymmetrie > 1,2 wird mit 3 x b gearbeitet.	
	Fraktion 1-1: 17α-Estradiol	
	Fraktion 1-2: Dehydroepiandrosteron	
	Fraktion 1-3: Androst-5-en-3β,17β-diol	
	Fraktion 2-1: Etiocholanolon	

Fraktion 3-1: Progesteron

Fraktion 3-2: Pregnenolon

6.8.2 Bearbeitung der Proben:

Von den derivatisierten HPLC-Fraktionen (6.7) werden 5 mal 50 μ L injiziert und fraktioniert.

Die gesammelten Fraktionen werden jeweils vereinigt und bei 40 ($\pm$ 5) °C unter einem Stickstoffstrom (4.4.1) auf etwa 1 – 2 mL eingengt. Die einzelnen Fraktionen werden dann zweimal mit dem gleichen Volumen n-Hexan (4.2.7) ausgeschüttelt. Die Hexanphasen werden gesammelt in neue Sammelgefäße (5.8.7) überführt und zur Trockene eingengt.

Die Rückstände der Fraktionen werden in 50 μ L n-Hexan (4.2.7) aufgenommen und in Vials mit Mikroeingang (5.13) überführt.

Die Proben können nun mittels GC-MS oder GC-IRMS analysiert werden. Bis zur Analyse sind die Proben gut verschlossen im Kühlschrank zu lagern.

7 Literatur

- [1] ISO standard 78/2-1982. Layout for standards - Part 2: standard for chemical analysis.

Lebenslauf

Name: Anja Weltring
Geburtsdatum: 05.04.1976
Geburtsort: Hannover, Deutschland
Adresse: Bismarckstr. 74
12157 Berlin
Familienstand: ledig

Berufliche Tätigkeiten:

Juni 2002 – August 2004

wissenschaftliche Angestellte, Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

September 2001 – Mai 2002

selbstständige Tätigkeit als Lebensmittelchemikerin im Rahmen eines Werkvertrages, Berlin

Ausbildung:

September 2001 – Dezember 2004

Anfertigung einer Dissertation zum Thema:

„Bestimmung der Herkunft von Steroidhormonen: Erarbeitung einer Methode zur Probenaufarbeitung von Rinderfaeces für die GC-C-IRMS Analytik“,

Technische Universität Berlin / Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

April 2001

2. Staatsexamen in Lebensmittelchemie,

Staatliches Lebensmitteluntersuchungsamt Braunschweig

April 2000 – März 2001

praktische Ausbildung der Lebensmittelchemie,

Staatliches Lebensmitteluntersuchungsamt Braunschweig

März 2000

1. Staatsexamen in Lebensmittelchemie,

Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

Dezember 1999 – März 2000

Wissenschaftliche Abschlussarbeit zum Thema:

„Strategien für die Probenaufarbeitung von Naturstoffen für ein LC-NMR-Screening“,

Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig / ITA Fraunhofer Gesellschaft
Hannover

1995 – 1999

Studium der Lebensmittelchemie,

Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zusätzliche Praktika:

Juli – August 1999

Laborpraktikum der toxikologischen Analytik,

Institut für Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover

Schulbildung:

Mai 1995 Abitur, St. Ursula-Schule, Hannover

1988 –1995 Gymnasium, St. Ursula-Schule, Hannover

1986 – 1988 Orientierungsstufe Ludwig-Windthorst-Schule, Hannover

1982 – 1986 Grundschule Mühlenberg, Hannover

Veröffentlichungen:

WELTRING A, FRY H, LEBIZEC B, PREIß-WEIGERT A, (2004), Method development of a HPLC clean up of bovine feces for GC-MS and GC-C-IRMS measurements of natural steroids, *Proceedings EuroResidue V - Volume 2 - Poster Communications*, Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, Noordwijkerhout 10 – 12 May 2004, ed. Stephany RW, Bergwerff AA, distributed by National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands and Department of Public Health and Food Safety, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, 979 – 984

SANDVOSS M, WELTRING A, PREISS A, LEVSEN K, WUENSCH G, (2001), Combination of Matrix solid-phase dispersion extraction and direct on-line liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy-tandem mass spectrometry as a

new efficient approach for the rapid screening of natural products: Application to the total asterosaponin fraction of the starfish *Asterias rubens*; J Chromatogr A, 917, 75 – 86

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben.

Berlin, den 11. Oktober 2004

(A. Weltring)