

**Einsatz der Stabilisotopen-Massenspektrometrie
(GC/C/IRMS) als potentielle Untersuchungsmethode zum
Nachweis einer illegalen Anwendung von
19-17 β -Nortestosteron in der Ebermast**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Doktorgrades der
Naturwissenschaften an der Bergischen Universität im Fachbereich Mathematik und
Naturwissenschaften

Die Arbeit wurde in der Zeit vom 15. Mai 2003 bis 31. Dezember 2006 am
Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt in Freiburg angefertigt

vorgelegt von
Annette Mertineit-Heinz
Wuppertal 2007

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20070870

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20070870>]

dem Allmächtigen Gott

*Das Geheimnis Gottes ist Jesus Christus,
in dem alle Schätze der Weisheit und
Erkenntnis verborgen sind.*

*Die Bibel,
Kolosser 2, 3*

Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Petz, der es mir ermöglichte, an der Universität Wuppertal diese Dissertation anzufertigen. Für seine Hilfsbereitschaft und Ermutigungen bin ich ihm sehr dankbar.

Bedanken möchte ich mich beim Amtsleiter des CVUA Herrn Dr. Roland Renner sowie Laborleiter Herrn Dr. Martin Metschies, dass ich die Untersuchungen für diese Arbeit am CVUA durchführen durfte.

Bei Laborleiterin Frau Dr. Eva Annweiler möchte ich mich für ihre vielseitige Unterstützung in analytischen Fragen und ihre Hilfe bei der Durchsicht der Arbeit bedanken.

Den Labormitarbeitern Herrn Thomas Huber danke ich für die Unterstützung bei den EA/IRMS-Messungen, Frau Sylvia Scanlan-Sierra bei den GC/MS-Messung und Herrn Manfred Grosse bei den GC/FID-Messungen. Herr Grosse hat sich immer Zeit genommen, mich zu unterstützen, ohne dabei seine tägliche Arbeit zu vernachlässigen.

Für die Unterstützung der Aufarbeitung der Eberurine gilt mein Dank Laborleiter Herr Lippold und den Mitarbeitern Frau Annabarbara Fies, Herrn Markus Roth und Frau Maria Schmidt.

Den Mitarbeitern aus Labor 34 danke ich für die Hilfe bei den ELISA-Messung sowie der Durchführung des Vorversuchs zur Festlegung der Untersuchungsmatrix.

Ein großes Danke möchte ich Herrn Andreas Probst aussprechen. Ohne seine außergewöhnliche Hilfe, sein analytisches Wissen und seine Freundschaft wäre es vermutlich nicht zum Abschluss dieser Arbeit gekommen.

Für die Eberproben und die Probenahme danke ich Frau Dr. Siegrid Polten sowie ihrem Team aus der Landesanstalt für Landwirtschaft und Gartenbau des Landes Sachsen-Anhalt in Iden.

Herrn Dr. Friedhelm Erschig danke ich für die Probennahme des Kastratenurins im Schlachthof Freiburg.

Herrn Prof. Dr. Dr. Rolf Claus und Herrn Dr. Markus Lacorn an der Universität in Hohenheim danke ich für die Hilfe bei Fragen zu Steroiden.

Auch bei Herrn Dr. Matthias Gehre vom Umweltforschungszentrum in Leipzig bedanke ich mich für die Hilfestellung bei gerätetechnischen Problemen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglichten.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Tochter Anna-Maria, die während des Projektzeitraumes auf die Welt kam. Dank ihres zufriedenen Gemütes konnte ich die Arbeit ruhigen Gewissens beenden, was nicht zuletzt durch meine Schwiegereltern als tägliche Babysitter ermöglicht wurde.

Allen voran bin ich meinem Mann für seine Unterstützung, Hilfe und Opferbereitschaft in allen Situationen, vor allem den schwierigen Momenten mehr als dankbar.

Das Vertrauen auf den Herrn Jesus Christus gab mir die Kraft, trotz vieler teils unüberwindbarer Schwierigkeiten bis zum Ende durchzuhalten.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
Abkürzungen	4
Theoretischer Teil.....	6
1 Einleitung	6
2 Ebermast.....	8
3 Chemie der Stabilisotopen	10
3.1 Begriffe.....	10
3.2 Isotopendiskriminierung	12
3.3 Das Element Kohlenstoff und seine Diskriminierungsmöglichkeiten	13
4 Eigenschaften der Steroide	17
4.1 Struktur und Nomenklatur der Steroide	17
4.2 Einteilung der Steroide	21
4.3 Chemische und biochemische Eigenschaften der Steroide	22
4.4 Wirkungs- und Regulationsmechanismus der Steroide	23
4.5 Steroid-Biosynthese	23
4.6 Industrielle Partialsynthese und Einfluss auf das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis der Steroide.....	27
4.7 Steroid-Metabolismus.....	27
5 Androgene	30
5.1 Allgemeines	30
5.2 Charakterisierung der anabolen Wirkung	31
5.3 Regulation und Wirkung der Androgene.....	31
6 Nortestosteron.....	32
6.1 Allgemeine Eigenschaften	32
6.2 Nortestosteron als anaboles Steroid.....	33
6.3 Nortestosteron als Arzneimittel.....	34
6.4 Illegale Anwendung.....	34
6.5 Biosynthese von Nortestosteron.....	35
6.6 Vorkommen von Nortestosteron.....	39
7 Analytik von Nortestosteron.....	41
7.1 Quantitative Methoden	41
7.2 Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses	44
8 Messtechnik der GC/C/IRMS	45
8.1 Messprinzip.....	45
8.2 Kalibrierung des CO_2 -Referenzgases.....	47

8.3	Probenaufbereitung für die GC/C/IRMS Analytik	47
8.4	Derivatisierung für die GC/C/IRMS-Analytik	47
8.5	Verhalten der Substanzen auf der GC-Säule	49
9	Zielsetzung	53
Ergebnisse und Diskussion		55
10	Einleitung und Überblick	55
11	Methodenentwicklung der Messmethoden	55
11.1	Ermittlung und Optimierung der GC-Parameter	55
11.2	GC/C/IRMS Parameter	61
11.3	Einflüsse der Messtechnik auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert	65
12	Ermittlung des Probenmaterials und der Kontrollmaterialien	68
12.1	Probenmaterial	68
12.2	Festlegen des Precursors von Nortestosteron	69
12.3	Kontroll- oder Blankurin mit Standards	70
13	Entwicklung der Aufarbeitungsmethode	72
13.1	Einleitung	72
13.2	Hydrolyse mit β -Glucuronidase aus <i>Helix pomatia</i>	73
13.3	Hydrolyse mit β -Glucuronidase aus <i>E.coli</i>	78
13.4	Vergleich der Hydrolyse mit β -Glucuronidase aus <i>Helix pomatia</i> und <i>E.coli</i>	79
13.5	Methanolyse	80
13.6	Clean up mit Hydrolyse und Flüssig-/Flüssigextraktion	81
13.7	Semipräparative NP-HPLC-Fraktionierung	83
13.8	Semipräparative RP-HPLC-Fraktionierung	85
13.9	Einflüsse der HPLC-Säulen auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert	86
13.10	Überprüfung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Fraktionierung durch die Aufarbeitung	87
13.11	Reinheitskontrolle der GC-Signale nach der Aufarbeitung	88
14	Ergebnisse der entwickelten Methode	93
14.1	Ermitteln der Vorstufe und der Metabolite im Eberurin	93
14.2	Konzentration von Nortestosteron im Urin	101
14.3	Konzentration von DHEA im Urin	105
14.4	Konzentration von Nortestosteron im Fleisch	106
14.5	Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Futters	107
14.6	Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Nortestosteron und DHEA im Urin	108
14.7	Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Futters im Vergleich zu den Steroiden im Urin	114
14.8	Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der im Handel erhältlichen Nortestosteronprodukte	115
14.9	Bestimmung des pH-Wertes des Urins	117
14.10	Bestimmung der Wasserlöslichkeit von Nortestosteron	117

14.11	Ermitteln der Bezugssubstanz Kreatinin	118
15	Validierung und Qualitätssicherung.....	121
15.1	Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	121
15.2	Validierung und Qualitätssicherung der Aufarbeitungsmethode	122
15.3	Prüfung auf ¹³ C/ ¹² C-Fraktionierung.....	126
15.4	Validierung und Qualitätssicherung der GC/C/IRMS-Messtechnik.....	127
16	Verwendete Software.....	132
17	Abschließende Diskussion mit Ausblick	133
	Experimenteller Teil.....	136
18	Methodenentwicklung	136
18.1	Chemikalien	136
18.2	Standardsubstanzen	136
18.3	Kleingeräte.....	136
18.4	Herstellen der Lösungen	137
18.5	GC-FID-Messungen	140
18.6	GC/C/IRMS-Messungen.....	141
18.7	GC-MS-Messungen.....	142
18.8	Probenaufarbeitung.....	142
18.9	Enzymatische Hydrolyse	147
18.10	Methanolyse.....	148
18.11	Bestimmung von Nortestosteron im Fleisch mittels ELISA	149
19	Identifizierung der Steroide	149
19.1	Chemikalien	149
19.2	Bestimmung der Steroide im Eberurin.....	149
20	Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Futters und der Standardsubstanzen	150
20.1	Chemikalien und Kleingeräte.....	150
20.2	EA/IRMS-Messungen.....	151
21	Bestimmung anderer Parameter	151
21.1	Chemikalien und Kleingeräte.....	151
21.2	pH-Wert.....	151
21.3	Wasserlöslichkeit	151
22	Kreatinin	152
22.1	Chemikalien und Kleingeräte.....	152
22.2	Herstellen der Lösungen	153
22.3	Bestimmung von Kreatinin.....	154
23	Darstellung der Substanzen.....	155
	Literaturverzeichnis	168

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Aufarbeitungsmethode zur komponentenspezifischen Kohlenstoffisotopenmessung von Nortestosteron und dessen Precursor Dehydroepiandrosteron (DHEA) im Eberurin entwickelt.

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten und einen Futtereinfluss auszuschließen, erhielten die Eber ein einheitliches standardisiertes Futter aus C3-Pflanzen.

Die aufgereinigten Eberurinextrakte wurden underivatisiert mit kalter On Column Technik auf das GC/C/IRMS-System aufgegeben. Das erarbeitete Aufreinigungsverfahren lieferte genügend reine Extrakte, so dass die Peaks von Nortestosteron und DHEA in der Gaschromatographie frei waren von co-eluierenden Matrixbestandteilen. Die beiden Substanzen konnten Basislinien getrennt detektiert werden, so dass zuverlässige $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron und DHEA erhalten werden konnten.

Die aufgereinigten Extrakte, die für die Bestimmung des Kohlenstoffisotopenverhältnisses eingesetzt wurden, konnten direkt für die Quantifizierung von Nortestosteron und DHEA mittels GC/FID verwendet werden.

Um für die GC/C/IRMS-Messung geeignete Extrakte zu erhalten, wurde eine Flüssig-/Füssigextraktion mit anschließender präparativer HPLC-Aufreinigung durchgeführt. Während für Nortestosteron die NP-HPLC-Aufreinigung zu einem geeigneten Extrakt führte, musste für DHEA eine weitere RP-HPLC-Aufreinigung an die NP-HPLC-Aufreinigung angeschlossen werden.

Die Steroid-glucuronide wurden mit β -Glucuronidase aus dem Schneckenschleim der *Helix pomatia* gespalten. Die verwendete Enzymzubereitung spaltete jedoch weder Nortestosteron- noch DHEA-sulfat. Im Eberurin konnten keine Substanzen nachgewiesen werden, aus denen die Steroide Nortestosteron und DHEA durch die Zubereitung der *Helix pomatia* als Artefakt hätten entstehen können.

Die Nortestosteronkonzentration im Eberurin wurde mit einer Spanne von 34,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bis 1112,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Median: 224,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) bestimmt, wobei der meiste Anteil ungebunden vorlag. Der Median des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von Nortestosteron lag bei -26,47 ‰.

Das Vorläufersteroid DHEA bei der Nortestosteronbiosynthese wurde mit einer Konzentration im Eberurin von 196,0 µg/kg bis 5184,0 µg/kg ermittelt. Der Median lag mit 556,0 µg/kg deutlich über der Konzentration von Nortestosteron, was durch den im Schwein dominierenden Delta 5-Biosyntheseweg erklärt werden kann. Der Median des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von DHEA lag bei -26,63 ‰.

Vergleicht man den gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Futters der Eber von -25,91 ‰ mit den gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von Nortestosteron und DHEA, spiegelt sich die isotopische Kohlenstoffzusammensetzung des Futters in denen der Steroiden wieder.

Ebenfalls konnten die Kohlenstoffisotopenverhältnisse einiger synthetischer Nortestosteronpräparate bestimmt werden.

Zusätzlich konnten im Eberurin die weiteren Steroide Norandrostendion, Testosteron, Epitestosteron, Etiocholanolon, 5-Androsten-3 β ,17 β -diol, 5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol, 11-Ketoetiocholanolon, Estren-5(10)-3 α ,17 β -diol und das Eberpheromon 5 α -Androst-16-en-3 β -ol nachgewiesen werden.

Kreatinin erwies sich als ein geeigneter Bezugsparameter, der unabhängig von der aufgenommenen Wassermenge vor der Schlachtung ist. Kreatinin zeigte mit Nortestosteron und DHEA eine Korrelation.

Um mit der Methode der Stabilisotopen-Massenspektrometrie eine illegale Anwendung von Nortestosteron an Ebern nachweisen zu können, sind noch weitere Untersuchungen im Rahmen von Tierversuchen notwendig. Eber unbekannter Herkunft und unbekannter Fütterung müssen mit synthetischem Nortestosteron behandelt und die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron und DHEA oder eines anderen Vorläufers bestimmt werden. Zusätzlich müssen die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der auf dem internationalen Markt befindlichen Nortestosteronpräparate bestimmt werden, was sich im Rahmen der Arbeit als äußerst schwierig herausstellte.

Obwohl die Stabilisotopen-Massenspektrometrie eine sehr komplexe Methode ist, hat sie bereits in anderen wissenschaftlichen Gebieten wie beispielsweise der Forensik, Archäologie und den Umweltwissenschaften Einzug gehalten und wird in der Lebensmittelanalytik vermehrt zur Authentizitätsanalyse eingesetzt.

Abstract

This thesis describes a clean-up procedure and analytical method for the compound-specific isotopic measurement of nortestosterone and its precursor dehydroepiandrosterone (DHEA) from urine of boars. The results were obtained with this method.

To investigate the influence of individual animals and to exclude the influence by the diet, a group of boars of different breed were fed with a standardised C3-plant diet. The boars' urine was firstly treated with β -glucuronidase from *Helix pomatia* to hydrolyse glucuronides of the steroids. The resulting solution was subjected to a liquid/liquid extraction and a normal-phase HPLC clean-up step to achieve a matrix-free nortestosterone peak. For DHEA it was necessary to apply an additional reversed-phase HPLC clean-up step. The cleaned extracts were injected without derivatization of the steroids by cold on-column injection into the GC/C/IRMS system. The developed clean-up procedure provided a sufficiently clean extract for reliable nortestosterone and DHEA carbon isotope measurements with baseline separation of these analytes and also allowed to detect more steroids like norandrostendione, testosterone, epitestosterone, etiocholanolone, 5-androsten-3 β ,17 β -diol, 5 β -androstan-3 α ,17 β -diol, 11-ketoetiocholanolon, estren-5(10)-3 α ,17 β -diol and 5 α -androst-16-en-3 β -ol. The extracts were also used for quantitative measurements by GC/FID. It could be shown that the major part of nortestosterone in the boars' urine was unconjugated, while DHEA was found exclusively as glucuronide.

The concentration of nortestosterone in the boars' urine had values between 34.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 1112.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The median was 224.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and the median of the $\delta^{13}\text{C}$ value of nortestosterone was -26.47 ‰. The concentration of DHEA, which originates from the delta 4-pathway of swines, was between 196.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 5184.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ with a median of 556.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The median of the $\delta^{13}\text{C}$ value of DHEA was -26.63 ‰. Both, the $\delta^{13}\text{C}$ values of nortestosterone and of DHEA reflect the isotopic composition of the boars' feed, which had a $\delta^{13}\text{C}$ value of -25.91 ‰.

Seven different commercially available synthetic nortestosterone standards or preparations had $\delta^{13}\text{C}$ values between -29.65 ‰ and -29.13 ‰. Just one (-27.28) was in the range of natural testosterone of boars' urine between -27.53 ‰ and -24.14 ‰. However, it still needs a higher degree of analytical validation and further animal experiments with applying synthetic nortestosterone and different diets before an illicit application of nortestosterone to boars can be reliably detected.

Abkürzungen

ALZ	Ausschusses für Leistungsprüfungen und Zuchtwertfeststellung beim Schwein
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
C	Combustion
CAM	Crassulacean Acid Metabolism
CPTMDS	Dicyanopropyltetramethyldisiloxan
CSIA	Component-specific isotope analysis
$\Delta 5$	Doppelbildung an C-5 im Kohlenstoffgerüst
DE	Deutsche Edelrasse
DL	Deutsche Landrasse
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dot	dotiert
DSHS	Deutsche Sporthochschule Köln
DU	Duroc
EA	Element-Analyser
ECD	Elektroneneinfangdetektor (Electron Capture Detector)
E.coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
ESTD	externer Standard
FID	Flammenionisations-Detektor
GC	Gaschromatographie
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
HFB	Perfluorbutyrat
HP	Helix pomatia
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HMG-CoA	β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA
HDS	Hydroxysteroiddehydrogenase
ID	Innendurchmesser
IAEA	International Atomic Energy Agency
IAC	Immuno Affinity Chromatography
IRMS	Isotope Ratio Mass Spectrometrie
IUPAC-IUB	International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry

LC	Liquid Chromatography
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LH	Luteinisierendes Hormon
LLE	Liquid/liquid extraction
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometer
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert)
NBS	National Bureau of Standards
NP	Normalphase
NRKP	Nationaler Rückstandskontrollplan
NOR	Nortestosteron
OC	On Column
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PDB	Pee Dee Belemnite
PGA	Phosphoglycerinaldehyd
Pi	Pietrain
RIA	Radio Immuno Assay
RP	Reversed Phase
RT	Retentionszeit
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
sH	saure Hydrolyse
SPE	solid phase extraction
SSL	Split Splitless Injektor
β-RVC	Rotation Vacuum Concentration (Konzentrationszentrifuge)
s	Standardabweichung
TFA	Trifluoacetat
TMS	Trimethylsilyl-
tBDMS	tert.-Butyldimethylsilyl-
UDP-GA	Uridin-5'-Diphospho-α-D-Glucuronsäure
V-PDB	Vienna-Pee Dee Belemnite
VK	Variationskoeffizient
WADA	World Anti-Doping Agency
WDF	Wiederfindung
x_{MW}	Mittelwert
ZDS	Zentralverbandes der Deutschen Schweineproduktion

Theoretischer Teil

1 Einleitung

Nortestosteron zählt wie Testosteron zu den Steroiden mit anaboler Wirkung. Im Jahr 1999 wurde 17 β -Nortestosteron (Trivialname: Nandrolon, im folgenden Nortestosteron genannt) in der Zahnpasta des Leichtathleten Dieter Baumann nachgewiesen. Er wurde deshalb wegen Verdacht des Dopings vom Leichtathletik-Weltverband gesperrt. Mit dem „Fall Baumann“ oder auch der „Zahnpastaaffäre“ wurde Nortestosteron der breiten Öffentlichkeit als Dopingmittel bekannt.

Wegen der Protein aufbauenden (anabolen) Wirkung wird es im Humansport^{1,2} und im Pferdesport³ illegal zur Leistungssteigerung verabreicht.

Auch bei Masttieren wurde Nortestosteron als Masthilfsmittel nachgewiesen. In der Europäischen Union darf Nortestosteron, unabhängig eines synthetischen oder physiologischen Ursprungs, bei Lebensmittel liefernden Tieren nicht angewendet werden⁴. Bei Untersuchungen im Rahmen des Nationalen Rückstandskontrollplanes⁵ wurde 1999 bei fünf Rindern und 2005 bei einem Mastschwein ein erhöhter Nortestosterongehalt festgestellt. Eine rechtliche Beurteilung dieser Befunde war jedoch nicht möglich, da man analytisch nicht zwischen exogenem und endogenem Nortestosteron unterscheiden konnte.

Bis in die 80iger Jahre zählte Nortestosteron auch in der lebensmittelrechtlichen Beurteilungspraxis zu den synthetischen Steroiden, die nur exogen dem Organismus zugeführt werden können. Der alleinige Nachweis von Nortestosteron in der zu untersuchenden Tierprobe galt als Beweis einer illegaler Anwendung.

Jedoch liegen bereits seit den 70iger Jahren Studien dazu vor, die Nortestosteron beim Pferd⁶, beim Eber⁷, beim Affen⁸ und bei der Maus⁹ als ein physiologisches endogenes Steroid beschreiben.

Erst in der jüngsten Vergangenheit wurden vermehrt Untersuchungen zu Nortestosteron durchgeführt, die das physiologische Vorkommen von Nortestosteron nicht nur beim Pferd^{10,11,12,13}, sondern auch beim Menschen^{14,15,16,17} und beim Hund¹⁸ zeigen. Auffallend ist, dass beim Eber^{7,19,20,21,22,23,24,25,26,27} die höchsten physiologischen Nortestosterongehalte nachgewiesen wurden.

Studien zeigen zudem, dass Eber wegen des anabolen Potentials allgemein eine positive Stickstoffretention und eine bessere Futterverwertung haben^{28,29,30}, so dass eine illegale Anwendung von Nortestosteron aus ökonomischen und ökologischen Gesichtspunkten als Masthilfsmittel denkbar ist.

Da physiologisches und synthetisches Nortestosteron strukturell identisch sind, war eine Unterscheidung zwischen exogenem und endogenem Nortestosteron und damit ein Nachweis der illegalen Anwendung in der Tiermast mit den vorherrschenden Untersuchungsmethoden in der Lebensmittelanalytik bis jetzt unmöglich.

Selbst ein Schwellenwert, oberhalb dessen ein Nachweis illegaler Anwendung erbracht werden könnte, ist wegen der hohen Schwankungsbreite der Nortestosteron-gehalte im Eber nicht anwendbar.

Mit der Stabilisotopen-Massenspektrometrie (Isotope Ratio Mass Spectrometry = IRMS) gibt es nun eine analytische Methode, physiologische und synthetische Substanzen aufgrund der unterschiedlichen Isotopenzusammensetzung voneinander zu unterscheiden.

Das erste Massenspektrometer (Thomsonscher Parabelversuch)^{31,32} wurde in den 20iger Jahren von Sir J.J. Thomson zur Messung der isotopischen Häufigkeit der Elemente entwickelt³³. Es war sozusagen das erste Stabilisotopen-Massenspektrometer, das mit der Weiterentwicklung durch Nier et al.^{34,35} und weiteren damaligen Wissenschaftlern^{36,37} den Vorreiter der heutigen Stabilisotopen-Massenspektrometern darstellte. Die Stabilisotopen-Massenspektrometrie wird auch Isotopenverhältnismassenspektrometrie stabiler Isotope genannt.

Wird dem Stabilisotopen-Massenspektrometer als zusätzliche Peripherie eine gaschromatographische Trennung vorgeschaltet, wird eine komponentenspezifische Analyse, eine so genannte „compound-specific isotope analysis“, kurz CSIA ermöglicht. Die Möglichkeit dieser gaschromatographischen Trennung erfolgte erst 1978 durch Matthews und Hayes³⁸.

Die analytischen Anwendungsmöglichkeiten der Stabilisotopen-Massenspektrometrie sind neben Kohlenstoff ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$) auch bei den Elementen Wasserstoff ($\text{D}/^1\text{H}$), Sauerstoff ($^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$), Stickstoff ($^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$) und Schwefel ($^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$) gegeben. Die Stabilisotopen-Massenspektrometrie, die den Ursprung in der Geochemie hatte³⁹, hat

bereits weite Bereiche der Wissenschaft wie beispielsweise die Biologie⁴⁰, Umweltwissenschaft^{41,42}, Archäologie⁴³, Klimatologie⁴⁴ und Forensik⁴⁵ durchdrungen. Auch in der Lebensmittelchemie^{46,47,48,49} wird die Stabilisotopen-Massenspektrometrie als analytische Methode zur Authentizitätsbestimmung vermehrt angewendet.

Zur Bestimmung der Herkunft organischer Komponenten ist die Stabilisotopen-Massenspektrometrie die einzige Methode, mit der die charakteristische Kohlenstoffisotopenzusammensetzung, das isotopische „Fingerprint“, bestimmt werden kann⁵⁰. Durch den biosynthetischen Einbau der Kohlenstoffatome ¹³C und ¹²C in das Molekül unterliegt die Isotopenzusammensetzung der Steroide natürlichen Variationen.

In dieser Arbeit wird jedoch nur auf das Element Kohlenstoff eingegangen.

2 Ebermast

In Ländern wie Großbritannien, Spanien und Australien werden Eber zur Fleischproduktion verwendet^{51,52}. Dies hat seine Berechtigung, denn der Eber weist (1) eine bessere Stickstoffretention und die damit verbundene (2) geringere Stickstoffaufbringung auf landwirtschaftlich genutzte Flächen, sowie (3) eine bessere Mast- und Schlachtleistung als kastrierte männliche Schweine (Börge) auf.

Bei Schweinen gilt als Maßstab für den Proteinansatz und das damit verbundene anabole Potential die Stickstoffbilanz oder auch Stickstoffretention. Darunter versteht man die Differenz zwischen Stickstoffaufnahme und -ausscheidung.

Die Stickstoffbilanzen^{28,53,54,55} der Eber liegen, abhängig von der Züchtung, zwischen 21,2 und 35,0 g N/d. Demgegenüber liegen die Stickstoff-Bilanzen des Kastraten zwischen 16,4 und 22,3 g N/d.

Die bessere Mastleistung^{30,56} der Eber liegt an den körpereigenen anabolen Gonadenhormonen²⁹. Eber nehmen grundsätzlich bei einer *ad libidum*-Fütterung (bis zur Sättigung) weniger Futter zu sich als Kastraten. Es wird von einer reduzierten Futteraufnahme in Höhe von 6,5%⁵⁷ und 12,5%⁵⁶ berichtet. Bei einer zusätzlichen Gabe von Hormonen wird ebenfalls bei einer *ad libidum*-Fütterung sogar eine um bis zu 21% reduzierte Futteraufnahme⁵⁸ beschrieben. Trotz der geringeren Futteraufnahme haben Eber eine bessere Futtermittelnutzung^{29,30,57,59,60}. Der wirtschaftliche Vorteil (Kastrationskostensparnis ist dabei noch nicht berücksichtigt) der Ebermast liegt auf der Hand. Kastraten können zwar das niedrigere Wachstumspotential durch

gesteigerte *ad libidum* Futteraufnahme kompensieren, das sich aber in einem vermehrten Fettansatz äußert.

Im Schlachtkörper weisen Eber im Vergleich zum Kastraten einen um 5% höheren Fleischanteil und einen um 8% geringeren Fettanteil auf⁶¹. Dies wird im Rücken- und Seitenspeck deutlich⁵⁷.

Nicht zuletzt soll auf den Tierschutz in Bezug auf die Kastration bei der Kastratenmast aufmerksam gemacht werden. Ohne Betäubung werden der Hodensack aufgeschnitten, die Hoden entfernt und der Samenstrang der Ferkel durchtrennt. In Norwegen gilt ab 01. Januar 2009 ein Totalverbot der Kastration und auch in der Schweiz darf die Ferkelkastration ab 2009 nur unter Betäubung durchgeführt werden⁵². In Deutschland ist die Kastration männlicher Ferkel jedoch die Regel.

Der Ebergeruch des zum Verzehr kommenden Fleisches ist der ausschlaggebende Nachteil für den Verbraucher. In der Fleischhygiene-Verordnung⁶² ist der Grenzwert für 5 α -Androst-16-en-3-on (5 μ g/g Fett) festgelegt, oberhalb dessen das Fleisch als untauglich beurteilt wird und verbrannt werden muss. Durch die Kastration tritt dieser beim männlichen Schwein vorkommende typische Geschlechtsgeruch, der durch das Pheromon 5 α -Androst-16-en-3-on (kurz Androst-16-en-3-on oder Androstanon) verursacht wird, nicht mehr auf. Die Eberpheromone haben einen steroidal Aufbau und tragen zum typischen Geruch des Ebers bei, wobei das Androst-16-en-3-on das geruchsintensivste Pheromon darstellt. Die Biosynthese der Pheromone findet im Hoden statt. Sie werden über das Blutplasma zu den Speicheldrüsen transportiert, wo sie als Geruchsstimulans für die Sau dienen. Die Pheromone reichern sie sich im gesamten Fettgewebe an^{29,63}. Skatol ist ein weiteres Pheromon, das zur Geruchsbeeinträchtigung beiträgt. Es kommt im Fettgewebe von Kastraten und Sauen vor. In der Fleischhygiene-Verordnung wird diese Substanz nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse einer internationalen Verbrauchenumfrage zeigten, dass die sensorische Wahrnehmung von Androst-16-en-3-on und Skatol bei Personen aus verschiedenen europäischen Ländern sehr unterschiedlich ist. Während Androst-16-en-3-on von gar nicht wahrnehmbar bis stechend, urin- und/oder schweißartig von den beteiligten Personen beschrieben wird, wird Skatol von allen als unangenehm wahrgenommen^{64,65}. Der Nachteil des Eberfleisches durch den Geruch wird nicht nur durch Androst-16-en-3-on hervorgerufen, sondern zusätzlich durch Skatol, das durch die Kastration jedoch nicht beseitigt werden kann.

3 Chemie der Stabilisotopen

3.1 Begriffe

3.1.1 Isotope

Isotope sind Nuklide gleicher Kern- oder Ordnungszahl (Z), also gleicher Anzahl an Protonen, aber einer unterschiedlichen Anzahl an Neutronen, woraus eine unterschiedliche Massenzahl resultiert. Die Massen der Nuklide werden als relative Größe in Bezug zum Kohlenstoffisotop ^{12}C angegeben, dessen relative Masse gleich 12 gesetzt wird⁶⁶.

Isotope werden in stabile (z.B. ^{12}C , ^{13}C) und radioaktive (^{14}C) Isotopen unterteilt.

Da die natürlich vorkommenden Elemente wie der Kohlenstoff im allgemeinen Gemische mehrerer Atome unterschiedlicher Masse (Mischelemente) sind, kommt dem Element die mittlere relative Atommasse (M) zu⁶⁷. Sie berechnet sich aus den relativen Isotopenmassen M_i sowie den prozentualen Häufigkeiten ω_i der Elementisotope i .

$$M = \sum_i \omega_i M_i / 100$$

Die unterschiedliche Neutronenzahl im Kern des Atoms wirkt sich nicht nur auf die Masse, sondern auch auf die Symmetrie der Kerne und der Elektronenhülle aus. Diese bedingt wiederum Unterschiede in intra- und intermolekularen Bindungskräften⁶⁸.

3.1.2 Isotopomere

Isotopomere haben die gleiche Anzahl der Isotope im Molekül, unterscheiden sich in der Position der Isotope. Isotopomere sind entweder Konstitutionsisomere oder isotopische Stereoisomere⁶⁹.

3.1.3 Isotopologe

Isotopologe unterscheiden sich in ihrer isotopischen Zusammensetzung in der Art und der Anzahl der isotopischen Substituenten (z.B. $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$)^{68,69}.

3.1.4 Isotopeneffekte

Wenn unterschiedliche Moleküle einer Verbindung, die sich voneinander durch Isotopomere oder Isotopologe unterscheiden, ein unterschiedliches Reaktionsverhalten zeigen, bezeichnet man dies als Isotopeneffekte und deren Auswirkungen in lebenden Systemen als Isotopendiskriminierungen. Insbesondere sind die thermodynamischen Isotopeneffekte (Quotienten von Gleichgewichtskonstanten bei chemischen und physikalischen Gleichgewichten) und kinetische Isotopeneffekte (Quotienten von Gleichgewichtskonstanten isotopomerer/ isotopologer Moleküle bei chemischen Reaktionen) von Interesse⁶⁸. Die Begriffe Isotopenfraktionierung oder Isotopendiskriminierung beschreiben demnach eine „Entmischung“ von isotopisch verschiedenen Molekülen während einer physikalischen oder (bio-)chemischen Reaktion.

3.1.5 Delta-Wert (δ)

Die aufgrund von Isotopeneffekten zu beobachtenden Veränderungen von Isotopenhäufigkeiten sind so gering, dass man dafür den δ -Wert, ausgedrückt in Promille, verwendet. Es können so Differenzen in der Isotopenzusammensetzung bis in die dritte und vierte Stelle angezeigt werden⁷⁰. Der δ -Wert ist die Differenz der Isotopenverhältnisse R (R = ratio) von der Probe P und einem internationalen Standard (St) relativ zu diesem Standard. Das Isotopenverhältnis stellt das Konzentrationsverhältnis eines Isotops zum Hauptisotop dar^{68,71} (**Gleichung**). Das Isotopenverhältnis wird als Verhältnis des schwereren zum leichteren Isotop berechnet⁶⁶.

$$\delta_p = \frac{R_p - R_{St}}{R_{St}} \cdot 1000$$
$$= \left(\frac{R_p}{R_{St}} - 1 \right) \cdot 10^3$$

mit $R_p = \frac{\text{absolute Menge des schwereren Isotops der Probe}}{\text{absolute Menge des leichteren Isotops der Probe}}$

Für das Element Kohlenstoff wird der internationale Standard Vienna-PeeDee Belemnite (V-PDB) von der International Atomic Energy Agency (IAEA) in Wien als Bezugsstandard festgelegt. Dieser Standard ersetzt das nicht mehr vorhandene fossile Material PDB, das per definitionem einen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von 0 ‰ hat^{39,72}. Das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis wurde von Craig⁷³ mit $R = 0,0112372$ gemessen. PDB war ein kreidehaltiger Belemnite (Belemnite americana) aus der PeeDee Formation in South Carolina. V-PDB stellt einen gegen PDB vermessenen standardisierten

Muschelkalk NBS-19 dar, dessen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert mit +1,95 ‰ definiert wurde^{74,75}. Das absolute Isotopenverhältnis von NBS-19 wurde nicht bestimmt⁷⁵. Zhang et al.⁷⁶ berichten für V-PDB ein international anerkanntes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von $R = 0,0111802$.

3.2 Isotopendiskriminierung

Der Isotopendiskriminierung oder Isotopenfraktionierung liegen allgemein zwei Isotopeneffekte zugrunde:

1. Die mittlere kinetische Energie wird durch die Temperatur ($kT = 1/2mv^2$ mit k = Boltzmann Konstante, T = absolute Temperatur, m = Molekülmasse, v = durchschnittliche Molekülgeschwindigkeit) bestimmt. Schwere Moleküle sind deshalb langsamer, die Kollisionswahrscheinlichkeit und damit die Reaktionsgeschwindigkeit mit anderen Molekülen nimmt ab^{77,78}.
2. Schwere Moleküle haben eine höhere Bindungsenergie, da sie tiefer im Potentialtopf (**Abbildung 3.2-1**) sitzen (E_H)⁷⁹. Es gibt aber auch Ausnahmen, bei der die leichteren Moleküle tiefer im Potentialtopf sitzen und die Bindungsenergie der leichteren Moleküle größer und der Partialdruck dann kleiner ist. Man nennt dies Inversen Isotopeneffekt. Diese Ausnahme ist zum Beispiel bei Raumtemperatur bei CO_2 der Fall, dessen schweres Isotop $^{13}\text{CO}_2$ einen höheren Dampfdruck in der flüssigen Phase und eine geringere Löslichkeit im Wasser aufweist^{77,78}.

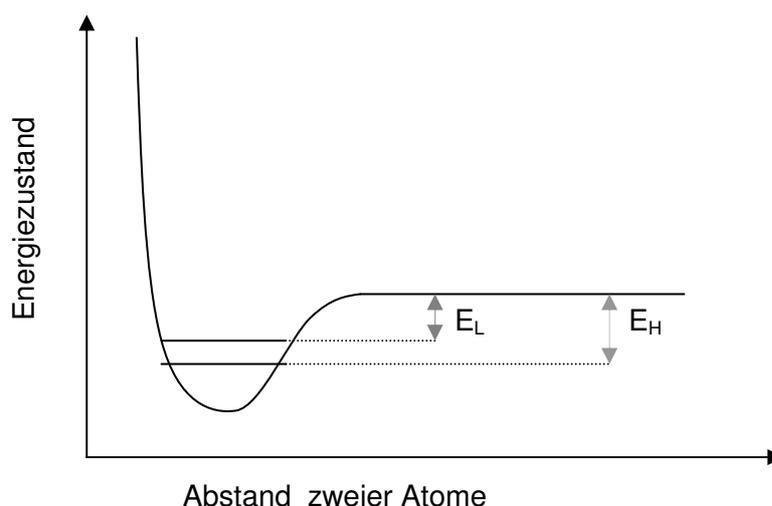


Abbildung 3.2-1: Schematische Potentialkurve der Energie eines zweiatomigen Moleküls als Funktion des Abstandes beider Atome, nach⁶¹, E_H =Energie des schweren Isotops, E_L =Energie des leichten Isotops

Man unterscheidet bei der Isotopenfraktionierung zwischen einem kinetischen Isotopeneffekt und einem thermodynamischen Isotopeneffekt. Der kinetische Effekt tritt bei irreversiblen (one-way) physikalischen oder chemischen Prozessen auf. Als Beispiel sei die Diffusion von Gasen oder der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei enzymkatalysierten Reaktionen zu nennen. Der thermodynamische Effekt tritt beim Isotopenaustausch in einer Gleichgewichtsreaktion auf^{71,77,78,80}.

Im Gegensatz zu Fraktionierungen durch den thermodynamischen Effekt, sind Fraktionierungen durch den kinetischen Effekt nicht additiv. Verläuft eine Reaktion quantitativ, in der alle Edukte ohne Verluste zu Produkten umgewandelt werden, findet keine Fraktionierung statt⁸¹.

3.3 Das Element Kohlenstoff und seine Diskriminierungsmöglichkeiten

3.3.1 Vorkommen

Kohlenstoff hat natürlicherweise die Isotopenzusammensetzung mit der Häufigkeit von 98,89 % ^{12}C und von 1,11 % ^{13}C ⁷¹, neben Spuren des radioaktiven Isotops ^{14}C ⁶⁷. Die Variationen in der Zusammensetzung sind sehr vielfältig. Sie reichen von der reduzierten Form in der Biosphäre bis zur oxidierten Form hauptsächlich als Carbonate. Aufgrund der Vielzahl von Oxidations- und Bindungszuständen des Kohlenstoffes, ist dieser zur Isotopenfraktionierung prädestiniert. Die **Abbildung 3.3-1** zeigt die wichtigsten Kohlenstoffreservoirs mit der natürlichen Variationsbreite der Isotopenzusammensetzung bzw. des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes. Der Abbildung sind die wichtigsten Kohlenstoffreservoirs wie organisches, sedimentäres Material, fossile Brennstoffe wie Kohle oder Öl, tierische und pflanzliche Organismen, Süßwasser-, marine und nichtmarine Karbonate und Luft- CO_2 zu entnehmen⁷¹.

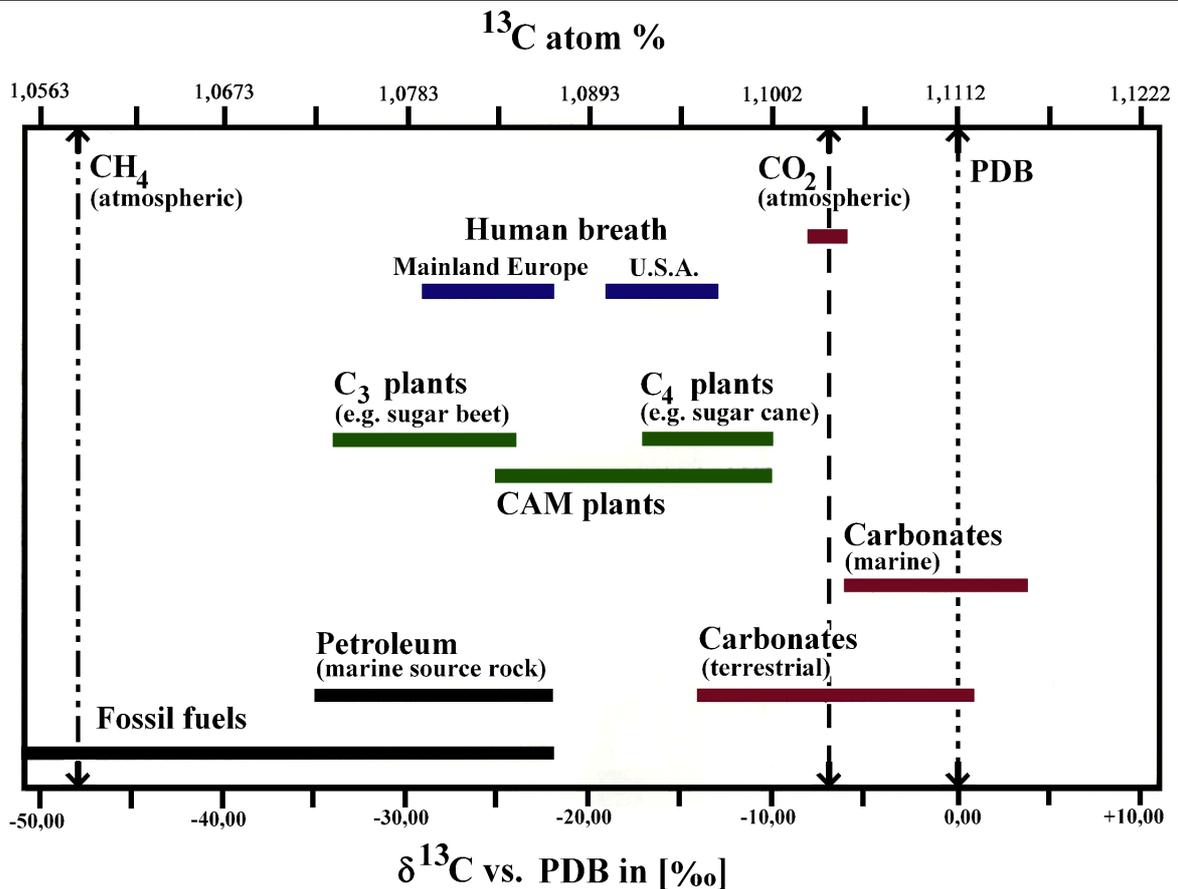


Abbildung 3.3-1 natürliche Kohlenstoffverteilung der Erde, nach⁵⁰

Die höchsten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zeigen marine Carbonate. Infolge des Austauschgleichgewichts im Wasser ($\text{H}^{12}\text{CO}_3^- + {}^{13}\text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{H}^{13}\text{CO}_3^- + {}^{12}\text{CO}_2$) reichert sich ${}^{13}\text{C}$ im Bicarbonat gegenüber dem CO_2 der Atmosphäre an. Organische Moleküle wie CH_4 können auf anorganischem Wege ($\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightleftharpoons \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$) gebildet werden, wobei sich ${}^{12}\text{C}$ in CH_4 anreichert.

Im Vergleich zu Carbonaten wird bei grünen Pflanzen durch die Photosynthese das leichte Isotop ${}^{12}\text{C}$ in der Materie stärker angereichert bzw. ${}^{13}\text{C}$ abgereichert. Dieser angereicherte bzw. abgereicherte Isotopengehalt gelangt über die Nahrungskette in die Tierwelt⁸².

Der Kohlenstoff ist seit der Entstehung der Erde einem Gleichgewicht unterworfen, so dass sich eine $\delta^{13}\text{C}$ -Wertänderung von Luft- CO_2 mit der Zunahme der industriellen Aktivität von -6,4 ‰ (1956) auf -7,0 ‰ (1978)⁸³ bzw. -7,9 ‰ (1982)⁸¹ beobachten lässt.

3.3.2 Isotopenfraktionierung bei Pflanzen allgemein

Bei Pflanzen tritt zudem eine unterschiedlich starke ^{13}C -Abreicherung zwischen C3-Pflanzen und C4-Pflanzen auf. Der Unterschied der beiden Pflanzenarten besteht darin, dass bei C3-Pflanzen (z.B. Weizen, Soja) das über die Photosynthese aufgenommene CO_2 über einen C3-Körper (Phosphoglycerinaldehyd) und C4-Pflanzen (z.B. Mais, Hirse, Zuckerrohr) über einen C4-Körper (Oxalacetat) eingebaut wird. Der mittlere $\delta^{13}\text{C}$ -Wert liegt bei C3-Pflanzen bei -25‰ , bei C4-Pflanzen -12‰ ⁷⁷. Während C3-Pflanzen mit der CO_2 -Aufnahme eine ^{13}C -Abreicherung erfahren, wird bei C4-Pflanzen ^{13}C angereichert.

Die größte Fraktionierung während der biologischen Kohlenstofffixierung geschieht zum einen während der CO_2 -Aufnahme und der interzellularen reversiblen Diffusion von CO_2 in der Pflanze. Zum anderen findet sie während der irreversiblen Biosynthese der zellulären Komponenten statt. Steht der Pflanze eine unbegrenzte Menge an CO_2 zur Verfügung, geschieht die Fraktionierung durch die Enzyme. Die Fraktionierung kann von -17‰ bis -40‰ reichen. Bei hoher CO_2 -Konzentration tritt eine hohe Fraktionierung ein, die Zellen haben sozusagen die Möglichkeit, zwischen ^{12}C und ^{13}C zu wählen. Bei niedriger Konzentration an CO_2 benutzt die Pflanze das komplette ihr zur Verfügung stehende CO_2 ohne Fraktionierung⁸³. Eine Konzentrationsaufnahme von $0,3\%$ CO_2 während der CO_2 -Fixierung verursacht eine Fraktionierung an ^{13}C von -27‰ bis -29‰ ⁸⁴.

3.3.3 Isotopenfraktionierung bei C3-Pflanzen

Atmosphärisches CO_2 wird von der Pflanze über die Stomata aufgenommen. Es liegt in der Zelle im Gleichgewicht mit HCO_3^- vor und gelangt zur äußeren Schicht des Photosyntheseortes, dem Mesophyll der Chloroplasten. Da der Kohlenstoff als CO_2 fixiert wird und die Umwandlung zwischen HCO_3^- und CO_2 in beide Richtungen verläuft, ist diese Fraktionierung nicht sehr wichtig. Im Mesophyll wird das CO_2 sofort durch das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase („RubisCO“) gebunden und über eine hydrolytische Spaltung des C6-Körpers in zwei Phosphoglycerinaldehyd-Moleküle (PGA), einem C3-Körper, zerlegt. Das Enzym „RubisCO“ zieht die Aufnahme von $^{12}\text{CO}_2$ gegenüber $^{13}\text{CO}_2$ vor^{85,86}. Das leichtere $^{12}\text{CO}_2$ wird sofort fixiert und in das erste Folgeprodukt Phosphoglycerat eingebaut. Das nicht verbrauchte $^{13}\text{CO}_2$ wird von der Pflanze wieder ausgeschieden. Der Variationsbereich der ^{13}C -Abreicherung liegt zwischen -20‰ und -30‰ . Dies liegt an der

hohen biochemischen Fraktionierung durch die beteiligten Enzyme, die wiederum vom pH-Wert, der Temperatur, den Metallionen und weiteren Faktoren abhängig sind⁸⁶. Die biochemische Fraktionierung basiert auf den unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten von $^{12}\text{CO}_2$ und $^{13}\text{CO}_2$.

3.3.4 Isotopenfraktionierung bei C4-Pflanzen

C4-Pflanzen hingegen bauen das CO_2 als HCO_3^- durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase über Phosphoenolpyruvat in Oxalacetat (C4-Körper) ein⁸⁷. Der C4-Körper wird aus dem Mesophyll in die innere Schicht der Leitbündelscheiden transportiert. In den Leitbündelscheiden der C4-Pflanze wird CO_2 , das aus Malat freigesetzt wird, angereichert und steht der RubisCO komplett zur Fixierung zur Verfügung. Das CO_2 wird ohne ^{13}C -Abreicherung eingebaut. Die Gesamtfractionierung von ca. -4 ‰ (bei C3-Pflanzen -18 ‰) liegt wegen der wenig durchlässigen Leitbündelscheidenmembran⁸¹ sehr nahe an der diffusiven Fraktionierung⁸³ durch die Luft von -4,4 ‰^{71,77,87}.

Weil CAM-Pflanzen wie beispielsweise die Ananas zwischen C3 und C4 Typus wechseln können, haben die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte eine Variationsbreite von -10 bis -35 ‰.

3.3.5 Abhängigkeit der Isotopenzusammensetzung durch Futter/Ernährung

Die Kohlenstoffisotopenzusammensetzung des aus der Biosynthese entstandenen Materials ist primär abhängig von der ^{13}C -Zusammensetzung der CO_2 -Quelle. Bei Pflanzen spielen deshalb die Isotopeneffekte bei der CO_2 -Assimilation wie oben dargelegt eine wichtige Rolle. Pflanzen und tierische Organismen werden in ihrer Kohlenstoffzusammensetzung zusätzlich durch die Isotopeneffekte, die bei Biosynthese und dem Metabolismus auftreten, festgelegt. Dabei ist die zelluläre CO_2 -Konzentration an den jeweiligen Verzweigungsstellen der Biosynthese und des Metabolismus entscheidend^{71,88}.

So wie bei Pflanzen die Kohlenstoffisotopenzusammensetzung der Pflanzenbestandteile durch die ^{13}C -Zusammensetzung der CO_2 -Quelle bestimmt wird, wird diese bei Tieren und Menschen auch durch die Kohlenstoffisotopenzusammensetzung des Futters bzw. der Lebensmittel bestimmt.

Der Futtereinfluss soll beispielsweise bei der Fettsynthese im folgenden näher erläutert werden. Die Kohlenstoffisotopenzusammensetzung verschiedener Fettsäuren hat sich am Ende einer Futterstudie an Schweinen⁸⁹ zu Gunsten des Isotops ^{13}C ver-

ändert. Die Tiere wurden entweder nur mit C3-Pflanzen oder nur mit C4-Pflanzen gefüttert. Nach dem Erreichen eines Gewichtes von 90 kg wurden die Tiere geschlachtet und sowohl das Fleisch als auch die Knochen wurden zur Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes verwendet. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Fettsäuren der C3-Pflanzen ($\delta^{13}\text{C}_{\text{Bulk}} = -25,3 \text{ ‰}$) wurden bei 16:0 (Palmitinsäure) mit $-31,4 \text{ ‰}$, bei 18:1 (Ölsäure) mit $-29,8 \text{ ‰}$ und bei 18:2 (Linolensäure) mit $-28,9 \text{ ‰}$ gemessen. Bei den C4-Pflanzen ($\delta^{13}\text{C}_{\text{Bulk}} = -12,4 \text{ ‰}$) wurden die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte $-16,5 \text{ ‰}$ bei Palmitinsäure, $-14,2 \text{ ‰}$ bei Ölsäure und $-15,4 \text{ ‰}$ bei Linolensäure gemessen. Bei den Fettsäuren aus den Knochen bei der Fütterung mit C3-Pflanzen wurden $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von $-26,6 \text{ ‰}$ bei der Palmitinsäure, $-25,9 \text{ ‰}$ bei der Ölsäure und $-29,8 \text{ ‰}$ bei der Linolensäure erhalten. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Fettsäuren durch die C4-Pflanzenfütterung wurden jeweils mit $-12,9 \text{ ‰}$, $-12,4 \text{ ‰}$ und $-15,1 \text{ ‰}$ bestimmt⁹⁰. Eine ^{13}C -Anreicherung konnte demnach bei beiden Fütterungsarten festgestellt werden. Der für die Isotopenfraktionierung verantwortliche Schritt liegt bei der Decarboxylierungsreaktion von Pyruvat⁹¹. Da die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Linolensäure keine signifikanten Änderungen zeigen, wird diese ohne Isotopenfraktionierung in die Knochen aufgenommen⁹². Es liegen keine Fettsäuredaten für das Fleisch der Tiere vor.

Ein Futtereinfluss wird auch bei dem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis der Steroide festgestellt. Ferchaud et al.⁹³ zeigten, dass der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert mit Heufütterung (C3-Pflanze) für DHEA zwischen $-25,0 \text{ ‰}$ und $-26,0 \text{ ‰}$ lag und nach der Fütterung mit Mais auf $-20,0 \text{ ‰}$ anstieg. Dies entspricht einer ^{13}C -Anreicherung.

4 Eigenschaften der Steroide

4.1 Struktur und Nomenklatur der Steroide

Die Bezeichnung „Steroide“ leitet sich von Cholesterin (griech: Chole = Galle; stereós = fest) ab^{66,94}. Gemäß der IUPAC-IUB Nomenklatur (International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry) sind Steroide „Verbindungen, die das Gerüst Cyclopentanoperhydrophenanthren besitzen oder eine durch Bindungsspaltung, Ringerweiterung oder Bindungsbildung abgeleitete Form. In der Regel befinden sich die Methylgruppen am Kohlenstoff C-10 und C-13. Eine Alkylseitenkette kann an C-17 lokalisiert sein“⁹⁵. Das tetracyclische Cyclopentanoperhydrophenanthren wird auch Gonan oder Steran genannt. Das Gonan-Grundgerüst ist ein alicyclischer gesättigter Kohlenwasserstoff, bestehend aus drei Cyclohexan-

ringen (A, B und C) und einem endständigen Cyclopentanring (D)⁹⁶. Dieses Ringsystem stellt auch die Grundstruktur des Cholesterins dar. Die **Abbildung 4.1-1** zeigt das allgemeine Gonangrundgerüst der Steroide.

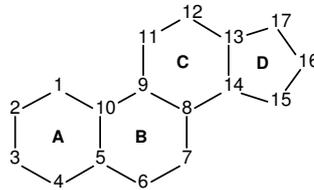
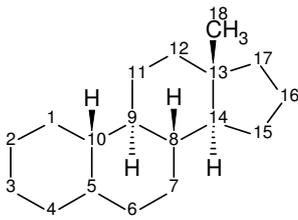


Abbildung 4.1-1: Gonan-Grundgerüst der Steroide

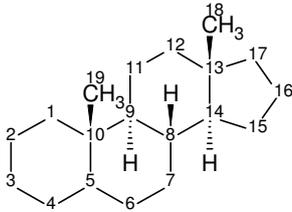
Für die systematische Bezeichnung werden die Namen der Steroide von jeweils einem Grundgerüst abgeleitet und unterscheiden sich durch Doppelbindungen und funktionellen Gruppen, Methylgruppen und Seitenketten⁹⁷. Abhängig von den angularen Methylgruppen an C-10 und C-13 und der Seitenkette an C-17, ergibt sich nach IUPAC Nomenklaturregeln⁹⁵ jeweils ein anderes Grundgerüst für die verschiedenen Steroide⁶⁶. Die Grundgerüste sind: Estran (Östran), 5 α -Androstan (Testan), 5 β -Androstan (Ätiocholan), 5 α -Pregnan (Allopregnan), 5 α -Cholan (Allocholan) und 5 β -Cholestan (Koprostan). Die in Klammern stehen Namen sind die veralteten ungültigen Namen⁶⁶. Zusammenfassend sind diese Grundgerüste in **Abbildung 4.1-2** dargestellt.



5 α / β -Estran

angulare Methylgruppe nur an C-13

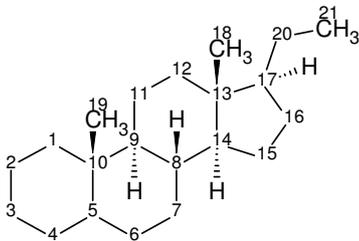
Grundgerüst der Estrogene und deren Derivate (C18-Steroide)



5 α / β -Androstan

angulare Methylgruppe an C-10 und C-13

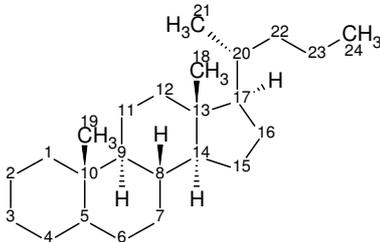
Grundgerüst der Androgene und deren Derivate (C19-Steroide)



5 α / β -Pregnan

angulare Methylgruppe an C-10 und C-13 und CH₂CH₃-Seitenkette an C-17

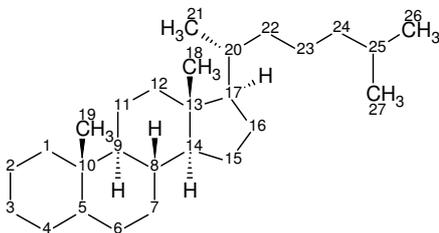
Grundgerüst der Progesterone und deren Derivate (C21-Steroide)



5 α / β -Cholan

angulare Methylgruppe an C-10 und C-13 und CH(CH₃)-(CH₂)₂-CH₃-Seitenkette an C-17

Grundgerüst der Cholsäure und deren Derivate (C24-Steroide)



5 α / β -Cholestan

angulare Methylgruppe an C-10 und C-13 und CH(CH₃)-(CH₂)₃-CH(CH₃)₂-Seitenkette an C-17

Grundgerüst des Cholesterins und seiner Derivate (C27-Steroide)

Abbildung 4.1-2: Grundgerüste der Steroide, nach der IUPAC Nomenklatur⁹⁵

Für jedes Ringpaar AB, BC und CD ist eine *trans*- oder eine *cis*-Verknüpfung möglich. In der **Abbildung 4.1-3** sind die Konformationen der 5α -Isomere und 5β -Isomere dargestellt. Die Konformation der 5α -Reihe und 5β -Reihe wird durch die Verknüpfung der Ringe A und B festgelegt⁹⁸. In der 5α -Reihe sind die Ringe alle *trans* verknüpft und liegen alle in der thermodynamisch stabileren, spannungsfreien Sesselkonformation vor, in der die Methylgruppen und die Wasserstoffatome an der Verbindungsstellen der Ringe eine axiale Position einnehmen^{66,99}. In der 5β -Reihe stehen die Ringe A und B gewinkelt zueinander. Befindet sich zwischen C-5 und C-6 eine Doppelbindung, liegt zwischen den Ringen AB immer eine *cis*-Konformation vor^{96,97}.

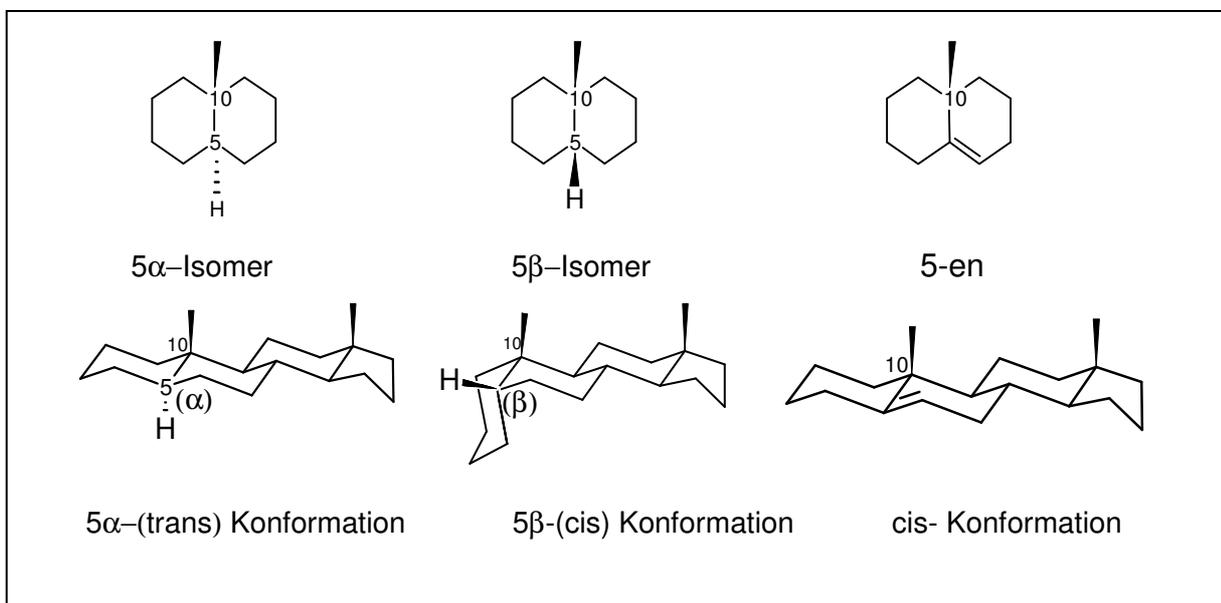


Abbildung 4.1-3: Konformationsformen der Ringe am C-5, nach ^{98,100}

Als Bezugspunkt für die Substituenten wurde die angulare Methylgruppe an C-10 festgelegt. Substituenten, die α -ständig zur Ebene stehen, liegen unterhalb der Ringebene und werden punktiert nach unten, β -ständige Substituenten liegen oberhalb der Ringebene und werden durch eine verdickte Linie aus der Ebene heraus symbolisiert⁹⁹.

Welche Konformation während des Stoffwechsels jeweils gebildet wird, wird durch das beteiligte Enzym bestimmt. Bei den meisten natürlich vorkommenden Steroiden sind die Ringpaare AB, BC und CD *trans* verknüpft. Nur zwischen den Ringen A und B kann die Verknüpfung wie bei den Gallensäuren, die eine *cis-trans-trans*-Verknüpfung aufweisen, verschieden sein⁹⁶. Gallensäuren sind 5β -Cholestan-

derivate. Ausnahme für die *trans*-Verknüpfung der Ringe BC und CD ist das natürlich vorkommende herzwirksame Steroidglykosid Digitoxigenin, das als *cis-trans-cis*-Verknüpfung vorliegt⁹⁸.

Das Fehlen von Methyl- oder Methylengruppen oder Ringerweiterungen werden durch Präfixe gekennzeichnet. Das Präfix „Nor“ benennt eine um eine verminderte Kohlenstoffverbindung, wobei immer die Zahl des C-Atoms oder der Buchstabe des Ringes vorangestellt ist z.B. 19-Nortestosteron: Methylgruppe am C-19 des Testosterons fehlt; A-Nor-Steroid: Ring A besteht nur aus 5 C-Atomen). Mit dem Präfix „Homo“ wird dagegen eine Verbindung bezeichnet, die ein C-Atom mehr besitzt (z.B. D-Homo-Steroid: Ring D besteht aus 6 C-Atomen).

Doppelbindungen werden z.B. mit „4-en“ oder „ Δ^4 “ abgekürzt, wobei die Nummer des C-Atoms, von der die Doppelbindung ausgeht, vorangestellt wird⁶⁶.

4.2 Einteilung der Steroide

Zur Stoffklasse der Steroide gehören Corticoide, Sexualhormone, Gallensäuren, Steroidsapogenine, Steroidalkaloide, Herzglykoside, Sterine⁹⁸, Vitamin D und dessen Metabolit Calcitriol sowie die als Insektenhormone wirksamen Ecdysteroide und die als Pflanzenhormone wirksamen Brassinosteroide⁶⁶.

Steroidhormone werden bei Mensch und Tier in der Nebennierenrinde (Cortex) gebildet, man nennt sie deshalb auch Corticoide. Ebenso werden sie in den Hoden, den Ovarien und der Plazenta gebildet. Bezüglich ihrer Funktion unterteilt man sie in Glucocorticoide (Cortisol, Cortison), Mineralcorticoide (Aldosteron) und Sexualhormone⁹⁴. Zu den Sexualsteroiden zählen Gestagen, Estrogene und Androgene, die in den Leydig'schen Zwischenzellen der Hoden^{94,101}, den interstitiellen Zellen der Ovarien¹⁰¹, der Nebennierenrinde und der Plazenta gebildet werden¹⁰². Glucocorticoide und Mineralcorticoide werden ausschließlich in den Nebennierenrinden gebildet.

Glucocorticoide beeinflussen den Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidstoffwechsel. Sie wirken entzündungshemmend und sind für die Bewältigung von Stress von Bedeutung. Mineralcorticoide dienen der Ausscheidungsregulation von Wasser und Salzen über die Nieren.

Sexualhormone beeinflussen die Entwicklung der Geschlechtsmerkmale und das sexuelle Verhalten¹⁰³.

Gallensäuren nehmen eine wichtige Rolle bei der Verdauung ein. Sie sind gute Emulgatoren⁹⁴. Gallensäuren kommen in der Gallenflüssigkeit vor und sind Amide der Cholsäure mit Taurin als Taurocholsäure und mit Glycin als Glycocholsäure¹⁰⁴.

Sterine sind durch die alkoholische Hydroxygruppe an C-3 gekennzeichnet. Man nennt sie deshalb auch Sterole. Das Sterin/Sterol der Wirbeltiere ist das ubiquitär vorkommende Cholesterin, das als Membranbaustein der Zellen dient und Ausgangsmaterial für weitere Steroide ist. Zu den Sterolen zählen auch Lanosterin aus dem Wollfett der Schafe und Ergosterin, ein Hefesterin. Sterine aus Pflanzen (Phytosterole) sind Stigmasterin und Sitosterin⁹⁶.

Steroidalkaloide sind Alkaloide mit dem Sterolgrundgerüst¹⁰⁴ und kommen vor allem in Solanaceen und Liliaceen vor⁹⁶. Die Steroidalkaloide haben eher pharmakologische Bedeutung.

Herzglykoside sind herzaktive Steroidwirkstoffe, die unter anderem aus Digitalis-Arten isoliert und eingesetzt werden⁹⁸.

Steroidsapogenine besitzen eine stark oberflächenaktive Wirkung, weshalb sie schäumende Lösungen bilden. Sie wirken destabilisierend auf Lipidschichten und hämolysierend auf die Erythrozytenmembran. Als Vertreter sei das Digitonin genannt. 3 β -Hydroxysterioide (Cholesterin) bilden mit Saponinen schwerlösliche Addukte und können dadurch deren Giftwirkung aufheben⁹⁸.

4.3 Chemische und biochemische Eigenschaften der Steroide

Steroidhormone zählen zu den nichtverseifbaren Lipiden. Sie sind kleine und lipophile Moleküle¹⁰². Wegen ihrer Fettlöslichkeit können sie die Plasmamembran ungehindert in beide Richtungen passieren. In hormonspezifischen Zellen werden sie jedoch von Steroid-Rezeptoren mit hoher Bindungsaffinität eingefangen^{101,103}.

Androgene und Gestagene sind neutrale Steroide und in organischen Lösungsmitteln löslich¹⁰⁵. Estrogene sind wegen der Hydroxygruppe am aromatischen A-Ring leicht azide und deshalb mit Natronlauge extrahierbar.

Die Polarität der Steroide steigt mit der Anzahl der Hydroxygruppen.

Wegen der schlechten Wasserlöslichkeit werden Steroide im Blut an Transcortin¹⁰³ (z.B. Cholesterin⁹⁴ und Glucocorticoide¹⁰⁶), an Albumin und Globulin (z.B. 17 β -Hydroxysterioide wie Estrogene, Androgene und Gestagene)^{94,106} gebunden, um an

die Zielorgane im Organismus zu gelangen. Die lipophilen Steroidhormone mit Ausnahme der Glucocorticoide sind in der Lage, sich mehr ins Zellinnere der Zielorgane zu verteilen¹⁰⁶.

Für die Ausscheidung im Urin oder Kot werden die Steroide mit Schwefelsäure oder Glucuronsäure verestert.

4.4 Wirkungs- und Regulationsmechanismus der Steroide

Zwischen Hormonproduktion, Ausschüttung und Wirkung bestehen vielschichtige Wechselbeziehungen.

Für Hormone gibt es in den Zielorganen spezifische Rezeptoren, die im Zellkern liegen. Ausnahme sind die Glucocorticoide, die bereits im Plasma an Rezeptoren gebunden werden können¹⁰⁶. Die Rezeptoren zeigen eine ausgeprägte Spezifität und eine hohe Affinität für das Hormon¹⁰⁷. Bedingt durch die Bindung am Rezeptor verweilt das Hormon im Zielorgan länger als in anderen Geweben¹⁰⁶ oder im Blut. Die Steroid-Rezeptoren wirken als Transkriptionsfaktoren, da sie nach der Bindung mit dem entsprechenden Hormon an die DNS binden und damit die Transkription (Synthese der mRNA) und die Translation (Synthese von Enzymen und Proteinen) beeinflussen. Was als eigentliche Hormonwirkung resultiert, hängt von der enzymatischen Ausstattung der Zellen der Zielorgane ab. So wird in den Hoden die Synthese der Androgene angeregt¹⁰⁶.

4.5 Steroid-Biosynthese

In **Abbildung 4.5-1** ist im Überblick die allgemeine Biosynthese der Steroide, ausgehend von Acetyl-CoA, dargestellt.

Der erste Schritt der Steroidsynthese (nicht im Überblick dargestellt) ist die Kondensation von Acetyl-CoA zu Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Die anschließende Reduktion zu Mevalonsäure ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Cholesterinsynthese und ein entscheidender Verzweigungspunkt bei der Verwertung der Acetate. Über einen feedback-Mechanismus entscheidet die HMG-CoA-Reduktase über die Reduktion zur Mevalonsäure und damit zur Steroidsynthese oder zur Rückreaktion zum Ausgangsprodukt Acetyl-CoA. Die Cholesterinbildung erfolgt über mehrere Zwischenschritte.

Durch das cholesterinseitenkettenspaltende (cholesterol side-chain cleavage) Enzym¹⁰³ wird Cholesterin zu Pregnenolon umgewandelt. Pregnenolon nimmt eine Schlüsselposition ein, da sich davon zum einen die Nebennierenrindenhormone (Aldosteron, Cortisol) und zum anderen die Geschlechtshormone ableiten¹⁰¹.

Das in den Mitochondrien entstandene Pregnenolon wird mittels Carrier Proteine in die Mikrosomen transportiert und dort irreversibel in Progesteron umgewandelt.

Die Synthese der Androgene und Estrogene ist in **Abbildung 4.5-2** näher aufgezeigt. Die Bildung der Estrogene im Ovar und die Bildung der Androgene in den Hoden verläuft über gemeinsame Zwischenstufen. Für das entstehende Endprodukt ist die Ausstattung des betreffenden endokrinen Organs mit spezifischen Enzymen entscheidend¹⁰⁸.

Die Testosteronsynthese kann auf zwei verschiedenen Wegen stattfinden. Im Delta 4-Stoffwechselweg ($\Delta 4$) erfolgt die Testosteronsynthese von Cholesterin über Progesteron, 17α -Hydroxyprogesteron und Androstendion zum Testosteron. Bei der Umwandlung von Androstendion in Testosteron handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion. Alternativ kann Testosteron auch über den Delta 5-Stoffwechselweg ($\Delta 5$) über Pregnenolon, 17α -Hydroxypregnenolon und DHEA gebildet werden^{102,105}.

Beim Eber kommt dem Delta 5-Stoffwechsel eine besondere Bedeutung zu, da über diesen die verschiedenen C_{19} - $\Delta 16$ -Verbindungen, die Eberpheromone (siehe Abbildung 14.1-2 in Kapitel 14.1), entstehen, die für den unerwünschten Geschlechtsgeruch verantwortlich sind¹⁰⁸.

Über die Aromatisierung von Testosteron und/oder von Androstendion entstehen die Estrogene. Schon in den späten 60iger Jahren konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Testosteron¹⁰⁹ und Nortestosteron¹¹⁰ zu Estrogenen umgebaut werden.

Nortestosteron entsteht beim Abbau des Testosterons in einem Zwischenschritt, der zur Estrogensynthese führt^{13,17}.

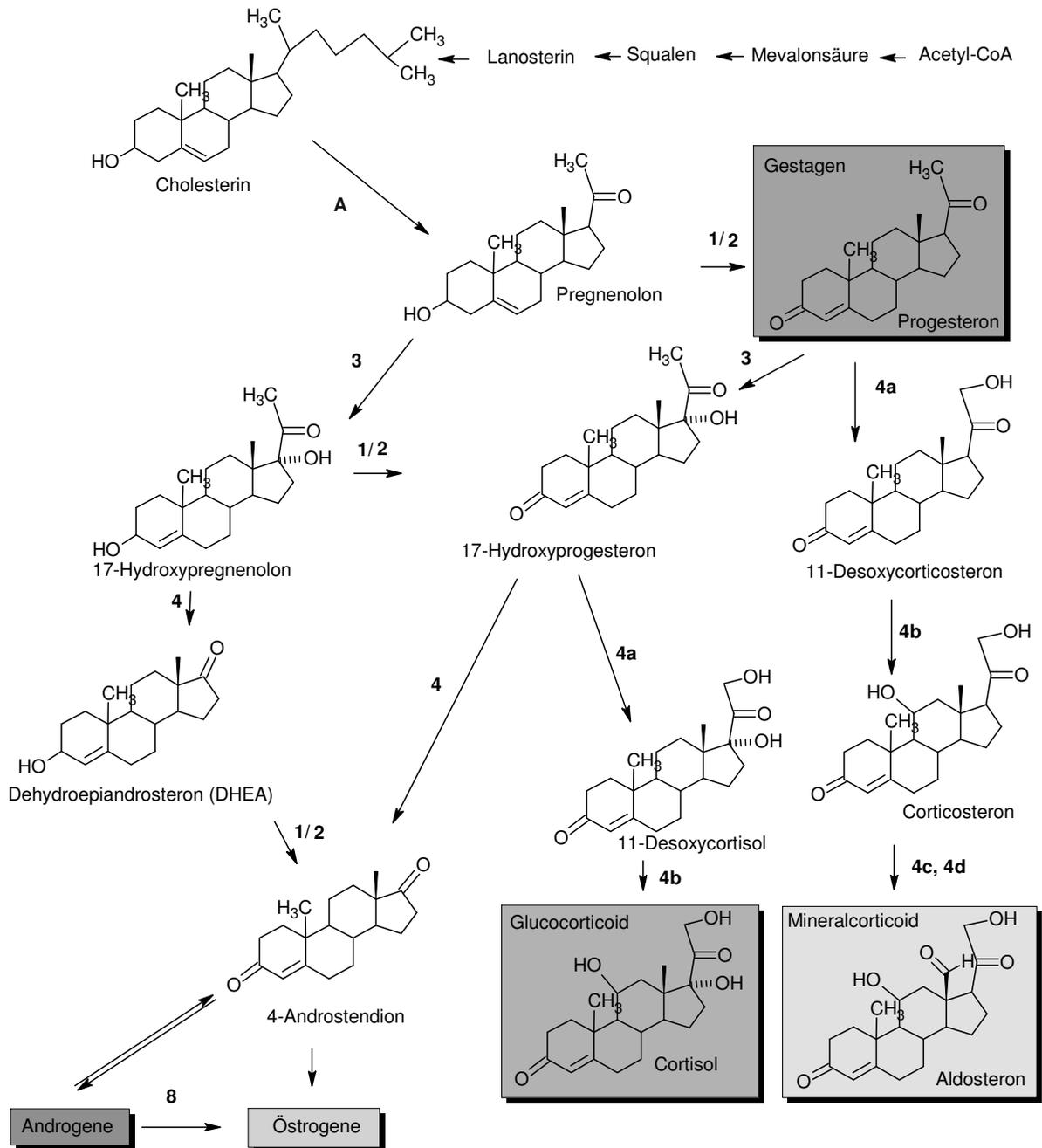


Abbildung 4.5-1: Biosynthese der Steroidhormone (A: C-20,22-Desmolase, 1: 3 β -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase, 2: $\Delta^{4,5}$ -Isomerase, 3: Steroid-17 α -Hydroxylase, 4: C-17,20-Desmolase, 4a: Steroid-C-21-Hydroxylase, 4b: Steroid-11 β -Hydroxylase, 4c: Steroid-C-18-Hydroxylase, 4d: 18-Hydroxysteroid-Oxidase, 8: Aromatase P_{450arom})^{102, 103}

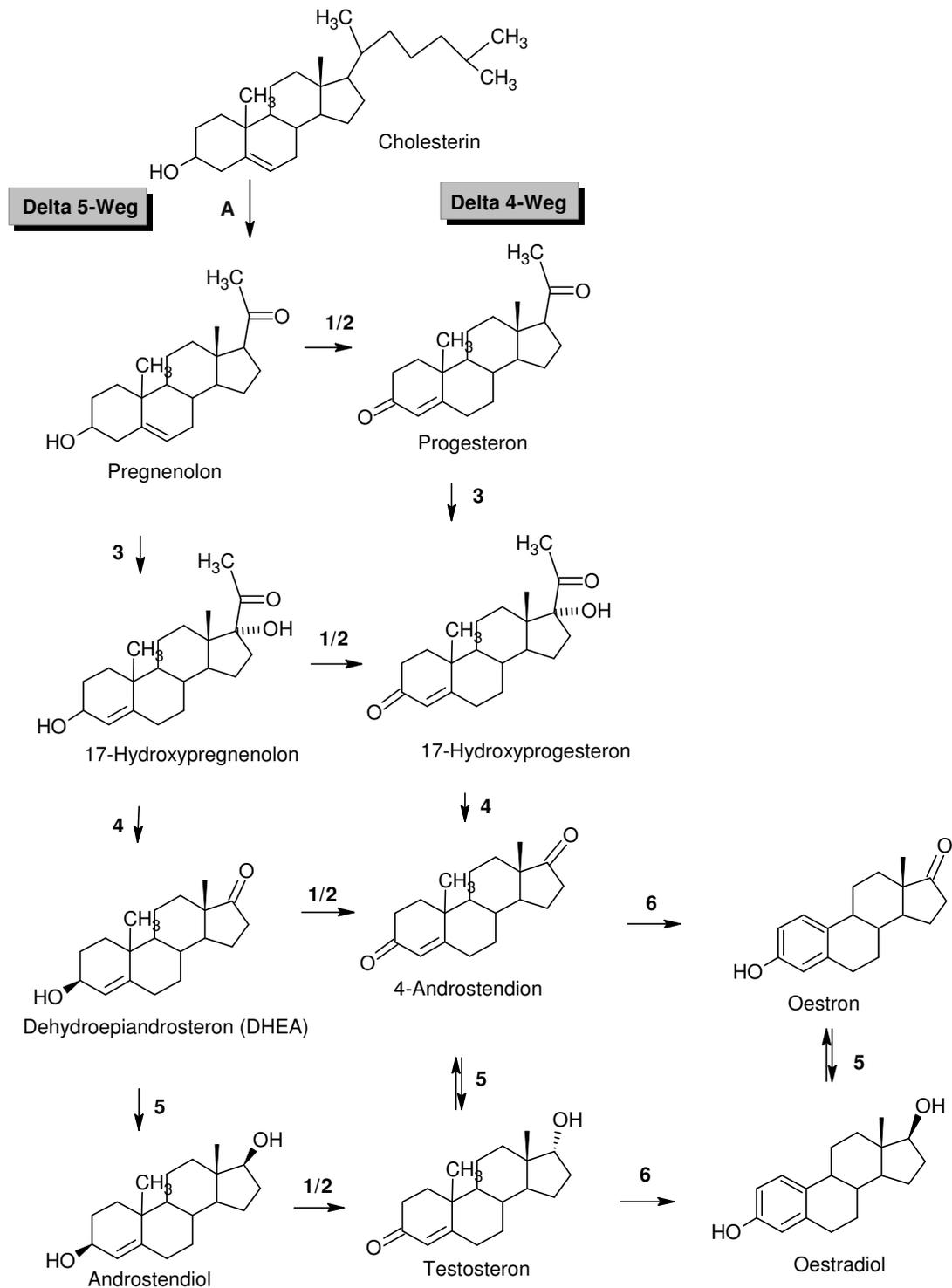


Abbildung 4.5-2: Biosynthese von Sexualhormonen, (A: C_{20,22}-Desmolase, 1: Δ^5 -3 β -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase, 2: $\Delta^{4,5}$ -Isomerase, 3: Steroid-17 α -Hydroxylase, 4: 17,20-Lyase, 5: 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, 6: Aromatase P₄₅₀, 7: 5 α -Reduktase, nach^{105,106}

4.6 Industrielle Partialsynthese und Einfluss auf das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis der Steroide

Eine wichtige natürliche pflanzliche Quelle für die industrielle Partialsynthese von Steroiden^{98,111} ist das aus der Yamswurzel (*Dioscorea villosa*) stammende Diosgenin, das Aglykon des Steroidsaponins Dioscin. Die kartoffelähnlichen Wurzelknollen wildwachsender *Dioscorea*-Arten werden in Mexiko, China, Südafrika und Indien gesammelt¹¹². Das aus der Sojapflanze^{104,113,114} gewonnene Stigmasterin und Sitosterin sind Ausgangsprodukte für die halbsynthetische Testosteronherstellung¹¹⁵. Neben Stigmasterin und Sitosterin sind Diosgenin und Hecogenin weitere Ausgangsstoffe zur Steroidsynthese. Hecogenin wird aus der südafrikanischen Sisalagave (*Agave sisalina*) gewonnen¹¹².

Diese für die Steroidsynthese verwendeten Stoffe stammen entweder aus der C3-Pflanze (Yamswurzel, Soja) oder C4-Pflanze (Sisalalgave) und bauen die Isotope des CO_2 entsprechend dem biochemischen Pflanzentyp ein. Das für die Pflanze und deren Inhaltsstoffe spezifische $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis findet sich im synthetischen Steroid wieder.

So wie exogene Steroide durch das Isotopenmuster der Ausgangsstoffe gekennzeichnet sind, spiegeln ebenfalls die vom tierischen Organismus synthetisierten, endogenen Steroide das Isotopenmuster des Futters wieder, wie in Kapitel 4.3.4 beschrieben wurde.

Diese Tatsache ermöglicht den Nachweis einer Steroid-Applikation. Während das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis des endogenen Steroids vom $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse des applizierten Steroids überlagert wird, ändert sich das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis der Vorläufer-substanzen nicht. Ferchaud et al.⁹³ zeigten dies anhand von Testosteron und dem Vorläufer DHEA.

4.7 Steroid-Metabolismus

Die Leber ist das wichtigste Organ für die Metabolisierung¹⁰². Um körperfremde und körpereigene Stoff zu inaktivieren bzw. abzubauen, verfügt der Organismus über wirkungsvolle Mechanismen, die als „Biotransformation“ bezeichnet werden. Die Biotransformation ist in zwei Phasen unterteilt, der Phase I-Reaktion und Phase II-Reaktion¹⁰⁷. Die Umwandlungsreaktionen der Phase I-Reaktionen bestehen aus hydrolytischen Spaltungen, Oxidationen, Reduktionen, Methylierungen und Desulfonierungen. Daran schließt sich die Konjugatbildung der Phase II-Reaktionen

an. Die Konjugatverbindung ist entweder eine Veresterung mit Schwefelsäure oder eine glykosidische Verbindung mit Glucuronsäure. Dadurch wird die Wasserlöslichkeit erhöht und die gebundenen Steroide können über die Niere oder den Kot ausgeschieden werden¹⁰². Die Kopplung für die Glucuronidierung erfolgt mit aktivierter Glucuronsäure (**Uridin-5'-Diphospho- α -D-Glucuronsäure**, kurz: UDP-GA) oder die Sulfatierung mit aktivierter Schwefelsäure (**3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat**, kurz: PAPS). Die bei der Kopplung beteiligten Enzyme sind die Transferasen¹⁰⁷.

Der initialisierende Schritt der Biotransformation der 3-Keto-4-en-steroiden (Testosteron, Nortestosteron) ist die Reduktion der Doppelbindung an C-4(5) (4-en) am A-Ring durch die 5 α - oder 5 β -Reduktase. Durch die irreversible Reduktion erhält man 5 α - und 5 β -Konfigurationsisomere (**Abbildung 4.7-1**).

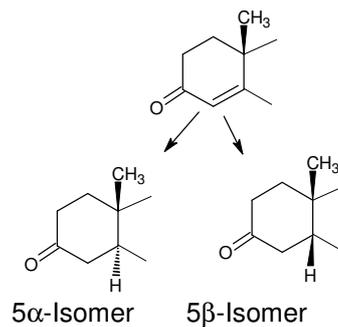


Abbildung 4.7-1: A-Ring Biotransformation: 5 α - und 5 β -Reduktion von 3-Keto-4-en-steroiden

Die Aktivität der 5 α - bzw. der 5 β -Reduktase sind von der Struktur des D-Ringes abhängig. Beide Enzyme befinden sich in der Leber, die 5 α -Reduktase im Endoplasmatischen Retikulum, während 5 β -Reduktase im Cytoplasma zu finden ist¹¹⁶. Ist die Doppelbindung an C-4(5) einmal reduziert, wird sofort die 3-Ketogruppe durch eine 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase oder eine 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase reduziert (**Abbildung 4.7-2**).

Die Reduktion der 3-Ketogruppe der 5 β -Isomere führt beim Menschen vor allem zu 3 α -Hydroxyisomeren. Nur eine kleine Menge wird zu 3 β -Hydroxyisomeren reduziert.

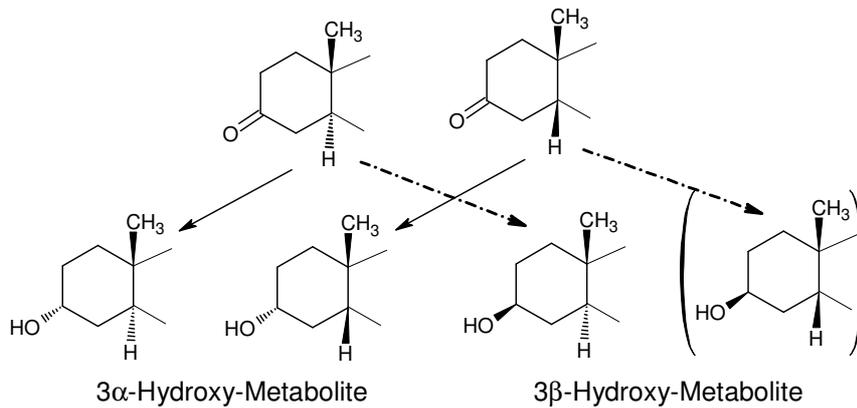


Abbildung 4.7-2: A-Ring Biotransformation, Phase I-Reaktion: Reduktion der 3-Ketogruppe mit 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (\rightarrow) und 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (\dashrightarrow), (): wurde bis jetzt nicht identifiziert, nach⁹⁸

Die Phase I-Reaktion am D-Ring ist die Oxidation der 17 β -Hydroxygruppe zu 17-Ketogruppe (**Abbildung 4.7-3**). 17-Keto-Metaboliten sind die Hauptmetaboliten der Androgene. Das beteiligte Enzym ist die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Abhängig von den nachfolgenden Schritten ist die Oxidation auch reversibel. Bei der Reduktion der 17-Ketogruppe ist auch eine 17 α -Konfiguration durch die 17 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase möglich¹¹⁶.

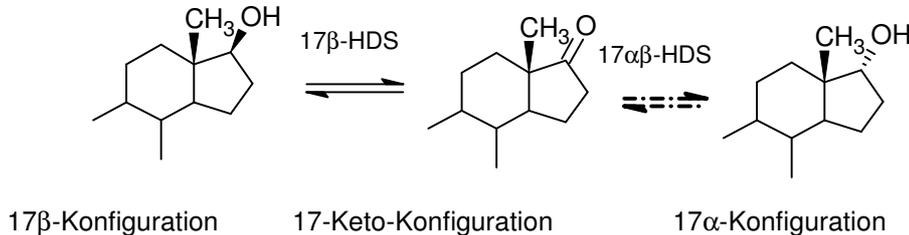


Abbildung 4.7-3: D-Ring Biotransformation: Oxidation der 17 β -Hydroxygruppe durch 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 β -HDS) und Bildung von 17 α -Steroiden durch die Reduktion der 17-Ketogruppe mit 17 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 α -HDS)

Bei den Phase II-Reaktionen können die Hydroxygruppen an den Kohlenstoffen C-3 und C-17 sowohl glucuronidiert als auch sulfatiert werden (**Abbildung 4.7-4**). Die jeweilige Kopplung ist Spezies spezifisch.

Beim Menschen liegen die Steroide der 3 α - und 17 β -Konfiguration (z.B. Testosteron) eher glucuronidiert, die 3 β -Konfiguration eher sulfatiert vor.

Es wird im Rahmen dieser Arbeit nur auf die genannten Phase I-Reaktionen am Ring A und D sowie die Phase II-Reaktionen am Ring A und D eingegangen.

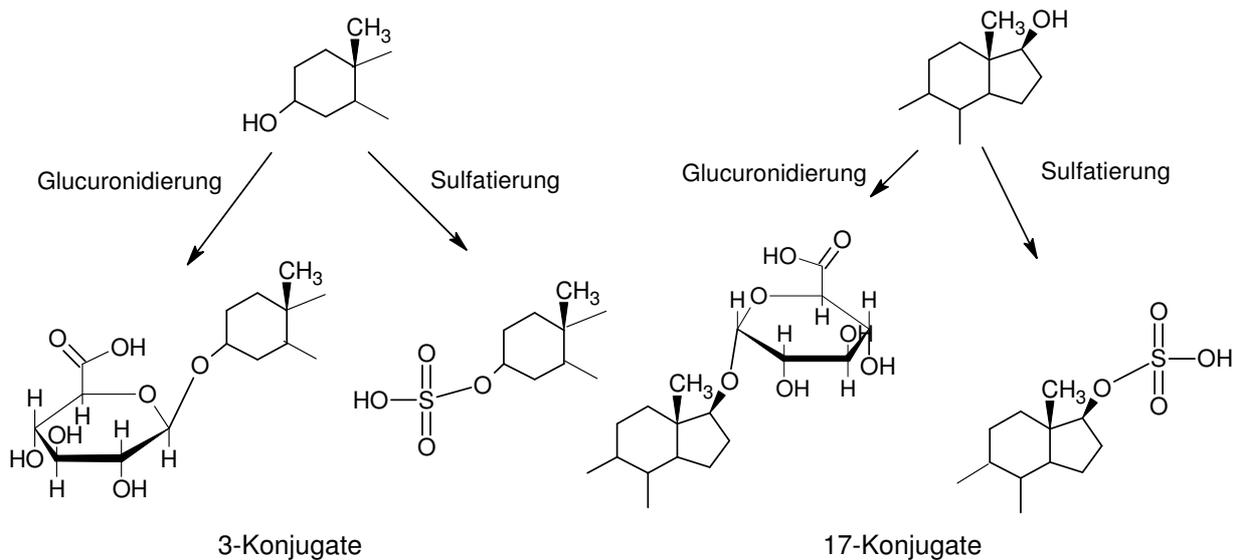


Abbildung 4.7-4: Glucuronidierung und Sulfatierung an C-3 am A-Ring (links) und an C-17 am D-Ring (rechts)

5 Androgene

5.1 Allgemeines

Androgene werden wie bereits erwähnt hauptsächlich in den Leydig'schen Zwischenzellen des Hodens synthetisiert. Androgene sind für die Ausbildung und das Wachstum der männlichen Geschlechtsorgane verantwortlich (androgene Wirkung)⁹⁴. Hauptvertreter der Androgene ist das Testosteron.

Androgene besitzen außer der androgenen auch anabole Wirkung⁶⁶. Unter anaboler Wirkung versteht man eine Muskel aufbauende Wirkung. Dabei nimmt die Skelettmuskelmasse durch vermehrte Eiweißbildung und erhöhte Hämoglobinkonzentration zu. Gleichzeitig nimmt das Körperfettgewebe ab und eine höhere Calcium- und Stickstoffaufnahme findet statt¹¹⁷. Ein erhöhtes Körpergewicht geht immer mit einer steigenden Stickstoffretention einher. Die anabole Aktivität liegt allgemein in einer positiven Stickstoffbilanz und in der Retention der Komponenten Stickstoff, Phosphor, Calcium und Kalium. Dies ist entweder von einer gesteigerten Proteinsynthese und gleichzeitig einem erniedrigten Proteinkatabolismus oder von einer erniedrigten renalen Proteinausscheidung¹¹⁸ gekennzeichnet.

Androgene fördern die Bildung der Knochenmatrix, erhöhen die Retention von Calcium und Phosphor. Sie beschleunigen den Epiphysenschluss¹¹⁹. Auf diese Weise wird einerseits die Knochenentwicklung gefördert und andererseits durch die

Wirkung auf die Epiphysenfuge das Längenwachstum beendet. Kastraten hingegen besitzen längere Extremitäten mit schwächerer Bemuskelung, da der Epiphysenschluss verlangsamt ist¹²⁰.

5.2 Charakterisierung der anabolen Wirkung

In der Humanmedizin wird zur Charakterisierung der anabolen Wirkung von Androgenen der myotrop-androgene Index (nach Hersherger¹²¹) herangezogen. Anabolika sind umso günstiger in ihrem Wirkungsspektrum, je höher der myotrop-androgene Index oder auch myotrop-androgener Quotient ist¹¹⁷. Statt dem Begriff „anabol“ wird auch „myotrop“ verwendet.

Der myotrop-androgene Index wird an der Muskelgruppe des Perinealmuskelkomplexes (*Levator ani*) der kastrierten Ratte ermittelt, da dieser stark auf myotrope Steroide anspricht¹²¹. Die Gewichtszunahme dieser Muskelgruppe nach einer Behandlung ist proportional zur gegebenen Menge an Steroiden. Aus dem Quotient der Gewichtszunahme des Muskels *Levator ani* und der Prostata nach Steroid-Injektion wird der myotrop-androgene Index bestimmt¹²¹. Je größer der Quotient aus der Gewichtszunahme des *Levator ani* und der Gewichtsabnahme der Prostata zwischen behandelten und unbehandelten Tieren ist, desto größer ist der anabole Effekt und desto kleiner die androgene Aktivität¹¹⁸. Als Referenzsubstanz wird Testosteron und Testosteron-propionat mit einem Index von 1 herangezogen. Einzelne Indices werden unter Punkt 6.2 in der Tabelle 6.2-1 genannt.

5.3 Regulation und Wirkung der Androgene

Für die Hormonproduktion bzw. -regulation gibt es Freisetzungshormone und Hormone, die regulieren und kontrollieren. Die Androgensynthese wird durch LH (luteinisierendes Hormon) gesteuert. Die Synthese und Ausschüttung von LH aus der Hypophyse wird wiederum von GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) des Hypothalamus reguliert¹⁰⁶. Die Androgene selbst haben eine negative Rückkopplung auf LH und GnRH. Das bedeutet, dass bei hoher Androgenkonzentration im Blut wenig GnRH gebildet wird. Die Androgenkonzentration im Blut sinkt.

Das Zielorgan für Androgene ist die Prostata, die Androgenrezeptoren besitzt¹⁰⁶.

Man geht davon aus, dass androgene und anabole Antworten durch dasselbe Rezeptorsystem vermittelt werden. Versuche an Ratten zeigten, dass die Rezeptoraffinität von 5 α -Dihydrotestosteron, über Nortestosteron zu Testosteron und 5 α -

Dihydrontestosteron abnimmt. Eine Reduktion des Testosterons zu 5α -Dihydrotestosteron durch die in der Samenblase vorkommende 5α -Reduktase verstärkt die Affinität zum Rezeptor. Eine Reduktion des Nortestosteron zu Dihydrontestosteron schwächt die Affinität ab¹²². Während die 5α -Reduktase in der Samenblase vorkommt, findet sich in der Skelettmuskulatur keine 5α -Reduktaseaktivität¹²³. Deshalb wirkt Testosteron auf die Gonaden stärker als Nortestosteron, da die in der Samenblase vorkommende 5α -Reduktase Testosteron zu 5α -Dihydrotestosteron abbaut. Nortestosteron hingegen wirkt stärker anabol, da es in der Muskulatur nicht zu Dihydrontestosteron abgebaut wird und eine höhere Affinität zum Rezeptor hat¹²⁴.

Bei Schweinen erfolgt die anabole Wirkung zum Teil direkt über spezifische Rezeptoren in der Skelettmuskulatur¹²⁵.

6 Nortestosteron

6.1 Allgemeine Eigenschaften

Nortestosteron (**Abbildung 6.1-1**) zählt wie Testosteron zu den Androgenen. Nortestosteron hat synonyme Bezeichnungen wie 17β -Hydroxy-4-estren-3-on, 4-Estren- 17β -ol-3-on, 17β -Hydroxy-19-nor-4-androsten-3-on und Nandrolon. Nortestosteron hat die Strukturformel $C_{18}H_{26}O_2$ mit einem Molekulargewicht von 274,4 Dalton. Es hat eine dimorphe kristalline Struktur mit weißer bis cremeweißer Farbe und einen Schmelzbereich von $112-124^\circ\text{C}$ ⁶⁶. Es ist löslich in Alkohol, Äther und Chloroform¹²⁶.

Das Epimer von Nortestosteron ist Epinortestosteron (**Abbildung 6.1-2**). Die Hydroxygruppe ist bei Epinortestosteron in 17α -Stellung.

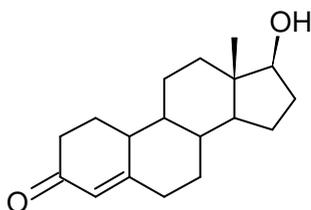


Abbildung 6.1-1: Nortestosteron

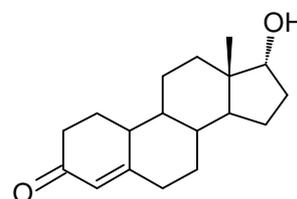


Abbildung 6.1-2: Epinortestosteron

Beide Stoffe kommen physiologisch bei verschiedenen Spezies vor. Die jeweilige Produktion ist abhängig vom physiologischen Zustand des Tieres, dem Alter und

dem Geschlecht. Im Eberurin kann weder im unbehandelten noch im behandelten Eber 17 α -Nortestosteron nachgewiesen werden^{21,127}, da die entsprechende Isomerase fehlt.

In den kommerziell erhältlichen Produkten zur Injektion ist Nortestosteron bzw. dessen Derivate in Sesamöl gelöst¹²⁸.

6.2 Nortestosteron als anaboles Steroid

Die biologische Aktivität der 19-Norsteroiden wurde 1936 von Dirscherl¹²⁹ untersucht, 1950 wurde Nortestosteron zum ersten Mal von Birch¹³⁰ synthetisiert.

Die anabole Eigenschaft des Hormons Nortestosteron ist 3-5fach stärker als die des Testosterons und Testosteron-propionats, was sich im Tierversuch an Ratten¹²¹ zeigte.

Nortestosteron wird illegal im Leistungssport bei Mensch und Tier als Dopingmittel angewendet. Auch im Freizeitsport¹³¹ finden Anabolika großen Anklang. Nortestosteron wird dort bereits als eine Decanoatinjektion selbst appliziert. In den USA hergestellte Nahrungsergänzungsmittel, enthalten Prohormone von Nortestosteron¹³².

Substanz	Index
Testosteron	1
Testosteron-propionat	1
Nortestosteron	9,5
Nortestosteron-decanoat	2,5
Nortestosteron-cyclopentylpropionat	9,6
Nortestosteron-phenylpropionat	2,4

In der nebenstehenden Tabelle sind die myotropen-androgenen Indices für verschiedene Nortestosteron-derivate^{117,118}

Tabelle 6.2-1: Zusammenstellung des myotropen-androgenen Indices einiger Steroid-derivate

zum Vergleich der anabolen Wirksamkeit aufgelistet.

Nortestosteron zählt wegen seiner hohen Bindungsaffinität zum Androgen-Rezeptor als stark wirksames Androgen¹³³.

Wird Nortestosteron oral verabreicht, passiert es zuerst die Leber mit einem exzessiven Metabolismus, dem „first-pass“ Abbau, so dass es wenig therapeutischen Nutzen hat. Deshalb wird es intramuskulär als Ester injiziert¹³⁴. Durch die Veresterung wird die Freisetzung vom intramuskulären Depot beeinflusst. Je länger die Fettsäurekette ist, desto langsamer ist die Abgabe ins Blut. Sind die Ester in die Blutbahn abgegeben, werden sie sofort hydrolysiert. Die Verweilzeit von Nandrolon-phenylpropionat beträgt 25 Stunden, die von Nandrolon-oleat hingegen 504 Stunden¹³⁵.

6.3 Nortestosteron als Arzneimittel

Heute verwendet man in der Humanmedizin vor allem Nandrolon-3-(4-hexyloxyphenyl)-propionat (Anadur®) und Nandrolon-decanoat (Deca-Durabolin®¹³⁶, Deca-Durabol, Deca-Hybolin, Hybolin Decanoat Retabolil¹²⁶), in der Veterinärmedizin hauptsächlich Nandrolon-laurat (Laurabolin®)¹³⁷.

Im folgenden werden einige Nortestosteron-Derivate mit den Trivial- bzw. Handelsnamen in Klammern genannt: Nortestosteron-hexahydrobenzoat (Norlongandron, Nor-Durandron), Nortestosteron-cyclohexylpropionat (Sanabolicum), Nortestosteron-furylpropionat (NFP, Demelon), Nortestosteron- β -phenylpropionat (Activin, Durabolin, Durabol, Strabolen, Superanabolon, Nandrolin) und Nortestosteron-propionat (Norybol-19, Nortesto)¹²⁶.

Indikationen von Nortestosterongabe mit Deca-Durabolin® (Nortestosterondecanoat), sind Osteoporose, chronische konsumierende Erkrankungen, besonders Infektionskrankheiten, schlecht heilende Knochenbrüche, Glucocorticoidüberdosierung und Anämien, verursacht durch eine Dauerdialyse¹³⁸.

In der Kleintierpraxis hat Laurabolin® eine gewisse Bedeutung. Es wird eingesetzt zur Rekonvaleszenz nach schweren Operationen und bei Muskeldystrophie. Auch findet es Anwendung bei chronischen Leber- und Nierenerkrankungen¹¹⁹.

Eine eindeutige Indikation für einen Androgeneinsatz in der Veterinärmedizin für Großtiere existiert nicht. Eine Androgenapplikation wird bei verschiedenen katabolen Zuständen und bei der Hämatopoese¹⁰² zur Stimulation der Erythropoese bei diversen Anämien¹²⁸ durchgeführt. Auch wird eine Nortestosterongabe als Appetitstimulanz vorgeschlagen¹²⁸.

6.4 Illegale Anwendung

Für Lebensmittel liefernde Tiere und tierische Erzeugnisse sind Androgene in Europa laut der EU-Richtlinie 96/23/EG⁴ nicht zugelassen. Im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung dient seit 1989 der Nationale Rückstandskontrollplan (NRKP) dem vorbeugenden gesundheitlichen Verbraucherschutz und wird von den Bundesländern als eigenständige gesetzliche Aufgabe durchgeführt. Tiere und tierische Erzeugnisse werden von Beginn des Produktionsprozesses an überwacht, um die illegale Anwendung nicht zugelassener Stoffe aufzudecken und den Einsatz von zugelassenen Tierarzneimitteln zu kontrollieren. Der NRKP ist national im

Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch in §41 in Verbindung mit §47 Abs. 1 LFGB, in §7 des Fleischhygienegesetzes und in §4 des Geflügelfleischhygienegesetzes verankert. Auf Europäischer Ebene basiert der NRKP auf der Richtlinie 96/23/EG⁴ und der Entscheidung 97/747/EG¹³⁹.

Wie eingangs erwähnt, gilt beim Sport jede Gabe von Nortestosteron und dessen Vorstufen als Doping². Bei einem Nachweis des Nortestosteron-Metaboliten Norandrosteron über 2 ng/µl Urin bei Männern und Frauen besteht gemäß der WADA² (World Anti-Doping Agency) der Verdacht des Dopings mit Nortestosteron. Die exogene Herkunft des Nortestosterons muss allerdings nachgewiesen werden.

Die Verwendung von Androgenen bei Sport- oder Schaupferden verstößt sowohl gegen arzneimittelrechtliche Vorschriften als auch gegen die Dopingbestimmungen der Pferdesportverbände¹⁰². Bei Pferden gilt Doping mit Nortestosteron als nachgewiesen, wenn das Verhältnis von 5α-Estren-3β,17α-diol zu 5(10)-Estren-3β,17α-diol über 1 liegt¹⁴⁰.

6.5 Biosynthese von Nortestosteron

Nortestosteron wurde noch bis in die 80iger Jahre als synthetisches Steroid eingruppiert und deshalb nicht in den Stoffwechsel eingegliedert. Bis heute gibt es noch keine allgemeingültige Darstellung der Nortestosteronbiosynthese.

Endogenes Nortestosteron wird bei der enzymatischen Umwandlung der Androgene in Estrogene als ein Nebenprodukt gebildet, wie es an Schweinezellen¹⁴¹, Pferdehoden¹³ und in der Plazenta von Mensch und Pferd¹⁴² nachgewiesen wurde.

Die Nortestosteronsynthese steht eng im Zusammenhang mit der Estrogensynthese¹⁴³. Im Eber wird die Androgensynthese durch hohe Mengen an Estrogen gesteuert, was sich auch in hohen Gehalten an Estrogen in verschiedenen Geweben des Ebers widerspiegelt⁵⁸. Ebenso werden Nortestosteron und Norandrostendion von den Leydig'schen Zellen des Ebers in Estron-sulfat umgewandelt¹⁴³.

In menschlicher Follikelflüssigkeit zeigte sich eine signifikante Korrelation der Konzentrationen an Nortestosteron und Estradiol sowie an Norandrostendion und Estron¹⁴⁴. Auch zeigte sich, dass die Nortestosteron- und Estrogenbiosynthese im humanen Ovar durch denselben Aromataseinhibitor (4-Hydroxyandrostendion)¹⁴⁵ gehemmt wird, was einen weiteren Zusammenhang zwischen Estrogenen und Nortestosteron darstellt.

Estrogene werden über einen Aromatase-Enzym-Komplexe aus Testosteron oder Androstendion katalysiert¹⁴⁶. Es handelt sich bei diesem Aromatase-Komplex um das Cytochrom P-450_{arom}, das hauptsächlich in den Ovarien lokalisiert ist¹⁴⁷. Diese Aromatisierung beinhaltet Hydroxylierungen, C-19-Demethylierung und Eliminierung von Wasserstoffatomen. Der Aromatase-Komplex beinhaltet eine Monooxygenase und benötigt für die Synthese von 1 mol Estrogen 3 mol O₂ und NADPH¹⁰⁵.

Aromataseaktivität ist in der Plazenta, den Follikeln des Ovars sowie den Hoden^{148, 149, 150} nachzuweisen. In Geweben, die reich sind an Aromatase wie zum Beispiel den Follikeln, sind hohe Mengen an Nortestosteron, dessen Metabolite sowie hohe Mengen an Estrogenen zu finden^{6, 14, 144}. Die männlichen Gonaden (Prostata, Hoden) weisen hohe Gehalte an den genannten Substanzen auf¹⁷.

Die von Geweben des Schweins produzierte Aromatase besteht aus drei Isoformen (Typ I: Ovarial, Typ II: Plazental, Typ III: Embryonal), die jeweils unterschiedlich sind in der Substratspezifität, der Aktivität und im Regulationsmechanismus. So wird beispielsweise das Verhältnis von 17β-Estradiol zu Nortestosteron in der plazentären Isoform 6:94 und in der embryonalen Isoform 94:6 gefunden¹⁵¹. Wie jedoch die Steuerung durch die Zelle stattfindet, bleibt offen¹⁵².

In dieser Arbeit wurden die Erkenntnisse zur Nortestosteronsynthese anhand unterschiedlicher Publikationen zusammengefasst. Da beim Pferd mehr Versuche zur Nortestosteronsynthese vorliegen als beim Schwein, sind für die zusammenfassende Darstellung in **Abbildung 6.5-1** die Untersuchungsergebnisse am Pferd eingeflossen.

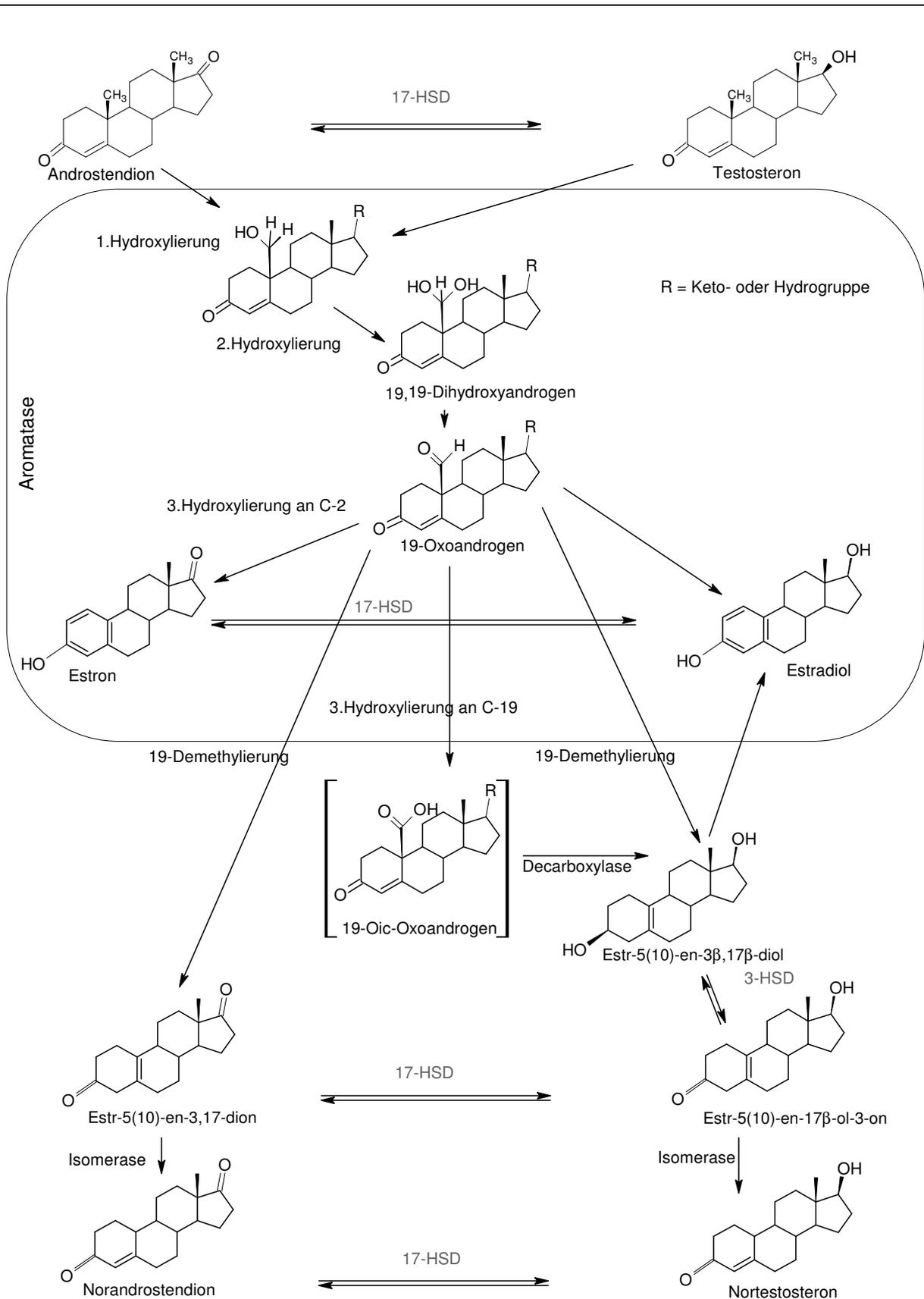


Abbildung 6.5-1: Darstellung des postulierten Synthesewegs von Nortestosteron^{105, 141, 153-157}

Hydroxy- und Oxogruppen stehen jeweils über die 3 β - oder die 17 β - Steroid-Dehydrogenase (z.B Testosteron und Androstendion) in einem Gleichgewicht. Der erste Schritt der Estrogen-/Nortestosteronbiosynthese ist die Hydroxylierung von Testosteron bzw. Androstendion an C-19 zu einem 19-Hydroxyandrogen^{100,141,153,154,158,159}. Durch eine zweite Hydroxylierung^{100,141,154,155} entsteht das 19,19-Dihydroxyandrogen, das nach Wasserabspaltung zu einem mengenmäßig¹⁵⁶ vorherrschende 19-Oxoandrogen^{100,153,155} umgebaut wird. Das 19-Oxoandrogen ist die Schnittstelle für die Estrogenbiosynthese oder die Nortestosteronbiosynthese. Über eine Hydroxylierung am A-Ring^{100,141} entsteht Estradiol bzw. Estron. Auf die Estrogensynthese wird in dieser Arbeit nicht eingegangen. Oder aber die Hydroxylierung findet an C-19 des 19-Oxoandrogens zu einem 19-Oic-Oxoandrogen statt^{105,153}. Durch eine weitere Decarboxylierungsreaktion entsteht ein 19-Norsteroid. Die Hydroxylierungen finden allgemein im oben erwähnten Aromatase-Komplex statt.

Damit aus Androgenen Norandrogene entstehen können, wird allgemein eine Demethylierung bzw. eine Decarboxylierung am C-19 des 19-Oxoandrogens bzw. des 19-Oic-Oxoandrogens vorgeschlagen^{141,153,159}. Es entsteht jedoch keine Doppelbindung am A-Ring wie bei der Estrogensynthese. Bei einer Decarboxylierung geht man von 19-Oic-Oxoandrogen als Zwischenprodukt aus. Bei einer Demethylierung wird Ameisensäure freigesetzt. Unabhängig des Zwischenproduktes gilt es als gesichert, dass die Nortestosteronsynthese über eine Estr-5(10)-en Verbindung^{153,154} stattfindet.

Diese Estr-5(10)-en Verbindung ist über eine säurekatalysierte Retro-Aldol-Kondensation^{141,159} (**Abbildung 6.5-2**) denkbar. Durch eine anschließende Isomerisierung von C-5(10) zu C-4(5)¹⁴¹ könnte Nortestosteron bzw. Norandrostendion entstehen.

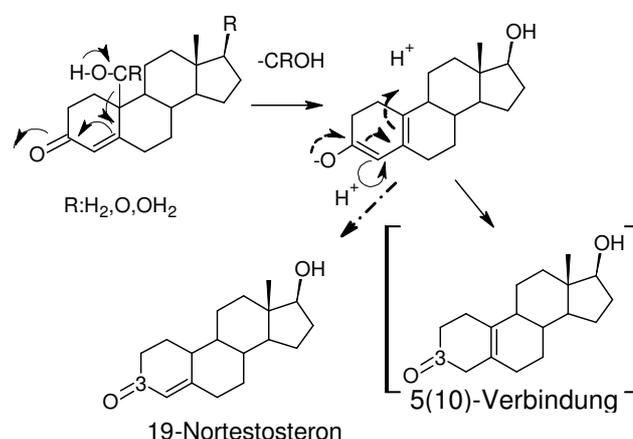


Abbildung 6.5-2: Retro-Aldol-Kondensation

Möglich ist aber auch durch eine Protonierung an C-10¹⁵⁹ des Intermediats (gestrichelte Pfeile) eine direkte Umwandlung in Nortestosteron.

6.6 Vorkommen von Nortestosteron

Wie zu Beginn der Arbeit erwähnt, galt Nortestosteron lange Zeit als synthetisches Anabolikum. Die **Tabelle 6.6-1** jedoch gibt einen Überblick über das physiologische Vorkommen und die Konzentration von Nortestosteron in den verschiedenen Tierarten in einem Zeitraum von 1985 bis 2006. Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass der Eber eine Sonderstellung einnimmt. Im Gegensatz zum Eber weisen Kastraten^{22,25,26} und Sauen^{22, 24-26}, unabhängig der Gravidität, keine nennenswerten Mengen an Nortestosteron auf.

Bei Kühen^{26,160} Auen (Mutterschafe)¹⁶¹ und Stuten¹⁶² ist nur das α -Isomer von Nortestosteron nachzuweisen. Besonders bei neugeborenen Kälbern¹⁶⁰ ist der anfängliche 17- α -Nortestosterongehalt hoch, der innerhalb weniger Tage drastisch abnimmt.

Während bei den männlichen Schweinen und Pferden Nortestosteron vorkommt, synthetisieren die männlichen Rinder, die Bullen^{163,164} keines der beiden Isomere von Nortestosteron.

Auffallend ist, dass beim Menschen der Gehalt an Nortestosteron bei Frauen im Verlauf der Schwangerschaft steigt und am Ende der Schwangerschaft am größten¹⁴ ist.

Bei den in der Tabelle 6.6.-1 aufgelisteten Gehalten an Nortestosteron handelt es sich um die Summe der nach der enzymatische bzw. chemischen Hydrolyse bestimmten Mengen. Ausnahme stellen die Gehalte von Nortestosteron bei den Ergebnissen von Roig et al.¹⁶⁵ dar. Das Nortestosteron wurde im Urin durch Roig et al. auch frei vorliegend bestimmt. Aus der Tabelle ist ebenfalls die Art der Hydrolyse ersichtlich. Zur Vollständigkeit sind auch die Bestimmungsmethoden dargestellt, die im folgenden Kapitel 7.1 kurz behandelt werden.

	Spezies	Gehalt an Nortestosteron (Matrix)	n	Art der Hydrolyse	Methode	Lit.		
Mensch	Mann	< 4 pg/ml (Plasma)	12	kA	RIA	¹⁴		
	Frau	4,9-9,7 ng/ml (Follikel)	44	HP+S	GC-MS	¹⁴⁴		
		< 4 pg/ml (Plasma)	12	kA	RIA, GC-MS	¹⁴		
	Frau, gravid	12-60 pg/ml (Plasma)	64	kA	RIA, GC-MS			
Schaf	Aue*	2,5 µg/kg (Urin), <i>aber α-Isomer</i> ¹⁶¹	21	HP	RIA	²⁶		
	gravid	< 0,5 µg/kg (Urin), <i>α-Isomer</i>	30	HP	GC/MS	¹⁶¹		
Schwein	Eber	51-344,1 µg/kg (Urin)	16	HP	GC-MS/MS, LC-MS/MS ¹⁶⁶	^{24,166}		
		10-55 µg/kg (Urin)	20	EC	ELISA	²⁵		
		0,6-17,5 ng/ml (Plasma)	20	EC	ELISA			
		1-277 µg/kg (Urin)	10	EC	GC/ECD	²⁵		
		2-8 ng/ml (Plasma)	6	EC	GC/ECD			
		4-1240 µg/kg (Urin)	38	HP+sH	LC/IAC	²²		
		3,6 µg/kg; 1,0-2,5 µg/kg (Fleisch)	4	HP; <i>Sub A</i>	GC/MS; LC-MS/MS	²⁷		
		0,9-62,8 µg/kg; 0,4-35,0 µg/kg (Leber)		HP; <i>Sub A</i>	GC/MS; LC-MS/MS			
		0,5-34,3 µg/kg; 1,1-19,0 µg/kg (Niere)		HP; <i>Sub A</i>	GC/MS; LC-MS/MS			
		12,9-172 µg/kg; 7,0-131,0 µg/kg (Hoden)		HP; <i>Sub A</i>	GC/MS; LC-MS/MS			
		0,3-8,5 µg/kg; 0,8-2,0 µg/kg (Herz)		HP; <i>Sub A</i>	GC/MS; LC-MS/MS			
		0-300 µg/kg (Urin)		HP	RIA		²⁶	
		<0,2-13 µg/kg (Fleisch)		25	Sub A		IAC; GC/MS	²⁰
		1,7-200 µg/kg (Leber)		25	Sub A		IAC; GC/MS	
		11-132 µg/kg (Urin)	25	HP	RIA-HPLC			
42-212 µg/kg (Galle)	25	HP	RIA-HPLC					
100-141 µg/kg (Hoden)	3	HP	GC/MS	¹⁶⁷				
91-166 µg/kg (Niere)	4	HP	GC/MS					
60 µg/kg (Leber)	1	HP	GC/MS					
	1,2-3257 µg/kg (Urin); NT _{frei}	48	EC	GC/MS	¹⁶⁵			

	Spezies	Gehalt an Nortestosteron (Matrix)	n	Art der Hydrolyse	Methode	Lit.
Schwein	Cryptorchideber**	8,6-343,3 µg/kg (Urin)	18	kA	kA	²⁴
		10-47 µg/kg (Urin)	10	EC	ELISA	²⁵
		1,1-15 ng/ml (Plasma)	10	EC	ELISA	
		10-146 µg/kg (Urin)	6	EC	GC/ECD	²⁵
		2-13ng/ml (Plasma)	3	EC	GC/ECD	
		0-100 µg/kg (Urin)	6	HP	RIA	²⁶
		30-35 µg/kg (Niere)	2	HP	GC/MS	¹⁶⁷
Rind	Kastrat	0,3-2,1 µg/kg (Urin)	23	EC	ELISA	²⁵
		0,1-1,2 ng/ml (Plasma)	23	EC	ELISA	
		< 1 µg/kg (Urin)	17	HP+sH	LC/IAC	²²
		3,5 µg/kg (Urin)	12	HP	RIA	²⁶
	Sau	1,3-1,9 µg/kg (Urin)	3	kA	kA	²⁴
		<1 µg/kg (Urin)	9	HP+sH	LC/IAC	²²
	Sau (gravid)	1 µg/kg		HP	RIA	²⁶
Rind	Stute	1,7-158 mmol/l (Follikel-flüssigkeit) 1-26 µg/kg (Urin); α-Isomer	kA	kA	GC/MS	¹⁰
	Bulle	n.n. (Galle)	73	HP	IAC/GC/MS IAC, GC/MS	¹⁶² ^{164,163}

kA: keine Angabe, n.n.: nicht nachweisbar, HP: Glucuronidase aus *Helix pomatia*, EC: Glucuronidase aus *E.coli*, S: Solvolyse, sH: saure Hydrolyse, Sub A: Subtilisin A

Abbildung 6.6-1: Nortestosterongehalte in verschiedenen Tierarten und Spezies, n: Anzahl der untersuchten Tiere; *Aue=Mutterschaf, Cryptorchideber= Binneneber

7 Analytik von Nortestosteron

7.1 Quantitative Methoden

Nortestosteron lässt sich mit immunochemischen und chromatographischen Verfahren nachweisen.

Bei den immunochemischen Methoden ist die Grundlage die Antigen-Antikörper-Reaktion oder auch das Schlüssel-Schloss-Prinzip. Als immunochemische Methoden sind der ELISA (Enzym linked immuno sorbent assay) und Radioimmunoassay (RIA) zu nennen. Voraussetzungen für die Tests sind: (1) Das zu bestimmende Hormon muss frei vorliegen und radioaktiv markierbar sein (RIA), (2) es muss ein spezifischer Antikörper zur Verfügung stehen (RIA, ELISA) und (3) die „gebundene Aktivität“ muss von der „freien Aktivität“ getrennt werden können (RIA, ELISA)¹²⁰.

Beim kompetitiven Enzymimmunoassay konkurrieren Probelösung (Antigen) und ein enzymmarkiertes Antigen mit dem Antikörper. Es kommt zu einer Komplexbildung von Antigen und Antikörper. Durch eine anschließende Zugabe eines chromogenen Substrates wird proportional zur Menge des gebildeten Komplexes und damit der vorhandenen Antigenmenge ein Farbstoff frei. Der Farbstoff des chromogenen Substrats wird freigesetzt, sobald es vom Enzym gespalten wird.

Beim Radioimmunoassay wird die konkurrierende Komplexbildung durch ein radioaktives markiertes Antigen ausgelöst. Markierungen mit den Isotopen ^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{14}C , ^{57}Co , oder ^{131}I sind möglich; üblich ist aber eine Markierung mit ^{131}I , einem γ -Strahler mit nahezu 100%iger Nuklidreinheit^{168, 169}. Allerdings stehen die nicht radioaktiven Methoden im Vordergrund.

Das chromatographische Verfahren ist ein Trennprozess, bei dem sich die Substanzen des Probengemisches zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen, der mobilen und der stationären Phase, verteilen. Ist die mobile Phase gasförmig, spricht man von Gaschromatographie (GC), ist sie flüssig, von Flüssigchromatographie (LC). Die Substanzen werden getrennt, wenn sie sich im betreffenden chromatographischen System bevorzugt in der einen oder der anderen Phase aufhalten¹⁷⁰. Beide Systeme können jeweils mit einem einfachen Massenspektrometer (MS), einem hochauflösenden Massenspektrometer (HRMS) oder einem Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) als Detektor gekoppelt werden. Im Falle der Gaschromatographie nennt man dies GC/MS, im Falle der Flüssigchromatographie LC/MS. Mit Hilfe des Massenspektrometers werden die Analyten entsprechend der Fragmentierungsmuster identifiziert und quantifiziert.

Dem Gaschromatographen kann aber auch ein Elektroneneinfangdetektor (Electron Capture Detector = ECD), ein Strahlungsionisationsdetektor, nachgeschaltet sein.

Die in der Literatur beschriebenen analytischen Methoden sind in der folgenden **Tabelle 7.1-1** zusammenfassend dargestellt.

Method	Name	Year	Literature
ELISA	Meyer et al.	1992	¹⁶⁰
	Rizzo et al.	1993	²⁵
RIA	Benoit et al.	1985	¹⁷¹
	Reznik et al.	1987	¹⁴
	Dintinger et al.	1989	¹³
	Van Ginkel et al.	1989	²⁰
	Vandenbroeck et al.	1991	²⁶
	Bruggeman et al.	2003	¹⁷²
LC/IAC	Haasnoot et al.	1990	²²
GC/ECD	Rizzo et al.	1993	²⁵
GC/MS	Silberzahn et al.	1985	¹⁰
	Reznik et al.	1987	¹⁴
	Dehennin et al.	1987	¹⁴⁴
	Van Ginkel et al.	1989	²⁰
	Clouet et al.	1997	¹⁶¹
	Sterk et al.	1998	¹⁶²
	Mc Evoy	1999	^{163,164}
	De Wasch et al.	2001	²⁷
	Lund et al.	2002	¹⁴⁵
	Dehennin et al.	2002	¹⁴⁰
	De Wasch et al.	2003	²⁴
	Prévost et al.	2004	¹⁶⁷
	Grosse et al.	2005	¹⁷³
Roig et al.	2006	^{165,174}	
GC/HRMS	Seinsch et al.	1999	¹⁷⁵
GC/MS/MS	Poelmans et al.	2005	¹⁶⁶
LC/MS	De Brabander et al.	2004	¹⁷⁶

Tabelle 7.1-1: Literaturübersicht der Messmethoden für Nortestosteron

7.2 Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses

Nur wenige Untersuchungen in Bezug auf das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von Nortestosteron sind bekannt und werden nur beim Humandoping^{1,177,178} durchgeführt. Dabei wird aber nicht Nortestosteron, sondern die humanspezifischen Metaboliten Noretiocholanolon und Norandrostendion untersucht.

Untersuchungen des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses von Nortestosteron im Eber lagen zum Projektbeginn nicht vor. Während des Projektzeitraums wurden in Parallelarbeiten von Roig et al.¹⁶⁵ und Prévost et al.¹⁶⁷ einige Daten des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses von Nortestosteron veröffentlicht, die in **Tabelle 7.2-1** aufgelistet sind.

Spezies	Matrix	$\delta^{13}\text{C}$ -Wert	n	Literatur
Eber	Urin	-19,6 ‰ bis -27,7 ‰	11	¹⁶⁵
	Hoden	-24,13 ‰ bis -26,66 ‰	3	¹⁶⁷
	Niere	-24,85 ‰ bis -26,26 ‰	3	
	Leber	-24,84 ‰	1	
Cryptorchideber	Niere	-25,17 ‰	1	

Tabelle 7.2-1: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron in verschiedenen Matrices und Spezies, n: Anzahl der gemessenen Tierproben

Für eine illegale Anwendung von Testosteron^{179,180,181,182,183} sind Nachweismethoden bekannt. Während des Projektzeitraumes wurde eine Nachweismethode für die illegale 17β -Estradiolgabe bei Rindern entwickelt. Daran waren 9 verschiedene international anerkannte Einrichtungen (BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung), DSHS (Deutsche Sporthochschule Köln), LABERCA (Laboratoire d'Études des Résidues et des Contaminantes dans les Aliments), CSL (Central Science Laboratory), sowie die Firmen TNO in den Niederlanden, QUB, DIONEX und ThermoElectron) beteiligt. Dieses internationale Forschungsprojekt „ISOSTER- Determination of the Origin of Hormones in Cattle, Project No. GRD1-2001-40085)¹⁸⁴, im folgenden abgekürzt mit ISOSTER-Projekt, dient zur Kontrolle der Rindfleischimporte aus den USA, um die Einhaltung des Verbotes gemäß der RL 96/23/EC⁴ zu gewährleisten. In den USA ist die Gabe von natürlich vorkommenden Steroiden legal.

Anhand der teilnehmenden Einrichtungen wird die Komplexität der Analytik der Stabilisotopen-Massenspektrometrie deutlich.

8 Messtechnik der GC/C/IRMS

8.1 Messprinzip

Die verwendete Stabilisotopen-Massenspektrometrie-Messeinheit (**Abbildung 8.1-1**) besteht aus einem Gaschromatographen (GC), einer Verbrennungseinheit (Combustion) mit Oxidations- oder Verbrennungsrohr, einer Nafion[®]-Membran, dem Interface (IF) und dem Massenspektrometer (IRMS).

Die Strömungsrichtung der Probe und des Referenzgases ist mit Pfeilen gekennzeichnet.

Über das Interface werden die Positionen der beiden open split Kapillaren mittels Druckluft gesteuert. Entsprechend der Position (oben = zu; unten = offen) bestimmen sie den Einlass des CO₂-Gases der Probe und des CO₂-Referenzgases in das Massenspektrometer. Zusätzlich werden die Gase Helium und Sauerstoff über Ventile innerhalb des Interface gesteuert. Dieser Vorgang ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung dargestellt.

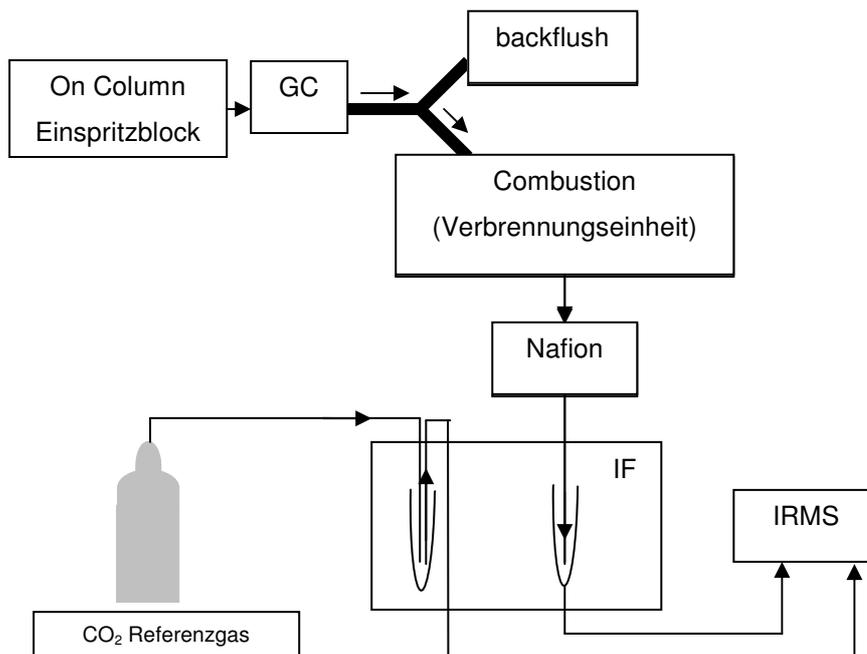


Abbildung 8.1-1: Schematische Darstellung der GC/C/IRMS Einheit

Nach der gaschromatographischen Trennung gelangt die Probe in das Verbrennungsrohr und wird bei 940 °C zu CO₂ verbrannt. In dem ca. 2 mm dicken Verbrennungsrohr aus Al₂O₃ befinden sich miteinander verdrehte Ni-, Pt- und Cu-Drähte.

Die eigentliche Verbrennung geschieht an den durch Sauerstoff zu NiO und CuO oxidierten Drähten. Platin dient als Katalysator.

Bei der Verbrennung der Analyten entstehen CO₂ und H₂O. Das entstehende Wasser muss entfernt werden, da sonst CO₂ protoniert und HCO₂⁺ gebildet wird, das ebenso wie ¹³CO₂ die Masse 45 besitzt und ein falsches Signal für ¹³CO₂ liefert⁵⁰. Mit einer Nafion[®]-Membran (kurz Nafion)³³ wird das H₂O im Gegenstromprinzip entfernt. Nafion[®] (**Ab-**

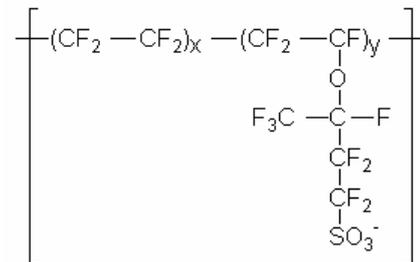


Abbildung 8.1-2 Nafion

bildung 8.1-2) ist ein sulfoniertes Tetrafluorpoly-

ethylen Polymer (PTFE). Durch die Addition der stark sauren Sulfonsäuregruppen ist es gut wasserdurchlässig und dient als semipermeable Membran zur Wasserentfernung.

Die gasförmige Probe und das Referenzgas werden jeweils über eine open split Kapillare in das Massenspektrometer überführt. Im Massenspektrometer herrscht ein Hochvakuum von 10⁻⁶–10⁻⁸ mbar. Mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV entstehen aus den CO₂-Moleküle positive Molekülionen. Diese positiven Ionen werden dann über ein Linsensystem mit einer Spannung von 3 kV zu einem Ionenstrahl gebündelt und sozusagen aus der Quelle herausgesogen.

Über ein Magnetsektorfeld werden die CO₂-Moleküle entsprechend der Massen ¹²C¹⁶O₂ (m/z = 44), ¹³C¹⁶O₂ (m/z = 45) und ¹²C¹⁶O¹⁸O (m/z = 46) getrennt. Bei konstanter Beschleunigung und konstantem Magnetfeld werden größere Massen entsprechend der Gleichung weniger abgelenkt.

$$r = \sqrt{\frac{m2U}{eB^2}}$$

r = Bahnradius *e* = Elementarladung
m = Masse der Ionen *B* = Magnetfeld
U = Beschleunigungsspannung

Der Detektor des Massenspektrometers besteht aus drei Faraday-Cups. Dieses Detektionssystem wird nur in der Isotopen-Massenspektrometrie verwendet. Ein Faraday-Cup ist ein kleiner Metallbecher, der die Ionen sammelt und sich dabei elektrisch auflädt. Die Ladung fließt über einen Widerstand ab, der Spannungsabfall wird gemessen und je nach Verstärkung registriert. Diese Spannung ist der Anzahl

der Ionen proportional. Mit dem Tripelkolektor werden die Massen 44, 45 und 46 gleichzeitig gemessen und über die Software Isodat NT 2.0 ausgewertet.

8.2 Kalibrierung des CO₂-Referenzgases

Die Kalibrierung des CO₂-Referenzgases erfolgt über die Bestimmung des ¹³C/¹²C-Verhältnisses der international gültigen Standards der IAEA. Für organisch gebundenen Kohlenstoff werden die Standards mit den Bezeichnungen IAEA CH-6 (Sacharose) und IAEA CH-7 (Polythylenfolie) verwendet.

Da diese teuer und nur alle drei Jahre zu erwerben sind, ist es in der Stabilisotopenanalytik gängig, mehrere Sekundärstandards, so genannte Hausstandards, gegen die IAEA-Standards zu kalibrieren. Diese Standards wurden gegen den international gültigen V-PDB von zugelassenen Laboratorien durch die IAEA vermessen.

8.3 Probenaufbereitung für die GC/C/IRMS Analytik

Die für die GC/C/IRMS Messung obligatorische Basislinientrennung¹⁸⁵ der Substanzen erfordert eine Aufarbeitung, die es ermöglicht, aus der Probenmatrix unerwünschte und coeluierende Substanzen von der Zielsubstanz zu trennen.

In der Literatur werden als geeignete analytische Möglichkeiten die Festphasenextraktion (SPE)^{115,177,178,179,180,181,182}, die Gelfiltration^{177,181,182}, die Flüssig-/Flüssigextraktion (LLE)^{115,179,180} und die semipräparative HPLC^{115,177,178,179,180,183} beschrieben. Ebenfalls werden Extraktaufreinigungen mit Immunitätssäulen^{178,186} beschrieben. Die genannten Methoden werden in unterschiedlicher Kombination und Reihenfolge angewendet.

Grundsätzlich sind die verwendeten Methoden immer auf mögliche Isotopenfraktionierungen zu überprüfen⁵⁰.

8.4 Derivatisierung für die GC/C/IRMS-Analytik

Für die gaschromatographische Trennung werden Steroide in der Routineanalytik wegen der Schwerflüchtigkeit und der Polarität der Steroide im allgemeinen derivatisiert.

Allerdings werden bei einer Derivatisierung verschiedene negative Einflüsse auf das GC/C/IRMS-System und das Isotopenverhältnis beschrieben^{50,92,187}. Die ver-

schiedenen Derivatisierungsmethoden sollen in Bezug auf die Eignung für die Stabilisotopen-Massenspektrometrie beleuchtet werden.

Grundvoraussetzung einer erfolgreichen Derivatisierung ist eine fraktionsfreie quantitative Umsetzung des Derivatisierungsreagenz mit dem Analyten.

Wird eine Derivatisierung angewendet, wird durch zusätzliche Kohlenstoffatome die Isotopenzusammensetzung und damit das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis der Substanz verändert, das über eine Umrechnung¹⁸⁸ korrigiert werden muss. Ergänzend sei die Korrekturgleichung¹⁸⁹ (**Formel 8.4-1**) genannt.

$$\delta^{13}\text{C}_S \times n_S = \delta^{13}\text{C}_{\text{S-derivat}} \times n_{\text{S-derivat}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{DerivatR}} \times n_{\text{DerivatR}}$$

n: Anzahl der Kohlenstoffatome im Derivat

S: Substanz

S-derivat: derivatisierte Substanz

DerivatR: Derivatisierungsreagenz

Formel 8.4-1: Korrekturgleichung für Anwendung einer Derivatisierung

8.4.1 Fluorierung

Bei Derivatisierungen mit fluorierten Verbindungen wie Trifluoracetat (TFA) oder Perfluorbutyraten (HFB) bilden sich die stabilen Fluoride CuF_2 , NiF_2 , die den Platin-katalysator im Verbrennungsrohr irreversibel schädigen. Zusätzlich ist ein Isotopeneffekt bekannt, der eine Abweichung zwischen errechnetem und ermitteltem $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von bis zu -2,46 ‰ erreicht¹⁸⁷.

8.4.2 Silylierung

Die Silylierung als Trimethylsilyl- (TMS) oder tert.-Butyldimethylsilyl- (tBDMS) Derivate ist die am meisten angewendete Derivatisierungsmethode. Mit einer Silylierung werden die meisten Kohlenstoffatome ins System gebracht werden. Es findet keine Fraktionierung bei vollständiger Umsetzung statt, da keine Kohlenstoffgruppe an der Reaktion beteiligt sind¹⁸⁷. Ist die Silylierung unvollständig, können Mono-, Di- und Tri-TMS-Derivate und cis-/trans-Isomere entstehen³⁹. Auch wird von der Entstehung von Enol-TMS-Ethern berichtet¹⁹⁰. Zur vollständigen Derivatisierung sind Temperatur und Dauer der Derivatisierung von enormer Bedeutung. Beide Parameter sind für jede Substanz individuell zu testen. Während Nortestosteron bei 80 °C spontan und ohne Zerfallsprodukte abhängig von der Zeit zum TMS-Derivat umgewandelt wird, wird die vollständige Derivatisierung des Methyltestosteron-TMS-

Derivat erst nach 40 Minuten erreicht und die des Boldenon bereits ab 20 Minuten. Die zuletzt genannten TMS-Derivate bauen sich nach Erreichen der vollständigen Umsetzung wieder ab¹⁹¹.

Durch die Verbrennung silylierter Substanzen entsteht SiO_2 , das sich auf den Drähten des Oxidationsrohres ablagert¹⁸⁰. Dadurch können Reoxidation und Gasfluss und damit das Isotopenverhältnis beeinflusst werden. Dieses Phänomen ist jedoch abgänglich von den zur Messung verwendenden Geräten. Methylierung

8.4.3 Methylierung

Methylierungsreagenzien sind Diazomethan oder BF_3 /Methanol. Da bei beiden Reagenzien das Kohlenstoffatom im letzten Schritt eingefügt wird, ist eine Fraktionierung möglich, wenn keine quantitative Umsetzung erfolgt. Da die Dissoziation der Diazogruppe der limitierende Schritt ist, ist eine quantitative Umsetzung nicht durch einen Überschuss an Reagenz, sondern nur durch Verlagerung des limitierenden Schrittes mit entsprechenden Reaktionsbedingungen möglich. Die Methylierung mittels überschüssigem Alkohol und BF_3 als Lewis-Säure verläuft jedoch quantitativ. Aber mit BF_3 als fluoridhaltiges Reagenz wird der Platinkatalysator geschädigt¹⁸⁸.

8.4.4 Acetylierung

Bei der basenkatalytischen Acetylierung liegt Essigsäureanhydrid als Reagenz im Überschuss vor. Das Derivatisierungsreagenz hat zwei Reaktionszentren¹⁹², die von der Substanz nucleophil angegriffen werden. Da dies der limitierende Schritt ist¹⁸⁷, kann es zu einer Fraktionierung kommen, selbst wenn die Umsetzung quantitativ erfolgt.

In der Literatur werden aber auch effektive gaschromatographische Trennungen underivatisierter Steroide beschrieben^{177,192,193,194,195}.

8.5 Verhalten der Substanzen auf der GC-Säule

In **Abbildung 8.5-1** ist die gaschromatographische Auftrennung des CO_2 -Peaks in $^{13}\text{CO}_2$ und $^{12}\text{CO}_2$ dargestellt¹⁹⁶. Das Verhältnis der beiden Massenspuren m/z 44 und m/z 45 wird kontinuierlich errechnet und als „ratio“, „S-Form“ oder auch als „swing“ dargestellt. Das Massesignal m/z 45 läuft dem Massesignal m/z 44 zwischen 50 und 150 ms, abhängig von der Substanz und vom Trägergasfluss, voraus^{50,197,198,199}.

Beim Verhältnis von m/z 46/44 zeigt sich dieses Phänomen nicht, denn diese zusätzliche Masse stammt vom Sauerstoff aus der Verbrennung nach der GC-Trennung¹⁹⁸. Der Referenzgaspeak hingegen hat keine S-Form, da das CO_2 direkt ins MS eingeleitet wird.

Das Zustandekommen der S-Form liegt darin begründet, dass das schwerere $^{13}\text{CO}_2$ früher eluiert als das leichtere $^{12}\text{CO}_2$. Dies nennt man auch den chromatographischen Isotopeneffekt oder auch „inversen Isotopeneffekt“^{200,201,202}. Beim „normalen Isotopeneffekt“ eluiert das leichtere Isotop zuerst²⁰².

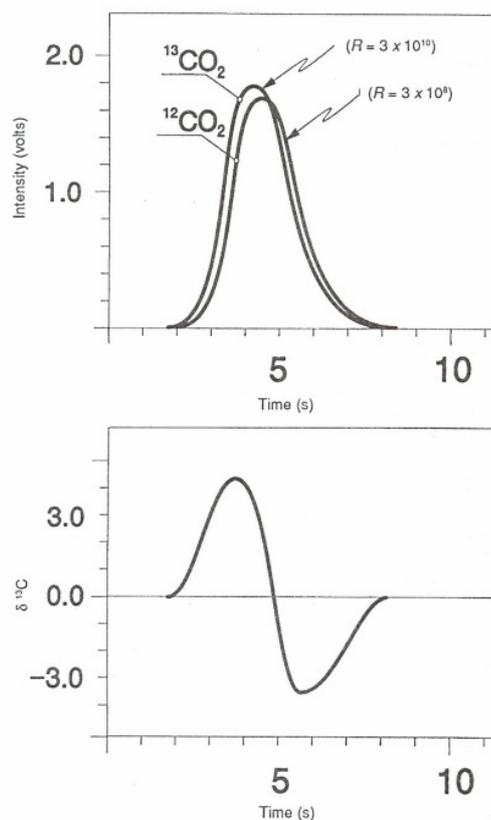


Abbildung 8.5-1: Darstellung des GC-Peaks von $^{13}\text{CO}_2$ und $^{12}\text{CO}_2$, unten: Darstellung ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ als swing, nach ¹⁹⁶

Die Ursache des chromatographischen Isotopeneffektes liegt bei der Gaschromatographie in den zwischenmolekularen Wechselwirkungen zwischen den Phasen, wenn die Van-der-Waals-Kräfte überwiegen. Substanzen mit schwereren Isotopen eluieren aufgrund der schwächeren Van-der-Waals-Kräfte früher^{50,92,202,203,204}.

Allgemein beruht die gegenseitige Anziehung der Moleküle und der stationären

Phase auf dem Wechsel der induzierten Dipole. Die Ausbildung der induzierten Dipole nimmt mit zunehmender Molekülgröße zu, da die Elektronen leichter verschiebbar sind²⁰⁵. Schwerere Isotope weisen ein kleineres Molekülvolumen²⁰⁶ auf und damit eine höhere Bindungsstärke, was schwächere Van-der-Waals-Kräfte bedeutet⁵⁰.

9 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, eine Aufarbeitungsmethode zur komponentenspezifischen Kohlenstoffisotopenmessung von Nortestosteron und eines Precursors zu entwickeln. Das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis bzw. die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron sollten mittels Stabilisotopen-Massenspektrometrie und gaschromatographischer Kopplung (GC/C/IRMS) in einem geeigneten Untersuchungsmaterial des Ebers bestimmt werden, um eine illegale Anwendung von Nortestosteron nachweisen zu können.

Zuerst sollten deshalb die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des im Eber vorkommenden Nortestosterons bestimmt werden. Ebenso sollten die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron aus unterschiedlichen Nortestosteronpräparaten bestimmt werden, die für eine mögliche Mastleistungsförderung angewendet werden.

Da der im Futter enthaltene Kohlenstoff gleichzeitig der Kohlenstoff ist, der im Organismus zur Steroidbiosynthese verwendet wird, sollten deshalb nur Eber untersucht werden, die standardisiertes Futter erhalten haben und aus demselben Gebiet stammten, um eine Bezugsgröße für das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von Nortestosteron zu erhalten.

Ein weiteres Ziel bestand darin, eine geeignete Substanz als Precursor (Vorläufer) der Nortestosteronbiosynthese beim Eber zu identifizieren und ebenfalls das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis zu bestimmen. Dadurch kann bei entsprechend großer Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen dem Precursor und Nortestosteron eine illegale Anwendung nachgewiesen werden, ohne die Futterzusammensetzung und die Herkunft der Tiere zu kennen.

Dazu sollte eine Aufarbeitungsmethode entwickelt werden, die es ermöglicht, einen Extrakt mit hoher Konzentration des gesuchten Analyten ohne Veränderung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisses zu liefern. Für die GC/C/IRMS-Messung ist neben dieser fraktionsfreien Aufarbeitung eine Basislinientrennung der gaschromatographischen Signale zwingend. Gleichzeitig darf das Signal nur aus dem CO_2 der gesuchten Substanz stammen.

Da bei jedem Aufreinigungsschritt potentiell Isotopenfraktionierungen auftreten können, sollten bei der Aufreinigungs- und Messmethode möglichst wenig Schritte

durchgeführt werden. Deshalb sollte geprüft werden, ob man auf eine Derivatisierung für die Messung verzichten kann.

Die Extraktion sollte so durchgeführt werden, dass der gewonnene Extrakt für die Quantifizierung sowohl von Nortestosteron als auch des Precursors geeignet ist.

Da die aufgenommene Wassermenge der Tiere vor der Schlachtung einen Einfluss auf die Konzentration der Steroide im Urin haben könnte, sollte ein Bezugsparameter für den Gehalt an Nortestosteron in der gewählten Matrix bestimmt werden.

Ergebnisse und Diskussion

10 Einleitung und Überblick

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Aufarbeitungs- und Messmethode entwickelt werden, die geeignet ist, die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von Nortestosteron aus Eberurin zu bestimmen. Ebenfalls konnte als biosynthetische Vorstufe von Nortestosteron das Steroid Dehydroepiandrosteron (DHEA) ermittelt und dessen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis bestimmt werden. Auf die Arbeitsschritte der Festphasenextraktion und der Derivatisierung konnte dabei verzichtet und mögliche Isotopenfraktionierungsreaktionen schon zu Beginn ausgeschlossen werden.

Neben Nortestosteron und DHEA als Precursor konnten andere Steroide identifiziert werden, die ebenfalls im Urin vorkommen. Die Aufarbeitungsmethode erlaubt die gleichzeitige Quantifizierung der beiden Steroide.

Das Cleanup beinhaltete die Schritte (I) enzymatische Konjugatspaltung, (II) Flüssig-/Flüssigextraktion, (III) semipräparative NP-HPLC-Aufreinigung und (IV) semipräparative RP-HPLC-Aufreinigung.

Die sich daran anschließenden Messmethoden waren (V) GC/FID-Messung zur Bestimmung der Konzentration und (VI) GC/MS-Messung zur Reinheitsprüfung der Peaks. Die eigentliche Bestimmungsmethode des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses erfolgte mittels GC/C/IRMS-Messung (VII).

11 Methodenentwicklung der Messmethoden

11.1 Ermittlung und Optimierung der GC-Parameter

11.1.1 GC-Säule

Die Basislinientrennung der Steroide ist eine Grundvoraussetzung für die GC/C/IRMS-Messtechnik. Die Trennsäule im Gaschromatographen muss deshalb so beschaffen sein, dass eine Basislinientrennung mehrerer Substanzen, die im gereinigten Probenextrakt vorliegen, erreicht werden kann. Da die Zielsetzung eine Messung von underivatisierten Steroiden war, musste die Säule zusätzlich eine optimale Trennungsleistung für underivatisierte Steroide aufweisen. Durch die

Schwerflüchtigkeit der Steroide war gleichzeitig festgelegt, dass die Säule eine hohe Temperaturstabilität besitzen musste.

Die einzelnen Substanzen zeigen auf der Säule jeweils ein anderes Elutionsverhalten. Aus diesem Grund wurde die Trennleistung verschiedener GC-Säulen (polar, mittelpolar und unpolar) mit verschiedenen Substanzzusammensetzungen getestet. Der Auswahl der dazu benötigten Steroide lagen die Substanzen des Ringversuches für das EU-Projekt „ISOSTER“²⁰⁷ zugrunde, da in der Literatur bei Beginn der Arbeit weder Metabolite noch Vorstufen von Nortestosteron im Eberurin vorlagen. Ergänzt wurde die Auswahl mit Nortestosteron und einigen 19-Norsteroiden anhand unterschiedlicher funktioneller Gruppen und der Methylgruppe an C-10. Die Zusammensetzung der einzelnen Testgemische ist in **Tabelle 11.1-1** zusammengefasst.

Mischungen	Substanzen
Testmix NA (Norandrogene)	Nortestosteron, Epinortestosteron, DHEA, Androstendion, Norandrostendion
Testmix A (Androgene)	DHEA, Testosteron, Epitestosteron, Androsteron, Epiandrosteron, Etiocholanolon, 5 α -Androstan-3 β ,17 β -diol
Mix E (Estrogen)	Estron, Estradiol, Epiestradiol
Mix NAA	Mix A (außer 5 α -Androstan-3 β ,17 β -diol) + Mix NA
MIX NAAD	Mix A + Mix NA + 5-Androsten-3 β , 17 β -diol und 5-Androsten-3 β , 17 α -diol sowie 5 α -Androstan-3 β , 17 β -diol und 5 α -Androstan-3 β , 17 α -diol

Tabelle 11.1-1: Zusammensetzung der Testgemische für die Überprüfung der GC-Trennung

In der vorliegenden Arbeit erfüllte eine 30 m lange HP-5MS Hauptsäule mit einer Filmbelegung von 0,25 μ m aus 5% Diphenyl-, 95% Dimethylsilicone Copolymer die genannten Kriterien. Die Säule mit einem Innendurchmesser (ID) von 0,25 mm wies ein geringes Säulenbluten auf. Sie wurde mit einer 2,5 m langen methyldeaktivierten Vorsäule (0,32 mm ID) verbunden.

Für die Chromatographie wurde das unpolare Lösungsmittel Cyclohexan verwendet.

Für die Versuche wurde als mittelpolare Säule die am CVUA hergestellte²⁰⁸ Säule OV-1701 (14% Cyanopropylphenyl-, 86% Methylpolysiloxane Copolymer) verwendet. Nach Matthiesen et al.¹⁹³ liefert diese Säule die beste Trennung für underivatisierte

Steroide. Auch bei GC/C/IRMS Analysen wurde von einer Anwendung dieser Säulenbelegung berichtet¹⁷⁸.

Aufgrund der polaren Gruppen der Steroide wurden auch polare Optima® Delta Säulen (Optima® Delta 3 und Optima® Delta 6) von Macherey-Nagel getestet. Die Säule besteht aus quervernetzten Methylphenylpolysiloxan-Blockpolymeren definierter Zusammensetzung. Polare Analyten sollen in der stationären Phase ein Dipolmoment induzieren, so dass die Moleküle stärkere Wechselwirkungen mit der Phase zeigen. Macherey-Nagel nennt dies „Autoselektivität“ und gibt den Optima® Delta Säulen die Eigenschaft der „probenabhängigen Polarität“²⁰⁹.

Die Trennsäulen wurden nicht mit einer Vorsäule versehen, da es sich bei den Versuchslösungen um Standardlösungen handelte.

Die Chromatogramme der Testsubstanzen auf den verschiedenen Säulen OV-1701, Optima® Delta 3, Optima® Delta 6 sind vergleichsweise in **Abbildung 11.1-1** untereinander angeordnet. Die Chromatogramme sollen nur einen allgemeinen Überblick über die Trennleistung geben. Es wurde daher auf die Beschriftung der einzelnen Substanzen verzichtet.

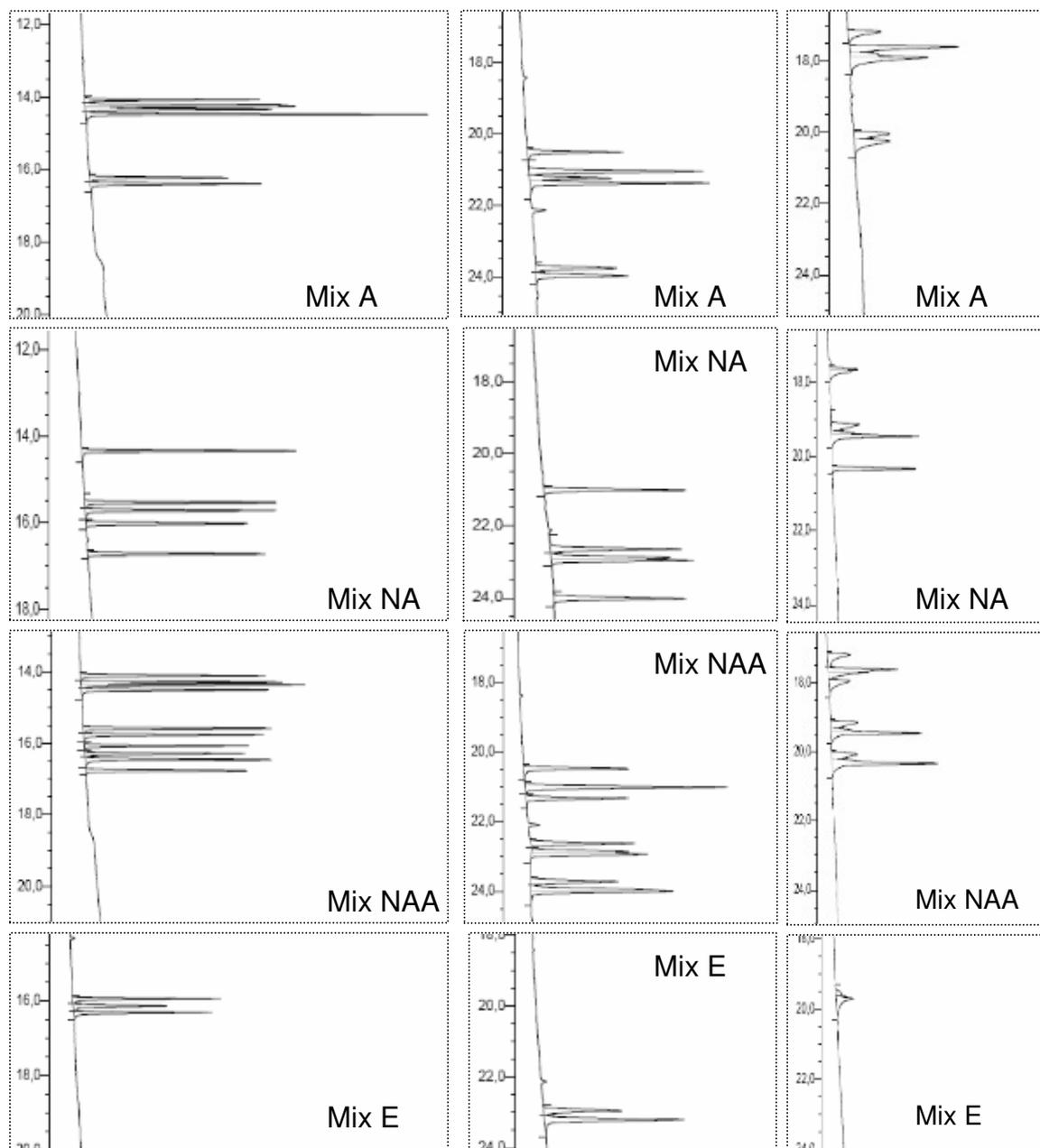


Abbildung 11.1-1: GC/FID Chromatogramme der Testgemische auf verschiedenen Säulen: links: OV- 1701, Mitte: Optima® δ 3, rechts: Optima® δ 6

Die mittelpolare Säule OV-1701 zeigte die beste Trennleistung. Es konnten die Epimere am C-17 des Steroidgerüsts Testosteron und Epitestosteron, Androsteron und Epiandrosteron, Nortestosteron und Epinortestosteron erfolgreich getrennt werden. Sogar die im Vergleich zu allen anderen Substanzen polarsten Verbindungen, die Estrogene Estron, Estradiol und Epiestradiol in Mix E konnten getrennt werden.

Die Optima® Delta 6 Säule zeigte die schlechteste Trennleistung bei den verwendeten Testsubstanzen. Die Optima® Delta 3 konnte die Testmischungen

besser trennen, jedoch co-eluierten die Substanzpaare Androsteron und DHEA, Nor-testosteron und Norandrostendion sowie Testosteron und Androstendion.

Im Gegensatz zur schlechten Trenneigenschaft der Optima[®] Delta 3 Säule in der vorliegenden Arbeit, wird in einer parallelen Untersuchung während des Projektzeitraums von Hebestreit *et al.*²¹⁰ von einer Eignung der Optima[®] Delta 3 Säule für die GC/C/IRMS Messung berichtet. Er führte die Untersuchung mit der Einzelsubstanz Norandrosteron auf einer Optima[®] Delta 3 Säule mit einer Länge von 17 m durch. Hebestreit *et al.* nennen keine signifikanten Unterschiede zwischen einer HP-5MS (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmbelegung) und der Optima[®] Delta 3 Säule.

Da jedoch mit zunehmender Länge der Trennsäule die chromatographische Trennung besser wird, kann davon ausgegangen werden, dass in der vorliegenden Arbeit mit einer kürzeren Optima[®] Delta 3 Säule kein besseres Trennergebnis hätte erreicht werden können.

Im Säulentest zeigte sich die OV-1701 zwar zunächst als die Säule mit der besten Trennleistung, nach nur wenigen Injektionen des aufgearbeiteten Urinextraktes verringerten sich jedoch die Signalintensitäten deutlich. Die daraufhin verwendete unpolare Säule HP-5MS zeigte ebenfalls eine gute Trennleistung mit gleich bleibender Signalintensität.

Aus der Literatur geht hervor, dass die mittelpolare Säule OV-1701 und die unpolare Säule HP-5 gleichermaßen angewendet werden. In der Trennleistung scheinen sich beide nicht sehr zu unterscheiden.

Abhängig von den zu untersuchenden Substanzen ist für zukünftige Arbeiten auch eine Kopplung verschiedener Säulen mit unterschiedlicher Polarität und unterschiedlicher Länge denkbar.

11.1.2 Auswahl der Injektionstechnik

Für das GC/C/IRMS System wird eine absolute Kohlenstoffmenge von 10 ng pro Injektion zur Bestimmung des ¹³C/¹²C-Verhältnisses benötigt. Jeder Substanzverlust und die damit mögliche ¹³C/¹²C-Fraktionierung durch den Injektor⁹² ist zu vermeiden.

Werden die Substanzen zuerst im SSL-Injektor (Split Splitless Injektor) über den Liner verdampft und gelangen als Gas auf die GC-Säule, bleiben die Steroide bereits an kleinen „aktiven“ Stellen durch Rekondensation haften. Die schwerflüchtigen

Steroide sind diesbezüglich besonders empfindlich. Bei der kalten On Column Technik gelangen die Substanzen ohne Verluste direkt auf die Trennsäule. Gerade bei hoch siedenden Substanzen wie den Steroiden ist eine kalte On Column Injektion die beste Wahl^{211,212}. Zukünftig wird kalte die On Column Injektion als „On Colmn“ Injektion bezeichnet.

In der **Tabelle 11.1-2** sind die Ergebnisse des Vergleiches zwischen On Column (OC) Injektion und SSL-Injektion (90 Sekunden splitless time) zusammengestellt. Es handelte sich dabei um Einzelbestimmungen. Durch die Injektion mit dem SSL-Injektor wurden substanzabhängige Verluste beobachtet. Vor allem bei den Estrogen traten Verluste bis zu 96 % auf. Ein Vergleich der Signalthöhen von acetylierten Derivaten bei der SSL-Injektion mit den Signalthöhen der underivatisierten Steoride bei der On Column Injektion zeigte, dass selbst bei acetylierten Steroiden die SSL-Injektion die kleineren Signale lieferte. Aus diesem Grund wurde für die Analyse der Steroide die On Column Injektion ausgewählt.

	On Column		SSL		Verlust [%]
	Signalhöhe [mV]	Fläche [mV*min]	Signalhöhe [mV]	Fläche [mV*min]	
DHEA	200	7,9	95	4,6	42
DHEA-acetat	250	10,5	150	6,9	34
Etiocholanolon	250	8,4	95	4,6	45
Epiandrosteron	425	16,5	110	6,1	63
Epitestosteron	210	8,1	65	3,3	60
Estradiol	200	4,4	2,5	0,2	96
Estradiol-acetat	160	6,9	50	2,6	63
Estron	140	7,3	10	1,0	86
Estron acetat	180	7,6	60	3,3	60
Nortestosteron	160	6,6	40	2,3	66
Nortestosteron-acetat	180	8,6	70	3,7	57
Testosteron	180	10,5	80	4,6	57
Testosteron-acetat	200	9,1	70	4,4	52

Tabelle 11.1-2: Vergleich der OC- und SSL-Injektion; Substanz je 10 ng/µl

11.1.3 Temperaturprogramm, Trägergas und Trägergasfluss

Es ergaben sich mit folgenden Temperatur- und Trägergasflusseinstellungen die besten Trennbedingungen:

Die Probe wurde 10 °C unterhalb der Siedetemperatur des Lösungsmittels (80 °C bei Cyclohexan) schnell²¹³ injiziert. Die GC-Temperatur wurde bei 70 °C eine Minute gehalten. Das Temperaturprogramm hatte zwei Aufheizraten. Im ersten Temperaturanstieg mit 25 °C/Minute bis zu einer Temperatur von 220 °C sollten die nicht interessierenden Extraktsubstanzen möglichst schnell über die Säule gegeben werden. Bei 220 °C wurde eine Minute gehalten. Die zweite Temperaturerhöhung mit 5 °C/Minute endete bei 320 °C. Die eigentliche Auftrennung begann bei einer Temperatur von 240 °C. Die Ausheizzeit zur Reinigung der Säule dauerte 12 Minuten. Als Trägergas wurde Helium mit einem konstanten Fluss von 1,2 ml/Minute verwendet.

11.2 GC/C/IRMS Parameter

11.2.1 Modifikationen

Die Tatsache, dass Steroide schwerflüchtig sind und damit eine hohe Temperatur zur Verdampfung bei der GC-Trennung benötigen und gleichzeitig an „aktiven Stellen“ teilweise irreversibel kondensieren, stellt hohe Anforderungen an das GC/C/IRMS System. Das vom Hersteller gelieferte GC/C/IRMS System musste modifiziert werden, damit Steroide ohne Substanzverluste auf diesem System gemessen werden konnten.

Die Modifikationen fanden am doppelten T-Verbindungsstück, am Oxidationsrohr und am Reduktionsrohr statt. Mit den Modifikationen konnte ein dichtes und ein für Steroide geeignetes GC/C/IRMS-System geschaffen werden.

Bei der Lieferung sind die Kapillaren mit doppeltem T-Verbindungsstück, kurz T-Stück, aus Metall verbunden und abgedichtet. In **Abbildung 11.2-1** ist das T-Stück mit den vier miteinander verbundenen Kapillaren und dem Backflushventil zu sehen. Im Messmodus (geschlossene Backflusseinheit) wird der vom GC kommende Gasstrom am T-Stück gleichzeitig in den Flammenionisationsdetektor (FID) und zum Verbrennungsrohr geleitet. Bei offener Backflusseinheit gelangt der komplette Gasstrom über die Backflushöffnung ins Freie.

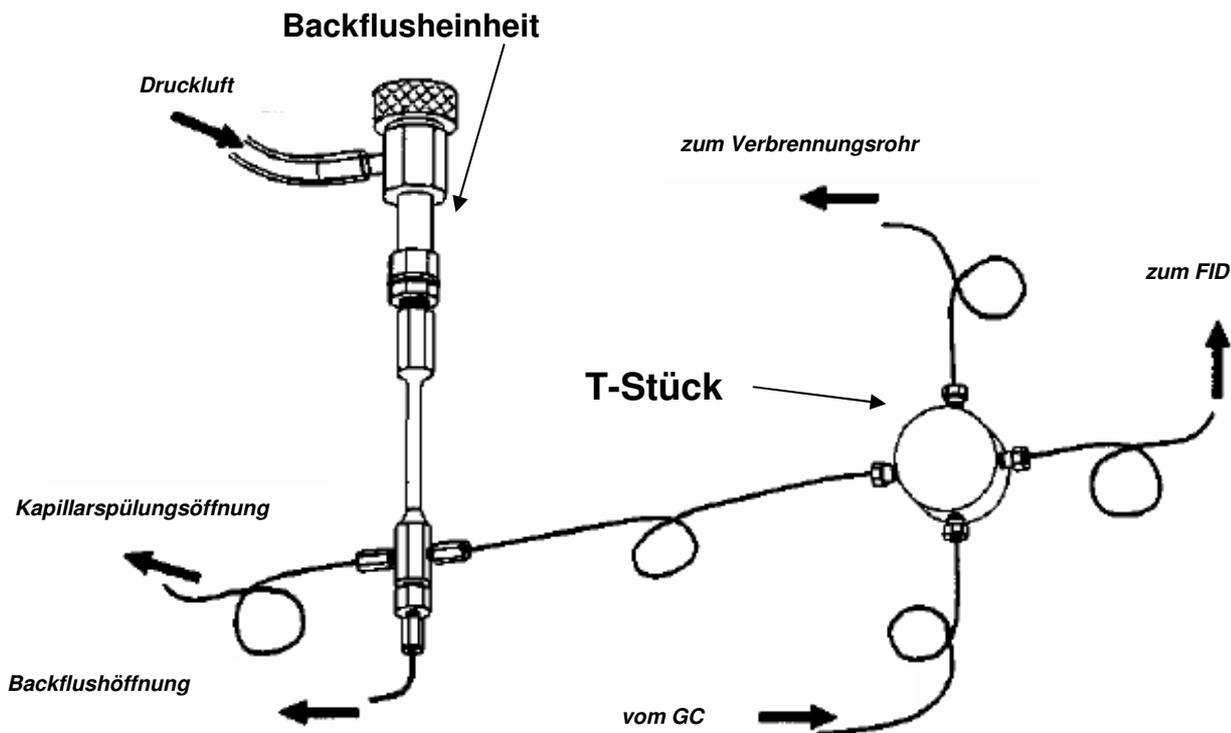


Abbildung 11.2-1: T-Stück mit Backflusseinheit im Lieferzustand

Der Teil des Gasstromes (ca.10 %), der in den FID gelangte, stand für die Messung am IRMS-Detektor nicht mehr zur Verfügung. Um diesen Substanzverlust zu vermeiden, wurde die Verbindung zum FID getrennt.

Die verbleibenden drei zu verbindenden Kapillaren wurden statt des T-Stücks mit einem deaktivierten 3-Wege-Pressfit aus fused silica verbunden und mechanisch mit Hilfe einer Bogenkonstruktion (SeCure™ „Y“Connector® von Restek) stabilisiert (**Abbildung 11.2-2**).

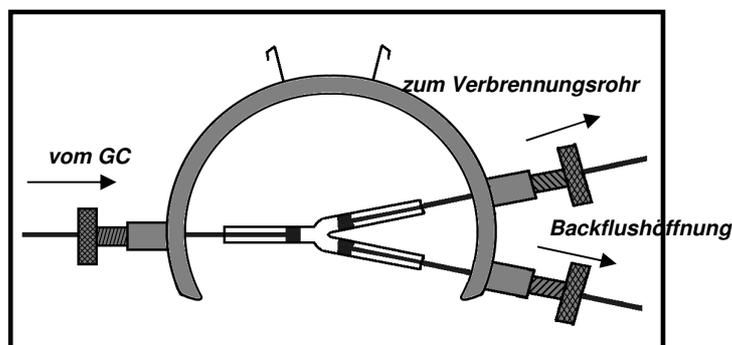


Abbildung 11.2-2: SeCure™ „Y“Connector® von Restek

Die Schaltung des Backflushventils geschieht mit Druckluft. Bei jedem Öffnen und Schließen des Backflushventils gelangten Druckstöße auf das 3-Wege-Pressfit, die aber durch die mechanische Stabilisierung abgefangen werden konnten. Das System blieb an dieser kritischen Stelle auch bei hohen Temperaturen erst nach der mechanischen Stabilisierung durch die Bogenkonstruktion dicht.

Der Versuch, das 3-Wege-Pressfit ohne Connector mit einem temperaturbeständigen Graphitkleber zu befestigen, zeigte sich wegen des hohen CO₂-Signals als unrealisierbar.

Auch der Einbau des Glasdoms²¹⁴ anstelle des Pressfits zeigte keine Verbesserung an der Dichtigkeit.

Eine weitere Modifikation wurde an der Verbindungsstelle zum Oxidationsrohr vorgenommen. Im Lieferzustand war die GC-Kapillare über eine Valco-Verschraubung aus Metall mit dem Oxidationsrohr aus Keramik so verbunden, dass die Kapillare auf der einen Seite des Valcos endete und das Oxidationsrohr auf der anderen Seite begann. Beide waren durch eine kleine Öffnung verbunden. Die Drähte, auf denen die Verbrennung der Substanzen stattfindet, befinden sich jedoch nicht an dem Ende des Keramikrohres, das an das Valco anstößt, sondern in dem weiter innen gelegenen Bereich des Rohres, der sich in der Heizeinheit befindet. Bis die eigentliche Verbrennung der gasförmigen Substanzen stattfand, musste diese zuerst mit dem Heliumstrom an die heißeste Zone gelangen.

Damit die gasförmigen Substanzen aus der gaschromatographischen Einheit direkt bis an die heißeste Zone der Verbrennung geführt werden konnten, musste die Bohrung des Valcos vergrößert werden. Die Modifikation ist in **Abbildung 11.2-3** dargestellt. Gleichzeitig musste die Polyimidschicht der Kapillare ca. 2 cm abgebrannt werden, damit kein zusätzliches CO₂ von der GC-Säule verbrannt wird.

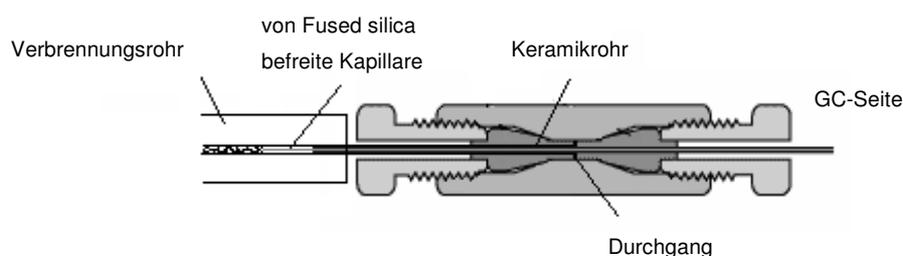


Abbildung 11.2-3: modifizierte Valco-Verschraubung im Verbrennungsofen

Durch diese Änderung wurde eine signifikante Steigerung der Signalintensität erreicht, da kältere Stellen, an denen die Steroide kondensieren konnten, überbrückt wurden.

Für die dritte Modifikation wurde das Reduktionsrohr ausgebaut, um das Totvolumen zu reduzieren. Das Reduktionsrohr ist zwischen dem Oxidationsrohr und der Nafion[®]-Membran lokalisiert. Es dient zum einen zur Entfernung des NO_x, das bei der Verbrennung des Stickstoffs entsteht. Die entstehenden NO_x sind nur bei der Stickstoffbestimmung störend. Zum anderen wird überschüssiger Sauerstoff entfernt, der aus dem Cu₂O des Oxidationsofens frei wird. Da bei der Messung nur die Kohlenstoffisotope relevant waren, konnte auf das Reduktionsrohr verzichtet werden. Lediglich der Sauerstoffuntergrund war nun leicht erhöht, was aber die Messung nicht beeinflusste.

11.2.2 Signalintensität

Je höher die Signalintensität, desto geringer ist die Streuung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes. In der **Abbildung 11.2-4** ist die Abhängigkeit der Streuung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes gegen die Signalintensität, die abhängig ist von der Menge des CO₂-Gases, dargestellt. Für eine hinreichend präzise Messung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes musste eine Spannung von mindestens 1000 mV erreicht werden.

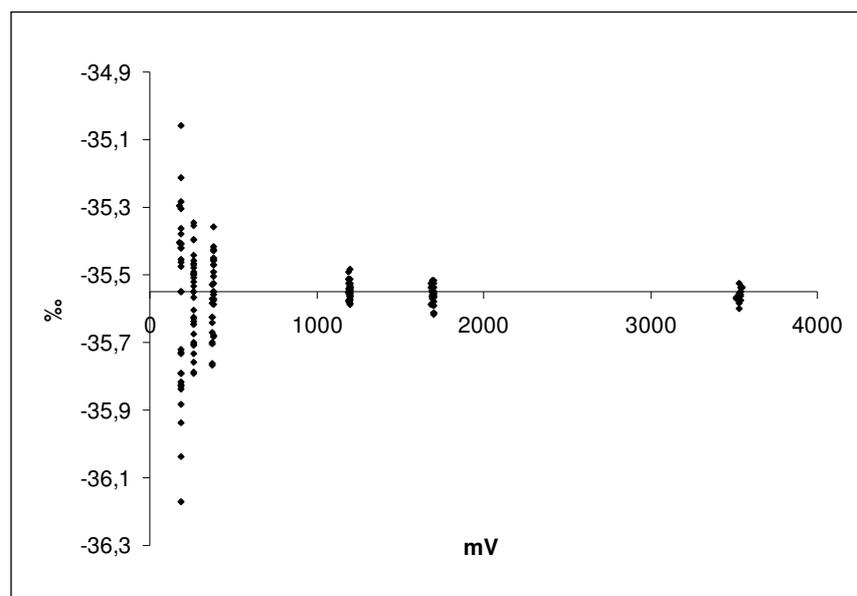


Abbildung 11.2-4: $\delta^{13}\text{C}$ des CO₂-Referenzgassignals in Abhängigkeit von der Signalthöhe in mV; n=30 je Signalthöhe, $\delta^{13}\text{C} = -35,550 \text{ ‰}$ (über EA/IRMS bestimmt)

Dies war ab einer Injektionsmenge von 35 ng/μl Nortestosteron gegeben. Dies entspricht einer absoluten Kohlenstoffmenge von 27,7 ng auf der Säule. In der vorliegenden Methodenentwicklung wurde diese Konzentration erreicht, indem der Extrakt mit Stickstoff zur Trockene eingeengt und in Cyclohexan wieder aufgenommen wurde. Die Menge an Cyclohexan wurde abhängig von der über die GC/FID-Messung bestimmten Konzentration an Nortestosteron so variiert, dass eine Signalintensität von 1000 mV erreicht wurde.

Die für die vorliegende Arbeit benötigte absolute Kohlenstoffmenge von 27,7 ng ist die doppelte Menge, die in der Veröffentlichung der Ergebnisse des ISOSTER-Projektes von Buisson et al.²¹⁵ genannt wird. Dort wird bereits von Messungen bei 15 ng absoluter Kohlenstoffmengen auf der Säule berichtet. Die Ergebnisse beziehen sich allerdings auf das Messsystem von GV Instruments, dem Isoprime. Bei diesem System beginnt der lineare Bereich bereits bei 2 nA (entspricht 600 mV). Prévost et al.¹⁶⁷ nennen für das Isoprime eine Signalintensität von 1,4 nA (420 mV). Hebestreit et al.²¹⁰ beschreiben in neusten Untersuchungen Messungen im Spurenbereich bei einer Signalhöhe von 250 mV.

Die benötigte Menge an Kohlenstoff für die Messung im Linearitätsbereich ist weniger abhängig von der Aufarbeitung. Sie ist vielmehr abhängig von der Gerätespezifität und der Nachweisempfindlichkeit der Quelle. Die Nachweisempfindlichkeit ist wiederum abhängig von der Anzahl der Ionen pro Molekül, die zur Messung benötigt werden. Bei der Nachweisempfindlichkeit der Quelle gibt es starke systembedingte Unterschiede.

11.3 Einflüsse der Messtechnik auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert

11.3.1 Aufkonzentrieren

Um die Signalintensität von 1000 mV zu erreichen, musste der Extrakt aufkonzentriert werden. Das Aufkonzentrieren verursachte keine messbare Isotopenfraktionierung, was aus den Versuchsergebnissen in **Tabelle 11.3-1** hervorgeht.

Der Betrag der Differenz der Mittelwerte zwischen „vor Abblasen“ und „nach Abblasen“ beträgt für Androstanon 0,11 ‰, für DHEA und Nortestosteron 0,21 ‰ und für Methyltestosteron 0,59 ‰. Alle Werte lagen innerhalb des Streubereiches der Standardsubstanzen (Androstanon $\pm 1,43$ ‰, DHEA $\pm 0,83$ ‰, Nortestosteron $\pm 0,60$ ‰, Methyltestosteron $\pm 0,54$ ‰, Bestimmung siehe Kapitel 15.4.2).

	Androstanon		DHEA		Nortestosteron		Methyltestosteron	
	frisch	abgeblasen	frisch	abgeblasen	frisch	abgeblasen	frisch	abgeblasen
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	-31,379	-31,99	-29,13	-29,18	-29,06	-28,60	-30,35	-29,55
	-32,01	-31,88	-29,611	-29,30	-29,00	-28,89	-30,10	-29,33
	-31,77	-31,63	-29,68	-29,30	-28,88	-28,83	-30,01	-29,82
$x_{\text{MW}} \delta^{13}\text{C}$ (‰)	-31,72	-31,83	-29,47	-29,26	-28,98	-28,77	-30,15	-29,57
$\pm s$	$\pm 0,26$	$\pm 0,15$	$\pm 0,24$	$\pm 0,06$	$\pm 0,07$	$\pm 0,12$	$\pm 0,14$	$\pm 0,20$
Differenz (‰)	0,11		0,21		0,21		0,59	

Tabelle 11.3-1: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Standardsubstanzen (je 35 ng/ μl) nach Abblasen (5 mal) unter N_2

11.3.2 Gaschromatographie

Die Aussage³⁹, dass durch die Veränderungen der Peakform (tailing und leading) während der gaschromatographischen Trennung, Isotopenfraktionierung auftreten können, konnte nicht bestätigt werden. Veränderungen des GC-Flusses und der Temperaturrate wirkten sich nicht auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert, sondern nur auf die Streuung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte aus.

In der **Tabelle 11.3-2** sind die Ergebnisse der Temperaturänderung (230°C und 250°C) und der Trägergasflussänderung (0,9 ml/Minute und 1,2 ml/Minute) auf die Parameter Retentionszeit (RT), Peakbreite (width), Signalintensität (Amp 44) und $\delta^{13}\text{C}$ -Wert vergleichend zusammengestellt. Die Änderungen wurden so gewählt, dass sie nicht außerhalb des Messzeitfensters lagen und damit nicht mehr vergleichbar gewesen wären.

Die Streuung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes der Substanzen wurde größer, je später die Substanz eluierte. Die Peakform wich stärker von der optimalen Gaußschen Verteilungsform ab, je später die Substanzen eluierten. Je früher die Substanzen eluierten, desto höher und schärfer waren die Signale und desto geringer war die Streuung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte. Dies fiel vor allem bei Methyltestosteron auf, das als letzte Substanz des Standardgemisches eluierte. Bei den für das Projekt gewählten GC-Bedingungen für die Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von Nortestosteron und DHEA waren die geringsten Streuungen im $\delta^{13}\text{C}$ -Wert zu beobachten.

	T (°C)	Fluss (ml/Minute)	RT (s)	width (s)	Amp 44 (mV)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
Androstanon	230	1,2	836,26±0,33	53,79±1,67	1500,14±133,17	-31,53±0,15
	240	0,9	862,17±0,52	38,23±3,8	1941,71±72,60	-31,25±0,11
	240	1,2	778,6±0,36	32,29±1,12	2829,39±52,07	-31,28±0,15
	250	1,2	726,13±0,46	30±0,34	4603,71±336,51	-31,28±0,14
DHEA	230	1,2	1186,23±0,49	47,11±2,22	1121,71±45,4	-29,53±0,15
	240	0,9	1129,15±0,81	49,73±1,8	1512,71±51,28	-29,16±0,11
	240	1,2	1003,37±0,47	42,53±2,34	1410,43±29,8	-29,30±0,15
	250	1,2	888,01±0,62	45,9±4,62	2162,85±95,87	-29,17±0,13
Nortestosteron	230	1,2	1337,7±1,86	49,79±2,48	695,71±57,34	-30,05±0,35
	240	0,9	1253,14±0,98	51,11±1,24	1040,43±42,18	-29,53±0,3
	240	1,2	1107,37±0,6	44,44±1,33	992,0±48,86	-29,73±0,13
	250	1,2	960,58±0,46	41,75±2,94	1307,33±69,13	-29,19±0,26
Methyltestosteron	230	1,2	1567,23±2,15	60,31±8,89	578,0±51,0	-30,76±0,51
	240	0,9	1441,74±1,15	58,07±1,98	880,71±51,95	-30,39±0,66
	240	1,2	1265,3±0,66	49,03±2,34	834,34±39,88	-30,42±0,44
	250	1,2	1070,33±0,49	43,95±5,31	1119,83±40,17	-30,04±0,36

Tabelle 11.3-2: Vergleich der Parameter Retentionszeit (RT), Peakbreite (width), Signalthöhe (Amp 44) und $\delta^{13}\text{C}$ -Wert in Abhängigkeiten zu Temperatur- und Trägergasflussänderung

11.3.3 Art des Messsystems

Die Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Festsubstanzen (Standardsubstanzen) wurde mit dem Isotopenverhältnismassenspektrometer ermittelt, dem ein Elementanalysator (EA) statt eines Gaschromatographen vorangeschaltet war. Während beim EA/IRMS-System die Festsubstanzen verwendet werden können, müssen diese, bevor sie auf das GC/C/IRMS-System aufgegeben werden können, erst in Lösung gebracht werden.

Um einen Unterschied der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen den Messsystemen EA/IRMS und GC/C/IRMS festzustellen, wurden die Reinsubstanzen des Standardgemisches auf beiden Systemen vermessen.

Nortestosteron von Sigma, das in der Standardlösung zur GC/C/IRMS-Messung verwendet wurde, entspricht mit dem $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von $-29,49 \text{ ‰} \pm 0,16$ ($n=8$) dem am EA/IRMS vermessenen $\delta^{13}\text{C}$ Wert von $-29,26 \text{ ‰} \pm 0,12$ ($n=8$). Es zeigte sich demnach kein signifikanter Unterschied im $\delta^{13}\text{C}$ Wert, wenn dieser über die Peripherie EA oder GC bestimmt wurde. Jedoch ist die Streuung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte, die über das EA/IRMS-System ermittelt wurden im Vergleich zur Bestimmung über das GC/C/IRMS-System geringer.

12 Ermittlung des Probenmaterials und der Kontrollmaterialien

12.1 Probenmaterial

Bei dem Probenmaterial handelte es sich um Urine geschlachteter Eber verschiedener Rassen (Deutsche Landrasse, Piètrain, Duroc und Deutsche Edelfrasse) aus einem Betrieb zur Eberleistungsprüfung. Die Tiere erhielten einheitliches Futter entsprechend der „Richtlinie für die Stationsprüfung auf Mastleistung, Schlachtkörperwert und Fleischbeschaffenheit beim Schwein“ vom 10.12.2003. Die im Internet und Eigendruck veröffentlichte Richtlinie²¹⁶ ist eine Empfehlung des Ausschusses für Leistungsprüfungen und Zuchtwertfeststellung beim Schwein (ALZ) des Zentralverbandes der Deutschen Schweineproduktion (ZDS) und basiert auf der Verordnung über die Leistungsprüfungen und die Zuchtwertfeststellung bei Schweinen²⁰⁹ sowie dem Tierzuchtgesetz²¹⁷. Eine Beeinflussung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses durch unterschiedliches Futter kann deshalb bei den hier berichteten Versuchsergebnissen ausgeschlossen werden.

Neben den Urinen konnten zusätzlich Muskel- und Organproben einiger Tiere entnommen werden.

Zur Auswahl einer geeigneten Probenmatrix für die Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses von Nortestosteron wurden Vorversuche durchgeführt. Dazu wurden die Gehalte von Nortestosteron in Leber, Niere, Hoden und Speicheldrüse mit konventioneller GC/MS im Labor des CVUA²¹⁸ bestimmt.

In keiner Publikation wird von einer Untersuchung des Gehaltes an Nortestosteron in der Speicheldrüse berichtet. Der Eber setzt als einziges Tier das Pheromon Androsten-16-3-on durch die Speicheldrüsen in den Speichelschaum im Vorspiel als Geruchsstimulans für die Sau frei. Es lag die Annahme nahe, dass Nortestosteron ebenfalls in hohen Konzentrationen in der Speicheldrüse vorkommen könnte. Daher wurde eine Speicheldrüse auf den Gehalt an Nortestosteron untersucht. Jedoch wies die Speicheldrüse beim Vorversuch den niedrigsten Gehalt aller gemessenen Matrices an Nortestosteron auf. In **Tabelle 12.1-1** sind die Ergebnisse des Vorversuchs dargestellt. Im Urin wurde mit Abstand der höchste Gehalt an Nortestosteron nachgewiesen, so dass Urin als Probenmatrix ausgewählt wurde.

Aus den in der Literatur genannten Werten geht hervor, dass im Fleisch der Nortestosterongehalt mit $3,6 \mu\text{g}/\text{kg}^{20, 27}$ und $<0,3-13 \mu\text{g}/\text{kg}^{20, 27}$ sehr gering ist. Fleisch wurde daraufhin nicht im Vorversuch untersucht.

Untersuchungsmaterial	Nortestosteron ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Speicheldrüse	0,4
Leber	9,8
Niere	11,9
Hoden	8,3
Urin	>1000

Tabelle 12.1-1: Nortestosterongehalte in verschiedenen Geweben und im Urin eines Ebers

Die Gehalte an Nortestosteron in Leber und Niere des Ebers, die in der vorliegenden Arbeit bestimmt wurden, liegen innerhalb des Datenbereiches der Untersuchungen von anderen Laboratorien, die für Leber^{20,27,167}, Niere^{27,167} und Hoden^{27,167} (siehe Tabelle 6.6-1) bestimmt wurden. Insgesamt lagen die Werte im unteren Bereich der Vergleichsdaten.

Die Nortestosterongehalte der oben genannten Organen sowie den weiteren Matrices Plasma^{25, 27}, Herz²⁷ und Galle²⁰ stellten gegenüber der Matrix Urin keine signifikanten Mengen dar.

Der Urin wurde bei der Schlachtung von den Mitarbeitern der Landesanstalt für Landwirtschaft und Gartenbau des Landes Sachsen-Anhalt in Iden direkt aus der Blase entnommen und sofort bei -20°C eingefroren. Die Muskel- und Gewebeproben wurden entsprechend tiefgefroren. Die tiefgefrorenen Proben wurden einen Tag später auf dem Postweg versendet. Die Proben wurden bei der Ankunft im Hause bei Raumtemperatur aufgetaut. Ein Aliquot von 15 g wurde abgewogen und bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

12.2 Festlegen des Precursors von Nortestosteron

Bei einer exogenen Nortestosteronanwendung wird Nortestosteron mit einem bestimmten $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis dem Organismus zugeführt. Die Vorläufersubstanz der Nortestosteronbiosynthese wird durch das exogene Nortestosteron und dessen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses nicht beeinflusst. Um einen Nachweis einer illegalen Nortestosteronanwendung zu erbringen, ist dieser Vorläufer deshalb von entscheidender Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde als biosynthetische Vorläufersubstanz für Nortestosteron nach den Ergebnissen der qualitativen Analyse des Steroidprofils das DHEA ausgewählt. Eine detaillierte Darstellung ist dem Kapitel 14.1 zu entnehmen. Verglichen mit den weiteren vorkommenden Steroiden lag DHEA in hoher Konzentration im Urin vor. Die hohen Konzentrationen von DHEA im Eber ist mit dem Delta 5-Weg zu erklären. DHEA ist der direkte Vorläufer der Testosteronbiosynthese und der Delta 5-Weg ist der beim Eber bevorzugte Weg für die Testosteronsynthese. Über Testosteron entsteht wie in Kapitel 6.5 besprochen das Nortestosteron.

Als Vorläufer für das Steroid Nortestosteron werden aber auch die Steroide Norandrostendion¹⁶⁷ und Estron¹⁶⁵ vorgeschlagen.

12.3 Kontroll- oder Blankurin mit Standards

Für die Aufarbeitungskontrolle und die Überprüfung einer möglichen Isotopenfraktionierung der Steroide sollte eine Matrix verwendet werden, die der Untersuchungsmatrix am ähnlichsten, aber frei von Steroiden, ist. Als Kontroll- oder Blankurin wurde Kastratenurin ausgewählt.

Es zeigten sich nach der durchgeführten Aufarbeitung keine relevanten Steroidmengen, so dass der Kastratenurin als Kontrollurin geeignet war. Der Kastratenurin stammte aus dem Schlachthof in Freiburg. Es handelte sich dabei um einen Mischurin der geschlachteten Tiere.

In der **Abbildung 12.3-1** ist das GC/FID Chromatogramm eines reinen Kastratenurins und eines mit den Kontrollstandardsubstanzen dotierten Kastratenurins dargestellt. Androstan-3-on, künftig nur als Androstanon bezeichnet, wurde als interner Korrekturstandard zur Quantifizierung verwendet. Androstanon wurde gewählt, weil es nicht im Eberurin vorkommt. Bei der Eberpheromonbestimmung in der Lebensmittelüberwachung²¹⁹ wird Androstanon als interner Standard verwendet.

Als Kontrollstandardsubstanzen wurden Nortestosteron und DHEA sowie Methyltestosteron festgelegt.

Methyltestosteron wurde als interner Standard zur Aufarbeitungskontrolle gewählt, da es physiologisch im Eberurin nicht vorkommt.

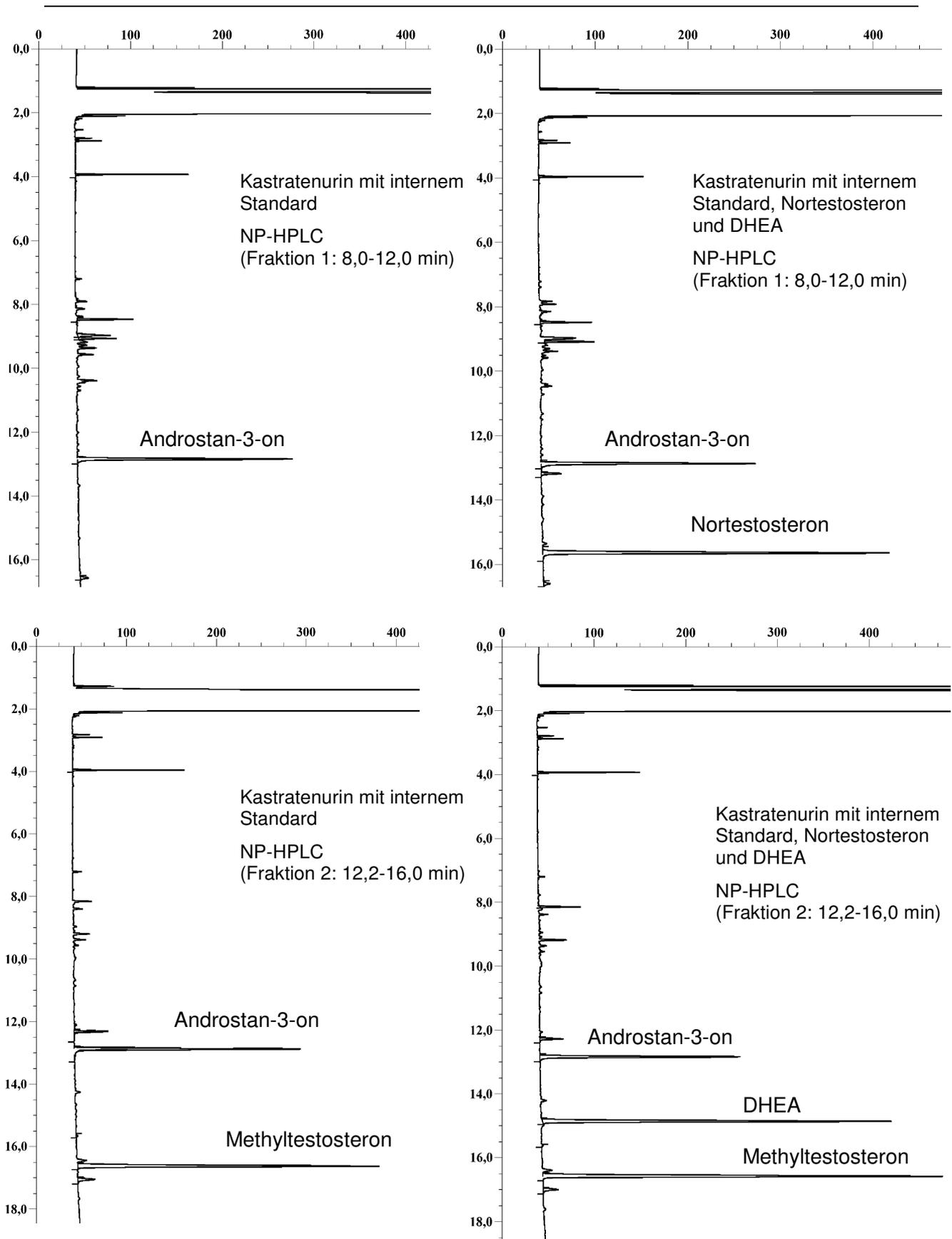


Abbildung 12.3-1: GC/FID Chromatogramme der beiden Fraktionen 1 und 2 der NP-HPLC-Analyse des Kastratenurins, links: Kastratenurin nur mit internem Standard (Methyltestosteron und Androstan-3-on), rechts: Kastratenurin mit internem Standard, Nortestosteron und DHEA

13 Entwicklung der Aufarbeitungsmethode

13.1 Einleitung

Die Steroide werden während des Metabolismus in der Phase II-Reaktion entweder glucuronidiert oder sulfatiert, damit sie über die Niere ausgeschieden werden können. Als Sulfat- und Glucuronid-derivat lassen sich Steroide schlecht bis gar nicht nachweisen. Die Steroide sollten deshalb in einer ungebundenen Form vorliegen. Dies wird erreicht, indem die Derivate entweder chemisch oder enzymatisch gespalten werden.

Die Glucuronidderivate werden über eine enzymatische Hydrolyse freigesetzt. Das dafür am häufigsten verwendete Enzym ist die β -Glucuronidase. Erhältlich ist die β -Glucuronidase in Enzymaufbereitungen aus Mollusken, aus Bakterien und aus der Rinderleber. Die Molluskenaufbereitungen werden aus *Helix pomatia* (Weinbergschnecke), *Patella vulgata* (gemeine Napfschnecke) und *Ampullaria* (Frischwasserschnecke) hergestellt. Abhängig vom Hersteller gibt es die Aufbereitung der *Helix pomatia* als lyophilisiertes Pulver oder als stabilisierte wässrige Form, welche in dem Projekt verwendet wurde. Die Bakterienzubereitungen sind aus *Escherichia coli* (*E.coli*) erhältlich. Möglich ist aber auch eine enzymatische Hydrolyse mit der Protease Subtilisin A aus dem Bakterium *Bacillus subtilis*.

Aus der zusammenfassenden Aufstellung in **Tabelle 6.6-1** auf den Seiten 40/41 wird deutlich, dass in den publizierten Untersuchungen die Hydrolyse der Steroide mit den unterschiedlichen Enzymen β -Glucuronidase und Subtilisin A durchgeführt wird. Auch werden bei einer enzymatischen Hydrolyse mit β -Glucuronidase entweder Zubereitungen aus *E.coli* oder aus *Helix pomatia* verwendet. In den Enzymzubereitungen aus *Helix pomatia* findet sich neben der β -Glucuronidase zusätzlich eine Arylsulfatase. Im folgenden wird die Enzymzubereitung aus *Helix pomatia* nur als *Helix pomatia* bezeichnet.

Obwohl bei der Steroidanalytik die Spaltung der Steroidderivate eine wesentliche Rolle spielt, gibt es kein einheitliches enzymatisches Verfahren zur Freisetzung von Nortestosteron bzw. anderer Steroide aus den Glucuronid- und Sulfat-derivaten.

Bei Untersuchungen, die im Rahmen der Dopingkontrolle durchgeführt werden, wird hauptsächlich das Enzym aus *E.coli* verwendet, da nur die an Glucuronsäure

gebundenen Steroide von Interesse sind¹⁷³. Eine Spaltung der an Schwefelsäure gebundenen Steroide ist nicht notwendig.

Am CVUA Freiburg werden die Proben für den Nationalen Rückstandskontrollplan mit Enzympbereitung aus *Helix pomatia* behandelt. Die dafür verwendete Analyse-methode entspricht der Entscheidung der Kommission 2002/657²²⁰. Viele Pub-likationen zur GC/C/IRMS Analytik, beschreiben die enzymatische Hydrolyse mit *Helix pomatia*^{179,180,181,182,183}. Auch jüngste Forschungsarbeiten von Poelmans et al.¹⁶⁶ und von Prévost et al.¹⁶⁷ werden ebenfalls mit *Helix pomatia* durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die enzymatische Spaltung der glucuronidiert vorliegenden Steroide die β -Glucuronidase aus dem Schneckenschleim der *Helix pomatia* (Merck, Darmstadt; Glucuronidaseaktivität: 40 Unit/ml; Sulfataseaktivität: 20 Unit/ml; stabilized aqueous) verwendet.

An verschiedenen Matrices sollte überprüft werden, welchen Einfluss die Enzym-behandlung auf die Probe hat. Dazu sollte untersucht werden, wie hoch die prozentuale Freisetzung von Nortestosteron und DHEA aus den Glucuronid- und Sulfat-derivaten durch die Enzyme aus *Helix pomatia* und *E.coli* ist.

13.2 Hydrolyse mit β -Glucuronidase aus *Helix pomatia*

Die Hydrolyse mit *Helix pomatia* wurde mit Puffer und Kastratenuurin als zwei unterschiedliche Matrices und den Einwirkzeiten von 90 Minuten und 24 Stunden ge-testet. Ausgehend von einem Prüfverfahren des CVUA Freiburg²²¹ wurde der Ver-such am pH-Optimum von 4,8 durchgeführt. Die Enzymaktivität der *Helix pomatia* liegt in einem breiten pH-Bereich von 4-7 und einem Temperaturbereich zwischen 4 °C und 80 °C²²².

In der folgenden **Tabelle 13.2-1** sind die Ergebnisse der Hydrolyse der Standardsubstanzen Nortestosteron-17 β -glucuronid und Nortestosteron-17 β -sulfat sowie DHEA-3 β -glucuronid und DHEA-3 β -sulfat dargestellt. Die prozentuale Freisetzung bezieht sich auf die nach der Hydrolyse frei vorliegenden Steroide Nortestosteron und DHEA. Quantifiziert wurden die freien Steroide mittels GC/FID.

Matrix	Kastratenurin		Acetatpuffer		Acetatpuffer	
Temperatur; pH	45°C; 4,8		45°C; 4,8		45°C; 4,8	
Reaktionszeit	90 Minuten		90 Minuten		24 Stunden	
	Steroid _{frei} (%)	n	Steroid _{frei} (%)	n	Steroid _{frei} (%)	n
Nortestosteron-17β-glucuronid	78,9	1	73,6	1	12,8 ± 7,1	2
Nortestosteron-17β-sulfat	2,0	1	-	-	-	-
DHEA-3β-glucuronid	60,0	1	67,4 ± 1,0	2	n.n.	2
DHEA-3β-sulfat	3,2	1	-	-	-	-

Tabelle 13.2-1: Konzentration von Nortestosteron und DHEA nach Spaltung der Glucuronid- und Sulfat-derivate mit *Helix pomatia* in Kastratenurin und Puffer (Dotierungsmengen: 400 µg/kg, Enzymmenge 150 µl)

Auffallend war, dass im Kastratenurin nur 2,0 % Nortestosteron und 3,2 % DHEA aus den Sulfat-derivaten freigesetzt und nachgewiesen wurden. Da im Urin die Steroid-sulfate mit der im Projekt verwendeten Enzymzubereitung aus *Helix pomatia* praktisch nicht spaltbar waren, wurden keine weiteren Versuche in Puffer als Matrix durchgeführt.

Auch bei Untersuchungen von Le Bizec et al.²²² konnten mit der Enzymzubereitung aus *Helix pomatia* kein Nortestosteron aus Nortestosteron-17β-sulfat freigesetzt werden. Bereits in frühen Publikationen wird bei Mollusken nur von einer Spezifität der Sulfatase für 3β-Sulfate (wie z.B. DHEA) oder 5α- oder Δ⁵-Derivate²²³ berichtet. Auch wird berichtet, dass die Sulfatase aus *Helix pomatia* keine 17β-Sulfate spalten kann^{22,224,225,226}. Deshalb wurde bei den publizierten Untersuchungen an Steroid-sulfaten entweder eine chemische Hydrolyse oder eine Solvolyse^{22,144,174,210,226} an die enzymatische Hydrolyse angeschlossen.

Im Gegensatz zu dem Ergebnis dieser Arbeit, berichten Messeri et al.²²⁷ von einer nahezu vollständigen Hydrolyse von DHEA-sulfat mit *Helix pomatia*. Jedoch wurde gleichzeitig beobachtet, dass das freigesetzte DHEA um so schneller abgebaut wird, je höher die eingesetzte Enzymkonzentration war. Diese Beobachtung machten auch Graef et al.²²⁸.

Aus den Versuchen der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Abhängigkeit der Steroidkonzentration von der Einwirkzeit. Bei 24 Stunden Einwirkzeit waren nur noch 12,8 % Nortestosteron und kein DHEA nachzuweisen. Auch andere Autoren^{227,228} berichteten von einer abnehmenden Enzymaktivität mit Zunahme der Einwirkdauer.

Messeri et al.²²⁷ beobachteten zusätzlich eine Abhängigkeit von der Zubereitung. Je frischer die aus dem lyophilisierten Pulver hergestellte Enzymlösung war, desto schneller wurde DHEA abgebaut.

Die unvollständige Spaltung der Steroidkonjugate liegt zum Teil aber auch an der Matrix Urin selbst, da im Urin Hemmstoffen für die Sulfatase und β -Glucuronidase berichtet werden, die die Enzymaktivitäten hemmen^{229,230,231}. Bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit war anhand der Einzelmessung kein Unterschied zwischen der Matrix Urin und Puffer festzustellen. Inwieweit im Eberurin Störstoffe vorhanden sind, ist in weiteren Untersuchungen zu prüfen. Zur Entfernung der Störstoffe wird das Absorberharz Amberlite XAD-2 vorgeschlagen²²⁹. In einigen Publikation^{180,225} findet es Anwendung.

Für eine vollständige Spaltung der Steroidkonjugate wird auch eine Kombination der Enzyme aus *Helix pomatia* und *Ampullaria* vorgeschlagen²³².

Graef et al.²²⁸ berichteten von einer Stabilität der Steroide während der Lagerung des Urins. Ein möglicher Steroidabbau während der Lagerung konnte somit ausgeschlossen werden. Auch konnte in der vorliegenden Arbeit kein Abbau der beiden Steroide Nortestosteron und DHEA durch die Enzymzubereitung beobachtet werden. Ein möglicher Abbau wurde getestet, indem dem Kastratenurin Nortestosteron und DHEA zugesetzt und entsprechend aufgearbeitet wurde. Die Wiederfindung für Nortestosteron lag bei 97,0 % \pm 15,6 und für DHEA bei 104,9 % \pm 14,9 (**siehe Tabelle 13.2-2**).

Steroid	WDF (%) \pm s	n
DHEA	104,9 \pm 14,9	3
Nortestosteron	97,0 \pm 15,6	6

Tabelle 13.2-2: Kastratenurin mit DHEA und Nortestosteron (100 μ l einer Konzentration von 33,3 μ g/kg) dotiert und mit 150 μ l Enzymzubereitung aus HP aufgearbeitet

In den Enzymaufbereitungen aus Mollusken wurden nicht nur die Enzyme β -Glucuronidase und Arylsulfatase gefunden, sondern weitere Enzyme, die dafür verantwortlich gemacht werden, dass es zum einen zu unerwünschten Abbaureaktionen kommen kann^{225,228}. Zum anderen kann es auch zu Artefaktbildung kommen. Im einzelnen handelt es sich bei der Enzymzubereitung von *Helix pomatia* um die Enzyme 3 β -Hydroxysteroid-Oxoreduktase und 3-Oxosteroid-5,4-Isomerase, die aus

DHEA das Steroid Androstendion^{225,233}, aus Androstendiol Testosteron^{225,233} und aus Pregnanolon Pregnenolon²³⁴ bilden kann. Auch wurde eine Aktivität für die Enzyme 6-Hydrolase, 6-Dehydrogenase und 6-Hydroxysteroidoxidase festgestellt²²⁵. Die Artefaktbildung ist zudem abhängig vom Hersteller²³³ und der Lagerung²²⁷.

In **Abbildung 13.2-1** sind die beschriebenen Artefaktbildungen dargestellt.

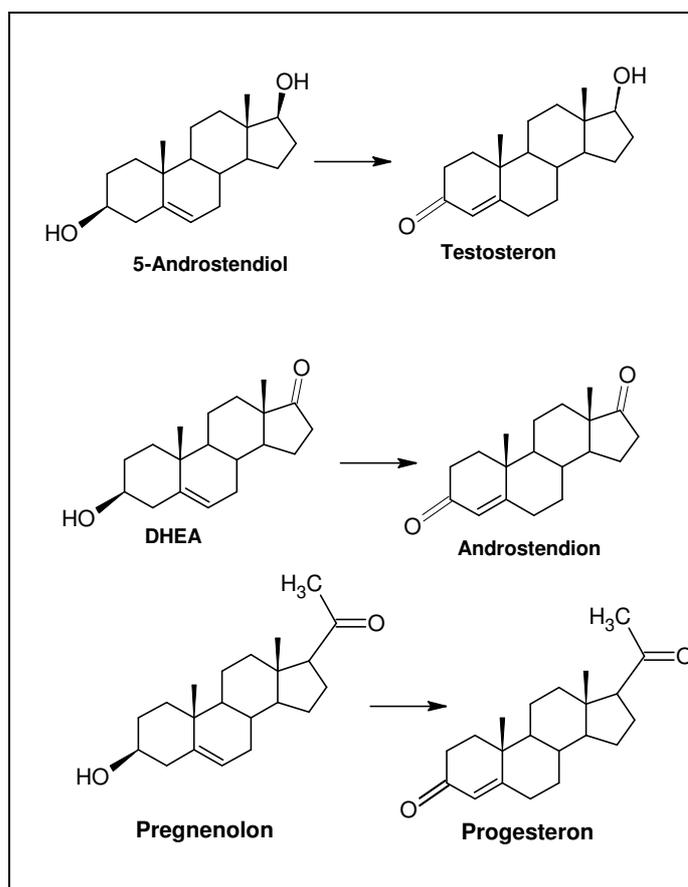


Abbildung 13.2-1: Beschriebene Artefaktbildung

Untersuchungen über die Artefaktbildung zu Nortestosteron gibt es nicht, obwohl Nortestosteron ebenfalls ein 3-Oxosteroid ist. Nortestosteron ist als Artefakt bei der enzymatischen Hydrolyse mit *Helix pomatia* denkbar. In **Abbildung 13.2-2** ist eine mögliche Bildung von Nortestosteron aus 4-Estrendiol dargestellt.

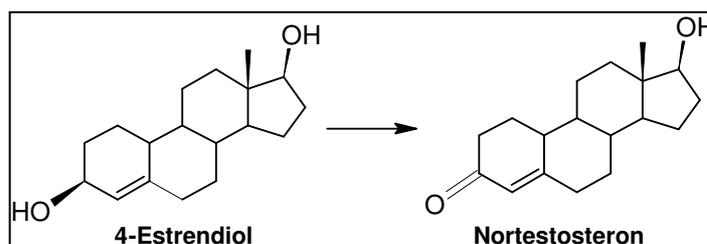


Tabelle 13.2-2: Mögliche Bildung von Nortestosteron

Bei der mit der verwendeten Helix pomatia von Merck (Darmstadt, Deutschland) wurde Nortestosteron als Artefakt von 4-Estren-3 β ,17 β -diol in einer Doppelbestimmung bei der Matrix Puffer zu 26,95 % und bei Kastratenurin zu 15,5 % bestimmt (**Tabelle 13.2-3**). Im Kastratenurin konnte Testosteron mit 6,2 % und Androstendion mit 3,9 % als Artefakte nachgewiesen werden.

	Nortestosteron (%)		Mittel (%)
	Puffer + 4-Estren-3 β ,17 β -diol	26,7	27,2
Kastrat Urin + 4-Estren-3 β ,17 β -diol	15,3	15,7	15,5

Tabelle 13.2-3: Prozentuale Artefaktbildung von 4-Estren-3 β ,17 β -diol unter Einwirkung von Helix pomatia

Da weder 4-Estren-3 β ,17 β -diol noch Androstendion im Eberurin massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnten, wurde Helix pomatia in der vorliegenden Arbeit zur Hydrolyse verwendet. In parallelen Untersuchungen aus Belgien (2003)²⁴ Frankreich (2004)¹⁶⁷ und wurde Helix pomatia ebenfalls zur Hydrolyse von Nortestosteron-derivaten verwendet.

Ist allerdings in der zu untersuchenden Matrix das Steroid 4-Estren-3 β ,17 β -diol vorhanden, ist eine Hydrolyse mit Helix pomatia nicht durchführbar. Weitere mögliche Steroide zur Artefaktbildung wären 5-Estren-3 β ,17 β -diol und 5-Estren-17 β -ol, 3-on, die aber beide auf dem internationalen Markt nicht zu erwerben waren.

Sind Testosteron und Progesteron die zu untersuchenden Substanzen, ist eine mögliche Artefaktbildung mit der zu verwendenden Helix pomatia immer zu überprüfen und gegebenenfalls mit der β -Glucuronidase aus *E.coli* aufzuarbeiten.

Bei der Verwendung von Helix pomatia der Firma Serva aus Heidelberg (β -Glucuronidaseaktivität: 7,8 Unit/ml; Sulfataseaktivität: 12,1 Unit/ml) wird ebenfalls eine Artefaktbildung bei den Substanzen Androstendion, Testosteron und Pregnenolon beschrieben²³³. Wird Helix pomatia von Boehringer Mannheim (β -Glucuronidaseaktivität: 100000 Fishman Units/ml (entspricht 4,5 Units/ml); Sulfataseaktivität: 1000-5000 Fishman Units/ml (entspricht 0,45-2,25 Units/ml)) verwendet, findet man sogar bis zu 50-70 % Testosteron als Artefakt, bei Helix pomatia von Sigma (Enzymaktivitäten sind nicht genannt) nur 0,1-0,2 %²³⁵.

Keine Artefaktbildung aus DHEA in ethanolischer Lösung wird mit *Helix pomatia* der Firma l'Industrie Biochimique Francaise in Clichy (β -Glucuronidaseaktivität: 2000 Fishman Units/ml (entspricht 0,09 Unit/ml); Sulfataseaktivität: 20000 Roy Units/ml (entspricht 0,35 Unit/ml)) DHEA beschrieben²³⁴. Zur Ergänzung sei genannt, dass diese Enzymzubereitung ebenso keine Artefakte aus den 5-Pregnensteroiden 16α -Hydroxypregnenolon und 21-Hydroxypregnenolon sowie den 5-Androstenen 16α -Hydroxyepiandrosteron und $3\beta,17\beta$ -Dihydroxy-5-androsten-16-on liefert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der Artefaktbildung und bei der Spaltung der Steroidderivate die Enzymzubereitung und die Herkunft des Präparates den größten Einfluss hat. Es ist daher sorgfältig auf die Eignung der Enzymzubereitung bei den zu analysierenden Steroiden und der verwendeten Matrix abzuwägen. Vor allem im Spurenbereich ist eine Artefaktbildung wegen eines falsch positiven Ergebnisses durch Hydrolyse mit *Helix pomatia* zu überprüfen.

13.3 Hydrolyse mit β -Glucuronidase aus *E.coli*

Neben der enzymatischen Hydrolyse mit *Helix pomatia* wurde auch die Hydrolyse mit *E.coli* überprüft.

Um zu sehen, ob sich durch die enzymatische Hydrolyse mit der β -Glucuronidase aus *E.coli* eine bessere Freisetzung aus Nortestosteron-glucuronid und DHEA-glucuronid ergibt, wurden in der vorliegenden Arbeit einige Versuche mit *E.coli* durchgeführt.

Bei 5 Stunden Inkubation wurden 65,2 % Nortestosteron und 67,6% DHEA aus den entsprechenden Glucuroniden freigesetzt. Wurde Kastratenerin statt Puffer verwendet, wurden 65,5 % freies Nortestosteron und 77,2 % freies DHEA nachgewiesen. Im Gegensatz zur Hydrolyse mit *Helix pomatia* zeigte sich, dass die Reaktionszeit bei *E.coli* keinen Einfluss auf die Menge der freien Steroide hat.

Eine vollständige Hydrolyse konnte auch mit *E.coli* nicht erreicht werden.

Die nachfolgende **Tabelle 13.3-1** zeigt die Ergebnisse im Überblick.

<i>Matrix</i>	<i>Puffer</i>		<i>Puffer</i>		<i>Urin Kastrat</i>	
<i>Temperatur</i>	37°C		37°C		37°C	
<i>pH</i>	6,0		6,0		6,0	
<i>Reaktionszeit</i>	5 Stunden		24 Stunden		5 Stunden	
	WDF _{frei} (%)	n	WDF _{frei} (%)	n	WDF _{frei} (%)	n
Nortestosteron17β-glucuronid	65,2	1	61,6 ± 4,7	2	65,5	1
DHEA-3β-glucuronid	67,6 ± 3,4	2	78,6 ± 5,6	2	77,2	1

Tabelle 13.3-1: Spaltung der eingesetzten Glucuronid-derivate von Nortestosteron und DHEA (je 100 µl einer Konzentration von 100 ng/µl) mit 100 µl *E.coli*

13.4 Vergleich der Hydrolyse mit β-Glucuronidase aus *Helix pomatia* und *E.coli*

Um die β-Glucuronidase aus *Helix pomatia* und *E.coli* zu vergleichen, wurde die Hydrolyse mit den beiden Enzymen durchgeführt und sowohl die Konzentration als auch die δ¹³C-Werte von Nortestosteron der Urine verglichen.

13.4.1 Einfluss der Hydrolyse auf die Konzentration von Nortestosteron

Auch bei der Aufarbeitung von Urin konnten keine Unterschiede in der Konzentration an Nortestosteron zwischen der enzymatischen Spaltung mit *E.coli* und mit *Helix pomatia* festgestellt werden.

So wurden bei einem Mischurin mit der Anwendung von *Helix pomatia* 593,4 µg/kg Nortestosteron und von *E.coli* 514,1 µg/kg Nortestosteron nachgewiesen. Auch bei einem Urin zeigte sich im Vergleich ein ähnliches Zahlenbild. Der Vergleich ist in der **Tabelle 13.4-1** dargestellt.

	Mischurin		Urin	
	HP	<i>E.coli</i>	HP	<i>E.coli</i>
	µg/kg		µg/kg	
Nortestosteron	593,4 (n=1)	514,2 (n=1)	393,1±27,5 (n=6)	315,4± 37,1 (n=3)

Tabelle 13.4-1: Vergleich zwischen den Gehalten an Nortestosteron anhand der Aufarbeitung zweier Eberurine mit β-Glucuronidase aus *Helix pomatia* und *E.coli*

13.4.2 Einfluss der Hydrolyse auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert

Es wurden die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron beider enzymatischer Hydrolyseverfahren mit *Helix pomatia* und *E.coli* gemessen. Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Nortestosteron aus der Hydrolyse mit *Helix pomatia* wurde mit $-26,26 \text{ ‰} \pm 0,23$ ($n=3$) bestimmt. Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Nortestosteron mit *E.coli* wurde zu $-25,92 \text{ ‰} \pm 0,15$ ($n=3$) bestimmt. Es konnte kein Unterschied am $\delta^{13}\text{C}$ -Wert gemessen werden, die Ergebnisse lagen im Bereich der Streuung für Nortestosteron von $\pm 0,6 \text{ ‰}$.

Ob die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für alle Steroide aller Matrices unabhängig der enzymatischen Aufarbeitung mit *Helix pomatia* oder *E.coli* sind, ist damit nicht gezeigt und muss bei entsprechender Fragestellung erneut untersucht werden.

13.5 Methanolyse

Eine chemische Hydrolyse, bei der gleichzeitig Glucuronide und Sulfate gespalten werden, ist die in der Literatur^{222,233,236} beschriebene Methanolyse. Eine Anwendung bei Urinen konnte in der Literatur nicht gefunden werden. Es wurde die Methanolyse nur mit synthetischen Testosteron-derivate beschrieben.

Die Methanolyse wurde nach Tang et al.²³⁶ durchgeführt, um zu testen, welche Ausbeuten für einige Derivate erzielt werden können, um gegebenenfalls die chemische Hydrolyse statt der enzymatischen Hydrolyse durchzuführen. Die genannte Literaturstelle von Tang et al. wird in Bezug auf eine gleichzeitige Spaltung der Sulfat- und Glucuronid-derivate in vielen Publikationen zitiert.

Nach der durchgeführten Methanolyse im Puffer wurde die Menge an freiem Nortestosteron aus synthetischen Nortestosteronverbindungen in Einzelbestimmungen bestimmt. Die Ergebnisse sind in der **Tabelle 13.5-1** dargestellt.

Substanz	Hersteller	Freies Nortestosteron (%)
Nandrolon 17-propionat	Riedel-de Haén	102,1
Nortestosteron-hemisuccinat	Steraloids	33,8
Nortestosteron-decanoat	Sigma	83,8

Tabelle 13.5-1: Ausbeute (%) aus synthetischen Nortestosteron-derivaten

Während Nortestosteron-17-propionat vollständig freigesetzt wurde, konnte nach der Methanolyse von Nortestosteron-hemisuccinat nur 33,8 % freies Nortestosteron bestimmt werden.

Die Methanolyse wurde daraufhin mit Sulfat- und Glucuronidderivaten von Nortestosteron und DHEA (Variante A in **Tabelle 13.5-2**) durchgeführt.

Zur Überprüfung auf die Vollständigkeit der Methanolyse, wurde die Methanolyse mit der 4-fachen Menge an Reaktionslösung und der 4-fachen Inkubationszeit (Variante B) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 13.5-2** zusammengefasst.

Substanz	Variante A	Variante B	Mittelwert (%)
	Freies Nortestosteron (%)		
Nortestosteron-17 β -glucuronid	30,7	32,2	31,45
Nortestosteron-17 β -sulfat	33,4	32,5	32,95
DHEA-3 β -glucuronid	51,9	62	56,95
DHEA-3 β -sulfat	54,6	82,2	68,3

Tabelle 13.5-2: Ausbeute (%) aus physiologischen Nortestosteronderivaten

Eine vollständige Hydrolyse der Nortestosteron- und DHEA-derivate konnte auch mit der Methanolyse nicht erreicht werden. Weiter ist festzustellen, dass durch die Methanolyse allgemein eine bessere Freisetzung von Nortestosteron aus den synthetischen Nortestosteron-derivaten als aus den physiologischen Nortestosteron-derivaten erreicht wurde.

Die Methanolyse war damit nach der durchgeführten Vorschrift für das vorliegende Projekt nicht geeignet.

Weiterführende Untersuchungen zur Methanolyse unter anderen Reaktionsbedingungen sind anzustreben, da diese Hydrolysemethode die Summe der Glucuronid- und Sulfat-derivate erfasst.

13.6 Clean up mit Hydrolyse und Flüssig-/Flüssigextraktion

Der Aufarbeitungsmethode der vorliegenden Arbeit lag eine Arbeitsvorschrift²³⁷ aus der Rückstandsanalytik zu Grunde. Diese sieht keinen Aufreinigungsschritt über eine Festphasenextraktion vor, sondern nur über eine Flüssig-/Flüssigextraktion. Der Vorteil der Flüssig-/Flüssigextraktion liegt in der einfachen Extraktion freier

Steroide¹⁷⁸. Auch lassen sich Androgene von den Estrogenen durch eine starke Änderung des pH-Wertes trennen, indem der pH-Wert vom sauren in den stark alkalischen Bereich verschoben wird. Der pK_a der Estrogene liegt bei 10,7²³⁸, so dass die Estrogene im basischen Bereich in der dissoziierten Form vorliegen und in die wässrige Phase übergehen.

Bei einem Vorversuch mit Festphasenextraktion (SPE) konnte nach durchgeführter Extraktion kein Nortestosteron im Extrakt detektiert werden, so dass auf den Schritt der SPE verzichtet wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden die glucuronidiert und frei vorliegenden Androgene untersucht. Die Aufarbeitung ist in **Abbildung 13.6-1** schematisch dargestellt.

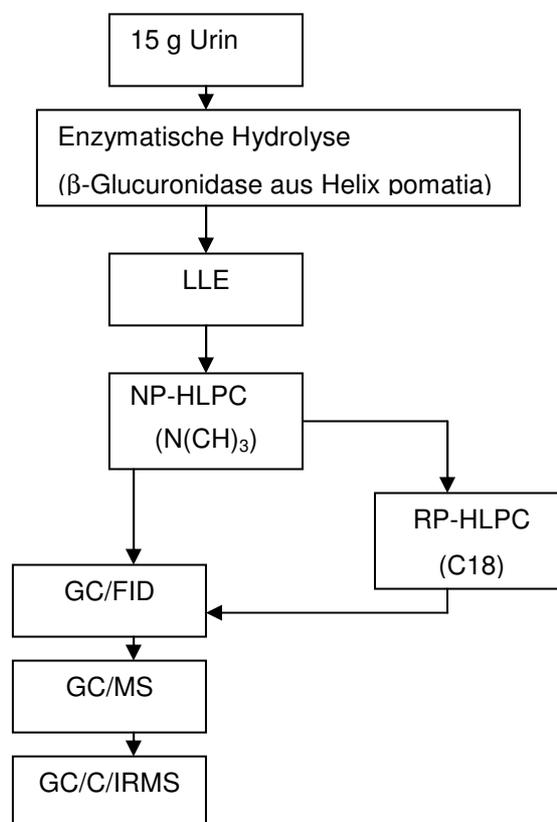


Abbildung 13.6-1: Aufarbeitungsschema

Der eingesetzte Urin (15 g) wurde mit Acetatpuffer auf das Optimum der Helix pomatia eingestellt und mit der β-Glucuronidase aus Helix pomatia versetzt, um die Steroid-glucuronide zu hydrolysieren. Die Urinprobe wurde mit Acetonitril homogenisiert. Die Steroide wurden durch Aussalzen von der wässrigen in die organische Phase überführt. Durch das Aussalzen mit NaCl, dem so genannten „Aussalzeffekt“,

wurde die Löslichkeit der Steroide in der wässrigen Phase aufgrund zunehmender Dichte zurückgedrängt, so dass diese vermehrt in die organische Phase übertreten mussten. Dabei lag NaCl nicht vollständig gelöst vor.

Dieser Rohextrakt²³⁹ war Ausgangspunkt für die darauf folgende Flüssig-/Flüssigextraktion. Die organische Phase wurde mit einem Butylmethylether/Hexan-Gemisch ausgeschüttelt, in der Konzentrationszentrifuge eingeeengt und aufkonzentriert. Anschliessend wurden die Estrogene durch Zugabe von NaOH im alkalischen Bereich abgetrennt.

13.7 Semipräparative NP-HPLC-Fraktionierung

Der Herstellung des gereinigten Rohextraktes folgten weitere Reinigungsschritte über verschiedene HPLC-Systeme. Bei dem ersten HPLC-System wurde eine Chromatographie auf einer Normalphase (NP) durchgeführt, die in der Literatur für die Steroidanalytik beschrieben wird^{115,240}. Eine Normalphasensäule besitzt eine polare stationäre Phase und eine weniger polare bzw. unpolare mobile Phase¹⁶⁹.

Mit dem HPLC-System, bestehend aus einer Dimethylaminopropyl-Vorsäule und einer Dimethylaminopropyl-Normalphase als Hauptsäule konnte Nortestosteron von unerwünschten Urinbestandteilen, den Matrixkomponenten, abgetrennt werden. Als mobile Phase wurde das Hexan/Isopropanol-Gemisch (96/4, v/v) verwendet. Die NP-HPLC-Fraktionierung wurde mit einem Lösungsmittelgradienten durchgeführt (siehe Tabelle 18.8.1 in Kapitel 18.8.3)

Für Nortestosteron konnte bereits nach dieser ersten Aufreinigung durch das NP-HPLC-System eine geeignete Messlösung für das GC/C/IRMS-System erhalten werden. Nortestosteron wurde während der HPLC-Analyse als Substanzpeak in einem bestimmten Zeitfenster fraktioniert (Fraktion 2) und in einem separaten Gefäß aufgefangen. DHEA (Fraktion1) wurde zusammen mit Methyltestosteron in einem anderen zeitlichen Schnittfenster als Nortestosteron fraktioniert und gesammelt (siehe Tabelle 18.8.2 in Kapitel 18.8.3).

Die Zeitfenster wurden über einen externen Standard (siehe Kapitel 18.4.3.2), kurz ESTD, bestimmt, so dass jeweils der komplette Substanzpeak erfasst wurde. Da es durch Matrixbelastung zu Retentionszeitverschiebungen kommen kann, wurde vor, innerhalb und am Ende jeder Serie das Zeitfenster des ESTD überprüft. Zusätzlich wurde der Substanzpeak selbst kontrolliert, ob dieser Peak im Zeitfenster lag. Die

Fraktion zwischen den Fraktionen von DHEA und Nortestosteron diene als Spülfraktion, um die Verunreinigungen nicht in die Nortestosteronfraktion zu verschleppen. Die Spülfraktion wurde auf DHEA und Nortestosteron stichprobenartig untersucht, um sicherzustellen, dass weder DHEA aus Fraktion 1 noch Nortestosteron der folgenden Fraktion 2 in der Spülfractionen waren.

Neben dem Effekt der Aufreinigung wurde Nortestosteron gleichzeitig um den Faktor 3 aufkonzentriert. Der auf das HPLC-System gegebene Extrakt von 600 µl wurde auf ein Endvolumen von 200 µl gebracht. Dazu wurden beide Fraktionen unter Stickstoff bei 40°C zur Trockene eingengt und in 200 µl einer Androstanonlösung (10 ng/µl) aufgenommen.

Der Extrakt wurde zuerst in das GC/FID-System injiziert, um die Signale von Nortestosteron und DHEA auf Reinheit zu überprüfen. Da der DHEA-Peak Schultern zeigte, musste die Fraktion 1 weiter aufgereinigt werden. Der Nortestosteron-Peak hingegen wurde nach einer weiteren Überprüfung am GC/MS-System als reiner Peak bestätigt. Mit dem Extrakt aus der NP-HPLC-Fraktionierung wurde die Quantifizierung am GC/FID-System und auch die Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses am GC/C/IRMS-System durchgeführt.

In **Abbildung 13.7-1** sind als Beispiel Chromatogramme des Extraktes eines Eberurins sowie des externen Standards auf der NP-HPLC-Anlage mit den entsprechenden Fraktionen 1 und 2 dargestellt.

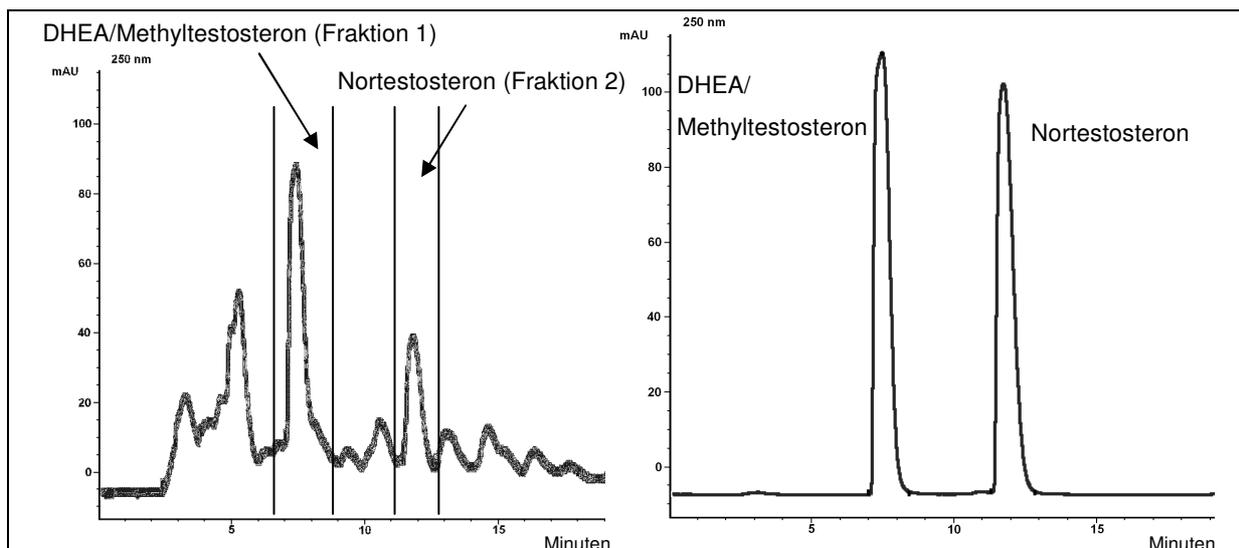


Abbildung 13.7-1: Chromatogramme eines Eberurins (links) und eines externen Standards auf der NP-HPLC mit einer $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ -Säule bei der Wellenlänge: $\lambda=250\text{ nm}$

13.8 Semipräparative RP-HPLC-Fraktionierung

Nach der Fraktionierung auf der NP-HPLC-Anlage konnte DHEA mittels Reinheitskontrolle über die GC/FID-Analyse noch nicht als reiner Substanzpeak bestätigt werden. Deshalb wurde eine weitere Reinigung durch eine HPLC anderer Polarität durchgeführt. Es wurde eine Hypersil Gold® C18-Reversed Phase gewählt. Bei der Reversed Phase (RP) ist die stationäre Phase im Gegensatz zur Normalphase unpolar.

Da die Extrakte der NP-HPLC-Fraktionierung mit einem unpolaren Lösungsmittel (96 % n-Hexan/ 4% Isopropanol) eluiert wurden, mussten die Extrakte für die RP-HPLC-Fraktionierung in ein polares Lösemittel überführt werden. Dies wurde über das Lösemittelgemisch Acetonitril/Wasser erreicht.

Zur Festlegung des Zeitfensters wurde wie bei der NP-HPLC-Anlage vorgegangen. In **Abbildung 13.8-1** sind als Beispiel die Chromatogramme des Extraktes eines Eberurins sowie des externen Standards auf der RP-HPLC-Anlage dargestellt.

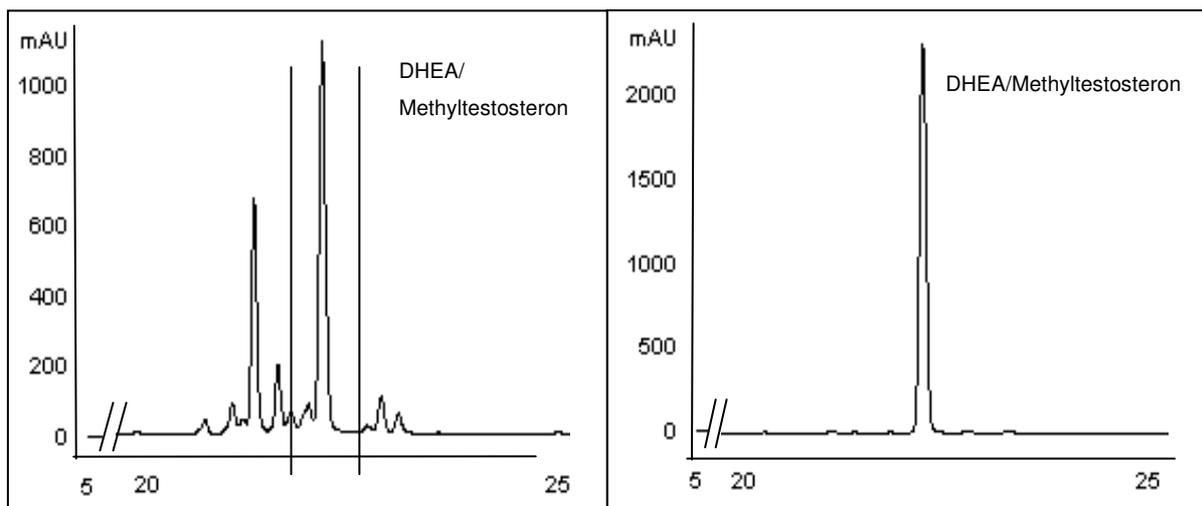


Abbildung 13.8-1: Chromatogramme (nach der Fraktionierung auf der NP-HPLC) eines Eberurins (links) und des externen Standards (rechts) auf der RP-HPLC mit einer C-18-Säule bei der Wellenlänge $\lambda=250$ nm

Das Eluat der RP-HPLC-Fraktionierung wurde mit Acetatpuffer versetzt und mit NaCl gesättigtem Acetonitril ausgeschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde die organische Phase bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in 200 μ l einer Androstanonlösung (10 ng/ μ l) aufgenommen.

DHEA und Methyltestosteron co-eluierten auf der NP-HPLC-Anlage und wurden erst durch die Gaschromatographie getrennt. DHEA konnte durch die zusätzliche

Aufreinigung mittels RP-HPLC-Fraktionierung ebenfalls als reiner Peak erhalten und der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im GC/C/IRMS-System vermessen werden. Die Substanzpeaks auf der RP-HPLC-Anlage mit der C-18-Säule zeigten allgemein schärfere Peakformen als auf dem vorgegangenen NP-HPLC-System.

Methyltestosteron war als interner Standard zur Kontrolle der Aufreinigung geeignet, da Methyltestosteron bei beiden HPLC-Systemen dieselbe Retentionszeit hat wie DHEA und daher bis zur Messung am GC/C/IRMS System erfasst wird. Ein Standard, der die gleiche Retentionszeit bei der NP-HPLC-Anlage hat wie Nortestosteron und zusätzlich ähnlicher chemischer Struktur ist, konnte nicht gefunden werden. Ein solcher Standard würde die zusätzlichen Kontrollmessungen der Spülfraktionen ersetzen.

13.9 Einflüsse der HPLC-Säulen auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, welchen Einfluss die Chromatographie bei den beiden HPLC-Säulen auf die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Fraktionierung hat. Dazu wurde das Zeitfenster für die Fraktionen von Nortestosteron und DHEA während der HPLC-Analyse in kleinere Zeitfenster, also kleinere Fraktionen aufgeteilt und aufgefangen. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron und DHEA wurden in jeder Fraktion bestimmt. **Abbildung 13.9-1** zeigt die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Fraktionen bei verschiedenen Zeitfenstern.

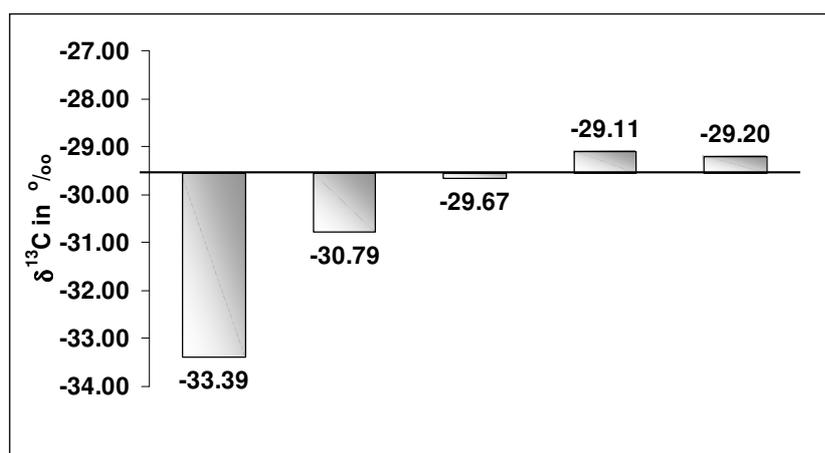


Abbildung 13.9-1: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Fraktionierung von Nortestosteron durch NP-HPLC-Anlage (Säule: $\text{N}(\text{CH}_3)_2$; Zeitfenster: je 20 s

Es wurde festgestellt, dass bei der Dimethylaminopropyl-Normalphase eine deutliche Fraktionierung von ^{13}C am Anfang des Peaks auftrat. Der Peakbeginn war also an

^{13}C angereichert. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der ersten drei Fraktionen, die den aufsteigenden Ast des Peaks darstellen, stiegen von -33,39 ‰ auf -30,79 ‰ und blieben in den nachfolgenden Fraktionen, dem absteigenden Ast, unter Berücksichtigung der Streuung im Mittel bei $-29,20 \text{ ‰} \pm 0,50$ konstant.

Dieser Effekt wurde auch an einer Probe verdeutlicht. Die Probe, bei der absichtlich nur der Anfang des Peaks bei der NP-HPLC-Anlage erfasst wurde, hatte einen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von -29,67 ‰, also eine ^{13}C -Anreicherung. Die gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron im Eberurin lagen zwischen -24,14 ‰ und -27,53 ‰.

Bei der Reversed Phase Säule zeigte sich ein umgekehrtes Bild der ^{13}C -Anreicherung. **Abbildung 13.9-2** zeigt die ^{13}C -Anreicherung am Peakanfang und die ^{13}C -Abreicherung am Peakende bei der RP-Säule an.

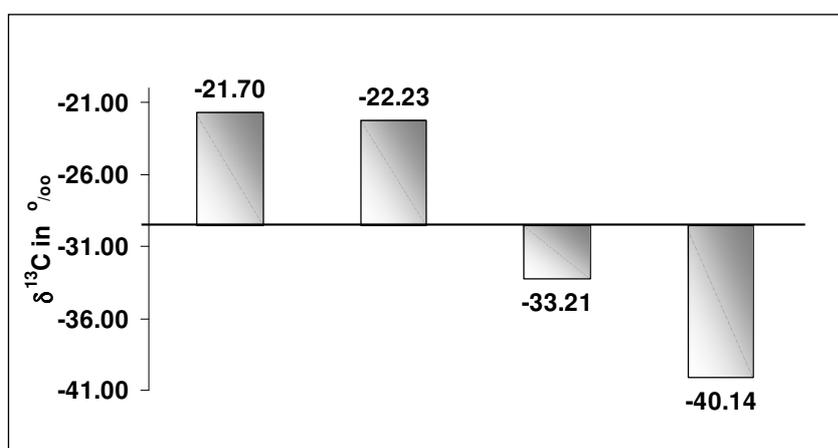


Abbildung 13.9-2: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Fraktionierung von Nortestosteron durch RP-HPLC-Anlage (Säule: C18); Zeitfenster: 10 s

Eine vollständige Erfassung des Substanzpeaks ist unabhängig des HPLC-Systems sehr wichtig, da sich die Änderung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes vor allem am Peakanfang und Peakende auswirken.

13.10 Überprüfung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Fraktionierung durch die Aufarbeitung

Zur Überprüfung der möglichen Isotopenfraktionierung wurde der Kastratenurin verwendet, der mit Nortestosteron und DHEA dotiert wurde und entsprechend den Eberurinen aufgearbeitet und das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis bestimmt wurde. Bei der vorliegenden Aufreinigungsmethode konnten keine $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Fraktionierungen an den Zielsubstanzen Nortestosteron und DHEA festgestellt werden.

Die Daten sind der **Tabelle 13.10-1** zu entnehmen.

		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	n
Nortestosteron	dot. Kastrat	$-29,76 \pm 0,67$	6
	ESTD	$-29,89 \pm 0,59$	33
DHEA	dot. Kastrat	$-29,46 \pm 0,14$	3
	ESTD	$-29,83 \pm 0,18$	3

Tabelle 13.10-1: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von mit 100 μl Standardlösung dotiertem Kastratenurin (100 ng/ μl) und ESTD (10 ng/ μl)

Die mittleren $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron mit $-29,76 \text{ ‰} \pm 0,67$ lagen innerhalb des Streubereichs von $\pm 0,60 \text{ ‰}$ für Nortestosteron. Die mittleren $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von DHEA mit $-29,46 \text{ ‰} \pm 0,14$ lagen ebenfalls innerhalb der Streuung von $\pm 0,83 \text{ ‰}$ für DHEA (siehe Kapitel 15.4.2)

Zusätzlich wurden der Einfluss der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron und DHEA im externen Standard durch die HPLC-Aufreinigung ohne Aufarbeitung ermittelt. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte mit $-29,89 \text{ ‰} \pm 0,59$ für Nortestosteron und $-29,83 \text{ ‰} \pm 0,18$ zeigten keine Isotopenfraktionierung durch die HPLC-Aufreinigung.

13.11 Reinheitskontrolle der GC-Signale nach der Aufarbeitung

13.11.1 Reinheitskontrolle der GC-Signale über GC/MS-Messung

Die GC/C/IRMS-Technik lässt im Vergleich zur GC/MS-Technik keine strukturelle Identifizierung zu, da nur das entstandene CO_2 detektiert wird. Um zu überprüfen, dass das CO_2 von den Zielsubstanzen Nortestosteron und DHEA und nicht von unerwünschten Begleitsubstanzen stammte, wurde vor der GC/C/IRMS-Messung zusätzlich eine Messung am GC/MS-Gerät mit gleichen Messbedingungen durchgeführt.

Die in der Literatur angegebenen charakteristischen Fragmente m/z für Nortestosteron²⁴¹ von 274, 256, 110, 91, 79 und für DHEA²⁴² von 288, 270, 255, 203 und 177 konnten über den kompletten Peak nachgewiesen werden. Beide Signale waren frei von Fremdfragmenten. Das im GC/C/IRMS entstehende CO_2 der beiden Signale bestand also nur aus den beiden Substanzen Nortestosteron und DHEA. Die Fragmentierung von Nortestosteron und DHEA ist in **Abbildung 13.11-1** aufgezeichnet.

Die **Abbildung 13.11-2** zeigt das Spektrum von Nortestosteron und **Abbildung 13.11-3** von DHEA an drei verschiedenen Messpunkten des Peaks.

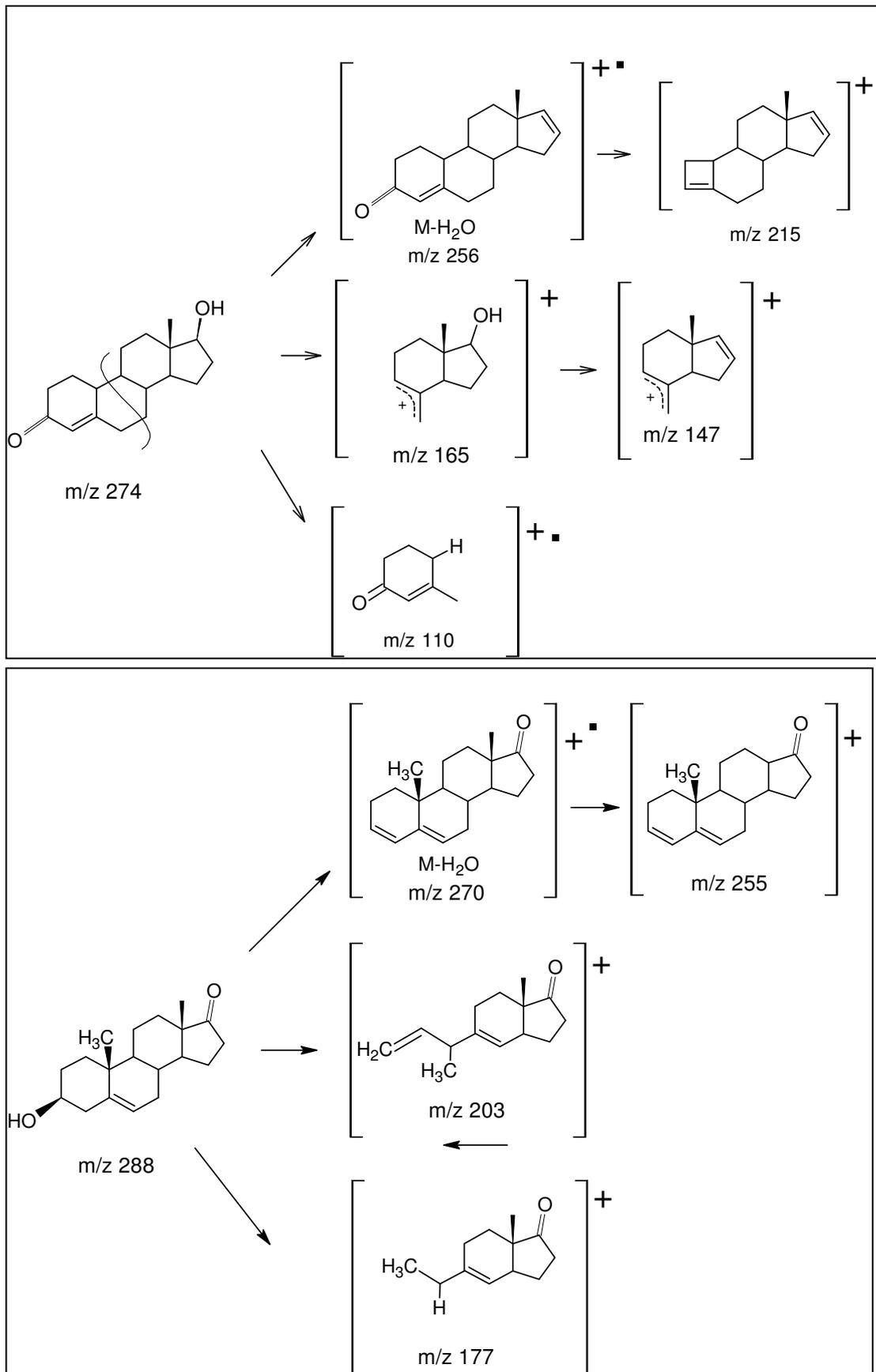


Abbildung 13.11-1: Fragmentierungsschema von Nortestosteron (oben) und DHEA (unten)²⁴²

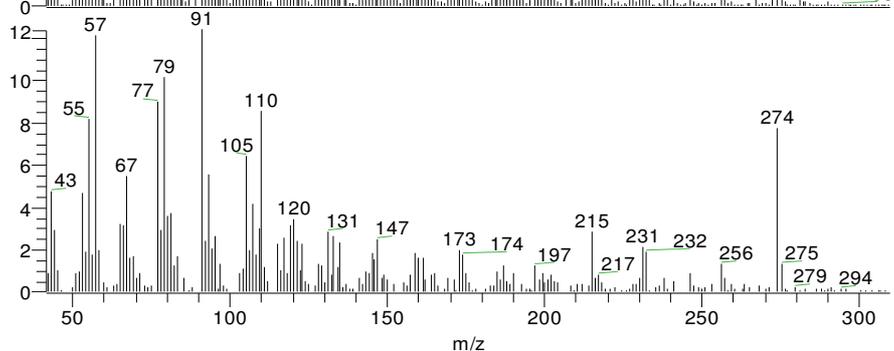
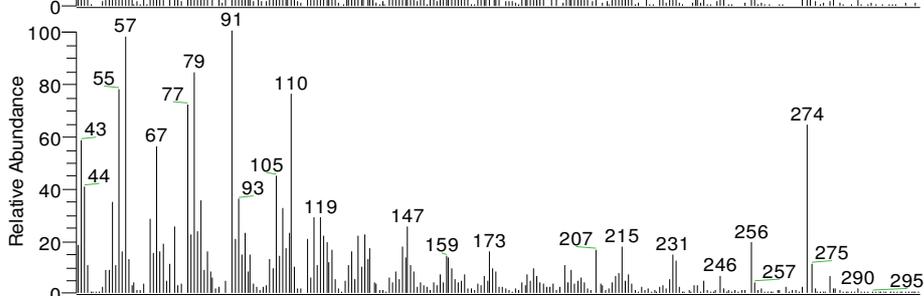
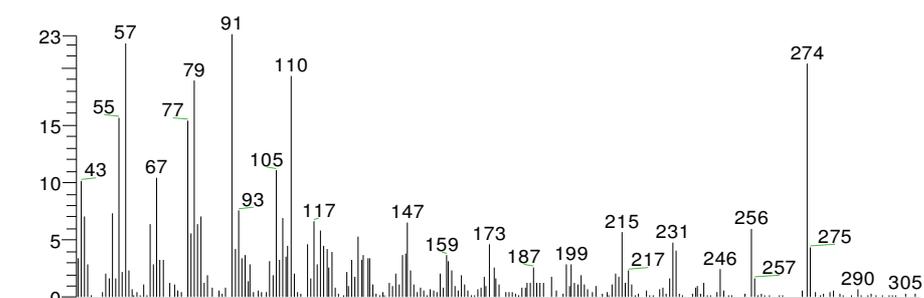
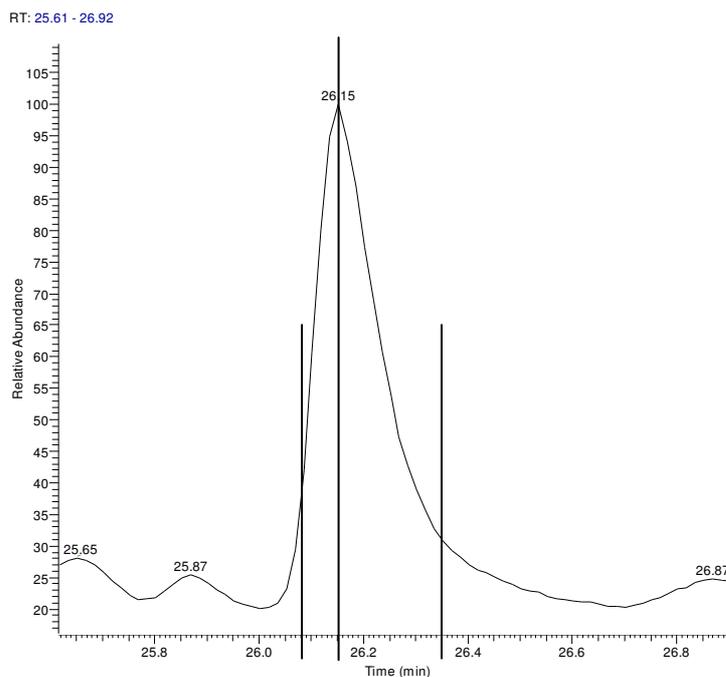


Abbildung 13.11-2: oben: Ausschnitt des GC/MS Chromatogramms des Extraktes des NP-HPLC-Systems (Fraktion 2), unten: Massenspektren von Nortestosteron an drei verschiedenen Stellen des Peaks; Detektion: Totalionenstrom bei 70 eV

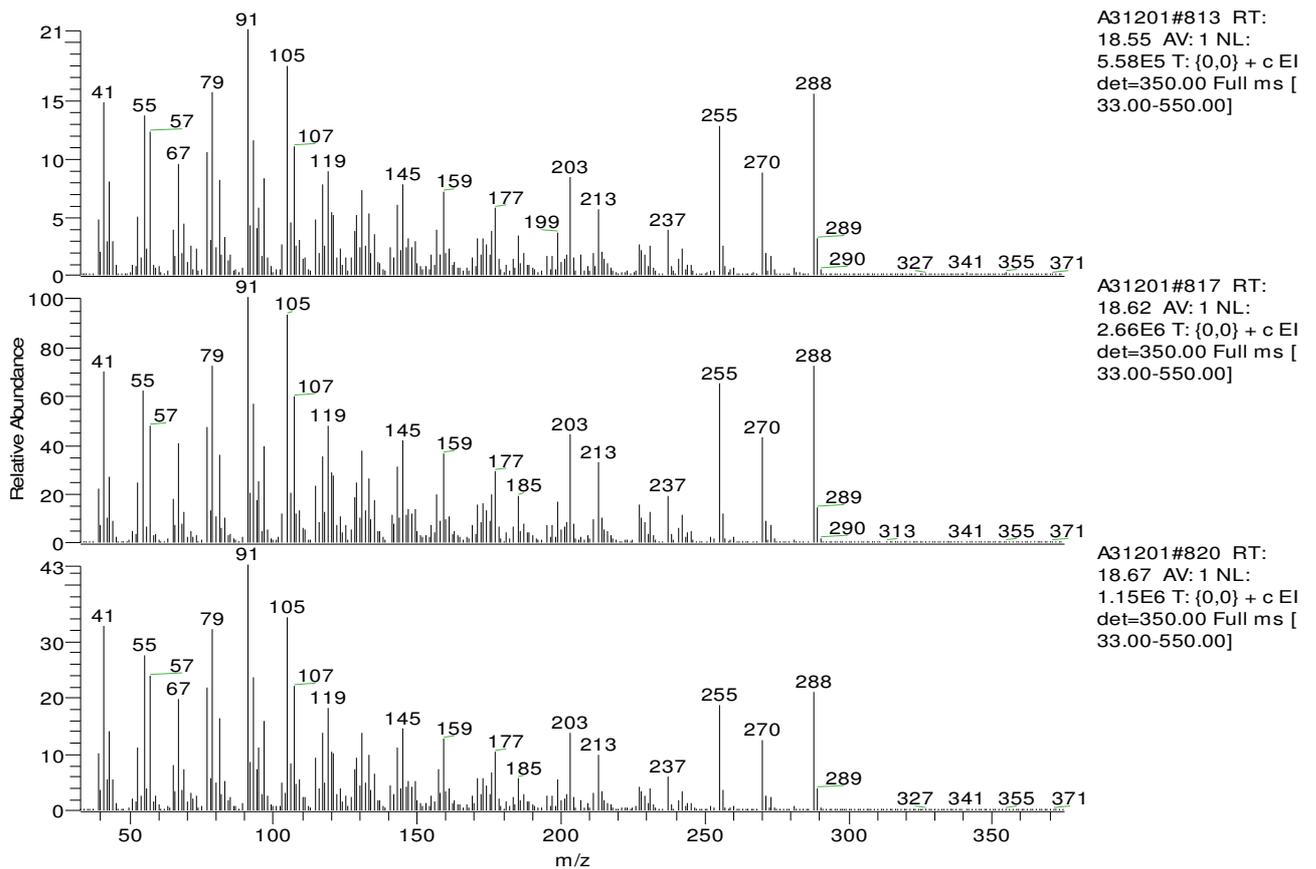
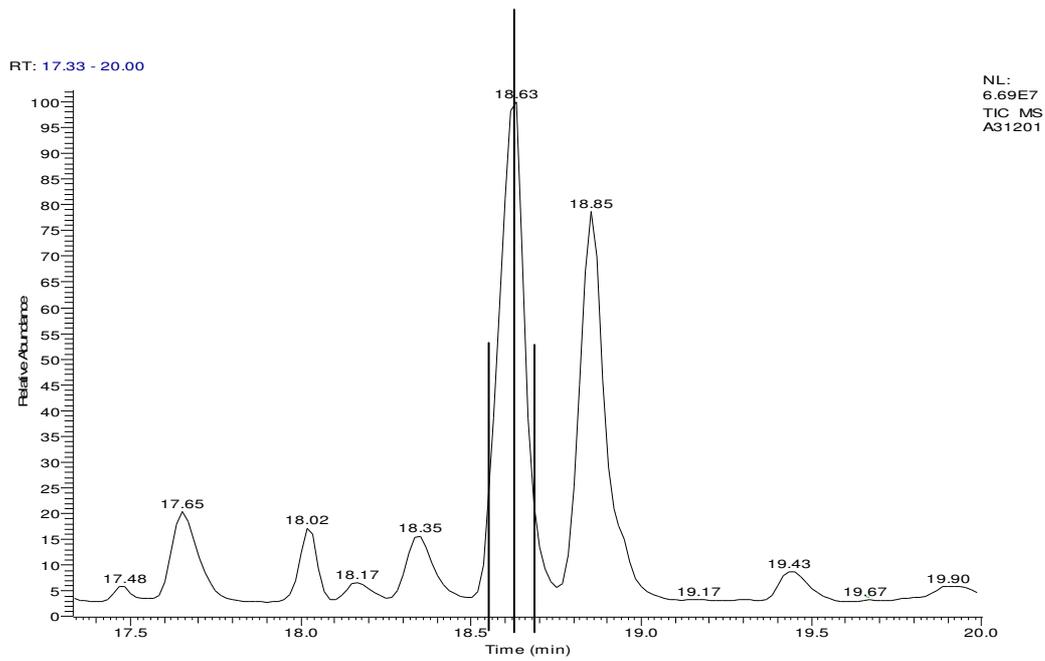


Abbildung 13.11-3: oben: Ausschnitt des GC/MS Chromatogramms des Extraktes des RP-HPLC-Systems (Fraktion 1), unten: Massenspektren von DHEA an drei verschiedenen Stellen des Peaks; Detektion: Totalionenstrom bei 70 eV

13.11.2 Reinheitskontrolle der HPLC-Fraktion über GC/FID-Messung

Nortestosteron lieferte bei der GC/FID-Messung einen scharf abgetrennten Peak. So eignete sich auch das GC/FID Chromatogramm zur zusätzlichen Reinheitskontrolle. Wenn allgemein unter den Substanzpeaks unerwünschte Begleitsubstanzen waren, war dies anhand sichtbarer Schultern des GC/FID Chromatogrammes sofort zu erkennen. Da bei der GC/FID-Messung H₂ als Trägergas verwendet wurde, wurden die Substanzen als schärfere Peaks detektiert. Das Optimum dieses Trägergases (ca. 40 cm/s) liegt bei höheren Strömungsgeschwindigkeiten als das Optimum von Helium (ca. 25 cm/s)²⁰³.

13.11.3 Reinheitskontrolle über GC/C/IRMS-Messung

Zusätzlich wurde der „swing“ zur Reinheitskontrolle herangezogen. Diese Darstellung des ¹³C/¹²C-Verhältnisses als entgegengesetzte Kurven stellt die erste Ableitung des Peaks dar. Sie wird in der Literatur als mögliche Kontrolle der Substanzreinheit genannt^{197,243}. Besteht der Peak nur aus einer Komponente, ist ein klarer Wendepunkt wie in der folgenden **Abbildung 13.11-4** oben zu sehen ist.

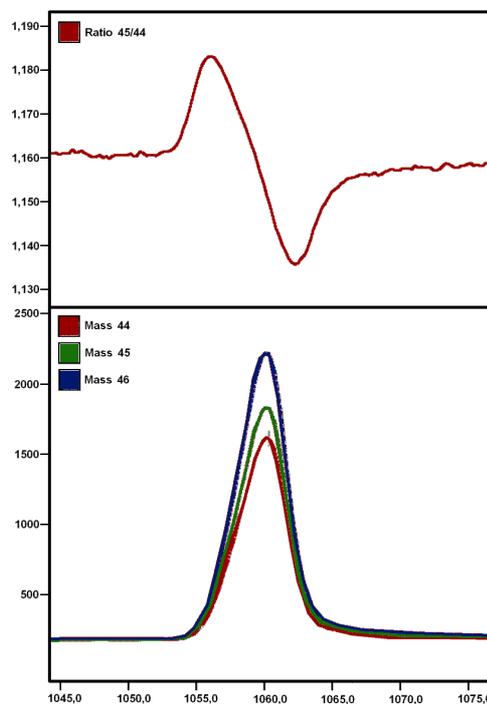


Abbildung 13.11-4: Ausschnitt des GC/C/IRMS-Chromatogrammes des Nortestosteronpeak, oben: swing (ratio ¹³C/¹²C), unten: Nortestosteron mit den Massen m/z 44, 45, 46

14 Ergebnisse der entwickelten Methode

14.1 Ermitteln der Vorstufe und der Metabolite im Eberurin

Es wurde das Steroidprofil des Eberurins ermittelt, um eine geeignete Vorläufer-substanz (Precursor) für Nortestosteron zu bestimmen. Ein Eberurin wurde mit der entwickelten Aufarbeitungsmethode aufgereinigt. Die unbekanntenen Substanzen wurden mit dem GC/MS-System identifiziert und gegebenenfalls mit dem GC/FID-System quantifiziert. Die Quantifizierung wurde über eine Einpunktkalibrierung durchgeführt.

Als potentielle Precursor der Nortestosteronbiosynthese kommen DHEA, Norandrostendion, 11-Ketoetiocholanolon sowie die Eberpheromone 5α -Androst-16-en-3-on, 5α -Androstan-3 α -ol sowie 5α -Androstan-3 β -ol in Betracht.

In der vorliegenden Arbeit konnte im Eberurin DHEA in höheren Konzentrationen als die von Nortestosteron nachgewiesen werden. Dies spiegelt den Δ 5-Weg der Biosyntheseweg der Androgene beim Eber wieder. DHEA kann nur auf diesem Weg gebildet werden. In der vorliegenden Arbeit bestimmte der hohe Gehalt an DHEA im Eberurin die Auswahl der Vorläufersubstanz. DHEA wurde deshalb als dominierenden Precursor für das physiologische Nortestosteron ausgewählt.

Das Vorkommen von DHEA beim Eber wird ebenfalls sowohl im Urin^{244,245} als auch im Blut^{246,247} beschrieben.

Das unmittelbare Precursorsteroid von Nortestosteron ist Norandrostendion (**Abbildung 6.5-1**). Es kann aber auch gleichzeitig Metabolit sein, da beide im Gleichgewicht stehen. Norandrostendion konnte mit der entwickelten Aufarbeitungs- und Messmethode nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Wegen der geringen Menge im Urin war eine IRMS-Messung jedoch ausgeschlossen, so dass diese Substanz nicht weiter untersucht wurde. Da Nortestosteron und Norandrostendion in direktem Gleichgewicht stehen, ist Norandrostendion als Precursor jedoch ungeeignet.

Prévost et al.¹⁶⁷ wiesen Norandrostendion bei drei Ebern in den Nieren mit einer Spanne von 303-535 μ g/kg nach und favorisieren Norandrostendion als Precursor. Im Urin wurde es von Poelmans et al.¹⁶⁶ nur in einer Konzentration von 5-109 μ g/kg bestimmt. Auch Roig et al.¹⁶⁵ bestimmen Norandrostendion im Urin im Mittel nur mit 50 μ g/kg.

Im menschlichen Urin wird das über den Cortisol-/Cortisonweg gebildete 11-Ketoetiocholanolon⁶³ (**Abbildung 14.1-1**) als Vorläufersubstanz von Nortestosteron nachgewiesen^{248,249}. Auch im Eberurin wurde 11-Ketoetiocholanolon bestimmt²⁴⁴.

Das Steroid 11-Ketoetiocholanolon wird nach dem aktuellen Kenntnisstand weder im Sport noch in der Mast als Leistungsförderer eingesetzt, so dass es für den Nachweis einer illegalen Anwendung von Nortestosteron geeignet wäre.

Das 11-Oxosteroid wird aus Cortison bzw. Cortisol gebildet. Das 17-Hydroxyprogesteron ist die Schnittstelle für Synthese von Androgenen über Androstendion (siehe Abbildung 4.5-2) oder für die Synthese von 11-Ketoetiocholanolon über Cortison.

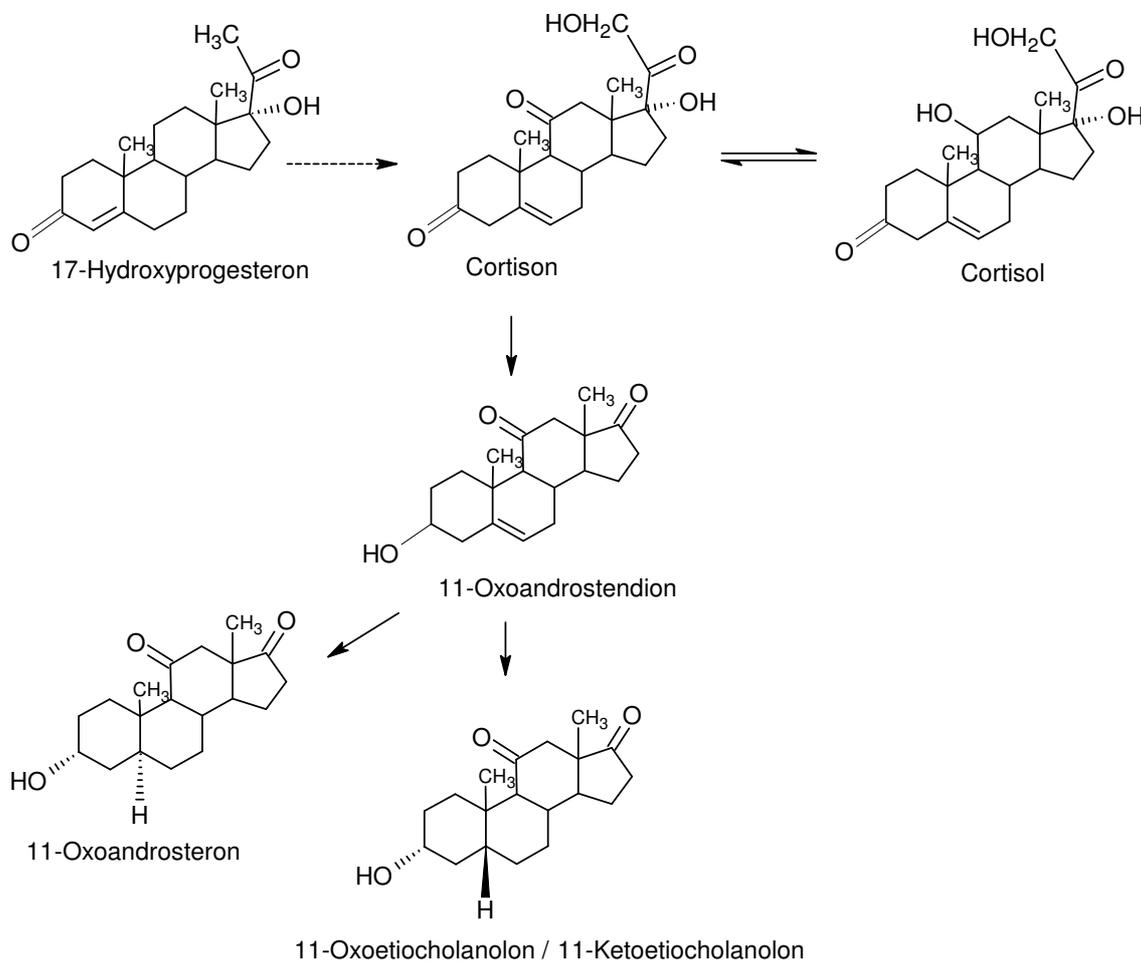


Abbildung 14.1-1: Biosynthese von 11-Ketoetiocholanolon⁶³

11-Ketoetiocholanolon konnte jedoch mit 20 µg/kg Urin nur in geringen Mengen nachgewiesen werden und wurde daher nicht als Vorstufe des Nortestosterons gewählt.

Der geringe Gehalt des Steroids spiegelt auch hier den im Eber dominierenden Delta 5-Weg der Biosynthese über Pregnenolon (**Abbildung 4.5-2**) wieder.

Da Nortestosteron und die Pheromone mit Pregnenolon die gleiche Ausgangssubstanz bei der Biosynthese haben, wurden auch die Pheromone untersucht. Die Biosynthese der Pheromone, ausgehend vom Pregnenolon ist in der **Abbildung 14.1-2** dargestellt.

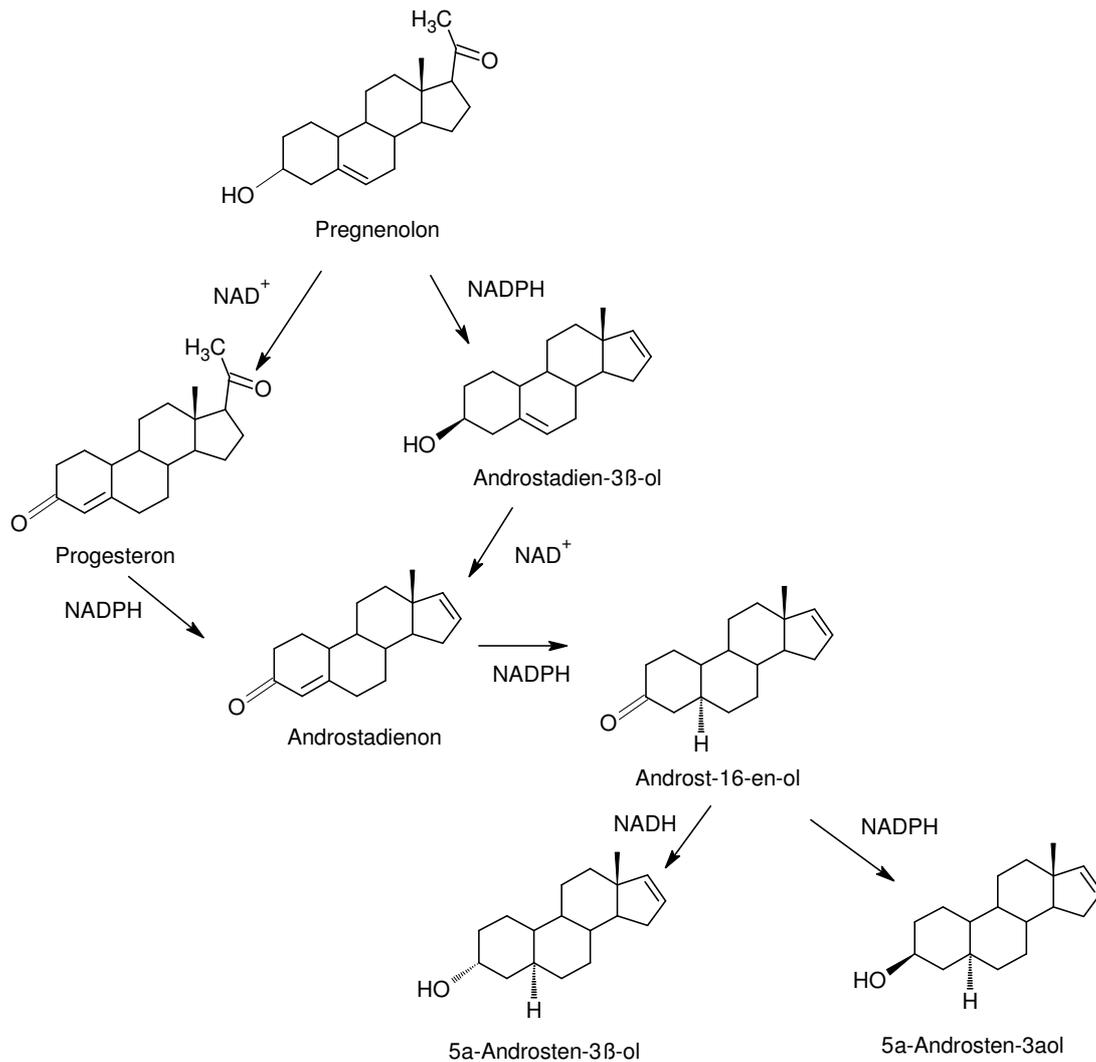


Abbildung 14.1-2: Biosyntheseweg der Eberpheromone im Hoden, abhängig von den dominierenden Coenzymen NAD⁺, NADH und NADPH, nach Gower²⁵⁰

Gower²⁵⁰ berichtet, dass im Eberurin 5 α -Androsten-3 β -ol-glucuronid mit einer Konzentration von 240 $\mu\text{g/l}$ gemessen wurde. Im Eberhoden liegt dieses Pheromon frei vor und wurde sogar bis 2460 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ nachgewiesen⁷.

Das Pheromon 5α -Androsten- 3β -ol konnte mit einem Gehalt von 119 $\mu\text{g}/\text{kg}$ im Urin nachgewiesen werden. Die anderen Pheromone 5α -Androsten- 3α -ol sowie 5α -Androst-16-en-3-on wurden im Urin nicht nachgewiesen. Aufgrund der geringen Menge des Pheromons im Vergleich zum Gehalt an Nortestosteron mit bis zu 1112 $\mu\text{g}/\text{kg}$, wurde das nachgewiesene Eberpheromon nicht als Vorläufersubstanz ausgewählt. Ein anderer Ansatz, den Precursor nicht im Urin, sondern im Hoden zu bestimmen, ist in weiterführenden Untersuchungen zu prüfen, denn die Steroide werden hauptsächlich in den Hoden synthetisiert²⁵¹.

Da zum Beispiel das spezifische Eberpheromon 5α -Androst-16-en- 3β -ol unkonjugiert in Hoden mit 2400 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (24 mg/kg) beschrieben wird⁷, ist eine GC/C/IRMS-Messung möglich.

Zur weiteren Auswahl der zu untersuchenden Steroide im Eberurin wurden die Nortestosteronmetabolite beim Menschen und beim Meerschweinchen herangezogen, da keine Daten zum Steroidprofil des Eberurins vorlagen. Beim Menschen werden die Metabolite von Nortestosteron¹³⁴ (**Abbildung 14.1-3**) entsprechend denen von Testosteron²⁵² (grau in der Abbildung 14.1-3 dargestellt) in 5α -Metabolite und 5β -Metabolite eingeteilt, deren Vorkommen durch die 17β -Hydroxy- und 17-Ketogruppe am D-Ring beeinflusst werden.

Ist im Molekül eine 17β -Hydroxygruppe vorhanden, kommen die 5β -Metabolite zu 85 % vor. Wenn eine 17-Ketogruppe vorliegt, kommen die 5β -Metabolite nur zu 28 % vor. Dies wird beim Menschen mit einer höheren Substratspezifität der 5α -Reduktase für Steroide mit einer 17-Ketogruppe am D-Ring erklärt.

So weisen Schänzer et al.¹³⁴ beim Menschen nach einer Nortestosteronapplikation den 5α -Metabolit Norandrosteron und den 5β -Metabolit Noretiocholanolon nach.

Welche Auswirkungen der D-Ring auf die Metaboliten beim Eber haben, ist nicht bekannt.

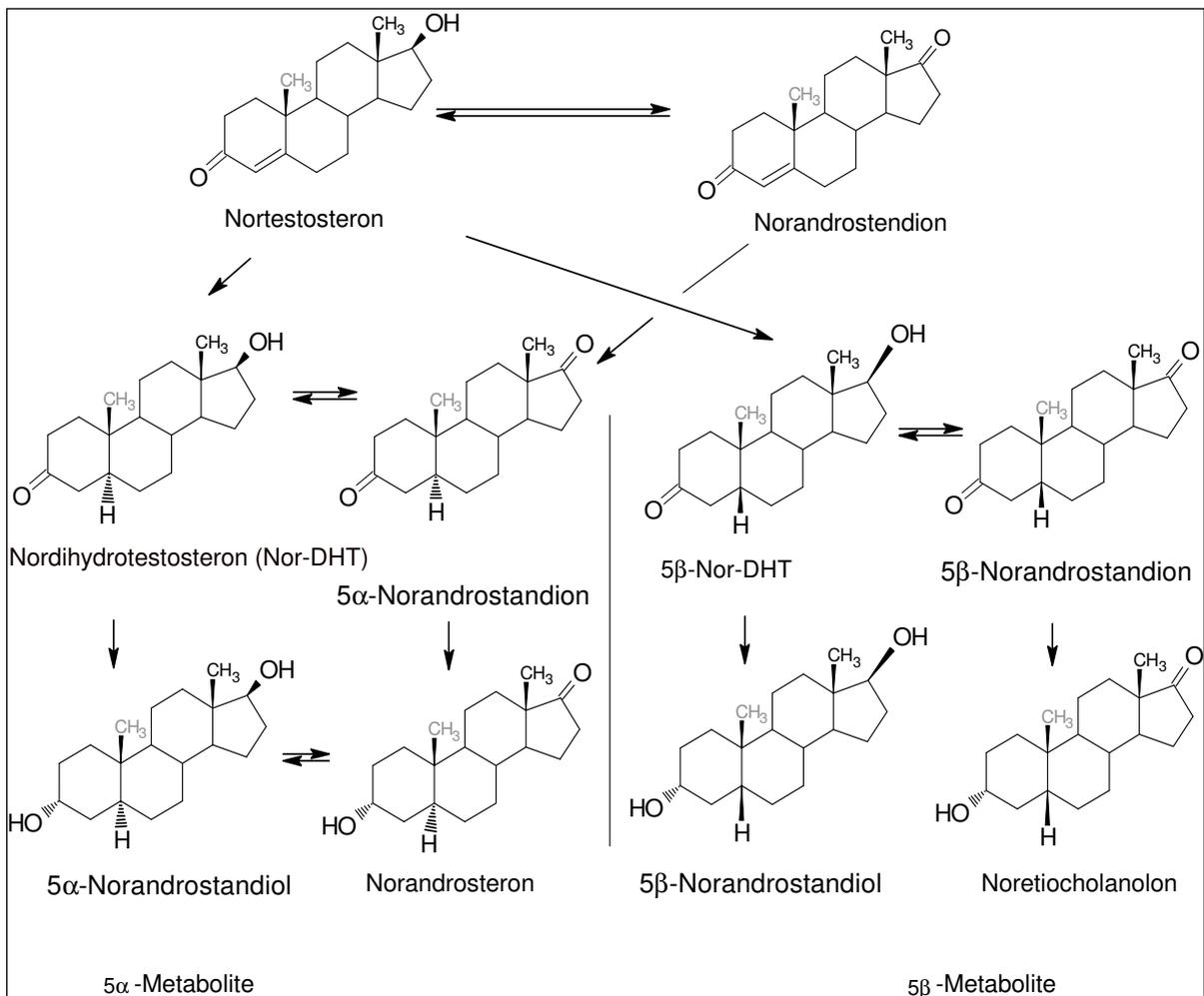


Abbildung 14.1-3: Metabolismus von Nortestosteron und Testosteron (CH₃-Gruppe an C-10: grau dargestellt) beim Menschen

Beim männlichen unkastrierten Meerschweinchen konnten Debruyckere et al.¹²⁷ nach Applikation von Nortestosteron die Isomere der 3-Hydroxyestran-17-one (5 α -Estran-3 α -ol-17-on, 5 β -Estran-3 α -ol-17-on, 5 α -Estran-3 β -ol-17-on und 5 β -Estran-3 β -ol-17-on) und der Estran-3,17-diole (5 α -Estran-3 α ,17 β -diol, 5 α -Estran-3 β ,17 β -diol, 5 α -Estran-3 β ,17 α -diol und 5 β -Estran-3 α ,17 β -diol) als Nortestosteronmetabolite nachweisen.

Im Projekt konnten weder Norandrosterone noch Noretiocholanolon noch die bei den Meerschweinchen beschriebenen Steroide im Eberurin nachgewiesen werden. Roig et al.¹⁶⁵ konnten erst nach einer Applikation von Nortestosteronlaurat die Metabolite Norandrosteron, Norepiandrosteron, Noretiocholanolon, 5 β -Estran-3 α ,17 β -diol und 5 α -Estran-3 β ,17 β -diol in dem Eberurin nachweisen. Zu Beginn des von Roig et al. durchgeführten Applikationsversuches konnten diese ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Ein mikrobieller Abbau von Norandrosteron und Noretiocholanolon kann ausgeschlossen werden, da die beiden Substanzen im Humanurin sowohl bei Sonneneinstrahlung als auch bei Lagerung bei Raumtemperatur stabil sind²⁵³. Auch Graef et al.²²⁸ beschreiben die Stabilität der Steroide im Urin bei der Lagerung.

Neben den bereits genannten Steroiden Nortestosteron, DHEA, 11-Ketoetiocholanolon, 5 α -Androst-16-en-3 β -ol und Norandrostendion konnten Testosteron und seine Metaboliten²⁵² Etiocholanolon, Epiandrosteron, 5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol und 5-Androsten-3 β -17 β -diol identifiziert werden.

Epiandrosteron und Etiocholanolon lagen in den Konzentrationsbereichen des Nortestosterons vor. Da sie jedoch weder Precursor noch Metaboliten von Nortestosteron, sondern von Testosteron sind, wurden sie nicht näher bestimmt. Testosteron selbst wurde im Eberurin nur in Spuren identifiziert.

Testosteron scheint im Eberurin im Gegensatz zum männlichen Humanurin weder frei noch als Testosteron-glucuronid mit der höchsten Konzentration vorzuliegen. Auch in den Eberhoden, dem Hauptsyntheseort der Androgene, kommen Testosteron und Testosteron-sulfat nur in geringen Konzentrationen vor⁷.

Jedoch für das Pheromon Androst-16-en-3-on verhält es sich genau umgekehrt. Dies kommt in den Eberhoden in 10-fach höherer Konzentration vor als Testosteron²⁵⁴.

Während das 17-Ketosteroid Etiocholanolon in hohen Mengen im Eberurin nachgewiesen wurde, wurde das 11-Ketoetiocholanolon, ebenfalls ein 17-Ketosteroid, nur in geringen Mengen im Eberurin nachgewiesen.

Eine mögliche Erklärung ist der im Eber dominierende Delta 5-Steroidsyntheseweg, über den das Testosteron synthetisiert wird. Das Testosteron wird nach der Synthese sofort zum Etiocholanolon metabolisiert. Dies würde auch die niedrige Testosteronkonzentration im Eberurin erklären.

Eine andere Erklärung könnte aber auch ein möglicher Einfluss der Oxogruppe am C-11 sein, die einen begünstigenden Einfluss auf die Sulfatierung in der Phase II-Reaktion des Metabolismus haben könnte.

Beim Menschen werden beispielsweise die 3 β -Hydroxy-Steroide als Sulfate ausgeschieden. Ausnahmen jedoch sind die Substanzen Androsteron, Etiocholanolon, Epiandrosteron, Testosteron und Epitestosteron. Diese liegen sowohl sulfatiert als auch

glucuronidiert im Urin vor¹¹⁶. Auch bei Pferden wird durch die Stellungsisomerie eine Tendenz der Glucuronidierung und Sulfatierung festgestellt. Eine Glucuronidierung wird bei den 17α -Hydroxysteroiden und eine Sulfatierung bei den 17β -Hydroxysteroiden festgestellt²²⁴.

Bei beiden Steroiden 11-Ketoetiocholanolon und Etiocholanolon ist die Hydroxygruppe in der 3α -Stellung. Auch sind beide Substanzen 5α -Steroide. Ob eine Oxogruppe am C-11 auch einen Einfluss auf die Metabolisierung hat, muss in weiterführenden Arbeiten überprüft werden.

Weiter konnten 5α -Androst-16-en-3 β -ol, Estr-5(10)-en-17 β -ol-3-on sowie Estr-5(10)-en- $3\alpha,17\beta$ -diol identifiziert werden. Bei dem $\Delta 16$ -Androstan 5α -Androst-16-en-3 β -ol handelt es sich um ein Pheromonderivat.

Estr-5(10)-en-17 β -ol-3-on sowie Estr-5(10)-en- $3\alpha,17\beta$ -diol könnten bei der Nortestosteronsynthese beteiligt sein^{141,159}.

In der **Tabelle 14.1-1** sind die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Steroide zusammenfassend dargestellt. In der Tabelle sind gleichzeitig die bei GC/MS Messung entstehenden charakteristischen Fragmente aufgelistet.

Steroide	GC/MS	
		m/z
DHEA	x	288/255/270/203/213
Nortestosteron	x	274/110/247/215/256
Testosteron	x	288/246/228/203/124
5 β -Androstan,3 α -ol-17-on (Etiocholanolon)	x	290/244/272/257/216
Epiandrosteron	x	290/272/257/246
5 α -Estran-3 α -17-on (Norandrosteron)	-	276/258/240/232/202
5 α -Estran-3 β -17-on (Norepiandrosteron)	-	276/202/214/258/204
5 β -Estran-3 α -ol-17-on (Noretiocholanolon)	-	276/258/243/232/214/187
Norandrostendion	x	272/254/244/228/186
11-Ketoetiocholanlon	x	304/286/271/232/191
Androstendion	-	286/268/244/201/148
5 α -Estran-17 β -ol-3-on (5 α -Dihydrornortestosteron)	-	276/258/232/233/217/199
5 α -Estran-3 α ,17 β -diol (5 α -Norandrostendiol)	-	278/260/219/216/201
5 β -Estran-17 β -ol-3-on (5 β -Nordihydrotestosteron)	-	276/258/233/217/199
5 β -Estrandion(5 β -Norandrostendion)	-	274/256/230/197
5 β -Estran-3 α ,17 β -diol (5 β -Norandrostendiol)	-	278/260/242/216/201
4-Estren-3 α ,17 β -diol	-	276/258/240/218/199
4-Estren-3 β ,17 α -diol	-	276/258/240/225/200
4-Estren-3 α ,17 α -diol	-	276/258/240/225/200
4-Estren-3 β ,17 β -diol (Bolandiol)	-	276/258/240/225/214
5-Androsten-3 β -17 β -diol	x	290/272/257/205/239
5 α -Androst-16-en-3 β -ol	x	274/259/241/148
5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol	x*	292/274/215/256/230
Estr-5(10)-en-3 α ,17 β -diol	x	276/258/225/199/91

Tabelle 14.1-1: untersuchte Steroide im Eberurin (x = identifiziert über Spektren der Vergleichssubstanzen, - = nicht identifiziert, x* = nur über Spektrenbibliothek identifiziert)

14.2 Konzentration von Nortestosteron im Urin

Die für die GC/C/IRMS-Messung aufgearbeiteten Extrakte wurden ebenfalls für die Quantifizierung der Steroide verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mittels GC/FID-Messung mit denselben Injektions- und Temperaturbedingungen, die durch das GC/C/IRMS-System vorgegeben waren. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Messsystemen bestand im Trägergas. Für die GC/FID-Messung wurde Wasserstoff, für die IRMS-Messung wurde Helium als Trägergas verwendet.

Die Injektion wurde manuell durchgeführt, so dass eine Aufgabenkorrektur vorgenommen wurde. Das nicht physiologisch vorkommende Androstanon wurde als interner Standard ausgewählt. Es besitzt keine polaren Hydroxygruppen und weist damit sehr gute chromatographische Eigenschaften auf. Dieser interne Standard wurde vor der GC/FID-Messung bei der Aufnahme des eingengten Extraktes zugegeben.

Zur quantitativen Bestimmung der Substanzen Nortestosteron und DHEA wurden Kalibriergeraden erstellt. Die nach DIN 32645 errechnete Nachweisgrenze von Nortestosteron lag bei 0,35 ng/μl, (entspricht im Urin 7,0 μg/kg), die errechnete Bestimmungsgrenze bei 1,25 ng/μl (entspricht im Urin 25,0 μg/kg). Zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wird auf das Kapitel 15 Validierung und Qualitätssicherung verwiesen.

Die Spanne der ermittelten Konzentration von freiem Nortestosteron und von Nortestosteron-glucuronid im Eberurin lag zwischen $\leq 34,8$ μg/kg und 1112,0 μg/kg Urin. Im Eber unterliegen die Substanzen physiologisch einer natürlichen Schwankungsbreite, die im Falle der Steroide sehr groß ist. Der Median der Nortestosteronkonzentration in 52 Eberurinen lag bei 224,3 μg/kg, der Mittelwert bei 316,5 μg/kg.

Der Median wird als zusätzliche statistische Größe angegeben, da dieser weniger anfällig ist gegen einzelne stark abweichende Werte im Vergleich zum arithmetischen Mittel. Der Median ist der mittlere Wert eines der Größe nach angeordneten Datenbündels. Jeweils die Hälfte der Daten liegt unter- und oberhalb des Medians. Die zentrale Tendenz ist durch den Median besser zu charakterisieren. Er liefert bei schiefverteilten Daten ein realistischeres Bild als der Mittelwert. Bei einer symmetrischen Verteilung der Daten entspricht er dem Mittelwert¹⁶⁹.

Die gemessenen Gehalte wurden in einer Häufigkeitsverteilung in der **Abbildung 14.2-1** dargestellt.

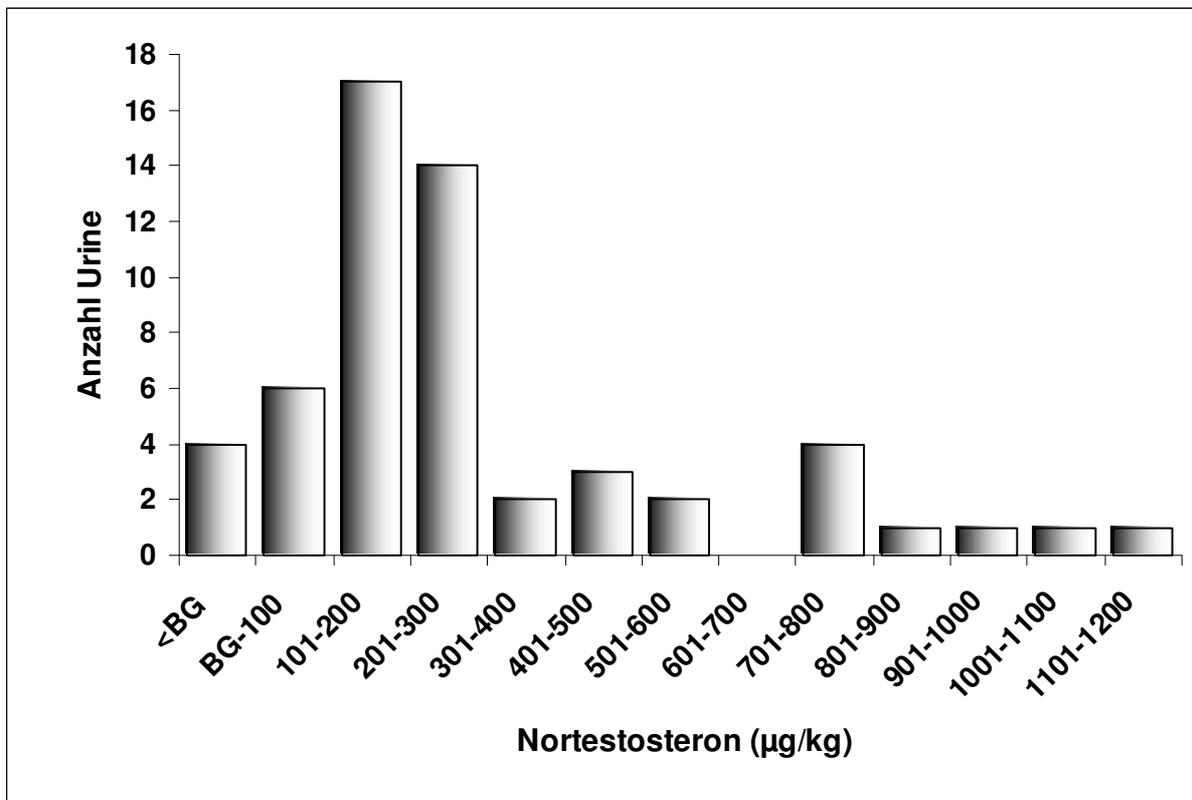


Abbildung 14.2-1: Häufigkeitsverteilung von Nortestosteron im Eberurin; n=56, Median (n=52): 224,3 µg/kg; BG: Bestimmungsgrenze

Eine vergleichende Graphik zwischen den publizierten Konzentrationen von Nortestosteron im Eberurin zwischen 1989 und 2006 und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist in der **Abbildung 14.2-2** logarithmisch dargestellt.

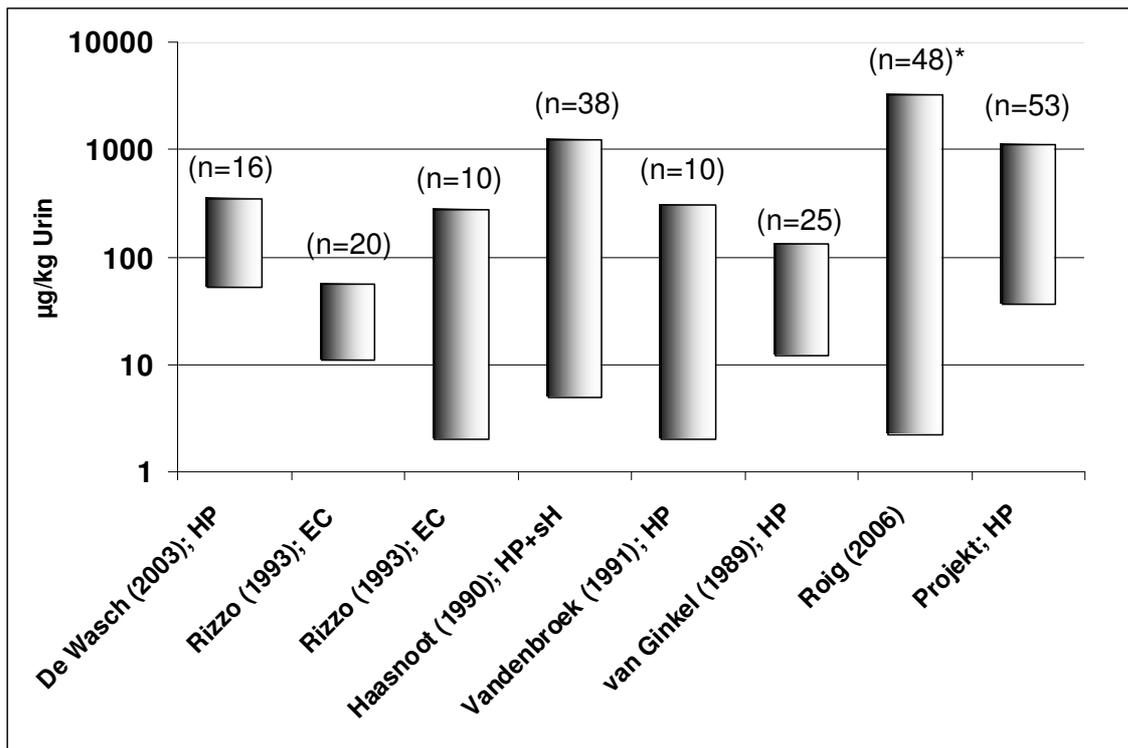


Abbildung 14.2-2: logarithmische Darstellung zwischen 1989 und 2006 veröffentlichten und im Projekt ermittelten minimalen und maximalen Nortestosteronkonzentrationen im Eberurin, Daten sind der Tabelle 6.6-1 entnommen; *=freies Nortestosteron; HP: β -Glucuronidase aus *Helix pomatia*, EC: β -Glucuronidase aus *E.coli*, sH: saure Hydrolyse

Die große Spanne der im Projekt ermittelten Nortestosterongehalte im Eberurin von $\leq 34,8$ -1112,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ liegt in dem Bereich der bereits publizierten Gehalte von 0-3257,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^{20,22,24,25,165}.

Der hohe Nortestosterongehalt im Urin von 1240,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wurden laut Haasnoot et al.²² nachgewiesen, weil im Anschluss an die Aufarbeitung mit der Enzymzubereitung aus *Helix pomatia* eine saure Hydrolyse durchgeführt wurde. Der deutlich niedrigere maximale Nortestosterongehalt von 132,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ wurden von van Ginkel et al.²⁰ jedoch nur mit der enzymatischen Hydrolyse (HP) ermittelt, der keine weitere chemische Hydrolyse folgte. Aber auch mit der enzymatischen Hydrolyse (HP) allein wurden von de Wasch et al.²⁴ der höchste Gehalt mit 344,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, von Vandenbroek et al.²⁶ mit 300,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und in der vorliegenden Arbeit mit 1112,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nachgewiesen.

Ein weiterer Grund, niedrige Gehalte nachzuweisen liegt in der Messmethode. Während Rizzo et al.²⁵ mit der ELISA-Methode nur maximal 55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Nortestosteron bestimmten, wurde bei den gleichen Tieren bei der GC/ECD-Messung 277 $\mu\text{g}/\text{kg}$

nachgewiesen. Van Ginkel et al. führten die Untersuchungen mit dem RIA-HPLC-System durch, während Haasnoot et al. mit einem LC/IAC-System die Messungen durchführten.

Auffallend ist jedoch der von Roig et al.¹⁶⁵ ermittelte frei vorliegende maximale Nortestosterongehalt von 3257,1 µg/kg. Sie bestimmten mit der GC/MS-Technik die jeweiligen Gehalte an freiem Nortestosteron (1,2-3257,1 µg/kg, MW: 306,7 µg/kg ± 527,7, n=41), an Nortestosteron-glucuronid (2,2-1165,9 µg/kg, MW: 113,90 µg/kg ± 216,7, n=41) und an Nortestosteron-sulfat (2,0-872,4 µg/kg, MW: 191,1 µg/kg ± 215,1, n=44). Das freie Nortestosteron wurde mit der Flüssig-/Flüssigextraktion zuerst abgetrennt und dann bestimmt. Nach der durchgeführten Hydrolyse mit β-Glucuronidase aus *E.coli* zur Freisetzung des Nortestosteron-glucuronids, wurde eine Solvolyse mit dem Gemisch aus Essigsäureethylester, Methanol, und H₂SO₄ im Verhältnis 80:20:0,06 zur Bestimmung des als Sulfat gebundenen Anteils durchgeführt.

Die genannten Konzentrationen von freiem Nortestosteron, Nortestosteron-glucuronid und Nortestosteron-sulfat wurden in der Arbeit von Roig et al. nicht den jeweiligen Ebern zugeordnet, so dass keine Aussage über das Verhältnis von freiem Nortestosteron zu den einzelnen Derivate gemacht werden kann.

Auffällig ist im Vergleich zu den bisher erhaltenen Ergebnissen der fast um das dreifache erhöhte Nortestosterongehalt von 3257,1 µg/kg. Der in der Veröffentlichung von Roig et al. angegebene Mittelwert von 306,7 µg/kg gleicht jedoch dem des Projektes von 316,5 µg/kg.

In der vorliegenden Arbeit wurde Nortestosteron auch als frei vorliegendes Steroid bestimmt, indem drei zufällig ausgesuchte Urine jeweils ohne Enzym und mit Enzym aufgearbeitet und vermessen wurden. Die ermittelten Gehalte der Extraktbearbeitung ohne Enzym (frei vorliegendes Nortestosteron) wurden von den Gehalten der Extrakten mit der Durchführung der enzymatischen Hydrolyse (glucuronidert plus frei vorliegendes Nortestosteron) subtrahiert. Daraus ergab sich eine Spanne des glucuronidierten Anteils von 4,6 % - 25,8 % (**Tabelle 14.2-1**). Den größten Anteil der Nortestosteronkonzentration im Eberurin stellte aber das freie Nortestosteron dar.

	Ohne Enzym (freies Nortestosteron)	Helix pomatia (freies+gluc. Nortestosteron)	Nortestosteron- glucuronid
Urin 8	195µg/kg (186,7/204,2)	241,0µg/kg	18,9%
C1	871,0µg/kg	912,8µg/kg	4,6%
C6	83,3µg/kg	112,2µg/kg	25,8%

Tabelle 14.2-1: Vergleich der Gehalte an Nortestosteron mit und ohne enzymatische Hydrolyse im Eberurin

In der Arbeit von Roig et al.¹⁶⁵ wurde das frei vorliegende Nortestosteron ebenfalls als der größte Anteil bestimmt. Haasnoot et al.²² vermuteten, dass Nortestosteron mit 20% frei, 20% als Glucuronid-derivat und 60% als Sufatderivat im Eberurin vorkommt. Um die physiologische Verteilung des freien Nortestosteron und der Derivate zu verifizieren, sind weitere Untersuchungen nötig.

Die Tatsache, dass Nortestosteron im Eberurin frei vorliegt, liegt in der Wasserlöslichkeit von Nortestosteron begründet. Entgegen der allgemeinen Aussage, dass Nortestosteron wasserunlöslich sei, waren im Versuch der vorliegenden Arbeit bereits 285 mg/l Nortestosteron in Wasser löslich (siehe Kapitel 14.10).

Laut Claus et al.²⁹ stellt die Rasse Pietrain im Vergleich zu anderen Rassen eine frühreife Rasse dar und weist eine verstärkte Steroidsynthese auf. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Nortestosterongehalte zwischen den Rassen Pietrain und Deutschem Landschwein verglichen. Es konnte jedoch kein Unterschied festgestellt werden. Bei 41 Tieren der Rasse Deutsches Landschwein lag der Median von Nortestosteron bei 234,0 µg/kg mit einer Spanne der Gehalte von 37,8 µg/kg bis 1112,0 µg/kg. Bei 12 Tieren der Rasse Pietrain lag der Median bei 243,7 µg/kg mit einer Spanne von 34,8 µg/kg bis 568,5 µg/kg.

Die Gehalte von Androst-16-en-3-on und Testosteron im Hodengewebe sollen gleichsinnig verlaufen^{29,254}. Ob sich eine Korrelation zwischen Nortestosteron als anabolem Steroid im Vergleich zu Testosteron und Androst-16-en-3-on als Pheromon ergibt, ist in zukünftigen Untersuchungen zu klären.

14.3 Konzentration von DHEA im Urin

Die quantitative Bestimmung von DHEA wurde entsprechend der Quantifizierung von Nortestosteron durchgeführt. Für DHEA wurde eine Nachweisgrenze von 0,61 ng/µl (entspricht im Urin 12,2 µg/kg) und eine Bestimmungsgrenze von 2,19 ng/µl (ent-

spricht im Urin 43,8 µg/kg) errechnet. Die Daten der Kalibriergeraden werden im Kapitel 15 „Validierung und Qualitätssicherung“ besprochen.

Das DHEA-glucuronid wurde mit einer Konzentration zwischen 196,0 µg/kg und 5184,0 µg/kg (n=23) bestimmt. Eine Verteilung der Häufigkeit ist in der **Abbildung 14.3-1** dargestellt.

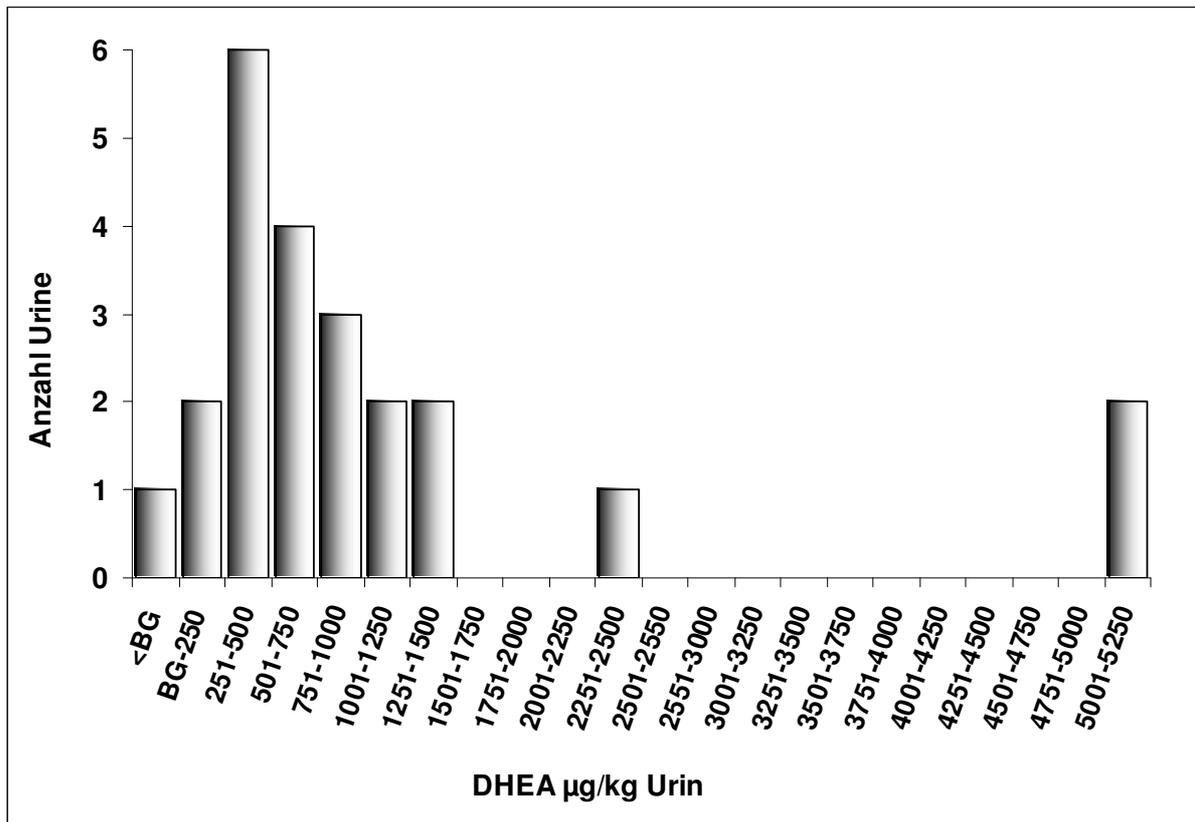


Abbildung 14.3-1: Häufigkeitsverteilung DHEA im Eberurin; n=24; Median (n=23): 556,0 µg/kg; BG: Bestimmungsgrenze

Der Median lag bei 556,0 µg/kg, der Mittelwert bei 651,5 µg/kg. Bei den bestimmten Gehalten an DHEA handelte es sich um das DHEA-glucuronid. DHEA wurde nicht frei im Eberurin nachgewiesen. Der sulfatierte Anteil an DHEA wurde nicht untersucht.

14.4 Konzentration von Nortestosteron im Fleisch

Eine Korrelation der Konzentration an Nortestosteron im Fleisch und Urin wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Für diese Arbeit standen vier Fleischproben zur Verfügung, so dass die Nortestosterongehalte im Fleisch mit einer ELISA-

Messung nach der Prüfvorschrift²⁵⁵ für den Nationalen Rückstandskontrollplan bestimmt werden konnten.

Die Gehalte lagen zwischen 1,1 µg/kg und 6,3 µg/kg. Dieses Ergebnis stimmt mit den von van Ginkel et al.²⁰ und de Wasch et al.²⁷ bestimmten Gehalte zwischen 0,2 µg/kg und 13,0 µg/kg überein.

Zwischen den Gehalten an Nortestosteron im Fleisch und im Urin war anhand der ermittelten Werte keine Korrelation zu erkennen. Dieses Ergebnis sollte in weiterführenden Untersuchungen verifiziert werden, da nur wenige Fleischproben für diese Untersuchung zur Verfügung standen.

Die ermittelten Gehalte im Fleisch und im Urin sind logarithmisch in der **Abbildung 14.4-1** aufgetragen.

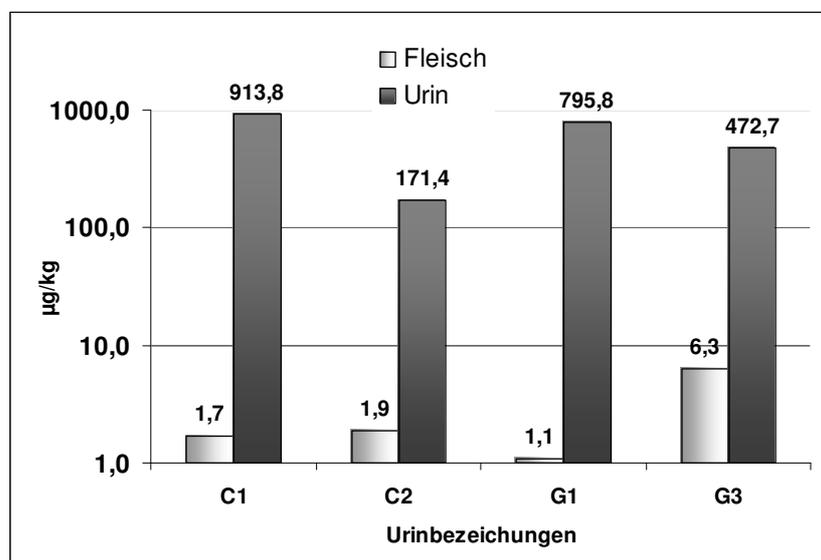


Abbildung 14.4-1: Vergleich der Konzentration an Nortestosteron im Fleisch (ELISA) und im Eberurin (GC/FID)

14.5 Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Futters

Das Futter bestimmt als Kohlenstofflieferant das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis der Steroide im Organismus und damit den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert. Die Tiere erhielten ein standardisiertes einheitliches Futter, das der „Richtlinie für die Stationsprüfung auf Mastleistung, Schlachtkörperwert und Fleischbeschaffenheit vom 10.12.2003“²¹⁶ entsprach. Das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von Nortestosteron und DHEA muss deshalb eine ähnliche Isotopensignatur aufweisen wie die des Futters. Ein Auszug der genannten Richtlinie ist im unteren Kasten zitiert.

Die Futtermischung besteht aus den folgenden Komponenten, wobei der Nährstoffgehalt der eingesetzten Komponenten und das Mischungsverhältnis innerhalb der angegebenen Grenzen variabel ist.

82 - 85% Getreide (Gerste/Weizen)¹⁾

8 - 14% Sojaextraktionsschrot ²⁾

0 - 4% Fischmehl ²⁾

2 - 3,5% Mineralfutter

¹⁾ In Abhängigkeit vom Nährstoffgehalt kann der Gersteanteil zwischen 40 % und 50 % und der Weizenanteil zwischen 35 % und 45 % variiert werden.

²⁾ Entfällt das Fischmehl als Eiweißkomponente, muss ggf. Sojaschrotextrakt aus geschälter Saat verwendet werden, da sonst der geforderte Proteingehalt im Futter nicht erreicht wird.

Abbildung 14.5-1: Auszug aus der „Richtlinie für die Stationsprüfung auf Mastleistung, Schlachtkörperwert und Fleischbeschaffenheit vom 10.12.2003¹⁸³“

Zur Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes des Futters, wurden die Futter-Pellets als Homogenisat mittels EA/IRMS vermessen. Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert wurde mit $-25,91 \text{ ‰} \pm 0,12$ ($n=6$) bestimmt. Eine Gegenüberstellung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Futters und der Steroide folgt im Kapitel 14.7.

14.6 Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Nortestosteron und DHEA im Urin

Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron und DHEA wurden mit dem GC/C/IRMS-Gerät bestimmt. Als Beispiel der gemessenen Urinextrakte ist ein Ausschnitt des IRMS-Chromatogrammes der Nortestosteronfraktion nach der NP-HPLC-Fraktionierung in der **Abbildung 14.6-1** zu sehen. Die Basislinientrennung ist klar zu erkennen.

Neben Nortestosteron wurden noch die Signale von Etiocholanolon und 5-Androsten- $3\beta,17\beta$ -diol identifiziert.

Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron der 36 gemessenen Urine von Ebern, die einheitliches Futter erhielten, lagen zwischen $-27,53 \text{ ‰}$ und $-24,14 \text{ ‰}$. Der Median der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte wurde mit $-26,47 \text{ ‰}$ und der Mittelwert mit $-26,29 \text{ ‰} \pm 0,85$ berechnet.

Die gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron in den Urinen sind in einer Häufigkeitsverteilung in Abhängigkeit von der Nortestosteronkonzentration größer und kleiner $100 \text{ }\mu\text{g/kg}$ im Urin (**Abbildung 14.6-2**) dargestellt.

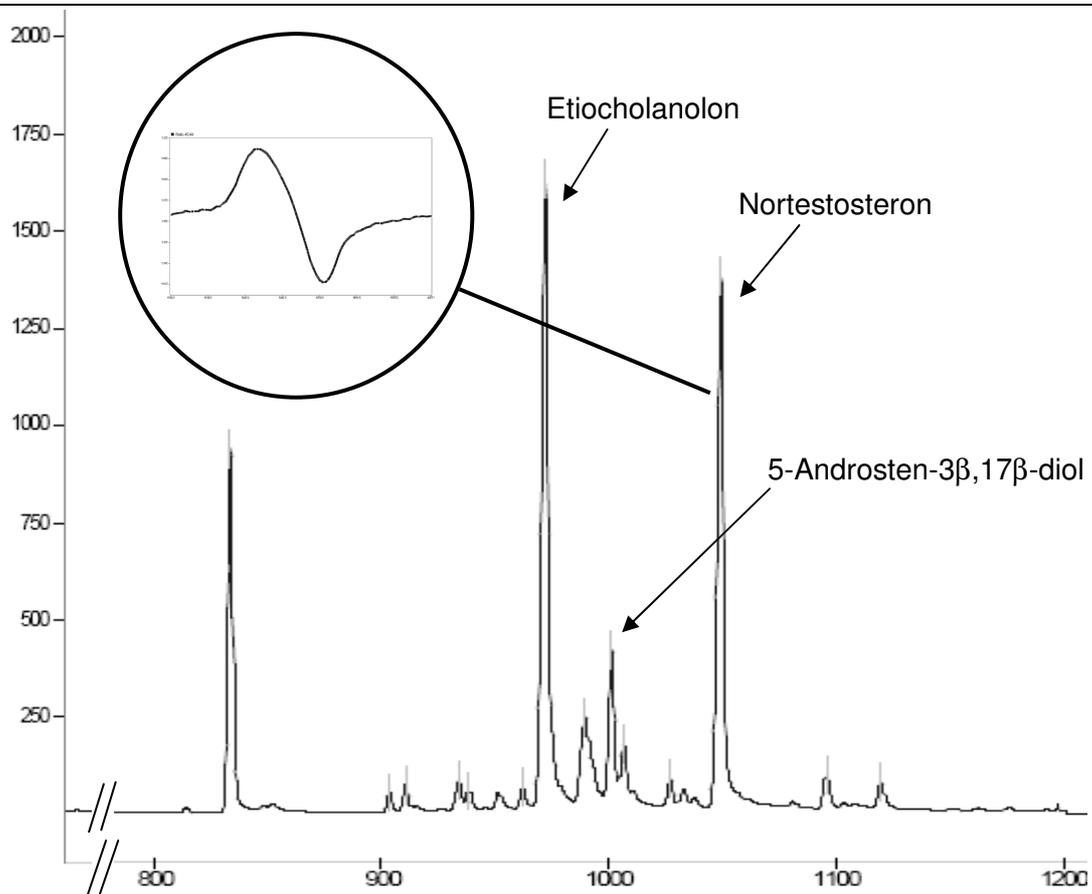


Abbildung 14.6-1: Ausschnitt des GC/IRMS-Chromatogrammes nach der NP-HPLC-Fraktionierung (Fraktion 2) mit dem swing für Nortestosteron (Kreis)

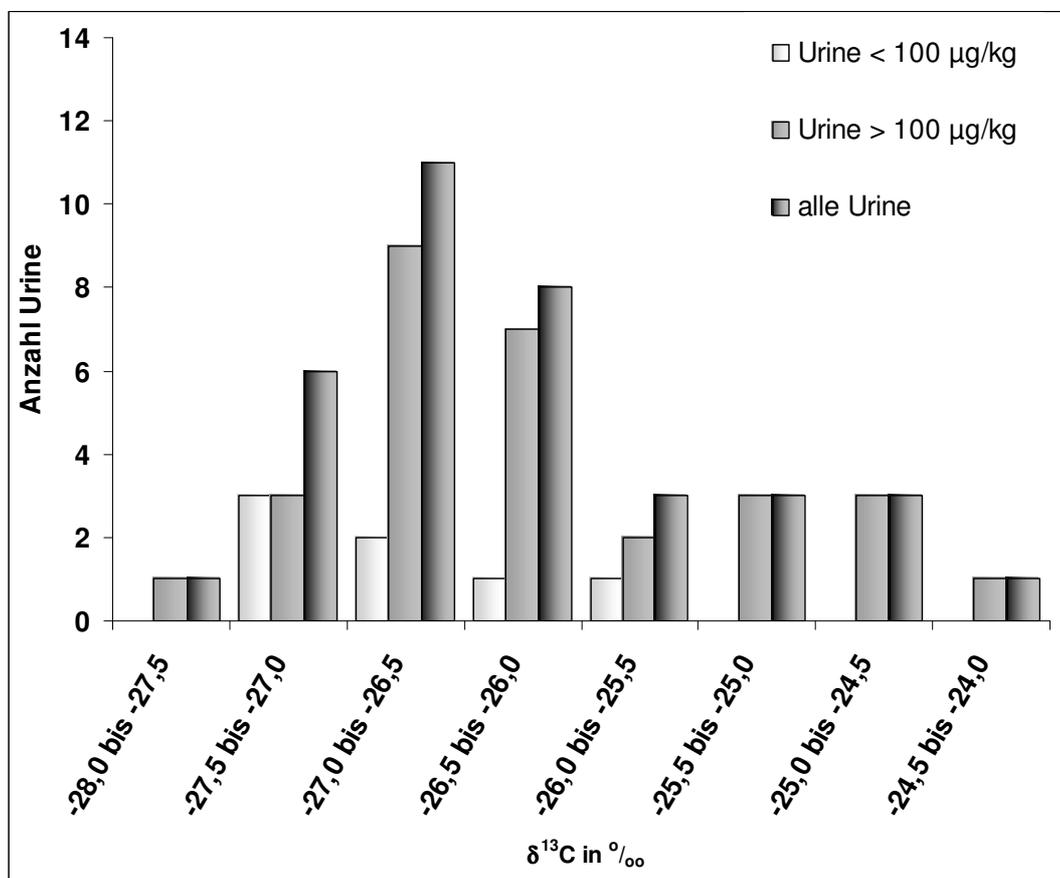


Abbildung 14.6-2: Häufigkeitsverteilung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von Nortestosteron der Urine (n=36)

Zur Berechnung der statistischen Größen Median und Mittelwert wurden alle erhaltenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte miteinbezogen. Es wurden auch die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte berücksichtigt, bei denen die Konzentrationen unter der Bestimmungsgrenze lagen, da keine signifikanten Abweichungen im $\delta^{13}\text{C}$ -Wert bei einem Nortestosterongehalte $<100 \mu\text{g}/\text{kg}$ beobachtet werden konnten. Aus der Graphik (**Abbildung 14.6-2**) geht die Unabhängigkeit des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von der Konzentration hervor.

Der Mittelwert von Nortestosteron von $-26,29 \text{‰} \pm 0,85$ war dem von Prévost et al.¹⁶⁷ berichteten Mittelwert von $-25,14 \text{‰} \pm 0,75$ sehr ähnlich. Prévost et al. bestimmten die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron nicht im Urin, sondern in den Nieren und den Hoden. Diese Ergebnisse zeigen, dass keine signifikanten Änderungen im $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von Nortestosteron, wenn die Substanz einmal im Körper gebildet wurde, gemessen werden konnte.

Die Vorläufersubstanz DHEA wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem ähnlichem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis bestimmt. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte lagen zwischen $-27,50 \text{‰}$ und $-25,20 \text{‰}$. Der Median wurde mit $-26,63 \text{‰}$, der Mittelwert mit $-26,42 \text{‰} \pm 0,69$ bestimmt. Es zeigte sich beim Vergleich der Mittelwerte und Mediane der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron und DHEA eine signifikante Übereinstimmung. In der **Abbildung 14.6-3** wurden die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von DHEA und Nortestosteron zusammen entsprechend der Häufigkeit dargestellt.

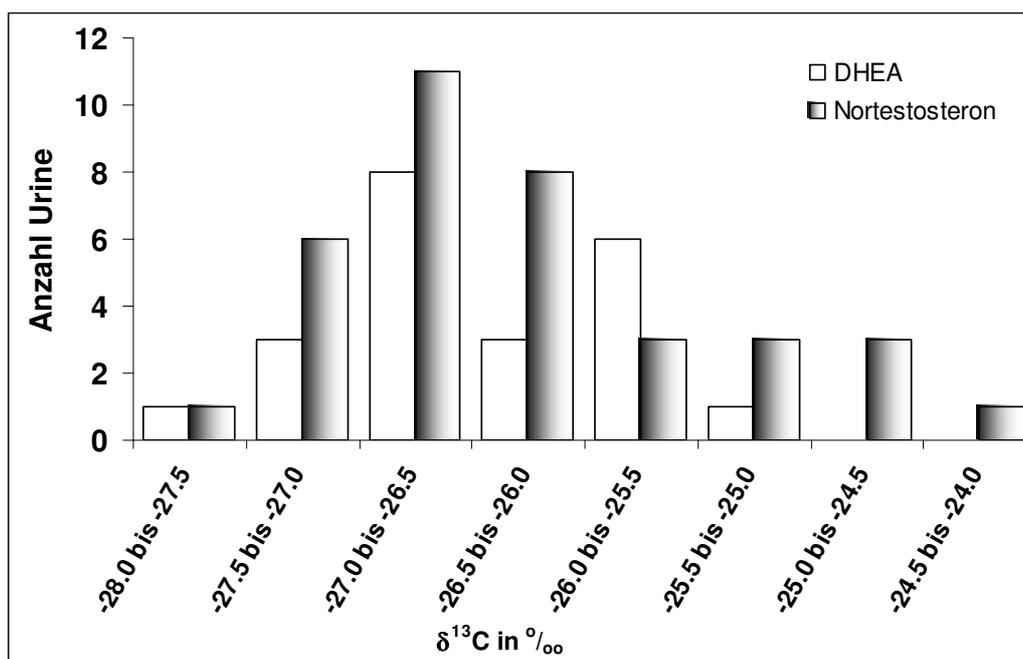


Abbildung 14.6-3: Häufigkeitsverteilung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von Nortestosteron (n=36) und DHEA (n=22) im Vergleich

Die Untersuchungen von Prévost et al.¹⁶⁷ zeigten bei den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von Nortestosteron ($-25,14 \text{ ‰} \pm 0,75$; $n=8$) und DHEA ($-25,54 \text{ ‰} \pm 0,29$; $n=3$) in der Nieren ebenfalls eine Übereinstimmung.

Nicht nur die Mittelwerte der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron und DHEA wurden miteinander verglichen, sondern auch die von den einzelnen Urinen, von denen die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte Nortestosteron und DHEA bestimmt wurden. Von den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten der beiden Substanzen wurde jeweils die Differenz ($\Delta \delta^{13}\text{C}$ DHEA-NOR in der **Tabelle 14.6-1**) gebildet. Es ergab sich aus den 23 gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Wertepaaren eine Spanne der Differenzen der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von $-2,32 \text{ ‰}$ und $+1,04 \text{ ‰}$. Bei 19 Urinen lag die Differenz $<1 \text{ ‰}$. In weiterführenden Arbeiten ist zu untersuchen, wie sich diese Differenz bei Ebern unbekannter Herkunft und zusätzlich bei einer Nortestosteronapplikation verändert. Bei einer deutlich größeren Differenz zwischen den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von Nortestosteron und DHEA wäre der Nachweis einer exogenen Applikation erbracht.

Roig et al.¹⁶⁵ verglichen im Urin von 9 unbehandelten Ebern unbekannter Herkunft die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron mit der Vorläufersubstanz Estron. Es wird von einer Spanne der Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen $-2,9 \text{ ‰}$ und $+1,7 \text{ ‰}$ berichtet, wobei 6 von 6 $\delta^{13}\text{C}$ -Wertepaare $>1 \text{ ‰}$ liegen.

Die Einzelwerte der Eberproben sind in der **Tabelle 14.6-1** mit den allgemeinen Daten, dem Gehalt an Nortestosteron und DHEA sowie den dazugehörigen $\delta^{13}\text{C}$ -Werten und der Differenz $\Delta \delta^{13}\text{C}$ DHEA-NOR zusammengestellt.

L-Nr.	LPA-Nr.	Rasse	Alter	Schlachtgewicht	Menge	NOR	$\delta^{13}\text{C}$	DHEA	$\delta^{13}\text{C}$	$\Delta \delta^{13}\text{C}$ DHEA-NOR
			[d]	[kg]	[ml]	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	‰	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	‰	
A 1	664	DL	159	123,0	79,0	297,7	-27,26	952	-26,61	0,65
A 2	662	DL	159	126,5	33,0	120,9	-	-	-	-
A 4	675	DL	153	118,5	462,0	229	-	-	-	-
A 5	668	DL	160	115,0	121,0	453,6	-26,07	1324	-26,67	-0,6
A 6	672	DL	162	95,0	154,0	217,7	-26,51	540,0	-25,66	0,85
A 9	648	DL	199	116,5	41,0	9,00*	-26,57	620,0	-26,85	-0,28
A 11	600	Pi	194	122,0	173,0	34,8	-26,79	425,0	-27,46	-0,67
B 12	879	DE	194	116,5	91,0	785,6	-26,27	-	-	-
B 13	670	DL	173	123,5	92,0	1022,0	-25,33	2256,0	-25,27	0,06
B 14	677	DL	166	118,0	52,0	219,5	-27,04	-	-	-
B 15	594	Pi	208	112,0	130	100,8	-	-	-	-
B 16	598	Pi	208	115	79	285,5	-26,17	12,0**	-	-
B 18	674	DL	173	124,5	81	105,8	-25,66	400	-25,64	0,02
Urin 2	505	DL	194	111	172,5	134	-26,98	500	-26,13	0,85
Urin 4	547	DL	174	122,5	122,4	68,2	-27,09	660,0	-26,85	0,24
Urin 5	562	DL	176	83	102,9	182	-26,84	228,0	-25,98	0,86
Urin 8	583	DL	173	120,0	172,2	241,0	-26,45	-	-	-
Urin 9	571	DL	180	126,5	715,2	393,1	-26,76	-	-	-
Urin 10	533	DL	187	110,5	87,0	154,1	-27,53	404,0	-27,25	0,28
C 1	499 grün	AS	363	186,0	228	912,8	-26,86	-	-	-
C 2	663 gelb	DL	186	128,5	572	170,4	-26,47	1142,0	-25,57	0,9
C 3	678 gelb	DL	172	119,5	85	1112,0	-26,74	1104,0	-26,81	-0,07
C 4	680 gelb	DL	172	126,0	325	18,2*	-26,18	-	-	-
C 5	667 gelb	DL	190	106,0	694	196,0	-25,18	384	-27,5	-2,32
C 6	711 gelb	DL	159	121,5	324	112,2	-24,14	-	-	-
C 7	719 gelb	DL	159	116,0	74	282,8	-24,86	-	-	-
C 9	718 gelb	DL	159	156,5	625	37,8	-25,58	572,0	-26,4	-0,82
C 10	679 gelb	DL	172	119,0	54	45,7	-25,78	-	-	-
C 11	599 grün	Pi	222	115,0	75	40,3	-27,13	64,0	-	-
D 1	716	DL	116	121,5	527	17,4*	-27,32	5100,0	-27,26	0,06
D 2	684	DL	181	117,0	33,0	270,0	-26,83	-	-	-
D 4	705	DL	166	122,0	119,0	367,4	-26,63	260,0	-25,59	1,04

L-Nr.	LPA-Nr.	Rasse	Alter	Schlachtgewicht	Menge	NOR	$\delta^{13}\text{C}$	DHEA	$\delta^{13}\text{C}$	$\Delta \delta^{13}\text{C}$ DHEA-NOR
			[d]	[kg]	[ml]	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	‰	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]	‰	
D 5	715	DL	166	127,0	264,0	836,0	-26,36	5184,0	-26,2	0,16
D11	681	DL	179	116,5	46	234,0	-	-	-	-
D12	709	DL	166	119,0	54	149,00	-	-	-	-
D 13	641	DU	187	109,0	56	112,90	-24,50	-	-	-
D 14	704	DL	166	124,0	162	100,30	-25,31	880,0	-25,64	-0,33
D 15	682	DL	181	119,0	38	486,80	-26,37	780,0	-27,24	0,87
D 16	712	DL	166	121,0	118	248,50	-24,99	1316,0	-26,64	-1,65
D 17	642	DU	187	110,0	105	170,20	-26,54	196,0	-26,8	-0,26
D 18	695	DL	161	118,0	86	140,50	-27,45	-	-	-
F 7	701 G	DL	194	121,5	553	737,40	-	-	-	-
F 8	687 G	DL	207	127,0	720	260,10	-	-	-	-
F 9	622 GR	Pi	180	113,0	24	196,00	-	-	-	-
F 10	625 GR	Pi	180	106,5	159,0	502,60	-	-	-	-
G 1	690 Grün	DL	174	114,0	69,0	794,80	-	-	-	-
G 3	722 Gelb	DL	174	131,5	183,0	472,70	-	-	-	-
G 4	725 Gelb	DL	160	114,5	39	120,30	-	-	-	-
G 5	728 Gelb	DL	163	116,5	498	249,10	-	-	-	-
G 6	662 Grün	Pi	182	116,5	200	137,40	-	-	-	-
G 7	723 Gelb	DL	174	130,0	393	784,80	-	-	-	-
G 8	633 Grün	Pi	174	109,0	122	83,10	-	-	-	-
G 9	632 Grün	Pi	174	106,0	282	568,50	-	-	-	-
G 10	660 Grün	Pi	202	135,0	89	269,60	-	-	-	-
G 12	629 Grün	Pi	181	113,5	55	212,50	-	-	-	-
G 13	663 Grün	Pi	182	106,5	230	20,90*	-	-	-	-

Tabelle 14.6-1: Zusammenstellung der Daten der Eber, *: < Bestimmungsgrenze, **: < Nachweisgrenze, DL: Deutsches Landschwein, Pi: Pietrain, DU: Duroc, DE: Deutsche Edelrasse

14.7 Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Futters im Vergleich zu den Steroiden im Urin

Werden die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Steroide Nortestosteron (Median: -26,47 ‰) und DHEA (Median: -26,63 ‰) mit dem $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des aus C3-Pflanzen bestehenden Futters von $-25,9 \text{ ‰} \pm 0,12$ verglichen, so ergibt sich eine maximale Differenz von $-0,73 \text{ ‰}$.

Dieses Ergebnis wird im folgenden mit den Ergebnissen einer kontrollierten Futterstudie von Hare et al.⁸⁹ an Schweinen verglichen. In der beschriebenen Studie wurden die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte nicht von einzelnen Steroiden im Urin gemessen, sondern im Fäzes. Da es sich bei beiden Matrices, bei Fäzes und Urin um Ausscheidungen handelt, wurden die Ergebnisse miteinander verglichen.

In dieser Studie wurden Schweine mit reinen C3-Pflanzen ($-25,3 \text{ ‰}$) und reinen C4-Pflanzen ($-12,4 \text{ ‰}$) gefüttert. Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert wurde vom Muskel, Kollagen und Fäzes bestimmt. Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Fäzes, der aus der C4-Fütterung stammte, wurde mit $-12,8 \text{ ‰}$ und der, der aus der C3-Fütterung stammte, mit $-25,7 \text{ ‰}$ bestimmt. Insgesamt ist bei beiden Fütterungen eine $\delta^{13}\text{C}$ -Differenz im Fäzes von $-0,4 \text{ ‰}$ festzustellen. Die leichte ^{13}C -Abreicherung ist mit dem Ergebnis von $-0,63 \text{ ‰}$ der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Eine tendenzielle ^{13}C -Abreicherung ist zu erkennen, jedoch müssen diese Ergebnisse mit der Streuung von $0,60 \text{ ‰}$ für Nortestosteron beachtet werden. Für eine Verifizierung einer ^{13}C -Abreicherung zwischen der Kohlenstoffisotopenzusammensetzung des Futters und der Ausscheidungsmatrix Urin ist eine weitere Futterstudie notwendig.

Im Gegensatz zu den Ausscheidungsprodukten tritt in den Gewebe bildenden Matrices eine ^{13}C -Anreicherung auf. Die einzelnen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Studie von Hare et al. sind der **Tabelle 14.7-1** zu entnehmen.

	Fütterung mit C3 Pflanzen				Fütterung mit C4 Pflanzen			
	Futter	Muskel	Collagen	Fäzes	Futter	Muskel	Collagen	Fäzes
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	-25,3	-23,8	-23,9	-25,7	-12,4	-11,4	-9,2	-12,8

Tabelle 14.7-1: Ergebnisse des Versuches von Hare et al.⁸⁹

Eine ^{13}C -Anreicherung bei einer Fütterung mit C4-Pflanzen konnten auch Prévost et al.¹⁶⁷ bestätigen. Während der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Nortestosteron aller untersuchten Matrices (Leber, Niere, Hoden) bei Fütterung mit C3-Pflanzen bei $-25,14 \text{ ‰}$ lag, stieg dieser bei der Fütterung mit C4-Pflanzen auf $-18,46 \text{ ‰}$.

14.8 Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der im Handel erhältlichen Nortestosteronprodukte

Für den Nachweis der illegalen Anwendung von Nortestosteron anhand der Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen Nortestosteron und einem Precursor muss eine weitere Voraussetzung erfüllt sein. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Nortestosteronprodukte, die sich auf dem internationalen Markt befinden, müssen bekannt sein. Während des Projektzeitraumes konnten verschiedene kommerzielle Nortestosteronpräparate von internationalen Firmen erworben und die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte bestimmt werden. Die Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der verschiedenen Nortestosteronpräparate erfolgte als Reinsubstanzen über das EA/IRMS-System. Die einzelnen Präparate der verschiedenen Firmen mit den bestimmten $\delta^{13}\text{C}$ -Werten sind der **Tabelle 14.8-1** zu entnehmen. Die Nortestosteronprodukte der verschiedenen Hersteller wiesen eine Spanne im $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von -29,65 ‰ bis -27,28 ‰ auf.

Auffallend ist das Nortestosteronprodukt der Firma Riedel-de-Häen, das sich zwischen zwei Chargen um 2 ‰ unterschied.

Firma	Charge	$\delta^{13}\text{C}$ in ‰ (EA/IRMS)	$\pm\text{StAbw}$ (‰)	Anzahl
Riedel-de-Häen	Lot2190X	-27,28	0,11	8
Riedel-de-Häen	Lot4098X	-29,30	0,04	4
Fluka	442722/1	-29,30	0,13	8
Sigma	108H648	-29,26	0,12	8
Steraloids	H736	-29,65	0,12	8
Sequoia	060801900n	-29,13	0,08	3
aus China	keine vorhanden	-29,59	0,05	4

Tabelle 14.8-1: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (EA/IRMS-Messung) der kommerziell erhältlichen Nortestosteronpräparate

In der **Abbildung 14.8-1** wurden zum Vergleich die im Eberurin gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron und die der synthetischen Präparate dargestellt.

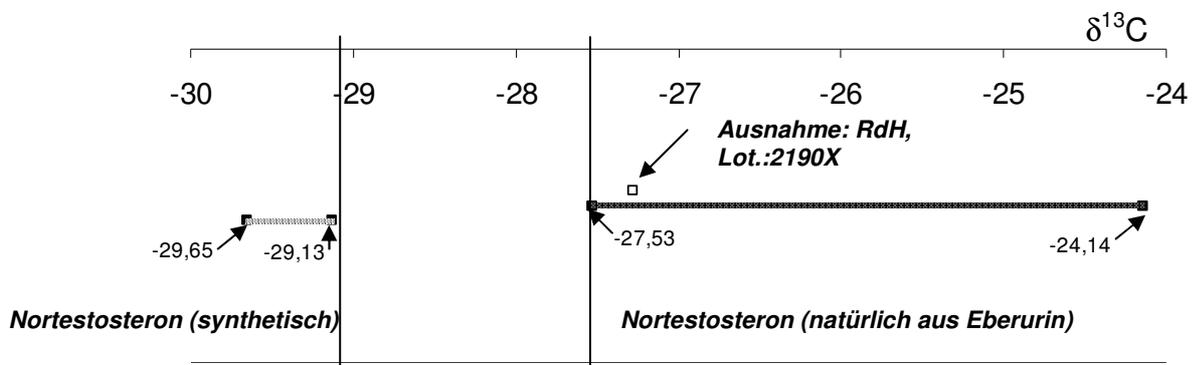


Abbildung 14.8-1: graphische Darstellung der Spanne der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron aus Eberurinen und von verschiedenen Herstellerfirmen, leeres Quadrat: gemessener $\delta^{13}\text{C}$ -Wert stellt eine Ausnahme dar; Angaben in ‰, RdH: Riedel-de-Häen

Es ist eine deutliche Trennung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen synthetischem und natürlichem Nortestosteron sichtbar. Nicht zu erklären ist die dargestellte Ausnahme des Präparates von Riedel-de-Häen.

Es wurde zusätzlich der Versuch unternommen, dem bereits aufgearbeiteten Extrakt synthetisches Nortestosteron (Sigma) (Standardlösung) dazu zugeben. Dabei wurde auf vergleichbare Signalintensitäten geachtet. Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Urins wurde mit $-26,74\text{‰}$ und der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der Standardlösung mit $-29,82\text{‰}$ bestimmt. Die Mischung der beiden Lösungen ergab einen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von $-28,46\text{‰}$, dies entspricht genau dem Mittelwert.

Auf dem internationalen Markt sind verschiedene Anbieter von Nortestosteron und dessen Derivaten vertreten. Bei verschiedenen Firmen wurden Anfragen über eine Nortestosteronlieferung gemacht, die jedoch bei einer konkreten Bestellung das offerierte Angebot sehr oft wieder zurückzogen. Aus diesem Grunde konnte in der vorliegenden Arbeit nur Nortestosteron von den Chemikalienlieferanten bestimmt werden. Die kontaktierten Lieferanten sind am Ende des Kapitels genannt. Ausnahme stellte das Nortestosteron aus China dar, das auf Umwegen besorgt werden konnte. Diese Tatsache verdeutlicht, dass man mit dem Thema Nortestosteron in einen illegalen Bereich stoßen kann.

Im folgenden sind die kontaktierten Internetanbieter aufgelistet: 3B Medical Systems, Inc. (Libertyville, Illinois, USA), Advanced Technology & Industrial Co., Ltd. (Hong Kong, China), ANDAChem, Inc. (Shanxi, China), Polyorganix (Texas, USA), Apinchemicals (Abingdon, UK), DSL Chemicals (Shanghai, China), Agnus Chemical Company (USA), Alltechweb/Grace (Deerfield, USA), ChromaDex Corporate (Santa Ana, USA), Pfaltz & Bauer (Waterbury, USA), Kingchem (Allendale, USA), Thinker Chemical Co. Ltd (Hangzhou, China).

14.9 Bestimmung des pH-Wertes des Urins

Der pH-Wert der Eberurine wurde mittels einer pH-Elektrode bestimmt. Der Mittelwert des pH-Wertes lag bei $\text{pH } 7,0 \pm 0,4$. In der **Abbildung 14.9-1** sind die Werte mit der jeweiligen Standardabweichung dargestellt.

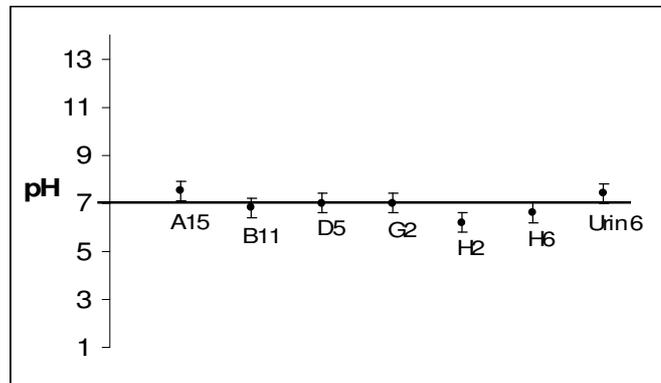


Abbildung 14.9-1: pH-Werte von 7 Urinen

Aus den gemessenen pH-Werten wurde der Schluss gezogen, dass sich die pH-Werte aller Urine im neutralen Bereich befanden. Im neutralem pH-Wert sind auch bei Lagerung keine signifikanten Änderungen der Steroidzusammensetzung oder Reaktionen der Steroide zu erwarten.

14.10 Bestimmung der Wasserlöslichkeit von Nortestosteron

Die Wasserlöslichkeit wurde in der vorliegenden Arbeit bestimmt, weil ein relativ hoher Gehalt an frei vorliegendem Nortestosteron nachgewiesen wurde. Anhand der Ergebnisse in **Tabelle 14.10-1** zeigte sich allgemein eine unerwartet hohe Wasserlöslichkeit von Nortestosteron. Im neutralen Bereich bei pH 7, das entspricht dem pH-Wert des Urins, wurde die höchste Wasserlöslichkeit von Nortestosteron bestimmt. Die Änderungen des pH-Wertes bei der Aufarbeitung hatten auf die Nortestosteron-gehalte keine Auswirkungen.

<i>pH</i>	<i>Löslichkeit (mg/l)</i>
4	259,9
7	304,9
10	249,3

Tabelle 14.10-1: Wasserlöslichkeit von Nortestosteron, n=2

14.11 Ermitteln der Bezugssubstanz Kreatinin

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob Kreatinin als Indikatormaterial für den Verdünnungszustand des Eberurins geeignet ist. Die Menge an Wasser, die der Eber vor der Schlachtung zu sich nahm, war unbekannt. Zwischen den Urinmengen, die zur Nortestosteronbestimmung geliefert wurden und den bestimmten Konzentrationen an Nortestosteron konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

Kreatinin (Anhydrid des Kreatins) ist das Endprodukt des Stickstoffstoffwechsels und befindet sich mit Kreatin im Gleichgewicht²⁵⁶. Es wird nicht metabolisiert und daher quantitativ ausgeschieden²⁵⁷. Unterschiedliche Wasseraufnahmemengen des Ebers spiegeln die Konzentrationen der im Urin gelösten Stoffe wie die des Kreatinins wieder.

Der Kreatiningehalt wurde deshalb als Bezugsgröße für die endogene Nortestosteronkonzentration im Urin herangezogen.

Die Eber erhielten standardisiertes Futter, so dass ein erhöhter Kreatininwert durch unterschiedliche Fleischzufuhr²⁵⁷ ausgeschlossen werden konnte.

In der nachfolgenden Tabelle (**Tabelle 14.11-1**) finden sich einige Literaturwerte für Kreatinin bei Menschen und Schweinen. Bei Schweinen wurden nur Werte für Blut in der Literatur gefunden. Von Kastraten waren keine publizierten Kreatininwerte bekannt.

	Blut	Urin	Quelle
Hanford Miniatur Eber	0,8 ± 0,2 mg/dl	nicht bekannt	²⁵⁸
Yukatan Miniaturschwein	1,6 ± 1,2 mg/dl	nicht bekannt	²⁵⁹
Schwein allgemein	1,2-2,0 mg/dl	nicht bekannt	²⁶⁰
Frauen, Männer	0,6-1,3 mg/dl	0,7-2,33 g/Tag	⁹⁴

Tabelle 14.11-1: Literaturdaten für Kreatinin

Die Kreatininbestimmung in den Urinen wurde nach einer Methode des CVUA Freiburg²⁶¹ durchgeführt. Das mit der Methode bestimmte Kreatinin ist die Summe aus Kreatin und Kreatinin (**Abbildung 14.11-1**).

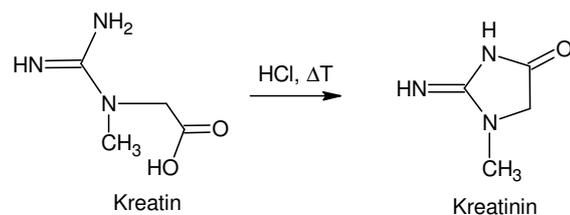


Abbildung 14.11-1: Darstellung von Kreatinin aus Kreatin nach Umsetzen mit HCl

Zur Kreatininbestimmung sollte 24h-Urin verwendet werden. Die Urine wurden aus der Blase der frisch geschlachteten Eber entnommen und stellten damit nur eine Momentaufnahme dar. Eine 24h Urinsammlung war nicht möglich.

Aus 15 Urinproben wurde Kreatinin im Mittel mit $1,84 \mu\text{g/l} \pm 0,91$ mit einer Spanne von $0,49 - 3,77 \mu\text{g/l}$ gemessen. Die Daten sind der **Tabelle 14.11-2** zu entnehmen. Der Kreatiningehalt des Kastratenurins wurde mit $2,39 \mu\text{g/l}$ bestimmt. Die Kreatininwerte des Ebers unterscheiden sich nicht von dem des Kastraten, der kein Nortestosteron ausscheidet.

Die Kreatininkonzentrationen wurden gegen die Nortestosteronkonzentration aufgetragen (**Abbildung 14.11-2**). Obwohl kein 24h Urin zur Untersuchung verwendet wurde, zeigte Kreatinin beim Eberurin mit den physiologischen Nortestosterongehalten eine Korrelation.

Kreatinin ist als ständig vom Körper ausgeschiedenes Stoffwechselprodukt ein geeigneter Bezugsparameter für die endogene Nortestosteronmenge.

Auch bei den Konzentrationen an DHEA ist eine tendenzielle Korrelation zu beobachten (**Abbildung 14.11-3**).

Labor-Nr.	Nortestosteron ($\mu\text{g/kg}$)	DHEA ($\mu\text{g/kg}$)	Kreatinin ($\mu\text{g/l}$)	Labor-Nr.	Nortestosteron ($\mu\text{g/kg}$)	DHEA ($\mu\text{g/kg}$)	Kreatinin ($\mu\text{g/l}$)
A 1	297,0	952	2,93	D 14	100,3	880	0,49
A 2	120,9	n.b.	0,87	D 15	486,8	780	2,42
A 5	453,0	1324	3,77	D 16	248,5	1316	1,11
A 6	217,7	540	1,22	D 17	170,2	196,0	0,83
B 14	219,5	322	1,49	D 18	140,5	n.b.	1,46
D 2	270,0	632	1,73	F 8	260,0	n.b.	1,97
D4	367,4	260	1,85	G 7	784,8	n.b.	3,30

Tabelle 14.11-2: Daten der Kreatininbestimmung, n.b.: nicht bestimmbar wegen unzureichender Urinmenge

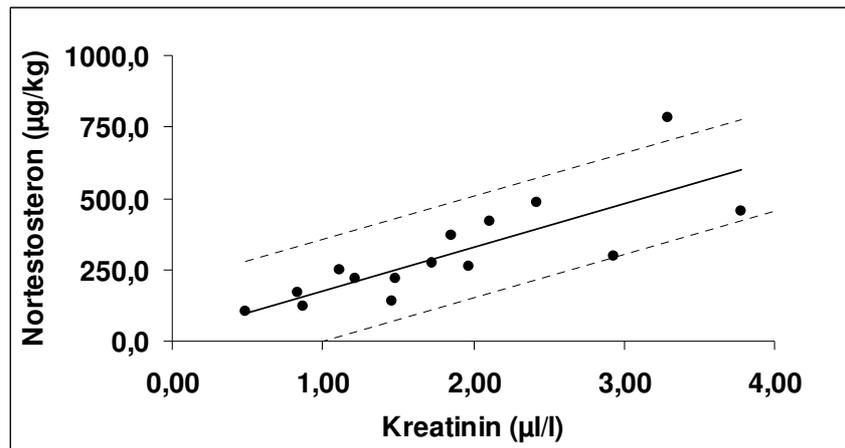


Abbildung 14.11-2: Darstellung der Korrelation zwischen der Konzentration an Kreatinin und Nortestosteron; Gleichung: $y=151,72x+25,132$; $R^2=0,6456$

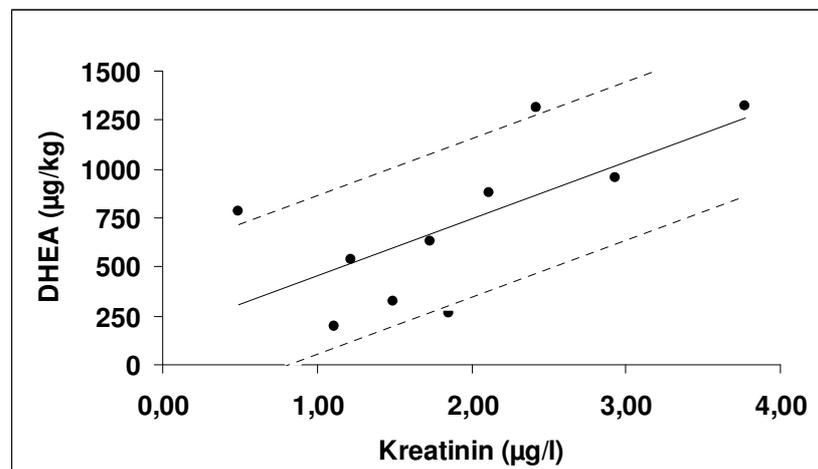


Abbildung 14.11-3: Darstellung der Korrelation zwischen der Konzentration an Kreatinin und DHEA; Gleichung: $y=290,35x + 164,94$; $R^2=0,4629$

Während Nortestosteron vor allem frei vorlag, kam DHEA nur als Glucuronid- bzw. Sulfat-derivat vor. Eine Erklärung für die geringere Korrelation zwischen den Gehalten von Kreatinin und DHEA kann der nicht bestimmte Sulfatanteil im Urin sein. Zur Abklärung der Korrelation sind weitere Versuche nötig, in denen auch die freigesetzten Steroid-sulfate bestimmt werden.

Kreatinin wurde in dieser Arbeit als Bezugssubstanz für die Hormonanalytik im Urin von Tieren nachgewiesen.

In früheren Untersuchungen wurde lediglich die Dichte des Urins in Korrelation zu Gehalten an Testosteron- und Epitestosteron-glucuronid beim Menschen berichtet. Die Gabe von Testosteron und Epitestosteron und deren Glucuronide führte zu einem Anstieg der Dichte²⁶².

15 Validierung und Qualitätssicherung

15.1 Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Zur Absicherung der quantitativen Messergebnisse von Nortestosteron und DHEA wurden mittels einer Kalibriergeraden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermittelt. Die Nachweisgrenze ist die kleinste nachweisbare Menge. Die Bestimmungsgrenze ist die kleinste quantifizierbare Menge, die mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision quantitativ erfasst werden kann. Die Präzision ist das Maß für die Streuung der Analysenergebnisse und wird mit den statistischen Größen Standardabweichung s , Variationskoeffizient VK (relative Standardabweichung) oder Varianz ausgedrückt²⁶³.

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden mit dem Softwareprogramm valoo 2.0 gemäß DIN 32645 berechnet. Die Kalibriergeraden für Nortestosteron und DHEA wurden mit vier Standardkonzentrationen durchgeführt. Für die Grundkalibrierung von Nortestosteron wurden Konzentrationen von 5 ng/μl, 10 ng/μl, 15 ng/μl und 33,3 ng/μl verwendet (**Tabelle 15.1-1**). Die Konzentrationen für die Grundkalibrierung von DHEA (**Tabelle 15.1-2**) lagen bei 5 ng/μl, 15 ng/μl, 25 ng/μl und 40 ng/μl. In den Tabellen sind Mittelwert (x_{MW}), Standardabweichung und Variationskoeffizient ersichtlich.

Beide Kalibriergeraden verliefen linear. Für Nortestosteron wurde eine Nachweisgrenze von 0,35 ng/μl und eine Bestimmungsgrenze von 1,25 ng/μl errechnet. Bei DHEA lag die Nachweisgrenze bei 0,61 ng/μl und die Bestimmungsgrenze bei 2,19 ng/μl. Die Kalibriergeraden sind für Nortestosteron in **Abbildung 15.1-1** und für DHEA in **Abbildung 15.1-2** dargestellt.

	5 ng/μl	10 ng/μl	15 ng/μl	33,3 ng/μl
x_{MW} (%)	5,01	10,06	14,91	33,35
s (ng/μl)	0,16	0,23	0,22	0,16
VK (%)	3,10	2,29	1,47	0,48

Tabelle 15.1-1: Daten Kalibriergerade Nortestosteron, n=10

	5 ng/μl	15 ng/μl	25 ng/μl	40 ng/μl
x_{MW} (%)	5,04	15,09	25,24	39,96
s (ng/μl)	0,17	0,29	0,50	0,24
VK (%)	3,31	1,90	1,98	0,59

Tabelle 15.1-2: Daten Kalibriergerade DHEA, n=10

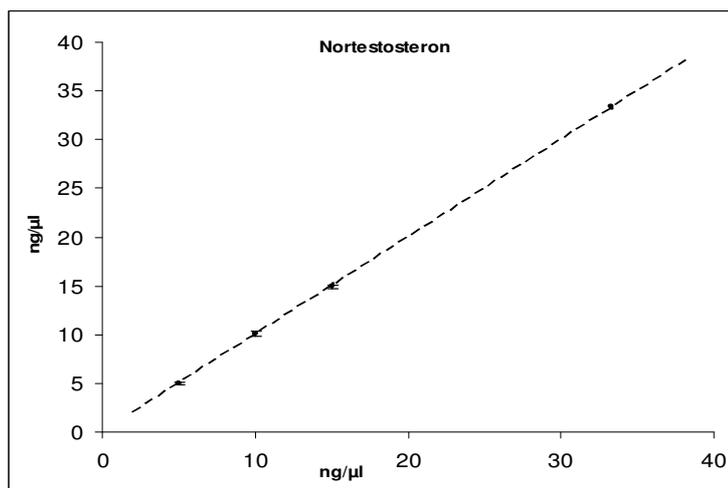


Abbildung 15.1-1: Kalibriergerade Nortestosteron, $n=10$; $y=1,0014x - 0,0245$; $R^2=0,9998$

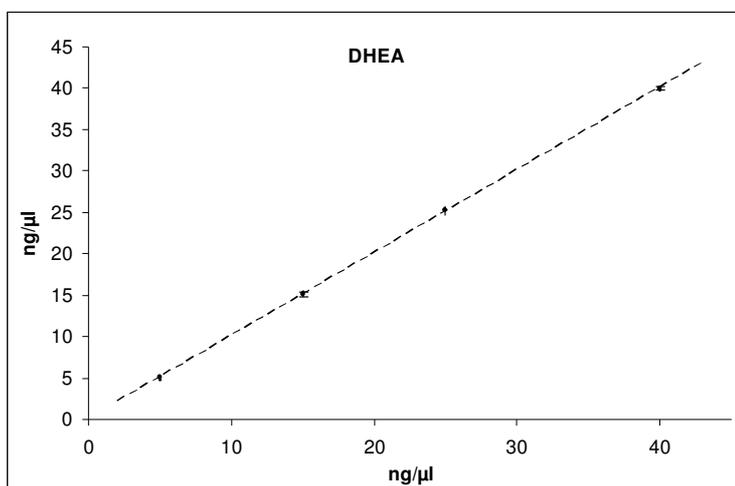


Abbildung 15.1-2: Kalibriergerade DHEA, $n=10$, $y=0,9983x + 0,1195$; $R^2=0,9997$

Zur Quantifizierung des internen Standards Methyltestosteron wurde eine Einpunkt-kalibrierung mit einer Konzentration von 33,3 ng/µl am GC/FID-Messsystem durchgeführt. Die ermittelte Standardabweichung betrug für Methyltestosteron 33,3 ng/µl ± 2,61 (VK: 7,83 %, $n=76$).

15.2 Validierung und Qualitätssicherung der Aufarbeitungsmethode

15.2.1 Stabilität der HPLC-Anlagen

Zur Kontrolle der Stabilität der Retentionszeiten (RT) und der Flächen wurde ein Funktionstest durchgeführt. Dieser beinhaltete 10 Injektionen innerhalb eines Tages

mit den Zielsubstanzen. Bei der HPLC-NP-Anlage wurde der Funktionstest zweimal durchgeführt (HPLC-NP.1 und HPLC-NP.2). Die Ergebnisse der Funktionstests beider HPLC-Anlagen sind in **Tabelle 15.2-1** dargestellt.

Substanz:	HPLC NP.1		HPLC NP.2		HPLC RP
	DHEA/Methyltestosteron	Nortestosteron	DHEA/Methyltestosteron	Nortestosteron	DHEA/Methyltestosteron
MW (Fläche)	4505	4465	3673	3921	14157
VK (Fläche)	0,89%	0,77%	0,86%	0,88%	1,47%
RT (Minuten)	10,03	14,98	9,52	13,97	22,08
VK (Rt)	0,64%	0,87%	0,24%	0,26%	0,30%

Tabelle 15.2-1: Stabilitätstests der HPLC-Anlagen, n=10

Bei beiden HPLC-Anlagen lagen die Abweichungen für die Flächen unter 2 % und für die Retentionszeiten unter 1 %, so dass eine ausreichende Stabilität der Anlagen innerhalb der Serie gewährleistet war.

15.2.2 Bestimmung der Wiederfindung nach der Aufarbeitung

Die Wiederfindung (WDF) ist das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in der Probe. Unter Wiederholbedingungen versteht man, dass die voneinander unabhängigen Ermittlungsergebnisse mit demselben Verfahren, derselben Probe, demselben Labor, durch denselben Bearbeiter und derselben Laborausstattung in kurzen Zeitabständen erbracht werden²⁶³.

Die Wiederfindung der Zielsubstanzen Nortestosteron und DHEA sowie des internen Standards Methyltestosteron wurde durch eine Dotierung des Kastratenerins bestimmt. Es wurde zur Bestimmung der Wiederfindung die komplette Aufarbeitung durchgeführt. Die zugesetzten Konzentrationen waren bei allen Substanzen 666,0 µg/kg. Dies entspricht einer Aufgabenmenge von 33,3 ng/µl auf das GC/C/IRMS-System mit der notwendigen Signalintensität von 1000 mV.

Die Wiederfindung von Nortestosteron lag bei 96,0 % ±15,7 (n=6, NP-HPLC). Bei der Vorläufersubstanz DHEA lag die Wiederfindung bei 78,4 % ± 8,3 (n=3, RP-HPLC). Beim internen Standard wurde die Wiederfindung von Methyltestosteron nach der Aufreinigung über das NP-HPLC-System und über das RP-HPLC-System bestimmt. Die Wiederfindung von Methyltestosteron im Kastratenerin lag bei 100,9 % ± 11,6 (n=6, NP-HPLC) und bei 75,7 % ± 4,4 (n=3, RP-HPLC).

Die Wiederfindung von Methyltestosteron in den Eberurinproben gegeben lag bei 92,1 % \pm 12,8 (n=55, NP-HPLC) und bei 69,2 % \pm 7,7 (n=25, RP-HPLC).

Bis zur weiteren Aufreinigung auf dem RP-HPLC-System konnten die Substanzen Nortestosteron und Methyltestosteron ohne Verluste bestimmt werden.

Nach der Aufreinigung durch das RP-HPLC-System wurden bei Methyltestosteron und DHEA jedoch Verluste in ähnlicher Größe von ca. 25 % festgestellt. Beim Eberurin war dieser Verlust mit 30 % stärker ausgeprägt. Möglicherweise lag hier ein matrixspezifischer Effekt vor, der in weiterführenden Untersuchungen zu klären ist.

Die Richtlinie 2002/657/EG²²⁰ wird zur Beurteilung der Analysemethoden für die Bestimmung von Rückständen in Lebensmitteln tierischer Herkunft angewendet. Der Schwerpunkt der entwickelten Analysemethode lag jedoch auf der fraktionierungsfreien Aufarbeitung bezüglich des ¹³C/¹²C-Verhältnisses. Die genannte Richtlinie wurde aus diesem Grund nicht zur Beurteilung der Methode herangezogen.

In der Tabelle 15.3-1 in Kapitel 15.3 sind die Wiederfindungen zusammen mit den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten zusammengestellt.

15.2.3 Bestimmung der Wiederfindung nach der HPLC-Analyse

Zusätzlich wurde die Wiederfindung der Substanzen des externen Standards (ESTD) bestimmt. Die externen Standardlösungen wurden jeweils nur über die HPLC-Anlagen ohne vorherige Flüssig-/Flüssigextraktion gegeben.

Die Wiederfindung von Nortestosteron nach der NP-HPLC-Analyse lag bei 96,0 % \pm 11,0 (n=33). Bei DHEA lag die Wiederfindung nach der RP-HPLC-Analyse bei 87,2 % \pm 9,5 (n=15).

Die Wiederfindung von Methyltestosteron wurde nach beiden HPLC-Analysen bestimmt. Sie lag bei 101,9 % \pm 9,9 (n=33 NP-HPLC) und bei 89,3 % \pm 4,0 (n=15, RP-HPLC).

Für Methyltestosteron der externen Standardlösungen wurde nach der RP-HPLC-Anlage deutlich geringere Verluste festgestellt als bei den Eberurinextrakten. Dies spricht wiederum für einen matrixspezifischen Effekt.

15.2.4 Bestimmung der Wiederholbarkeit

Unter Wiederholbarkeit oder auch Wiederholpräzision versteht man die Präzision unter Wiederholbedingungen.

Bei einer Mehrfachaufarbeitung eines Mischurins an einem Tag unter Wiederholbedingungen wurden die Gehalte und die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron und DHEA bestimmt. In der **Tabelle 15.2-2** sind die Ergebnisse dargestellt. Der Variationskoeffizient lag für Nortestosteron bei 2,5 % und für DHEA bei 6,1 %. Die Streuung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte lag ebenfalls innerhalb der in der Regelkarte erfassten Streuung der Standardsubstanzen (siehe folgendes Kapitel). Die Wiederholbarkeit für den Gehalt an Nortestosteron und DHEA war $< 10\%$.

Nortestosteron	DHEA	$\delta^{13}\text{C}$ Nortestosteron	$\delta^{13}\text{C}$ DHEA
$\mu\text{g}/\text{kg}$	$\mu\text{g}/\text{kg}$	‰	‰
Varianz (%)	Varianz (%)	Varianz (%)	Varianz (%)
456,2 \pm 11,3 (n=6)	1859,7 \pm 113,9 (n=6)	-26,64 \pm 0,22 (n=5)	-26,32 \pm 0,27 (n=5)
2,5 %	6,1 %	0,83 %	1,03 %

Tabelle 15.2-2: Mehrfachaufarbeitung eines Mischurins; n = Anzahl

15.2.5 Bestimmung der „inter day precision“

Werden die unabhängigen Ermittlungsergebnissen mit demselben Verfahren, derselben Probe, in demselben Labor, durch denselben Bearbeiter, aber an verschiedenen Tagen erbracht, nennt man dies auch „inter day precision“²⁶³.

Für die Bestimmung der „inter day precision“ von Nortestosteron wurde deshalb in verschiedenen Zeitabständen, am Anfang, in der Mitte und am Ende des Projektes jeweils der gleiche Urin doppelt aufgearbeitet (**Tabelle 15.2-3**). Nortestosteron wurde mit einem Variationskoeffizient von 7,0 % bestimmt. Dieses Ergebnis zeigte eine ausreichende Stabilität der Methode über den Projektzeitraum.

Nortestosteron	WDF Methyltestosteron	$\delta^{13}\text{C}$ Nortestosteron	$\delta^{13}\text{C}$ Methyltestosteron
$\mu\text{g}/\text{kg}$	%	‰	‰
Varianz (%)		Varianz (%)	Varianz (%)
393,1 \pm 27,5 (n=6)	98,1 \pm 13,1 (n=6)	-26,26 \pm 0,23 (n=3)	-29,28 \pm 0,05 (n=3)
7,0 %		0,87 %	0,17 %

Tabelle 15.2-3: Aufarbeitungskontrolle anhand eines Urins an drei unterschiedlichen Tagen; n = Anzahl

15.3 Prüfung auf $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Fraktionierung

Der Kastratenurin wurde zur Überprüfung einer Isotopenfraktionierung während der Aufarbeitung herangezogen.

Im dotierten Kastratenurin lag der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Nortestosteron bei $-29,75\text{‰} \pm 0,67$ (n=6, HPLC-NP) und von DHEA bei $-29,46\text{‰} \pm 0,14$ (n=3, RP-HPLC). Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Methyltestosteron lag bei $-29,85\text{‰} \pm 0,46$ (n=6, NP-HPLC) und bei $-30,78\text{‰} \pm 0,78$ (n=3, RP-HPLC). Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron wurden aus der Kontrollstandardlösung mit $-29,60\text{‰} \pm 0,60$ und von DHEA mit $-29,99\text{‰} \pm 0,83$ bestimmt.

Im externen Kontrollstandard ESTD lagen die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron bei $-29,58\text{‰} \pm 0,59$ (n=6, NP-HPLC), von DHEA bei $-29,83\text{‰} \pm 0,16$ (n=3, RP-HPLC) und von Methyltestosteron bei $-29,78\text{‰} \pm 0,62$ (n=33; NP-HPLC) und $-29,88\text{‰} \pm 0,18$ (n=3; RP-HPLC).

Das den Proben zugesetzte Methyltestosteron wies $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von $-31,01\text{‰} \pm 1,07$ (n=23; RP-HPLC) auf.

Bei den Zielsubstanzen Nortestosteron und DHEA konnte keine Isotopenfraktionierung festgestellt werden, denn die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte entsprachen denen der Standardsubstanzen.

Die Aufarbeitung des Internen Standards Methyltestosteron verlief bis einschließlich der Extraktreinigung mittels NP-HPLC-Anlage ebenfalls fraktionierungsfrei. Die sich anschliessende Aufreinigung mit der RP-HPLC-Anlage ergab sowohl eine Isotopenfraktionierung von bis zu $-1,5\text{‰}$ als auch eine erhöhte Streuung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von $>1\text{‰}$. Da dieses Problem der Isotopenfraktionierung nur bei Methyltestosteron zu beobachten war, könnte ein zusätzlicher substanzspezifischer Effekt aufgetreten sein, der in weiteren Untersuchungen zu klären ist.

Die Ergebnisse sind in der **Tabelle 15.3-1** zusammenfassend dargestellt.

HPLC-Typ	Matrix	Substanz	x_{MW} (WDF(%)) $\pm s$	n	$\delta^{13}C$ (‰) $\pm s$	n
HPLC-NP	dot. Kastratenerin	Methyltestosteron	100,9 \pm 11,5	6	-29,85 \pm 0,46	6
		Nortestosteron	97,0 \pm 15,6		-29,75 \pm 0,67	
	ESTD	Methyltestosteron	101,9 \pm 9,9	33	-29,78 \pm 0,62	33
		Nortestosteron	96,0 \pm 11,0		-29,58 \pm 0,59	
Eberurine	Methyltestosteron	92,1 \pm 12,8	55	-29,16 \pm 0,59	51	
HPLC-RP	dot. Kastratenerin	Methyltestosteron	75,7 \pm 4,0	3	-30,78 \pm 0,78	3
		DHEA	78,4 \pm 8,3		-29,46 \pm 0,14	
	ESTD	Methyltestosteron	89,3 \pm 8,4	15	-29,88 \pm 0,18	3
		DHEA	87,2 \pm 9,6		-29,83 \pm 0,16	
	Eberurine	Methyltestosteron	69,2 \pm 7,7	25	-31,01 \pm 1,07	23

Tabelle 15.3-1: Mittelwert der Wiederfindung und Standardabweichung der Standardsubstanzen (siehe Kapitel 18.4-3) Methyltestosteron, Nortestosteron (Sigma) und DHEA bei einer Konzentration von 666,0 μ g/kg sowie die $\delta^{13}C$ -Werte während des Projektzeitraumes

15.4 Validierung und Qualitätssicherung der GC/C/IRMS-Messtechnik

15.4.1 Stabilität des Referenzgases

Die Stabilität des IRMS-Systems wird über die Präzision des $^{13}C/^{12}C$ -Verhältnisses bzw. des $\delta^{13}C$ -Wertes des CO_2 Referenzgases bestimmt. Dabei wird das Referenzgas 30 Sekunden lang 10 mal in Abständen von 20 Sekunden direkt in die IRMS-Einheit eingelassen. Bei diesen 10 CO_2 -Pulsen muss die Abweichung des $\delta^{13}C$ -Wertes nach Angaben des Herstellers kleiner als $\pm 0,07$ ‰ sein. Die Überprüfung der Stabilität wurde arbeitstäglich vorgenommen und lag in den genannten Grenzen.

15.4.2 Stabilität des kompletten GC/C/IRMS-Systems

Zur Stabilitätskontrolle des gesamten GC/C/IRMS-Systems wurde eine Kontrollstandardlösung (siehe Kapitel 18.4.3) mit vier verschiedenen synthetischen Steroiden verwendet. Es wurde die Wiederholbarkeit und die „inter-day“ Präzision bestimmt.

Für die Bestimmung der Wiederholbarkeit wurden an einem Tag 8 Injektionen der Standardlösung durchgeführt und die $^{13}C/^{12}C$ -Verhältnisse der Steroide gemessen.

Das Standardgemisch enthielt Androstanon (40 ng/ μ l), DHEA (35 ng/ μ l), Nortestosteron (35 ng/ μ l) und Methyltestosteron (35 ng/ μ l).

In der **Tabelle 15.4-1** sind die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte, die Signalhöhen und die Flächen der einzelnen Standardsubstanzen für die Wiederholbarkeit aufgelistet. Die Standardabweichungen der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte lagen bei allen Substanzen unter 0,16 ‰ und damit unter dem vom Hersteller angegebenen Wert für Kohlenstoff $\leq 0,2$ ‰.

	Androstanon	DHEA	Nortestosteron	Methyltestosteron
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	-31,84	-30,01	-29,49	-29,63
S (‰)	$\pm 0,06$	$\pm 0,15$	$\pm 0,16$	$\pm 0,16$
Varianz (%)	0,2	0,49	0,53	0,53
Signalhöhe (mV)	2854	1499	1313	1271
s (mV)	$\pm 76,13$	$\pm 43,81$	$\pm 24,33$	$\pm 43,43$
Varianz (%)	2,67	2,92	1,85	3,65
Fläche (Area)	8,46	4,94	4,61	4,74
s (Area)	$\pm 0,19$	$\pm 0,15$	$\pm 0,14$	$\pm 0,15$
Varianz (%)	2,24	3,12	3,12	3,23

Tabelle 15.4-1: statistische Kenndaten des Standardgemisches von 8 Injektionen, Androstanon: 40ng/ μl , DHEA, Nortestosteron und Methyltestosteron: 35 ng/ μl

Das GC/C/IRMS-Chromatogramm der Kontrollstandardlösung ist in der **Abbildung 15.4-1** dargestellt.

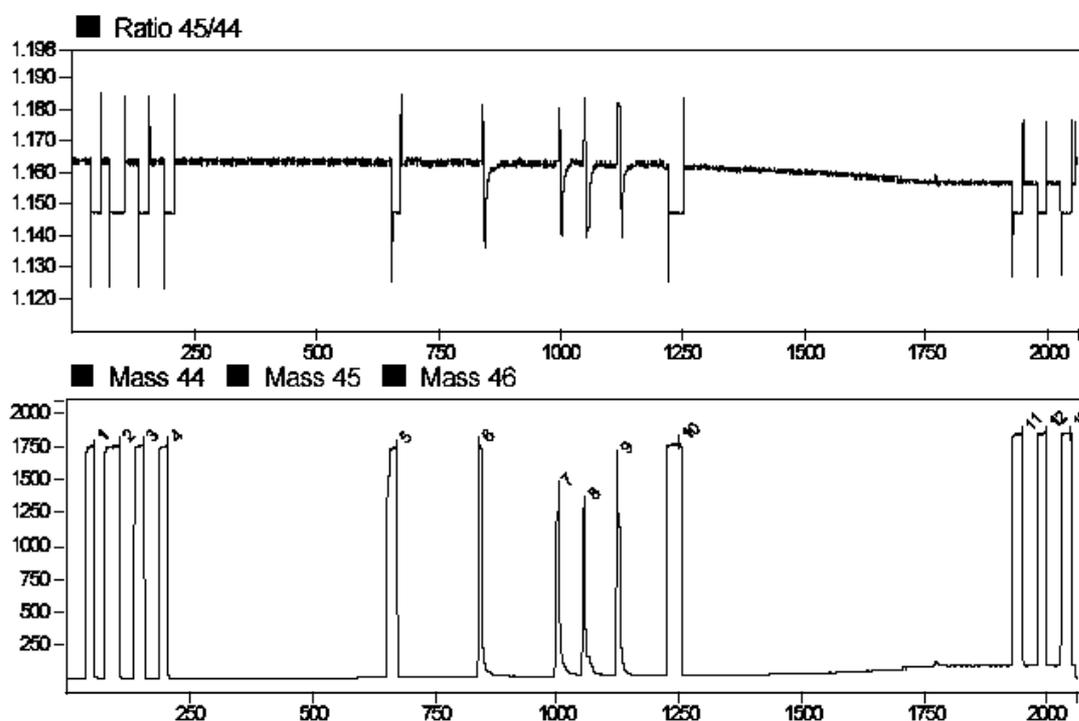


Abbildung 15.4-1: oben: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis als „swing“ dargestellt, unten: GC/C/IRMS Chromatogramm ($m/z = 44$) des Kontrollstandards: 1-5: CO₂-Referenzgas, 6: Androstan-3-on, 7: DHEA, 8: Nortestosteron, 9: Methyltestosteron, 10-12: CO₂-Referenzgas

Die täglichen Messungen für die Ermittlung der „inter day“ Präzision wurden in eine Shewhart-Regelkarte (**Abbildung 15.4-2**) eingetragen. Die Shewhart-Regelkarte dient zur Überwachung von Mittelwerten aus Mehrfachprüfergebnissen oder auch von Einzelergebnissen. Um die Shewhart-Regelkarte konstruieren zu können, werden die statistischen Kenndaten Mittelwert und Standardabweichung benötigt. Diese werden in der so genannten Vorperiode ermittelt. Der Mittelwert wird mit den jeweiligen 2s- und 3s-Werten auf der y-Achse eingezeichnet. Die 2s-Werte werden Warngrenze und die 3s-Werte Kontroll- oder auch Eingriffsgrenzen genannt.

Die Warngrenze ist eine Schranke, deren einmaliges Überschreiten noch toleriert wird. Die Kontroll- oder Eingriffsgrenze stellt eine Schranke dar, deren Überschreiten sofortige Korrekturmaßnahmen erfordert²⁶⁴.

In der vorliegenden Regelkarte wurden die Warn- und Eingriffsgrenzen jedoch nicht mit einer Vorperiode ermittelt. Die Grenzen wurden aus allen Ergebnissen errechnet, um die Stabilität bzw. die Änderungen über einen längeren Zeitraum überwachen zu können, da keine Erfahrungswerte für Messungen underivatisierter Steroide vorlagen.

Für den Mittelwert und die einfache Standardabweichung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte ergaben sich bei den synthetischen Reinsubstanzen Nortestosteron $-29,60 \text{ ‰} \pm 0,60$, bei Androstanon $-32,89 \text{ ‰} \pm 1,43$, bei DHEA $-29,99 \text{ ‰} \pm 0,83$ und bei Methyltestosteron $-29,34 \text{ ‰} \pm 0,54$. Über den gesamten Messzeitraum konnte eine Abweichung unter $0,2 \text{ ‰}$ nicht erreicht werden. Jedoch erkennt man mit fortschreitendem Projektverlauf eine Annäherung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes an den Mittelwert.

Die Standardsubstanzen, die unter Wiederholbedingungen in der 8-fach Bestimmung gemessen wurden, zeigten alle eine maximale Streuung von $\pm 0,16 \text{ ‰}$.

Während der Analyse der Standardlösungen im Wechsel mit Probenextrakten wurde speziell bei Androstanon die höchste Standardabweichung von $1,43 \text{ ‰}$ festgestellt. Eine Erklärung hierfür könnte die Bildung aktiver Stellen auf der GC-Säule durch die Chromatographie der Probenextrakte sein. Denn bei den unter Punkt 11.3-2 beschriebenen Versuche, bei denen längere Zeit nur die Standardlösungen injiziert und gemessen wurden, lag die Streuung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes für Androstanon bei $\pm 0,15 \text{ ‰}$. Eine durch die Probenextrakte induzierte Aktivierung der GC-Säule unterblieb

während dieses Versuches. In weiterführenden Untersuchungen ist dies zu verifizieren und die Aufreinigungsmethode gegebenenfalls daraufhin zu optimieren.

Man erkennt jedoch in der Regelkarte, dass die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der jeweiligen Komponenten sich über den Projektzeitraum dem Mittelwert annähern. Darin spiegelt sich die Erfahrung beim Umgang mit der Aufarbeitungsmethode wider.

Dieses Ergebnis verdeutlicht die grundsätzliche Problematik der GC/C/IRMS-Analytik. Je reiner der Probenextrakt ist, je mehr der Extrakt demnach einer Standardlösung gleicht, desto präziser sind die Messungen. Je polarer die Substanzen sind, desto drastischer wirkt sich dieses Phänomen aus.

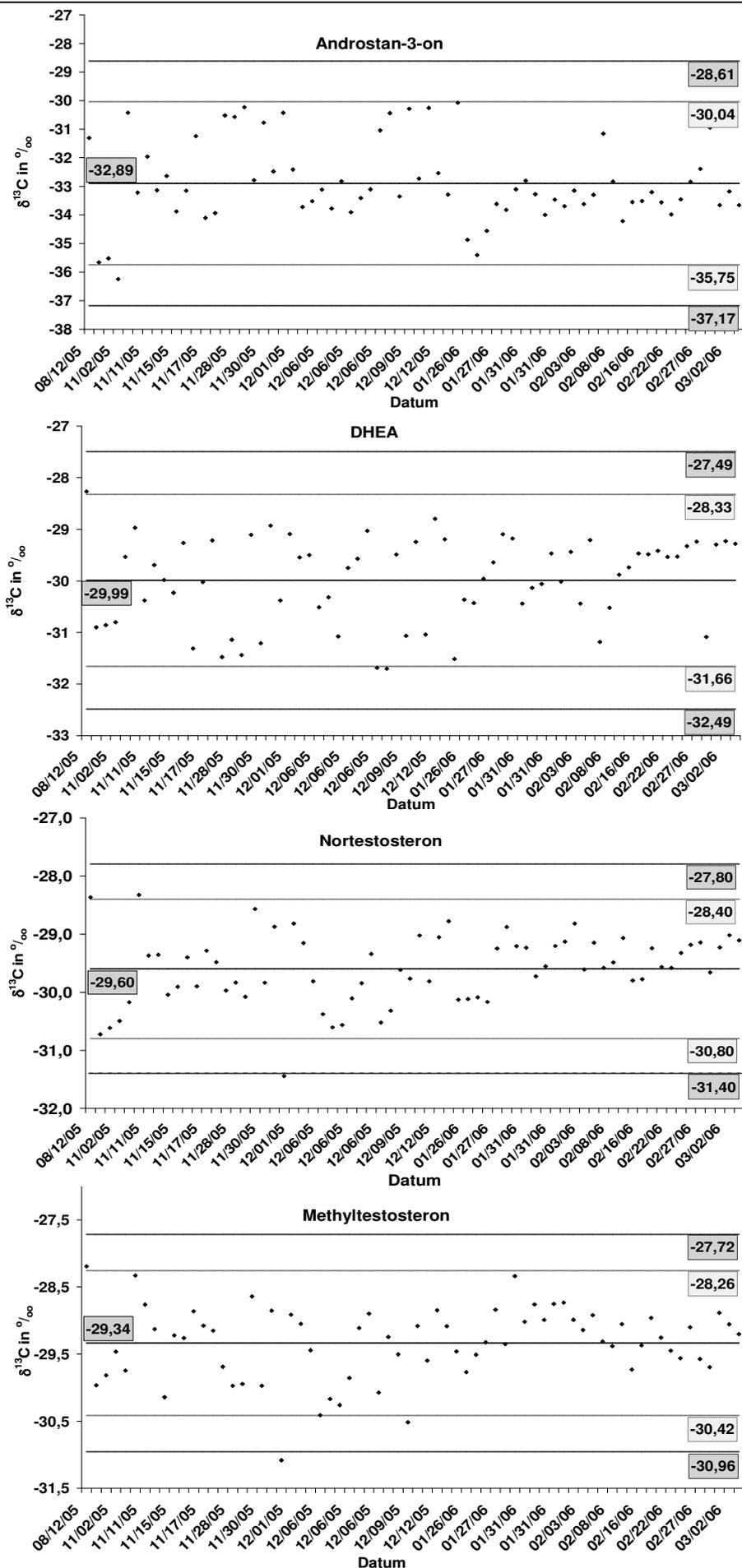


Abbildung 15.4-2: Regelkarten (Datum: Monat/Tag/Jahr), □: Warngrenzen, ■: Eingriffsgrenzen

16 Verwendete Software

Isodat NT 2.0 Version 2.38 (ThermoCorporation, Bremen-D)

Chromeleon (Dionex, Sunnyvale, USA)

Callidus (Euro Vector SpA, Milano, Italien)

MassLynx 4.0i (GVIstruments, Manchester, UK)

Windows XP

Office XP

ACD/ChemSketch Freeware 8.0 Version 8.17, 1994-2004© (www.acdlabs.com)

Valoo 2.0, 1995-2005[©] (analytik software, Leer; www.analytik-software.de)

17 Abschließende Diskussion mit Ausblick

Die im Projektzeitraum von verschiedenen internationalen Arbeitsgruppen unterschiedlicher Disziplinen erhobenen Daten spiegeln die Aktualität des Themas Nortestosteron als Doping- bzw. Masthilfsmittel wieder.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte im Rahmen des Projektzeitraumes eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von Nortestosteron und dessen Precursorsubstanz DHEA ohne Isotopenfraktionierung im Eberurin zu bestimmen. Es konnte auf eine Derivatisierung völlig verzichtet werden.

Bei jüngsten Ergebnissen^{210,248} zeigt sich die Tendenz, dass bei der GC/C/IRMS-Analytik weitgehend auf eine Derivatisierung verzichtet wird. Obwohl bei der am häufigsten durchgeführten Acetylierung in der GC/C/IRMS Analytik keine Isotopenfraktionierung gemessen wurde¹⁷⁹, wurde im Ergebnisbericht²⁶⁵ des Ringversuches des ISOSTER-Projekts die große Abweichung der Werte nach der Korrektur, die wegen der Acetylierung durchgeführt werden musste, als ein signifikantes Problem beschrieben.

Eine ausreichende Signalthöhe von 1000 mV am IRMS-Messgerät konnte erst nach Aufkonzentrieren der Injektionslösung erreicht werden. Inwieweit eine niedrigere Signalintensität mit ausreichender Präzision erreicht werden kann, ist für jede Substanz über einen längeren Zeitraum anhand von Regelkarten zu prüfen. Dies war im Rahmen der Arbeit jedoch nicht möglich.

Die Problematik, die geringe Flüchtigkeit der Steroide bei der gaschromatographischen Trennung zu eliminieren, besteht darin, statt der Gaschromatographie-Peripherie eine HPLC-Peripherie dem IRMS voranzuschalten. Die schwerflüchtigen Steroide müssen dann nicht mehr verdampft werden, um über die GC-Säule ins IRMS zu gelangen. Diese Technik der LC/C/IRMS ist erst seit 2006 kommerziell erhältlich und stand für das vorliegende Projekt nicht zur Verfügung.

Eine weitere Möglichkeit der Extraktaufreinigung neben der HPLC-Reinigung ist die der Immunitätssäulen. Diese wurden bei der Aufreinigung von Nortestosteron im Serum für die hochauflösende Massenspektrometrie¹⁷⁵ und bei der Quantifizierung von Nortestosteron im Eberurin²² angewendet. Die Aufreinigung mittels Immunitätssäulen konnte jedoch in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht getestet

werden. Sie weisen eine hohe Steroidspezifität auf, so dass sie nicht für das gesamte Steroidmuster einsetzbar sind. Für Nortestosteron werden Immunaффinitätssäulen mit wenig Kreuzreaktionen genannt¹⁷⁸, so dass eine vollständige Erfassung von Nortestosteron möglich ist.

Eine Möglichkeit, auch auf der gaschromatographischen Trennsäule eine Aufreinigung zu erzielen, ist über eine Säulenschaltung mit dem Glasdom²⁶⁶ gegeben. Dabei gelangt genau ein definierter Ausschnitt des Extraktes auf die eigentliche Trennsäule, die ins Verbrennungsrohr mündet. Die bereits in den 80iger Jahren beschriebene Technik wird auch in jüngsten Arbeiten bei der GC/C/IRMS-Technik von Horii et al.(2005)²⁶⁷ beschrieben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigten bezüglich der Artefaktbildung bei der enzymatischen Hydrolyse bisherige Untersuchungen^{225,233,234}. Der Schnecken-schleim der *Helix pomatia* weist neben der β -Glucuronidase zusätzliche Enzyme auf, die unerwünschte Artefakte bilden. Die Artefaktbildung ist dabei abhängig von der Enzymzubereitung des Hersteller und der Charge und muss bei einer Änderung der genannten Faktoren erneut überprüft werden. Für die Routineanalytik ist dieses Vorgehen jedoch sehr zeitaufwändig. Eine enzymatische Hydrolyse mit der β -Glucuronidase aus dem Bakterium *E.coli* ist deshalb vorzuziehen, weil dabei laut Hartmann et al.²³³ keine Artefakte entstehen.

Aufgrund der Komplexität des Steroidstoffwechsels beim Eber konnten die im Urin ausgeschiedenen Substanzen nur teilweise identifiziert werden, da keine Solvolyse durchgeführt wurde. Einige Metabolite liegen möglicherweise nur in sulfatierter Form vor.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird für weiterführende Untersuchungen vorgeschlagen, zuerst eine Abtrennung der frei vorliegenden Steroide im Urin durchzuführen. Dies kann mit einer Flüssig-/Flüssigextraktion erfolgen. Eine anschließende Hydrolyse mit β -Glucuronidase aus *E.coli* setzt nur den glucuronidierten Anteil frei. Der letzte Schritt ist die Solvolyse, die die sulfatierten Steroide freisetzt.

Da in der vorliegenden Arbeit keine Solvolyse durchgeführt wurde, kann keine Aussage über das Verhältnis von Nortestosteron-glucuronid und Nortestosteron-sulfat beim Eber gemacht werden. Dieses scheint nicht nur für die Quantifizierung der Sub-

stanz von Bedeutung zu sein, sondern auch für die illegale Applikation von Nortestosteron. Bei exogen appliziertem Nortestosteron ist der Sulfatanteil deutlich erhöht¹⁶⁵.

Für den sicheren Nachweis einer illegalen Anwendung von Nortestosteron beim Eber mit Hilfe der Isotopenverhältnismassenspektrometrie sind weitere Untersuchungen nötig. Zum einen müssen die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte aller synthetischen Darreichungsformen von Nortestosteron bekannt sein. Die Beschaffung des Steroids hat sich allerdings als schwierig herausgestellt. Gleichzeitig müssen sich die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von synthetischem und physiologischem Nortestosteron im Eber ausreichend unterscheiden. Dazu ist ein Applikationsversuch an Ebern im Rahmen eines genehmigten Tierversuches durchzuführen. Bei Verabreichung von synthetischem Nortestosteron ist dann zu untersuchen, wie groß die Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Nortestosteron und dessen Vorläufer ist.

Zum anderen müssen weitere Daten gesammelt werden, um eine Aussage über den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Nortestosteron in Ebern unbekannter Herkunft machen zu können. Es ist anhand von Tieren verschiedener Herkunft und verschiedener Fütterung zu prüfen, ob der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Nortestosteron und DHEA oder eines anderen Precursors wie beispielsweise Estron groß genug ist, eine illegale Anwendung nachzuweisen.

Experimenteller Teil

18 Methodenentwicklung

18.1 Chemikalien

Acetylchlorid (Merck, Darmstadt), Acetonitril *HPLC-grade* (Merck, Darmstadt); Butylmethylether (Roth, Karlsruhe); Citronensäure (Merck, Darmstadt); Cyclohexan (Destillationsanlage CVUA Freiburg); Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck, Darmstadt); Ethylenglycol (Roth, Karlsruhe); β -Glucuronidase (EC 3.2.1.31)/Aryl Sulfatase (EC 3.1.6.1) aus *Helix pomatia* (Charge: K34327914 523, Merck, Darmstadt); β -Glucuronidase aus *E.coli* (Merck, Darmstadt), Hexan (Merck, Darmstadt); Isopropanol (Sigma, Seelze); Methanol (Destillationsanlage CVUA Freiburg); NaCl (Roth, Karlsruhe); NaOH (Roth, Karlsruhe); deionisiertes Wasser aus der Anlage (Millipore, Schwalbach)

18.2 Standardsubstanzen

Nortestosteron (Sigma, Seelze, Lot.:188H648); DHEA (Sigma, Lot.:D4000); Androstan-3-on (Sigma, Seelze, Lot.:17H4073); Methyltestosteron (Roth Karlsruhe, Lot.:2344x); Nortestosteron-17 β -glucuronid (Steraloids, Rhode Island, Lot.: B0250); Nortestosteron-17 β -sulfat (Steraloids, Rhode Island, Lot.:L1810); DHEA-3 β -glucuronid (Steraloids, Rhode Island, Lot.: L167); DHEA-3 β -sulfat (Steraloids, Rhode Island, Lot.:H514); Nandrolon-17-propionat (Roth, Karlsruhe, Lot.:2190X), Nortestosteronhemisuccinat (Steraloids, Rhode Island, Lot.:C133), und Nortestosteron-decanoat (Sigma, Seelze)

18.3 Kleingeräte

Erlenmeyerkolben 10 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml, Konzentrationszentrifuge β -RVC (Christ, Osterode) Reagenzglasschüttelgerät (Vortex), Horizontalschüttelgerät (GFL 3015, Burgwedel), Autosampler-Vials (2ml, BGB, Art. Nr. 080400XLW) mit Microeinsatz (300 μ l, BGB, Art. Nr. 110502) und Schraubdeckel mit PTFE-Septum (BGB, Art. Nr. 090300), Magnetrührer, On Column Spritze 10 μ l (Hamilton 701 GROB, P/N: 200742), Pasteurpipetten, Zentrifugengläser 10 ml, 250 ml

18.4 Herstellen der Lösungen

18.4.1 Puffer

18.4.1.1 Acetatpuffer

16,4 g Natriumacetat wurden in einem 200 ml Becherglas mit deionisiertem Wasser gelöst und mit konzentrierter Essigsäure auf pH 4,8 mittels pH-Elektrode eingestellt.

18.4.1.2 Citrat-/Phosphatpuffer

21 g Citronensäure-Monohydrat (210,14 g/mol) und 18 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (177,99 g/mol) wurden in ein 1000 ml Becherglas eingewogen und mit ca. 37 NaOH Plätzchen der pH-Wert auf 6 eingestellt. Die Lösung wurde mit deionisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

18.4.2 Lösungsmittelgemische

18.4.2.1 Butylmethylether/Hexan

9 Volumenteile Butylmethylether wurden mit 1 Volumenteil Hexan gemischt.

18.4.2.2 Ethylenglykol/Acetonitril

1 Volumenteil Ethylenglykol wurde mit 2 Volumenteilen Acetonitril gemischt.

18.4.2.3 Butylmethylether/Hexan/Acetonitril

1 Volumenteil Acetonitril wurden mit 9 Volumenteilen Butylmethylether/Hexan gemischt.

18.4.2.4 Methanol/Natronlauge

400 ml Methanol wurden mit 600 ml 2 molarer wässriger Natronlauge gemischt.

18.4.2.5 Phosphat-/Citratpuffer/Methanol

7 Volumenteile Phosphat-/Citratpuffer wurden mit 3 Volumenteilen Methanol gemischt.

18.4.2.6 Isopropanol/Cyclohexan

10 Volumenteile Isopropanol wurden mit 90 Volumenteilen Cyclohexan gelöst.

18.4.2.7 *n-Hexan/Isopropanol*

96 Volumenteile Hexan wurden mit 4 Volumenteilen Isopropanol gemischt.

18.4.3 Standardlösungen

18.4.3.1 *Interner Standard*

100 mg Methyltestosteron wurden genau eingewogen und in einem 100 ml Messkolben mit Isopropanol/Cyclohexan gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Aus dieser Methyltestosteron Stammlösung (1000 ng/μl) wird eine 100 ng/μl verdünnte Lösung mit Isopropanol/Cyclohexan angesetzt. Zur Dotierung für die Aufarbeitung wurden 100 μl der Standardlösung eingesetzt.

18.4.3.2 *Externer Standard (ESTD)*

Für den ESTD wurde eine Stammlösung mit der Konzentration von 1111,1 ng/μl hergestellt. Dazu wurden jeweils 111,1 mg Nortestosteron, DHEA und Methyltestosteron genau in einen 100 ml Messkolben eingewogen, mit Isopropanol/Cyclohexan gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.

Als ESTD für die NP-HPLC wurde 1 ml aus der Stammlösung entnommen und in einen 100 ml Messkolben mit *n*-Hexan/Isopropanol bis zur 100 ml Markierung aufgefüllt. Zur Injektion wurden 900 μl verwendet.

Als ESTD für die RP-HPLC wurden 2 ml der Standardlösungen von DHEA und Methyltestosteron in einen 2 ml Messkolben gegeben und unter Stickstoff zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 1 ml Ethylenglykol gelöst und mit deionisiertem Wasser auf 2 ml aufgefüllt.

18.4.3.3 *Einspritzkontrolle*

100 mg Androstanon wurden genau in einen 100 ml Messkolben eingewogen, mit Isopropanol/Cyclohexan gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Aus der Androstanon Stammlösung (1000 ng/μl) wurde eine 10 ng/μl verdünnte Lösung angesetzt.

18.4.3.4 *Standardlösung*

Es wurden Stammlösungen von Nortestosteron (Sigma), DHEA und Methyltestosteron mit einer Konzentration von 1000 ng/μl hergestellt. In einen 100 ml Messkolben wurden genau 100 mg der jeweiligen Substanz eingewogen, mit Iso-

propanol/Cyclohexan gelöst und bis zur Marke aufgefüllt. Aus den Stammlösungen wurden eine 100 ng/μl und eine 10 ng/μl verdünnte Lösung angesetzt.

18.4.3.5 DHEA-glucuronid

50 mg DHEA-glucuronid (464,55 g/mol) wurden genau in einen 500 ml Messkolben eingewogen, mit Ethanol gelöst und mit Isopropanol/Cyclohexan auf 500 ml aufgefüllt. Die Lösung hatte eine Konzentration von 100 ng/μl.

18.4.3.6 Nortestosteron-glucuronid

100 mg Nortestosteron-glucuronid (450,52 g/mol) wurden genau in einen 100 ml Messkolben eingewogen, mit Ethanol gelöst und mit Isopropanol/Cyclohexan auf 100 ml aufgefüllt. Es wurden Lösungen von 100 ng/μl, 200 ng/μl, 400 ng/μl und 500 ng/μl hergestellt, indem je 10 μl, 20 μl, 40 μl und 50 μl aus der Stammlösung entnommen wurden und in je einem 100 ml Messkolben auf 100 ml aufgefüllt wurde.

18.4.3.7 Nortestosteron-sulfat

Es wurden genau 50 mg Nortestosteronsulfat (376,44 g/mol) in einen 500 ml Messkolben eingewogen und mit Methanol/Wasser im Verhältnis 1:1 gelöst und mit Isopropanol/Cyclohexan bis zur Markierung aufgefüllt. Die Lösung hatte eine Konzentration von 100 ng/μl.

18.4.3.8 DHEA-sulfat

50 mg DHEA-sulfat (390,50 g/mol) wurden genau in einen 500 ml Messkolben eingewogen, mit Ethanol gelöst und mit Isopropanol/Cyclohexan aufgefüllt. Die Lösung hatte eine Konzentration von 100 ng/μl.

18.4.4 Standardlösungen zur Artefaktbildung

Es wurden jeweils genau 50 mg von Testosteron, Androstendion, 5-Androsten-3β,17β-diol und 4-Estren-3β,17β-diol in je einen 100 ml Messkolben eingewogen und auf 100 ml aufgefüllt. Daraus wurden Verdünnungen 1:10 hergestellt.

18.4.5 Lösung für die Methanolyse

18.4.5.1 Herstellung der Substanzlösungen

Genau 50 mg von Nandrolon-17-propionat (330,46 g/mol), Nortestosteron-hemisuccinat (374,50 g/mol) und Nortestosteron-decanoat (428,70 g/mol) wurden ge-

trennt in 50 ml Messkolben eingewogen, in Methanol gelöst, zur Markierung aufgefüllt. Eine Verdünnung 1:10 wurde hergestellt.

18.4.5.2 Herstellung der methanolischen HCl

250 ml Methanol wurden unter dem Abzug in einem Eisbad mit 19,6 g Acetylchlorid tropfenweise unter ständigem Rühren versetzt.

18.5 GC-FID-Messungen

18.5.1 Quantifizierung

Die Quantifizierung aller Probenextrakte wurde mit dem Carlo Erba Mega 1 Gaschromatograph (Carlo Erba, Hofheim/Taunus) und dem FID-Detektor durchgeführt. Der FID-Detektor hatte eine Temperatur von 330 °C. Die Injektion wurde manuell mit dem On Column Block (Carlo Erba, Hofheim/Taunus) durchgeführt. Zur Datenaufnahme und Datenauswertung wurde die Software Chromeleon[®] 1998 Version 6.4 SP2 (Dionex, Sunnyvale, USA, ehemals Gynkotheke, München, Deutschland) verwendet. Der GC wurde manuell gestartet. Die gaschromatographische Trennung erfolgte über eine HP-5MS Fused-Silica-Kapillare (30 m Länge/0,25 mm ID/0,25 µm Filmbelegung; Serie No.:US3239056H). Als Vorsäule wurde eine methyldesaktivierte Fused-Silica-Kapillare (2,5m x 0,32 mm, BGB, Schweiz) verwendet.

Der Probenextrakt wurde bei 70 °C Injektionstemperatur manuell mittels kalter On Column Injektion auf die Vorsäule aufgebracht. Als Trägergas wurde Wasserstoff (Air Liquid, Kornwestheim) mit einem Druck von 0,7 bar verwendet. Die Anfangstemperatur wurde 1 Minute gehalten. Der GC wurde anschließend in der ersten Heizrate mit 25 °C/Minute bis 220 °C aufgeheizt und die Temperatur wurde bei 220 °C 1 Minute gehalten. Es folgte eine weitere Heizrate von 5 °C/Minute bis 320 °C. Nach 12 Minuten bei konstanter Temperatur von 320 °C wurde der GC auf die Anfangstemperatur abgekühlt.

18.5.2 Auswahl der GC-Säule

Bei den Versuchen zur Säulenauswahl wurde das Messsystem nur bezüglich der Säulen und Temperatur geändert. Folgende Säulen wurden abwechselnd in das oben beschriebene System eingebaut: PS 088 (2,5 % Diphenyl-, 97,5 % Dimethylsilicone Copolymer, selbst hergestellt nach²⁰⁸), 30 m Länge /0,32 mm ID/0,24 µm Filmbelegung); OV-1701 (30 m Länge/0,32 mm ID/0,27 µm Filmbelegung, von einem

Mitarbeiter (Manfred Grosse) des CVUA selbst hergestellt nach²⁰⁸); Optima[®] Delta 3 (25 m Länge/0,25 mm ID/0,20 µm Filmbelegung, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland); Optima[®] Delta 6 (30 m Länge/0,25 mm ID/0,25 µm Filmbelegung, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland).

18.6 GC/C/IRMS-Messungen

18.6.1 CO₂-Kalibrierung

Die zur CO₂-Kalibrierung verwendeten Standards wurden mit dem EA/IRMS-System (Element Analysator/Stabilisotopen-Massenspektrometer) gemessen (siehe Punkt 20.2).

Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der IAEA-Standards und der Hausstandards sind der **Tabelle 18.6-1** zu entnehmen. Der Hausstandard (siehe Kapitel 8.2) dient als Sekundärstandard und wurde gegen die IAEA-Standards vermessen.

IAEA-Standard	Hausstandard	$\delta^{13}\text{C}$ in ‰ (EA/IRMS)	±StAbw (%)	Anzahl
IAEA-CH-6	-	-10,4	0,09	5
IAEA-CH-7	-	-31,8	0,21	5
-	Theobromin	-51,93	0,12	5
-	Zucker Zu 1	-26,18	0,10	5
-	Glucose	-9,94	0,15	5
-	Coffein	-41,27	0,10	5
-	Maltose	-12,97	0,11	5
-	Saccharose	-25,62	0,08	5

Tabelle 18.6-1: Verwendete Hausstandards zur CO₂-Kalibrierung, vermessen gegen IAEA-Standards:IAEA-CH-6: Saccharose, IAEA-CH-7: Polyethylen (n: Anzahl der Messungen)

18.6.2 Messung

Zur Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes wurde das Delta^{PLUS} XP Isotopen-Massenspektrometer (ThermoElectron Corporation, Bremen, Deutschland) verwendet. Über das 940°C heiße Combustion Interface III (ThermoElectron, Bremen, Deutschland) war das Massenspektrometer mit dem Gaschromatographen Trace GC 2000 (Thermo Finnigan, Milano, Italien) verbunden. Das Trägergas Helium 5.0 (Air Liquid, Kornwestheim) wurde über einen carrier gas purifier (Supelco, Bellefonte PA, USA) zusätzlich aufgereinigt. Mit einem konstanten Fluss von 1,2 ml/Minute wird der manuell über den On Column Injektor injizierte Probenextrakt über die GC-Säule gebracht. Entsprechend den GC-FID-Analysen wurde eine HP-5MS Fused-Silica-Kapillare (30 m Länge/0,25 mm ID/0,25 µm Filmbelegung) mit der methylde-

aktivierten Fused-Silica-Kapillare (2,5m x 0,32 mm, BGB, Schweiz) als Vorsäule verwendet.

Das Temperaturprogramm entsprach dem der GC-FID-Analysen. Das Backflushventil wurde nach 500 Sekunden (8,3 Minuten) geschlossen und nach 1500 Sekunden (25 Minuten) wieder geöffnet. Während dieser Zeitspanne gelangte die Probe über das Combustion Interface ins IRMS-Gerät. Das Referenzgas CO₂ (Air Liquid, Kornwestheim) wurde zu Beginn der Injektion und am Ende bei 1900 Sekunden (31,6 Minuten) im Abstand von 30 Sekunden mit je vier Gaspulsen für 20 Sekunden ins Massenspektrometer gegeben. Ein zusätzlicher Referenzgasstrom wurde kurz vor dem Androstanonpeak bei 650 Sekunden (10,8 Minuten) ins Massenspektrometer eingelassen.

Gerätesteuerung, Datenaufnahme und Auswertung wurde mit der Software Isodat NT 2.0 (SP2, update 2.38) vorgenommen.

Die Reoxidation des Verbrennungsrohres wurde einmal in der Woche durchgeführt, indem Sauerstoff (Air Liquid, Kornwestheim) mit einem Fluss von 0,5 ml/Minute im backflush Modus 10 Stunden über das Verbrennungsrohr gegeben wurde. Anschließend wurde 5 Stunden mit Helium gespült.

18.7 GC-MS-Messungen

Zur Reinheitsbestimmung der Substanzen Nortestosteron und DHEA diente der GC 8060 mit On Column Injektor (Fisons Instruments, Mainz-Kastel, Deutschland) und das Massenspektrometer MD 800 (Fisons Instruments, Mainz-Kastel, Deutschland). Temperaturprogramm und Säule entsprachen dem GC/FID und GC/C/IRMS-Messsystem. Der Vordruck des Trägergases Helium 5.0 (Air Liquid, Kornwestheim) war 75 kPa. Die Molekülionen wurden mit der Elektronenionisation bei einer Ionisierungsenergie von 70eV erzeugt. Zur Datenaufnahme und Datenauswertung wurde XCalibur Data System Version 1.2 (ThermoFinnigan, Austin TX, US) verwendet.

18.8 Probenaufarbeitung

18.8.1 Clean-up mit Hydrolyse

Der portionierte (15 g) gefrorene Urin taute über Nacht im Kühlschrank auf. Als Interner Standard wurden 100 µl Methyltestosteron (100 ng/µl) dazu pipettiert. In jeder Serie wurde ein Kastratenurin mit 100 µl der Standardlösung (100 ng/µl DHEA,

100 ng/µl Nortestosteron, 100 ng/µl Methyltestosteron) versetzt und parallel mit den anderen Urinen aufgearbeitet. Es wurden 9 ml Acetatpuffer (pH: 4,8) und 150 µl Enzymlösung von *Helix pomatia* dazupipettiert und 90 Minuten bei 45°C im Wärmeschrank inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Extrakte in ein 250 ml Zentrifugenglas mit Schraubverschluss für die Konzentrationszentrifuge (β -RVC) überführt. Nach diesem Schritt wurden ausschließlich Glasgefäße verwendet, da durch den Lösungsmittelkontakt Bestandteile des Kunststoffes herausgelöst werden. Das Polypropylen-Zentrifugenröhrchen wurde mit jeweils 3 mal 10 ml Phosphat-/Citratpuffer (pH 6,0; 0,1 mol/l) gespült. Diese Spüllösung wurde in das Zentrifugenglas überführt. Auf der Schüttelmaschine wurde der überführte Extrakt 5 Minuten geschüttelt.

18.8.2 Flüssig-/Flüssigextraktion

Zur besseren Homogenisierung der Steroide wurden 45 ml Acetonitril zugegeben und 5 Minuten auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Der Vorgang wurde wiederholt und die festen Bestandteile ließ man absetzen.

Um die Steroide aus der wässrigen Phase in die organische Phase zu überführen, wurden zum Aussalzen 4,5 g NaCl in einen 250 ml Scheidetrichter vorgelegt. Der Rohextrakt wurde in den mit NaCl vorbereiteten Scheidetrichter mit Hilfe eines Trichters dekantiert, kurz und kräftig geschüttelt, bis sich das Salz gelöst hatte. Es wurden die Zentrifugengläser und der Trichter mit 10 ml Butylmethylether/Hexan (90+10/v+v) gespült und die Lösung in den Scheidetrichter überführt. Dies wurde 5 mal wiederholt. Die Lösung im Scheidetrichter wurde anschließend 1 Minute gut geschüttelt. Die untere wässrige Phase ließ man ablaufen. Sie wurde verworfen. Der fast entleerte Scheidetrichter wurde nochmals umgeschwenkt und das sich unten sammelnde restliche Wasser ließ man ebenfalls ablaufen. Die organische Phase wurde über die obere Öffnung des Scheidetrichters in ein neues Zentrifugenglas überführt. 2 ml Ethylenglykol/Acetonitril (1+2/v+v) wurden dazugegeben, um ein Einengen bis zur Trockene an der Konzentrationszentrifuge (β -RVC) zu verhindern.

In der Konzentrationszentrifuge wurden die Extrakte 4,5 Stunden bei 40 °C soweit eingengt, bis ein Rest von ca. 1 g an Ethylenglykol erreicht wurde, während das Acetonitril bereits vollständig abgedampft war.

Der Rückstand wurde mit 10 ml Methanol aufgenommen und in einen 250 ml Scheidetrichter überführt. Es wurde darauf geachtet, dass sich die Rückstände von der Gefäßwand lösen. Die Zentrifugengläser wurden mit 10 ml Citrat/Phosphatpuffer pH 6,0; 0,1 mol/l) gespült und in den Scheidetrichter überführt. Der Spülvorgang wurde wiederholt. Zusätzlich wurden die Zentrifugengläser mit 10 ml Butylmethyl-ether/Hexan (90+10/v+v) gespült und in den Scheidetrichter überführt. Dies wurde 5 mal durchgeführt. Nach 1 Minute Schütteln wurde die untere Phase verworfen.

Zur Abtrennung der Estrogene wurde 40 ml Methanol/NaOH (2 mol/l) (40+60/v+v) dazugegeben und 1 Minute geschüttelt. Die untere Phase der Estrogene wurde abgetrennt. In den Scheidetrichter wurden 5 ml Citrat/Phosphatpuffer (pH 6,0; 0,1 mol/l)/Methanol (70+30/v+v) dazugegeben und 1 Minute geschüttelt. Anschließend wurde die untere Phase verworfen.

Für den letzten Reinigungsschritt in der Flüssig-/Flüssigextraktion wurde die im Scheidetrichter befindliche Androgen-/Gestagenfraktion mit 30 ml Butylmethyl-ether/Hexan (90+10/v+v) versetzt. Weitere 20 ml Citrat-/Phosphatpuffer (pH 6,0; 0,1 mol/l)/Methanol (70+30/v+v) wurden hinzugefügt und 1 Minute geschüttelt. Die untere Phase wurde verworfen. Es wurde darauf geachtet, dass kein Wasser in der Lösungsmittelphase mehr ist, da das Wasser sonst schwer zu entfernen ist. Die obere organische Phase wurde in ein neues Zentrifugenglas überführt und bei 40 °C in der Konzentrierungszentrifuge zur Trockene ca. 2,5 Stunden eingengt.

Danach wurden mit einer Pasteurpipette 2 ml Methanol über die Innenwand des Zentrifugenglases pipettiert. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt. Anschließend wurde die Lösung unter Stickstoff 5.0 (Air Liquid, Kornwestheim) bei 40 °C - 45 °C zur Trockene eingengt. Der erhaltene Niederschlag wurde mit 900 µl Hexan/Propanol (96+4/v+v) aufgenommen und in die Autosamplergläschen mit Mikro-Vialeinsatz für die HPLC-Aufreinigung überführt.

18.8.3 NP-HPLC-Fraktionierung

Zur weiteren Aufreinigung des Extraktes wurde eine HPLC-Anlage Agilent 1050 (Hewlett Packard, Heilbronn) mit einem Fraktionssammler Foxy 200 (ISCO, Semrau GmbH, Sprockhövel, Deutschland) und einem Dioden Array Detektor verwendet. Von dem Extrakt wurden 600 µl über ein Probenschleifensystem auf das System gegeben. Der Extrakt wurde mit einem Fluss des Elutionsgemisches mit 1 ml/Minute

über eine endcapped (EC) Diaminopropyl-Säule mit einer Länge von 250 mm und einem Innendurchmesser von 4 mm bei einer Porengröße von 100 Å und einer Partikelgröße von 5 µm (Nucleosil® 100-5 Säule, EC 250-4, N(CH₃)₂; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gegeben. Dem Trennsystem vorangeschaltet war eine ChromCart (CC) Diaminopropyl-Vorsäule (CC 8/4 Nucleosil® 100-5 N(CH₃)₂; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Das Elutionsgemisch bestand aus n-Hexan und Isopropanol zu unterschiedlichen Anteilen. Folgendes Gradientenprogramm (**Tabelle 18.8-1**) wurde angewendet:

Zeit (Minuten)	0	15	19	28	30	34,5
n-Hexan (%)	96	96	20	20	96	96
Isopropanol (%)	4	4	80	80	4	4

Tabelle 18.8-1: Gradientenprogramm der NP-HPLC

Vor jeder Serie wurden 600 µl der externen Standardlösung (11,1 ng/µl) vier mal über die Säule gegeben. Nach diesen vier Zyklen hatten sich die Retentionszeiten und damit das Zeitfenster stabilisiert. Nach jedem dritten Probenextrakt wurde anstelle eines Probenextraktes ein externer Standard über die Säule gegeben.

Die ermittelten Retentionszeiten und die Zeitfenster sind der Tabelle **18.8-2** zu entnehmen. Diese mussten für jede Sequenz überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden.

	Vorfraktion	Fraktion 1	Zwischenfraktion	Fraktion 2	Nachfraktion
RT (Minuten)	-	10,0	-	13,9	-
Zeitfenster (Minuten)	7,5-8,0	8,0-12,0	12,0-12,2	12,2-16,0	16,0-16,5

Tabelle 18.8-2: Retentionszeiten und Zeitfenster für Fraktionen der NP-HPLC; Fraktion 1: DHEA und Methyltestosteron; Fraktion 2: Nortestosteron

Die gesammelte Extraktfraktion, in der Nortestosteron war, wurde unter Stickstoff bei 40 °C zur Trockene eingengt und in 200 µl Androstanonlösung (10 ng/µl Cyclohexan) aufgenommen. Stichprobenartig wurde mit den Vor-, Zwischen- und Nachfraktionen ebenso verfahren. Der messfertige Extrakt wurde in ein GC-vial überführt und mit einem Schraubdeckel verschlossen.

Die gesammelte Extraktfraktion, in der DHEA und Methyltestosteron waren, musste zur weiteren Aufreinigung auf der RP-HPLC zuerst in das dafür geeignete polare Lösungsmittel ausgeschüttelt werden. Dazu wurde direkt in den gesammelten

fraktionierten Extrakt 300 µl Acetonitril/Ethylenglykol (2:1) gegeben und bei 45°C unter Stickstoff so weit eingeeengt, bis ca. 100 µl oder 110 mg Ethylenglykol übrig blieben. Dieser Rückstand wurde mit ca. 100 µl H₂O auf 210 mg eingewogen und in ein braunes GC-Vial mit Microeinsatz pipettiert. Aus diesem GC-Vial konnte direkt die RP-HPLC durchgeführt werden.

18.8.4 RP-HPLC-Fraktionierung

Der Extrakt wurde über eine Hypersil® Gold Säule (250 x 3 mm; 5 µm) (Thermo Electron, Dreieich, Deutschland) in einer anderen HPLC-Anlage (Agilent, Waldbronn, Deutschland) mit einem Fluss von 0,5 ml/Minute gegeben. Der Hauptsäule war eine C18 Vorsäule (4,0 mm x 2,0 mm ID; AJO-4286 Phenomenex Ltd. Ltd., Aschaffenburg, Deutschland) vorangeschaltet. Mit folgendem Gradientenprogramm des Eluentengemisches (**Tabelle 18.8-3**), bestehend aus Acetatpuffer und Acetonitril, wurden 100 µl des Extraktes aufgereinigt.

Zeit (Minuten)	0,5	1,5	3	5	8,5	9,5	10	12	14,5	16	17,5	45	50	60
Puffer (%)	0	5	15	20	25	30	35	50	60	80	90	90	0	0
Acetonitril (%)	100	95	85	80	75	70	65	50	40	20	10	10	100	100

Tabelle 18.8-3: Gradientenprogramm der RP-HPLC

Zur Einstellung und Überprüfung der Retentionszeiten und der Zeitfenster wurde der ESTD wie bei der NP-HPLC beschrieben, verwendet. Der ESTD wurde jedoch im Eluentengemisch gelöst. In der **Tabelle 18.8-4** sind die Retentionszeiten und Zeitfenster dargestellt.

	Vorfraction	Fraktion 1	Nachfraktion
RT (Minuten)	-	22,0	-
Zeitfenster (Minuten)	20,0-21,5	21,5-22,5	22,5-23,5

Tabelle 18.8-4: Retentionszeiten und Zeitfenster für Fraktionen der RP-HPLC; Fraktion 1: DHEA und Methyltestosteron

Nach der Fraktionssammlung wurde der Extrakt in ein mit 200 mg NaCl befülltes Reagenzglas überführt. Das Samplergläschen wurde 5 mal mit 10 ml Acetonitril nachgespült. Es wurden 500 µl Acetatpuffer und 500 ml Acetonitril ins Reagenzglas dazugeben und 2 Minuten gut am Vibromixer geschüttelt. Die obere organische Phase wurde in ein anderes Reagenzglas überführt, die untere Phase erneut mit 1 ml Acetonitril versetzt und intensiv geschüttelt. Die obere Phase wurde wieder

abgenommen und mit der bereits abgenommen Phase vereinigt. Die vereinigten Phasen wurden unter Stickstoff abgeblasen und in 200 µl Androstanonlösung (10 ng/µl Cyclohexan) aufgenommen.

18.8.5 Säulenkapazität

Ein Standard von 100 ng/µl Nortestosteron (entspricht 6000 µg/kg Urin) und 300 ng/µl DHEA (entspricht 18000 µg/kg Urin) wurde auf beiden Anlagen fraktioniert und über GC/FID bestimmt. Vor- und Nachfraktionen waren frei von DHEA und Nortestosteron.

18.8.6 Vorbereiten der gereinigten Extrakte für GC/C/IRMS

Nach der Quantifizierung der Extrakte aus der NP-HPLC (Nortestosteron) und der RP-HPLC (DHEA) wurden diese erneut unter Stickstoff abgeblasen und je nach ermittelter Konzentration von Nortestosteron bzw. DHEA (GC/FID) mit 10-30 µl Cyclohexan aufgenommen.

18.9 Enzymatische Hydrolyse

18.9.1 Hydrolyse mit β-Glucuronidase aus *Helix pomatia*

Es wurden 100 µl von Nortestosteron-glucuronid, Nortestosteron-sulfat, DHEA-glucuronid und DHEA-sulfat (100 ng/µl) in 15 g Kastratenurin gegeben und wie die Eberurine aufgearbeitet. Quantifiziert wurde jeweils die freie Form von Nortestosteron und DHEA mit der GC/FID-Analytik.

Jeweils 100 µl der Lösungen von Nortestosteron- und DHEA-glucuronid wurden anschließend in 9 ml Acetatpuffer gegeben und 90 Minuten bei 45°C im Wärmeschrank inkubiert. Dieser Ansatz wurde auch bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden durchgeführt.

Um die Hydrolyseleistung der Enzymmischung *Helix pomatia* im Eberurin zu testen, wurde zuerst ein Mischurin verschiedener Eberurine hergestellt. Eine Aufstockung wurde durchgeführt, indem dem Mischurin zuerst 200 µl von den Lösungen an Nortestosteron- bzw. DHEA-glucuronid mit jeweils einer Konzentration von 100 ng/µl zugegeben wurde. Dieser Versuch wurde mit 500 µl Steroid-Lösung wiederholt. Neben der Aufarbeitung eines undotierten Eberurins wurde zusätzlich die Enzym-

menge verändert, indem statt 150 µl die doppelte Menge an Enzymzubereitung eingesetzt wurde.

18.9.2 Artefaktbildung durch *Helix pomatia*

Zuerst wurden auf der NP-HPLC die Retentionszeiten und die Zeitfenster von Testosteron, Androstendion, 5-Androsten-3 β ,17 β -diol und 4-Estren-3 β ,17 β -diol ermittelt. Zum Kastratenurin wurden 100 µl der jeweiligen Lösungen (100 ng/ml) gegeben. Die Hydrolyse wurde mit *Helix pomatia* durchgeführt und wie die Eberurine aufgearbeitet. Die Zeitfenster wurden entsprechend der Retentionszeiten der oben genannten Substanzen eingestellt.

18.9.3 Hydrolyse mit β -Glucuronidase von *E.coli*

Bei dem Versuch der enzymatischen Spaltung mit dem Enzym von *E.coli* musste statt Acetatpuffer Phosphatpuffer als Reaktionsmedium verwendet werden.

Zum Phosphatpuffer wurde in verschiedenen Ansätzen je 100 µl Nortestosteron-glucuronid (100 ng/µl) und 100 µl DHEA-glucuronid (100 ng/µl) gegeben und mit 100 µl Enzymlösung der β -Glucuronidase aus *E.coli* jeweils 5 Stunden und 24 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter Punkt 18.7-3 beschrieben.

Für den Vergleich zweier Urine wurden zum Eberurin 6 ml Phosphatpuffer (pH 6,0) und 100 µl Enzymlösung der β -Glucuronidase aus *E.coli* gegeben und 5 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

18.9.4 Bestimmung von freiem Nortestosteron

Zur Bestimmung des frei vorliegenden Nortestosteron wurden drei Eberurine entsprechend der Methode ohne Zugabe des Enzyms aufgearbeitet.

18.10 Methanolyse

Von den Substanzlösungen wurden je 80 µl in Reaktionsgefäße gegeben und mit 0,5 ml methanolischer HCl versetzt. Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen und das Reaktionsgemisch wurde gut homogenisiert. Im Inkubationsschrank inkubierte es bei 65°C 10 Minuten lang.

Nach der Inkubation wurden die Proben mit Stickstoff bei 60 °C bis zur Trockene eingengt. Die Rückstände wurden mit 200 µl Androstanonlösung (10 ng/µl Cyclohexan) aufgenommen. Die Bestimmung der freien Steroide erfolgte über GC/FID.

Die Versuche wurden für die Substanzen Nortestosteron-glucuronid und DHEA-glucuronid bzw. Nortestosteron-sulfat und DHEA-sulfat mit 2 ml methanolischer HCl und 20 Minuten Reaktionszeit wiederholt.

18.11 Bestimmung von Nortestosteron im Fleisch mittels ELISA

Die Bestimmung des Nortestosterongehaltes in der Matrix Fleisch wurde entsprechend den Prüfvorschriften²⁵⁵ im Labor für Nationalen Rückstandskontrollplan am CVUA durchgeführt. Als Testkit wurde der „Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Nortestosteron (R-Biopharm, Darmstadt)“ verwendet.

19 Identifizierung der Steroide

19.1 Chemikalien

Androstendion (Sigma, Lot.: 072K1134); 5-Androsten-3β,17β-diol (Steraloids, Lot.: H534); 5α-Androst-16-en-3β-ol (Steraloids); 5β-Androstan-3α-ol-17-on/Etiocholanolon (Sigma, Lot.: 40K4052); Epiandrosteron (Sigma, Lot.: 063K1261), 5α-Estran-3α-17-on/Norandrosteron (Steraloids, Lot.: L529); 5α-Estran-3β-17-on/Norepiandrosteron (Steraloids, Lot.: L503); 5β-Estran-3α-ol-17-on/Noretiocholanolon (Steraloids, Lot.: L243); 5α-Estran-17β-ol-3-on/5α-Dihydrontestosteron (Steraloids, Lot.: G528); 5α-Estran-3α,17β-diol/5α-Norandrostendiol (Steraloids, Lot.: L253); 5β-Estran-17β-ol-3-on/5β-Nordihydrotestosteron (Steraloids, Lot.: L295); 5β-Estrandion/5β-Norandrostendion (Steraloids); 5β-Estran-3α,17β-diol/5β-Norandrostendiol (Steraloids, Lot.: L460); 4-Estren-3α,17β-diol (Steraloids, Lot.: H783); 4-Estren-3β,17α-diol (Steraloids, Lot.: H869); 4-Estren-3α,17α-diol (Steraloids); 4-Estren-3β,17β-diol/Bolandioli (Steraloids, Lot.: B0115); Estr-5(10)-en-3α,17β-diol (Steraloids, Lot.: C293); Norandrostendion (Steraloids, Lot.: H409); 11-Ketoetiocholanolon (Steraloids, Lot.: L1762); Testosteron (Sigma, Lot.: 61K1659)

19.2 Bestimmung der Steroide im Eberurin

Es wurde von den Substanzen je eine 1000 ng/ml Stammlösung hergestellt. Abhängig von der gelieferten Menge der Reinsubstanzen wurden entweder 10 mg oder

50 mg genau eingewogen, entsprechend in ein 10 ml oder ein 50 ml Messkolben eingewogen und in Ethanol gelöst.

Zur Identifikation wurden die Komponenten als Reinsubstanzen auf der NP-HPLC-Analyse in vier verschiedenen zeitlichen Fraktionen gesammelt. Diese Schnittzeiten wurden für den mit den Substanzen dotierten Kastrat und einem undotierten Eberurin verwendet. Die einzelnen Fraktionen wurden zuerst mit der GC/FID-Analytik untersucht. Die Substanzen, die mittels GC/FID-Technik über die Retentionszeit identifiziert wurden, wurden anschließend mittels GC/MS-Messung bestätigt. Für die Fraktionierung auf der HPLC-Anlage wurden 900 µl entweder einer Konzentration von 10 ng/µl oder 100 ng/µl aufgegeben. Die verwendete Konzentration war abhängig von der Stärke des HPLC-Signals.

Für die GC/MS-Analysen wurden Lösungen einer Konzentration von 10 ng/µl verwendet.

Die einzelnen Substanzen der Fraktionen sind in der **Tabelle 19.2-1** aufgelistet.

Fraktionsfenster	Eluierende Substanzen
F1: 5:01-8:01	5β-Estrandion
F2: 8:01-12:01	Norandrosteron, Norandrostendion, Noretiocholanolon, 5α-Estran-17β-ol-3-on, 5β-Estran-17β-ol-3-on, Epiandrosteron, Androstendion, DHEA
F3: 12:01-17:01	5-Androsten-3β-17β-diol, 5α-Estran-3α,17β-diol, Testosteron, Etiocholanolon, Nortestosteron
F4: 17:01-25:01	11-Ketoetiocholanolon, 5β-Estran-3α,17β-diol

Tabelle 19.2-1: Liste der Substanzen, die über die NP-HPLC-Anlage fraktioniert und am GC/MS-Gerät vermessen wurden

20 Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Futters und der Standardsubstanzen

20.1 Chemikalien und Kleingeräte

Nortestosteron (Sequoia Research Products Limited, Pangbourne, UK), Nortestosteron (Sinuchem Hebei, Shanghai, China), Nortestosteron (Riedel-de-Häen), Nortestosteron (Fluka, Seelze, Germany)

Mikrospatel (Hekatech, Wegberg), Pinzette (Hekatech, Wegberg), Probenmagazin (Hekatech, Wegberg), Verschlussvorrichtung (Hekatech, Wegberg), Waage Sartoris M2P (Sartorius, Göttingen), Zinnkartuschen (3,3 x 5 mm, Hekatech, Wegberg)

20.2 EA/IRMS-Messungen

Die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von reinen Festsubstanzen wurden mit dem Stabilisotopen-Massenspektrometer IsoPrime (GCInstruments, Manchester, UK) und dem vorangeschalteten Element Analysator EuroEA3000 (Euro Vector SpA, Milano, Italien) bestimmt. Dazu wurden 1-2 mg der festen Reinsubstanz in Zinnkartuschen eingewogen, mit der Verschlusszange verschlossen und in das Probenmagazin gegeben. Der Element Analysator, der die Probe in die Verbrennungseinheit abgibt, wurde mit der Software Callidus (Euro Vector, SpA, Milano, Italien) gesteuert. Die Probe in der Kartusche wurde unter Zuführung von Sauerstoff (Air Liquid, Kornwestheim) zu CO_2 und H_2O verbrannt. Zur Errechnung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes des Kohlenstoffs der Probe wurde die Software MassLynx 4.0 verwendet. Es wurde dasselbe CO_2 -Referenzgas wie bei den Messungen am GC/C/IRMS verwendet.

Die Futterpellets wurden vor der Einwaage in die Zinnkartuschen im dem Mörser zerkleinert und homogenisiert.

21 Bestimmung anderer Parameter

21.1 Chemikalien und Kleingeräte

Multiprocessor pH-Meter (pH-535 Multical, WTW, Weilheim) mit Blue Line Elektrode (Schott, Mainz), Kalibrierlösungen pH 4 und pH 7 (Roth, Karlsruhe)

21.2 pH-Wert

Vor der Messung wurde die Elektrode mit den beiden Kalibrierlösungen pH 4 und pH 7 kalibriert. Anschließend wurden die Urine unter Rühren bis zur Stabilität der pH-Anzeige vermessen.

21.3 Wasserlöslichkeit

Das für die drei pH Stufen verwendete deionisierte Wasser wurde zuerst mit HCl und NaOH auf pH 4, pH 7 und pH 10 eingestellt.

In verschließbare Gefäße wurden jeweils ca. 200 mg Nortestosteron und ca. 100 g des mit unterschiedlichem pH-Wert eingestellten Wassers genau eingewogen. Die Lösungen wurden 10 Minuten geschüttelt und in einen zuvor ausgewogenen Glastiegel überführt und unter Vakuum abfiltriert. Anschließend wurde der Tiegel bei 100 °C getrocknet und bis zur Massenkonstanz gewogen. In der **Tabelle 21.3-1** sind die eingewogenen und ausgewogenen Mengen bei den verschiedenen pH-Werten aufgelistet.

	pH 4		pH 7		pH 10	
Einwaage Nortestosteron in g	0,212	0,216	0,212	0,212	0,205	0,209
Einwaage H ₂ O in g	100,007	100,026	100,034	100,002	100,381	100,139
Auswaage Nortestosteron in g	0,186	0,190	0,184	0,179	0,181	0,183
Differenz in g	0,026	0,026	0,028	0,033	0,024	0,026
Löslichkeit in mg/l H ₂ O	259,9	259,9	279,9	329,9	239,1	259,6

Tabelle 21.3-1: Daten zur Bestimmung der Wasserlöslichkeit

Die Wasserlöslichkeit von Nortestosteron wurde unter Berücksichtigung der Menge an zugegebenem Wasser und der Dichte nach folgender Gleichung errechnet:

$$\text{Löslichkeit} \left[\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right] = \frac{NT_{\text{gelöst}} [\text{mg}]}{\frac{\text{Einwaage}_{\text{Wasser}} [\text{mg}]}{\text{Dichte}_{\text{Wasser}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right]}} \times 1000,$$

mit $NT_{\text{gelöst}} [\text{mg}] = \text{Einwaage} [\text{mg}] - \text{Auswaage} [\text{mg}] \times 1000$

Abbildung 21.3-1: Formel zur Berechnung der Wasserlöslichkeit von Nortestosteron

22 Kreatinin

22.1 Chemikalien und Kleingeräte

Acetonitril (Merck, Darmstadt), Cytosin (Nr. 30430, Fluka, Seelze), di-Kaliumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt), Kreatinin (Nr. 27910, Fluka, Seelze), Methanol, Natriumhydroxidplättchen (J.T.Baker, Griesheim), Phosphorsäure (J.T.Baker, Griesheim), Salzsäure 37 % (J.T.Baker, Griesheim), Einmalspritzen 10 ml, Erlenmeyerkolben 250 ml, 100 ml, Membranfilter (Porenweite 0,45 µm, Chromafil PET 45/15MS, Waters, Eschborn), Messkolben, pH-Messgerät (686 Titroprocessor, Metrohm, Filderstadt) und pH-Messkette (Typ 6.0222.100, Metrohm, Filderstadt), Sep-Pak Kartuschen Alumina (Waters 20505, Eschborn), Sep-Pak Kartuschen C18 (Waters 20515, Eschborn), Vollpipetten, Wasserbad (GFL, Burgwedel)

22.2 Herstellen der Lösungen

22.2.1 Eluenten für die HPLC

Eluent A (Phosphatpuffer): 22,8 g di-Kaliumhydrogenphosphat werden in 1000 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit Phosphorsäure auf pH 7,0 eingestellt.

Eluent B: 3,65 g di-Kaliumhydrogenphosphat werden in 800 ml deionisiertem Wasser gelöst, mit Phosphorsäure auf pH 7,0 eingestellt und mit 200 ml Acetonitril gemischt. Die Eluenten sind eine Woche im Kühlschrank haltbar.

22.2.2 Stammlösungen

22.2.2.1 Kreatinin

100 mg Kreatinin wurden in einen 100 ml Messkolben eingewogen, mit 2 ml 21% Salzsäure versetzt und bis zur Marke mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die Lösung hatte eine Konzentration von 1 mg/ml.

22.2.2.2 Interner Standard (Cytosin)

450 mg Cytosin wurden in einen 500 ml Messkolben eingewogen, mit ca. 300 ml Wasser und 10 ml 21 %ige Salzsäure versetzt und zur Marke mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die Lösung hatte eine Konzentration von 0,9 mg/ml.

22.2.3 Kalibrierlösungen

Aus den Stammlösungen von Kreatinin und von Cytosin wurden gemäß dem Pipettierschema (**Tabelle 22.2-1**) die Kalibrierlösungen 1 bis 4 hergestellt. Die angegebenen Volumina wurden in einen 100 ml Messkolben gegeben, mit 10 ml 21 %ige Salzsäure und 4 ml Natronlauge (6 mol/l) versetzt und mit deionisiertem Wasser zur Marke aufgefüllt. Die Lösungen wurden im Kühlschrank gelagert.

Level	Stammlösung Kreatinin (ml)	Kreatinin	Stammlösung Cytosin (ml)	Cytosin
1	0,2	2 µg/ml	1,0	0,9 µg/ml
2	0,5	5 µg/ml	1,0	0,9 µg/ml
3	1,0	10 µg/ml	1,0	0,9 µg/ml
4	2,0	20 µg/ml	1,0	0,9 µg/ml

Tabelle 22.2-1: Pipettierschema

22.3 Bestimmung von Kreatinin

22.3.1 Probenaufarbeitung

Genau 2 ml des Urins wurden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und 10 ml 21 %ige Salzsäure dazugegeben. Der Probenansatz blieb 1 Stunde im siedenden Wasserbad. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz mit 4 ml Natronlauge (6 mol/l) und 10 ml des Internen Standards (siehe Kapitel 22.2.2.2) versetzt und bis zur Marke mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Davon wurden 2 ml in einen 20 ml Messkolben pipettiert und bis zur Marke des Kolbens aufgefüllt. Vor der Messung wurden die Proben mit Hilfe eines Kartuschensystems von Sep-Pak (Alumina B, C18) aufgereinigt. Die Kartusche Alumina B wurde zur Konditionierung mit 10 ml deionisiertem Wasser gespült. Die C-18 Kartusche wurde zuerst mit Methanol und anschließend mit deionisiertem Wasser gespült.

Eine Einwegspritze wurde mit ca. 10 ml der wie oben beschrieben aufgearbeiteten Proben gefüllt und auf das Kartuschensystem aufgesteckt. Mit einer Geschwindigkeit von 1 Tropfen pro Sekunde wurde die Flüssigkeit nun über die Kartuschen gedrückt. Die Lösung lief über die Aluminasäule, dann über die C 18 Säule und zuletzt durch den Membranfilter. Die ersten 3,5 bis 4,0 ml wurden verworfen, die folgenden 2 ml wurden für die Messung gesammelt und in ein Samplergläschen abgefüllt.

22.3.2 Bestimmung

10 µl des über das Kartuschensystem gereinigten Extraktes wurden auf die 40°C temperierte HPLC-Säule C18 Luna (5µm (2), 250 x 3 mm; Phenomenex Ltd., Aschaffenburg) der HPLC-Anlage (HPLC 1090, Agilent, Waldbronn) gegeben. Es war die Vorsäule (Security Guard Cartiges C18x3.0, No.:AJO-4287 Phenomenex Ltd., Aschaffenburg) vorangeschaltet. Mit einem Fluss von 0,4 ml/Minute gelangte der injizierte Extrakt mit einem Gradientenprogramm des Elutionsgemisches (**Tabelle 22.3-1**) in den UV-Dioden Array Detektor. Bei einer Wellenlänge von 234 nm wurde der Extrakt gemessen.

Zeit (Minuten)	Eluent B (%)	Fluss (ml/Min)
0	0	0,4
7	50	0,4
12	0	0,4

Tabelle 22.3-1: Gradientenprogramm

23 Darstellung der Substanzen

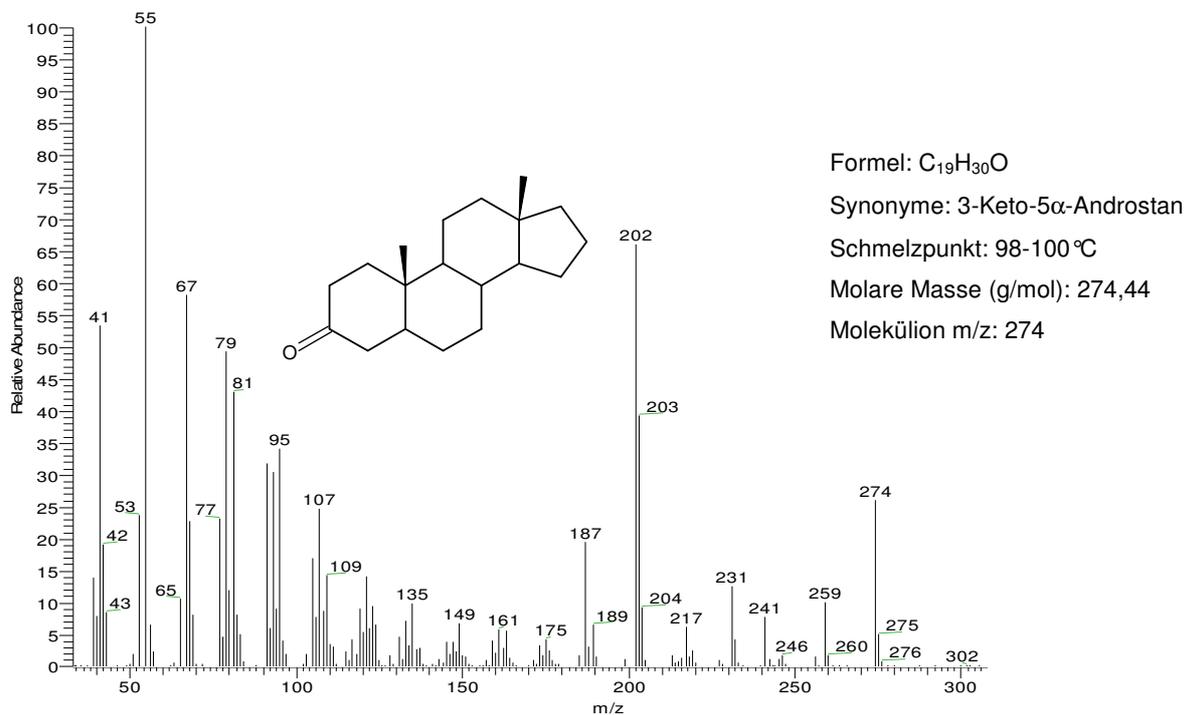


Abbildung 23-1: Massenspektrum: 5 α -Androstan-3-on

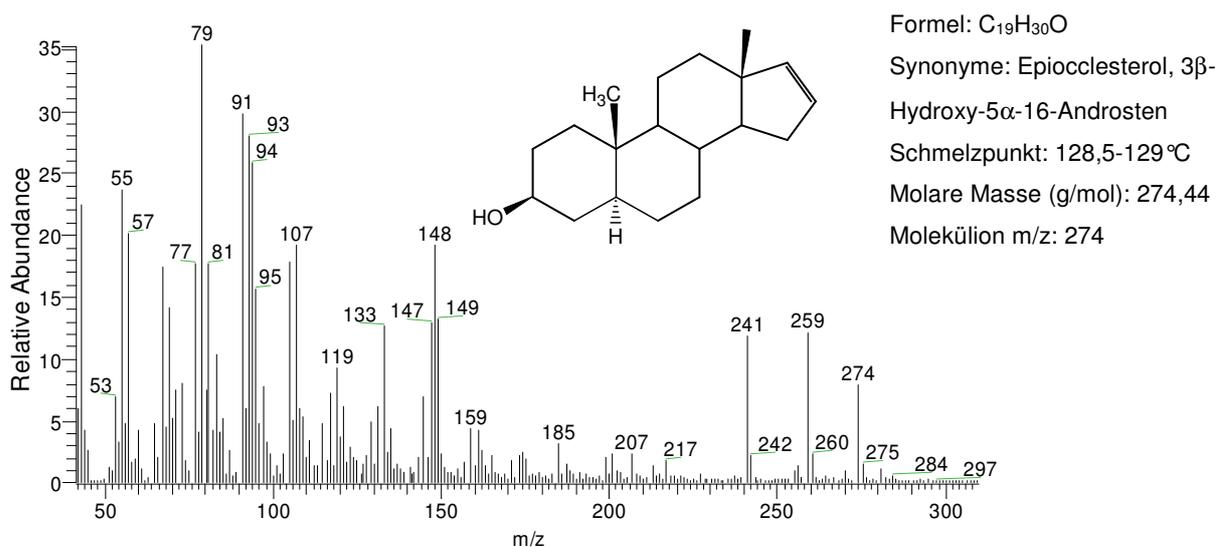


Abbildung 23-2: Massenspektrum: 5 α -Androst-16-en-3 β -ol

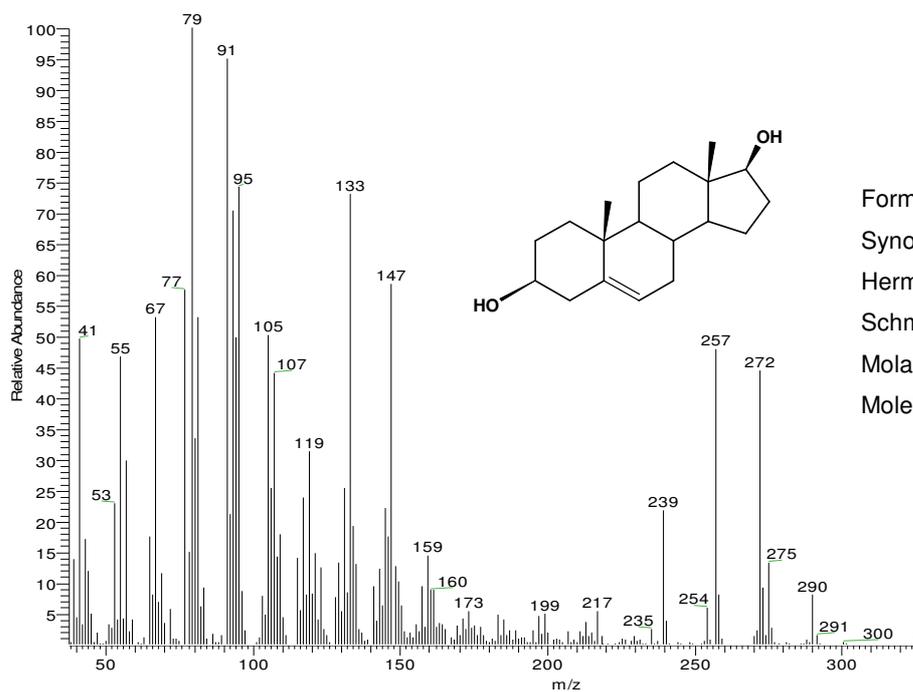


Abbildung 23-3: Massenspektrum: 5-Androsten-3 β ,17 β -diol

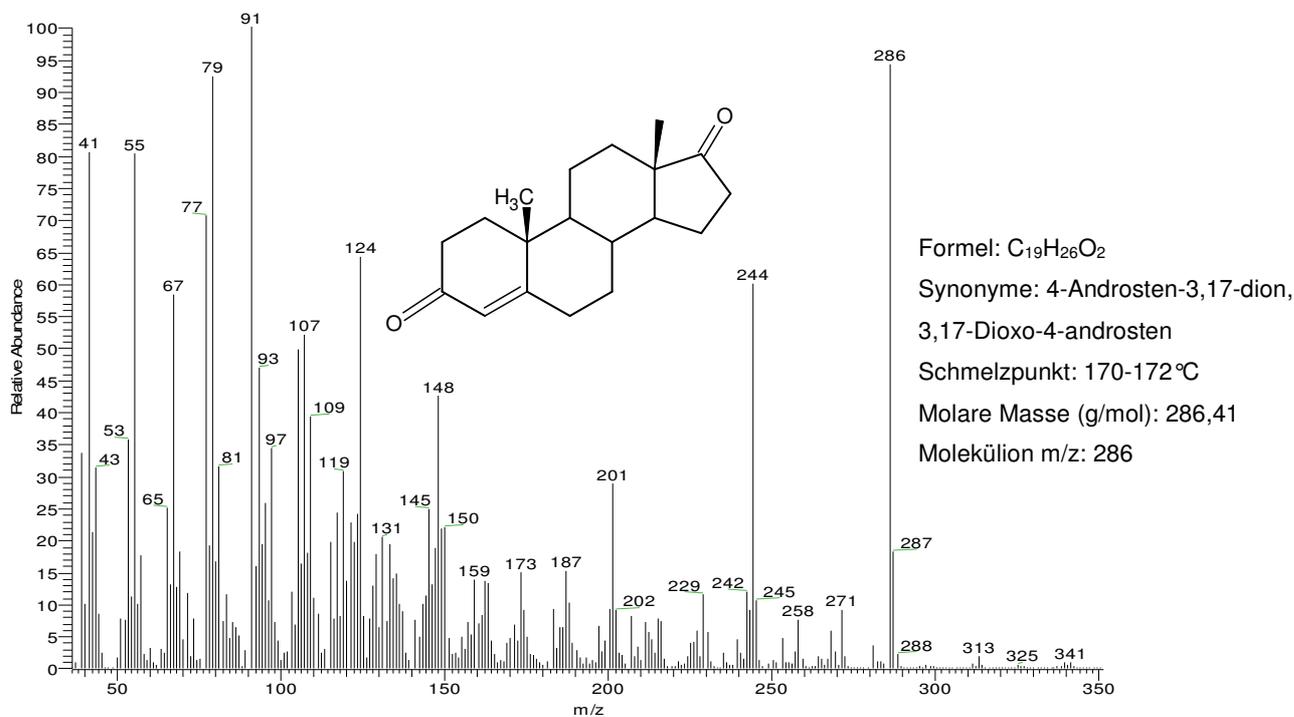


Abbildung 23-4: Massenspektrum: Androstendion

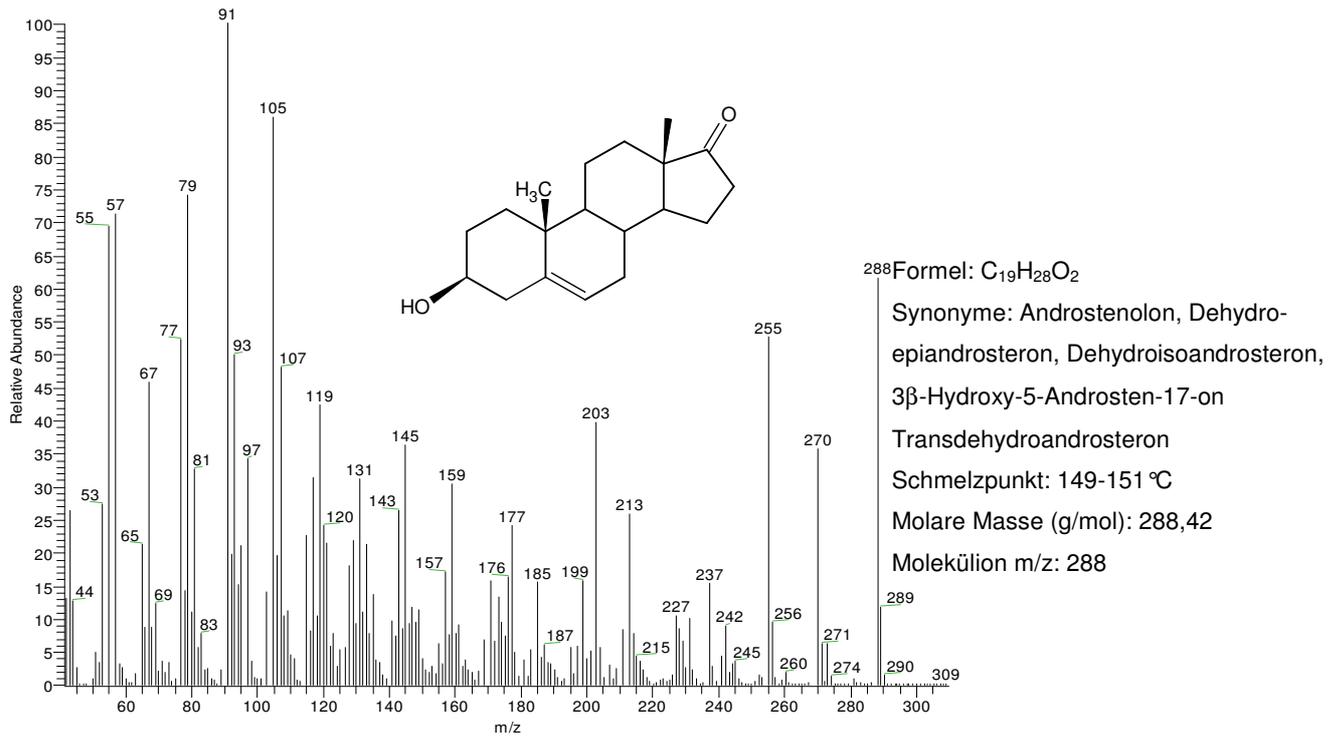


Abbildung 23-5: Massenspektrum: DHEA

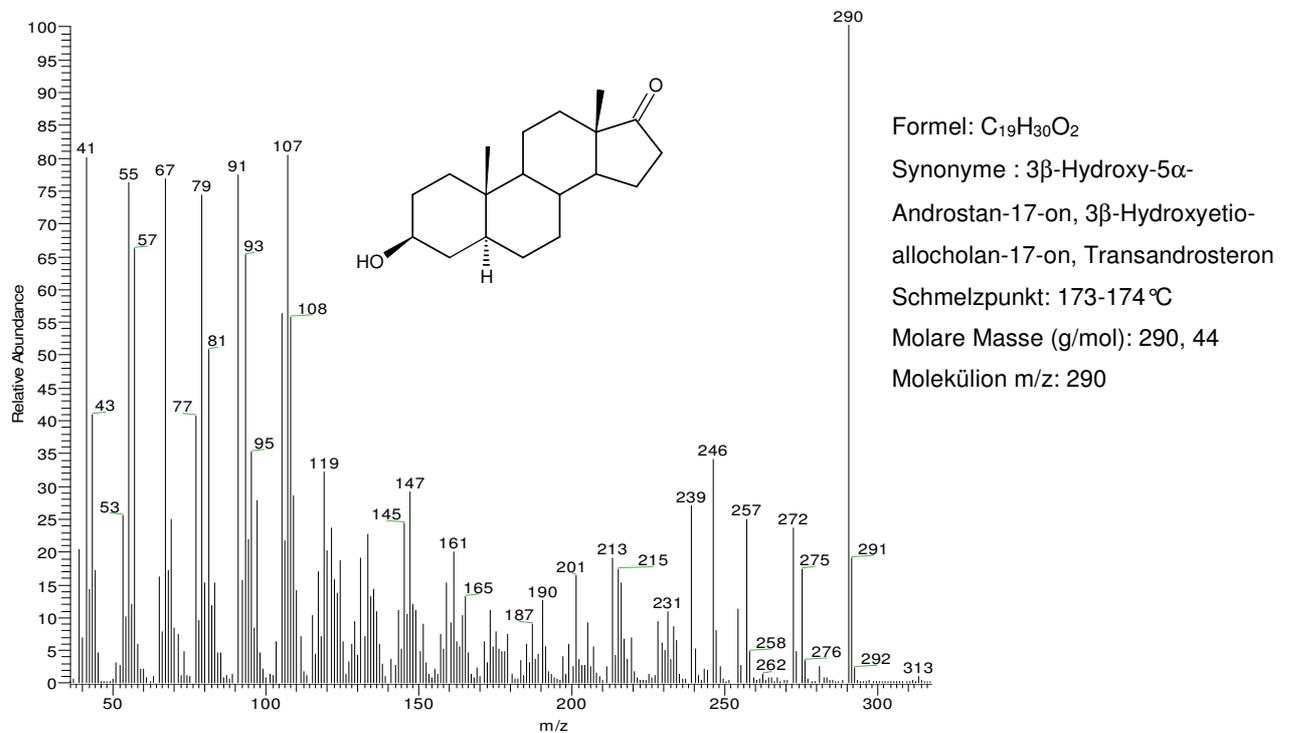


Abbildung 23-6: Massenspektrum: Epiandrosteron

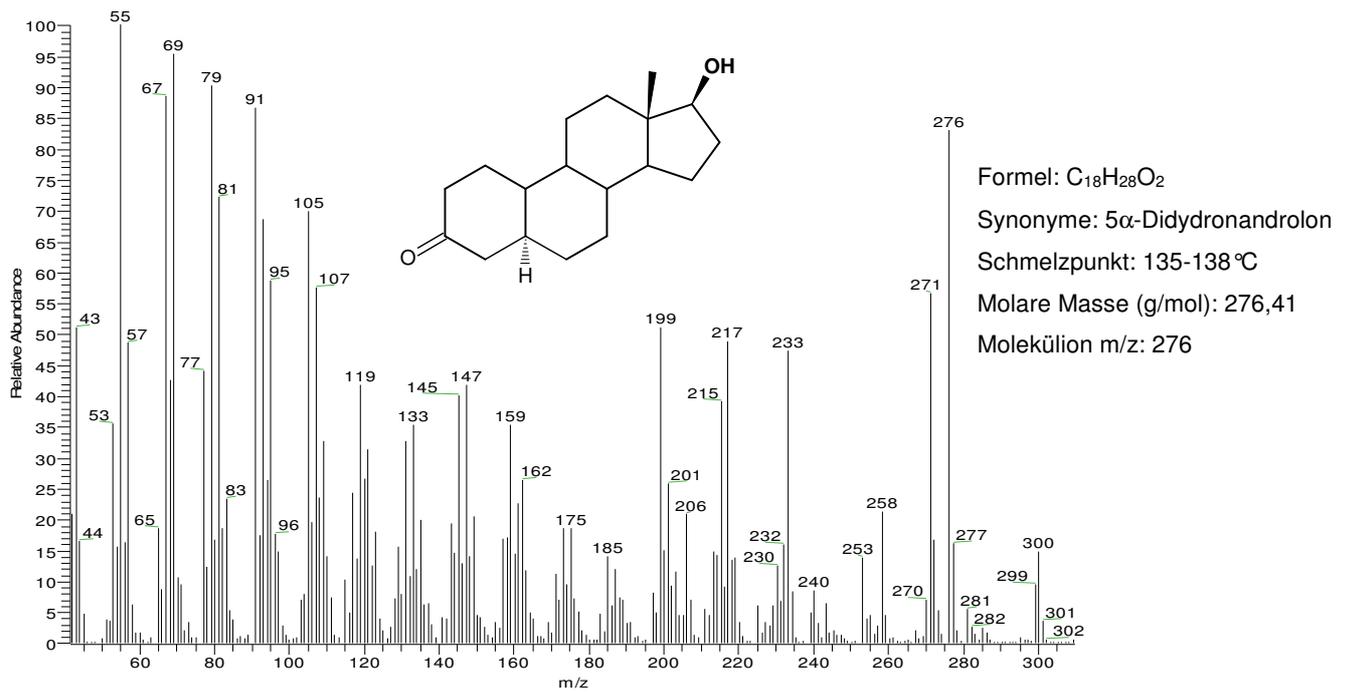


Abbildung 23-7: Massenspektrum: 5 α -Estran-3-on-17 β -ol

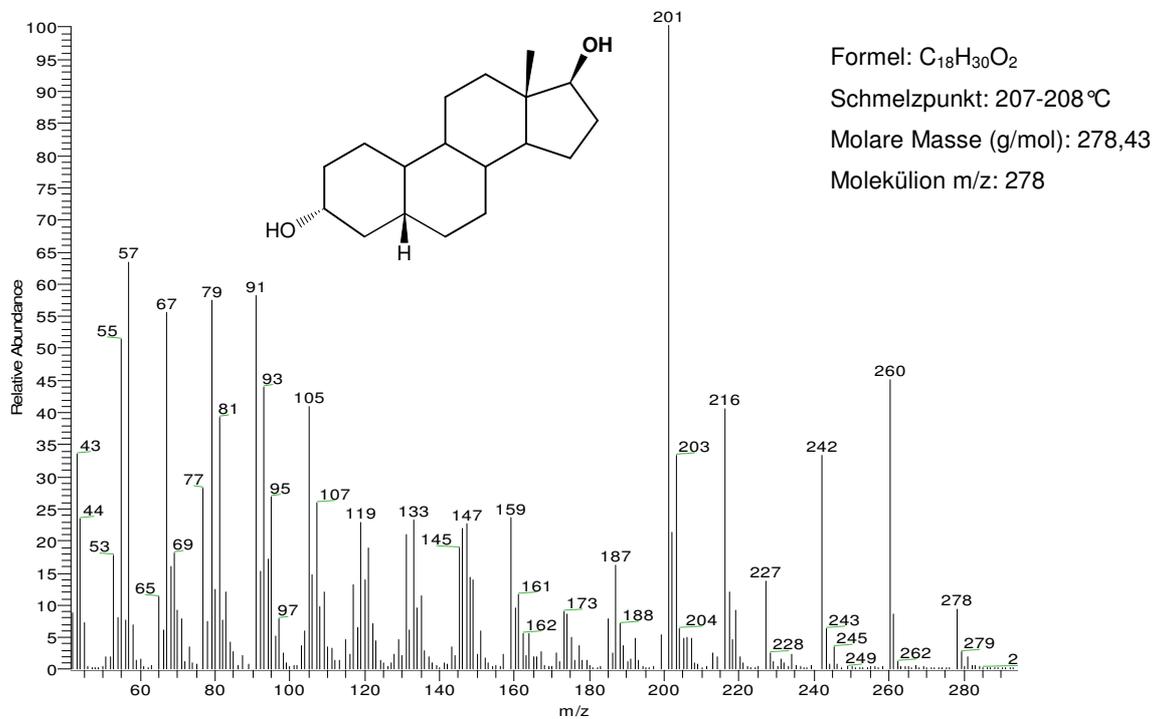


Abbildung 23-8: Massenspektrum: 5 β -Estran-3 α ,17 β -diol

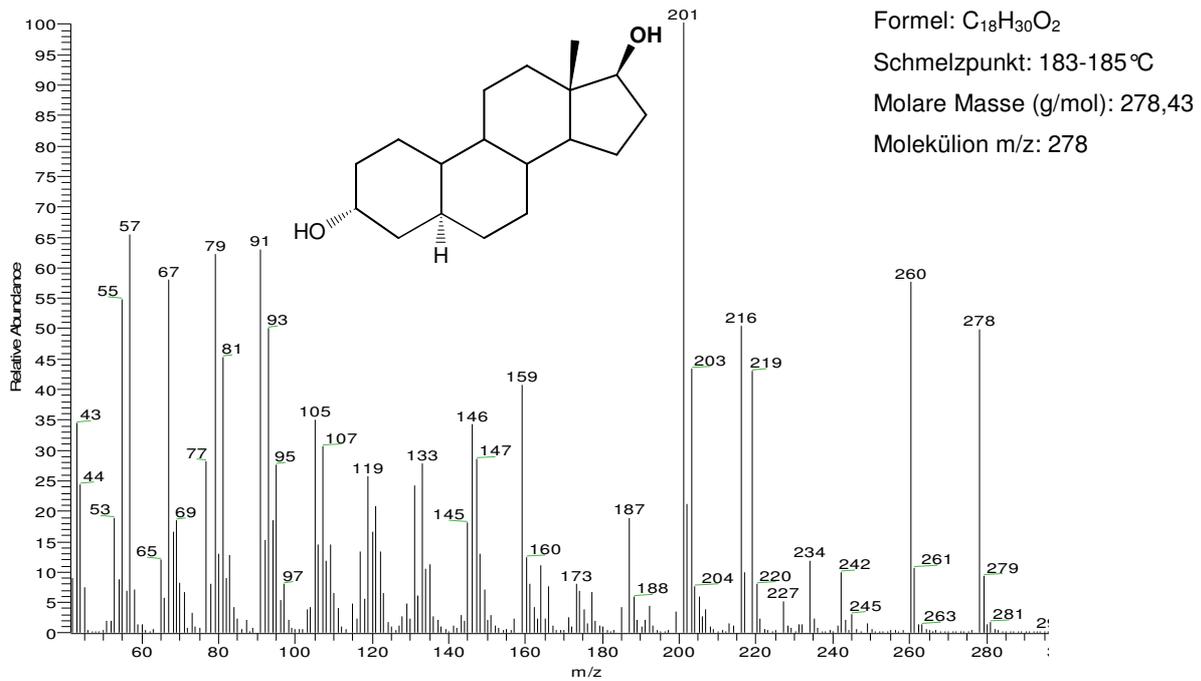


Abbildung 23-9: Massenspektrum: 5α-Estran-3α,17β-diol

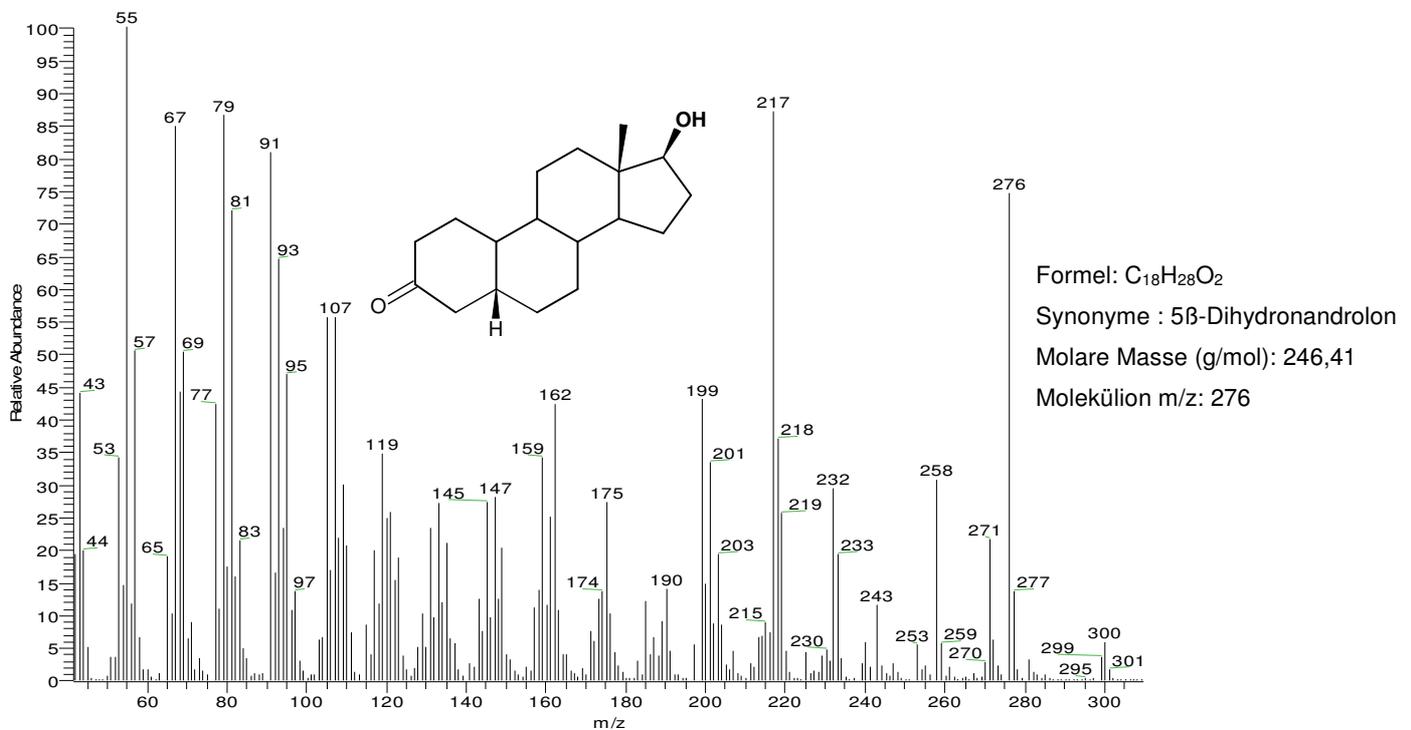


Abbildung 23-10: Massenspektrum: 5β-Estran-3-on-17β-ol

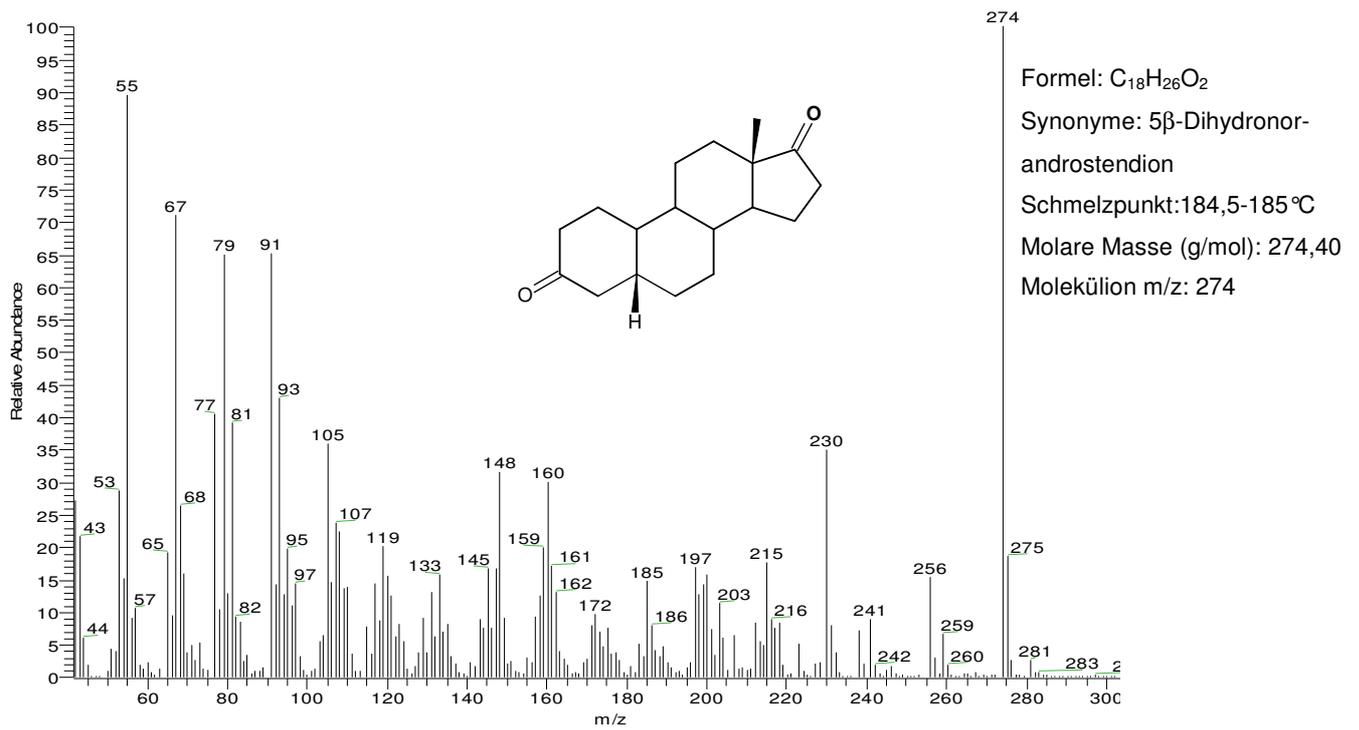


Abbildung 23-11: Massenspektrum: 5β-Estrandion

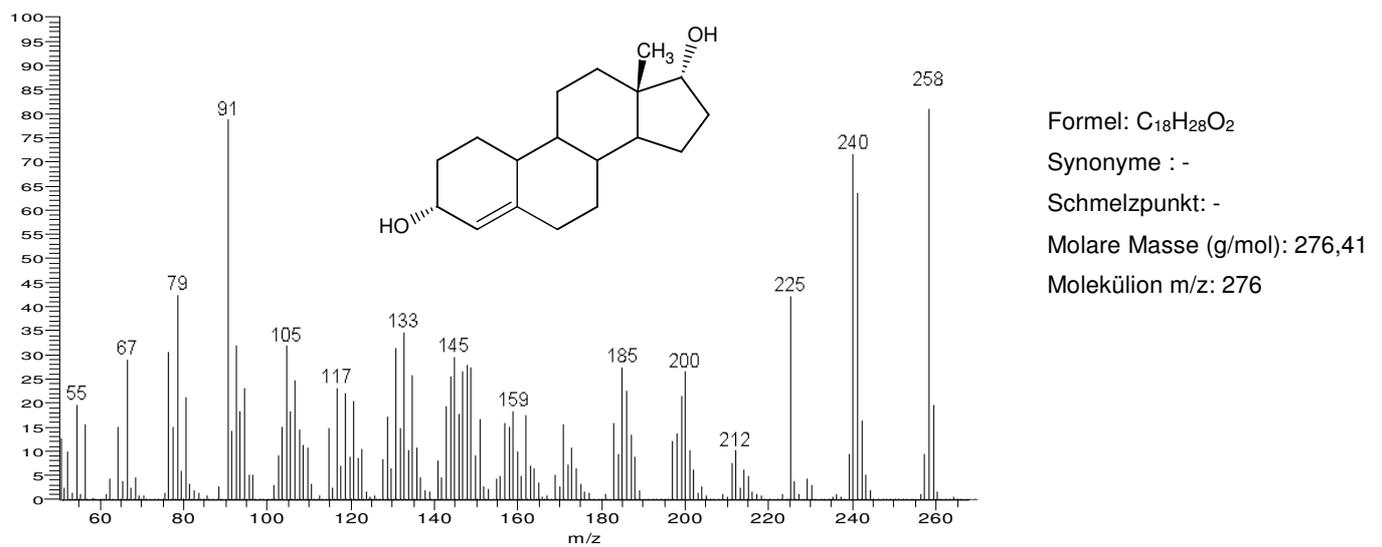


Abbildung 23-12: Massenspektrum: 4-Estren-3α,17α-diol

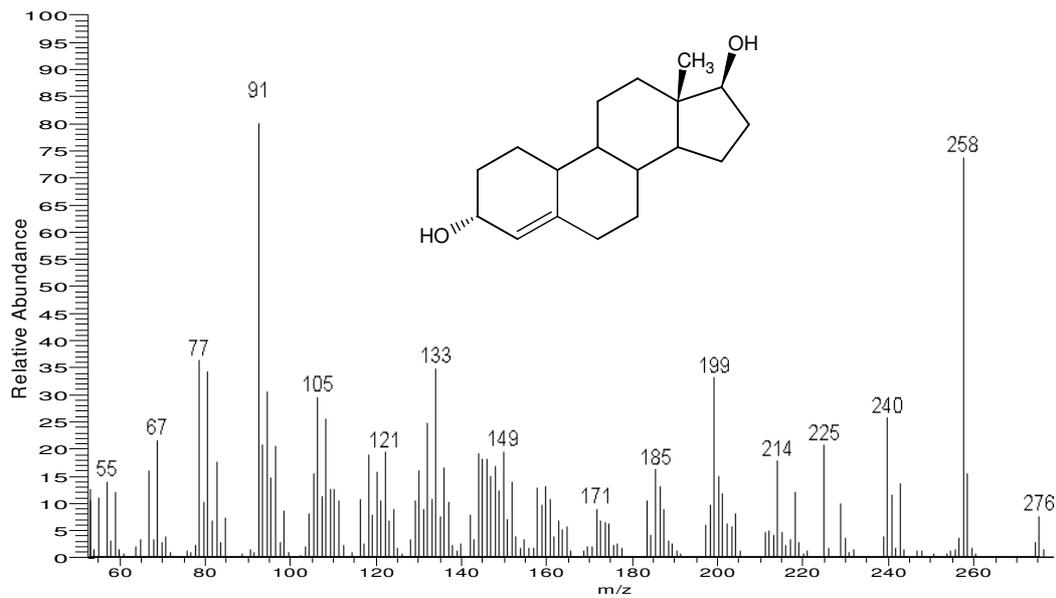


Abbildung 23-13: Massenspektrum: 4-Estren-3 α ,17 β -diol

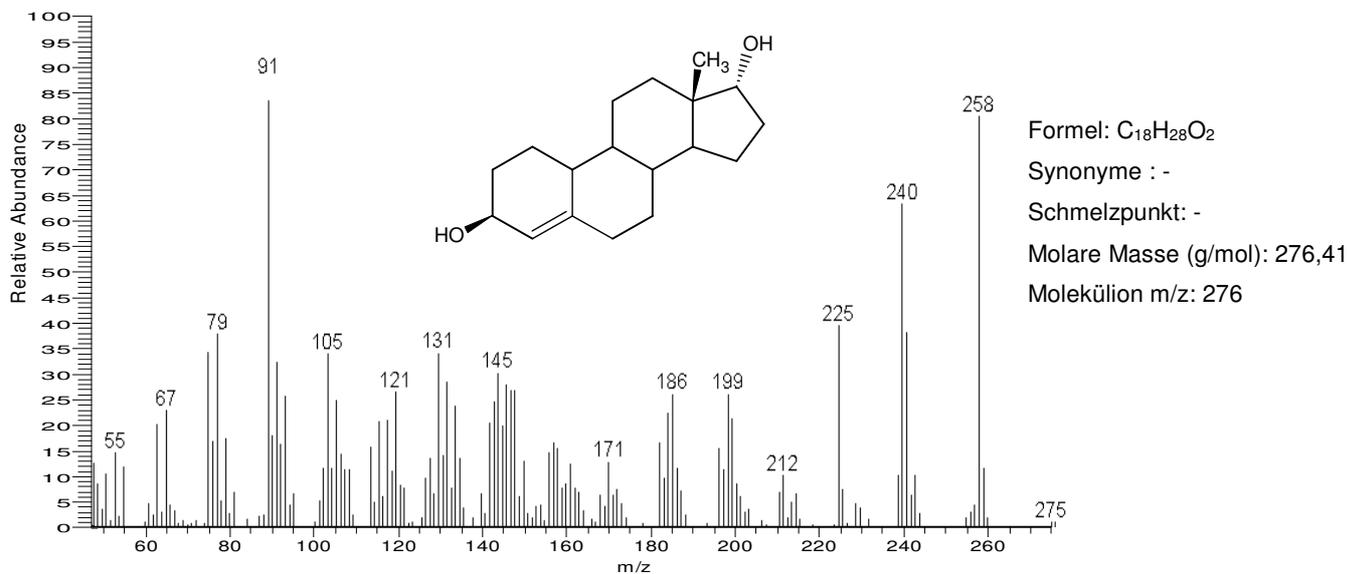


Abbildung 23-14: Massenspektrum: 4-Estren-3 β ,17 α -diol

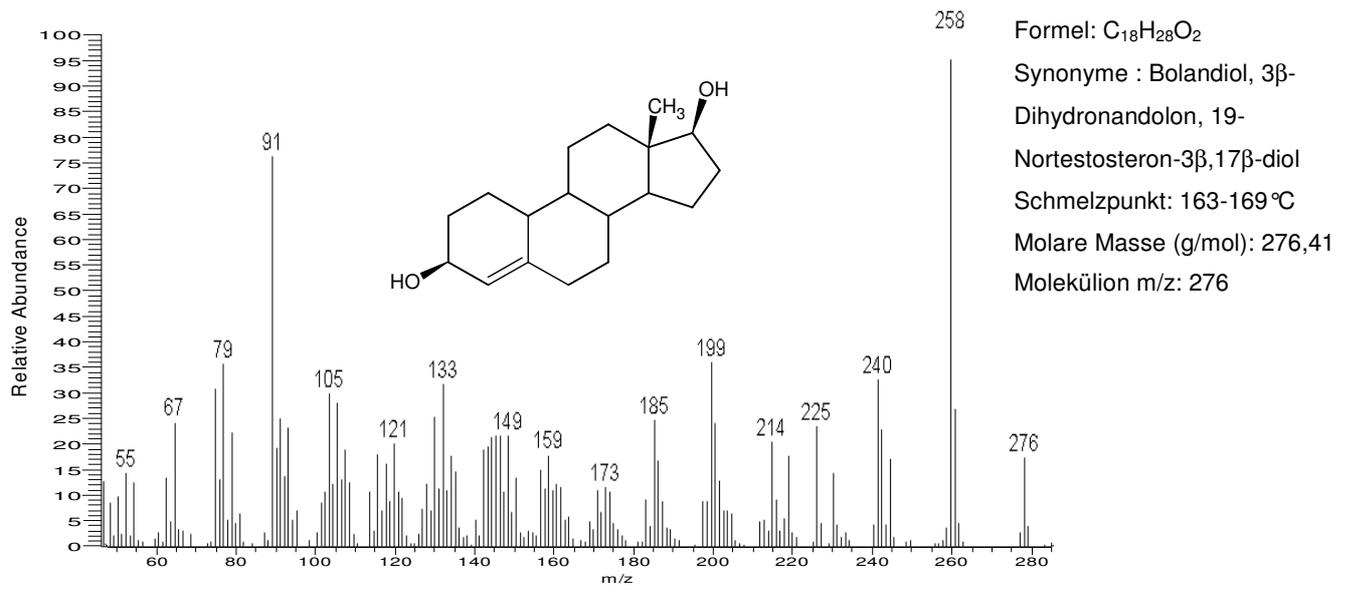


Abbildung 23-15: Massenspektrum: 4-Estren-3β,17β-diol

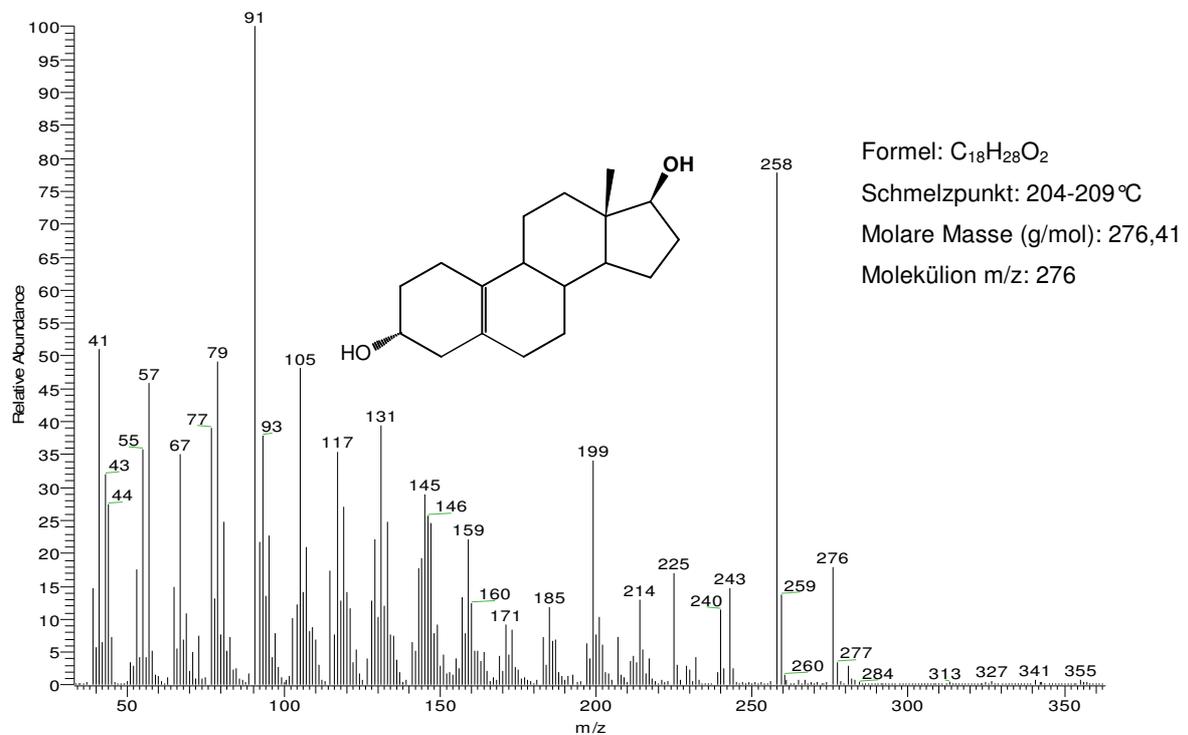


Abbildung 23-16: Massenspektrum: 5(10)-Estren-3α,17β-diol

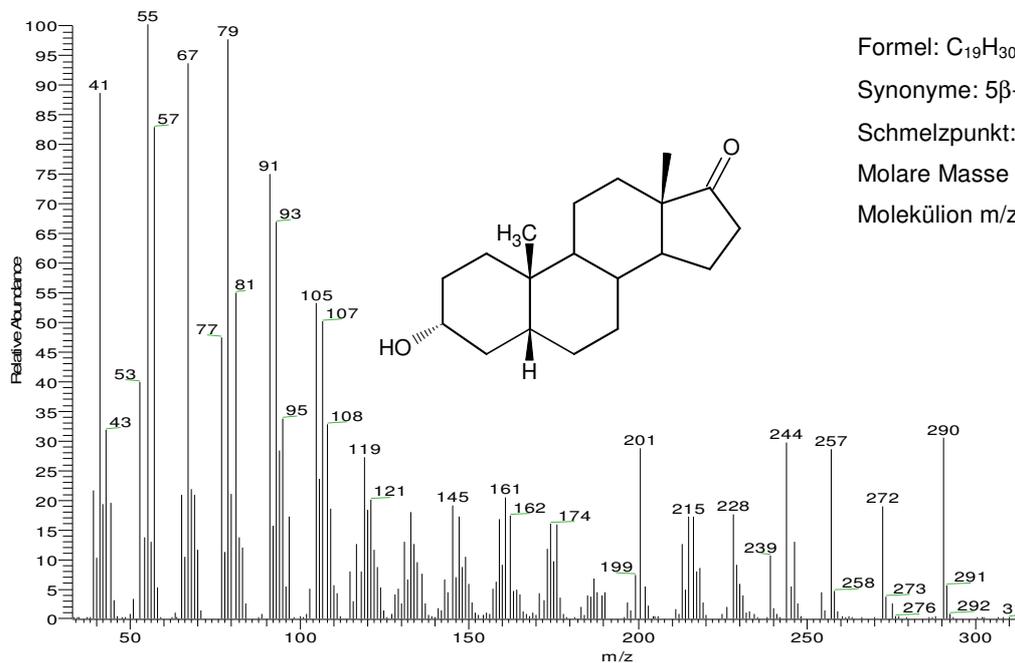


Abbildung 23-17: Massenspektrum: Etiocholanolon

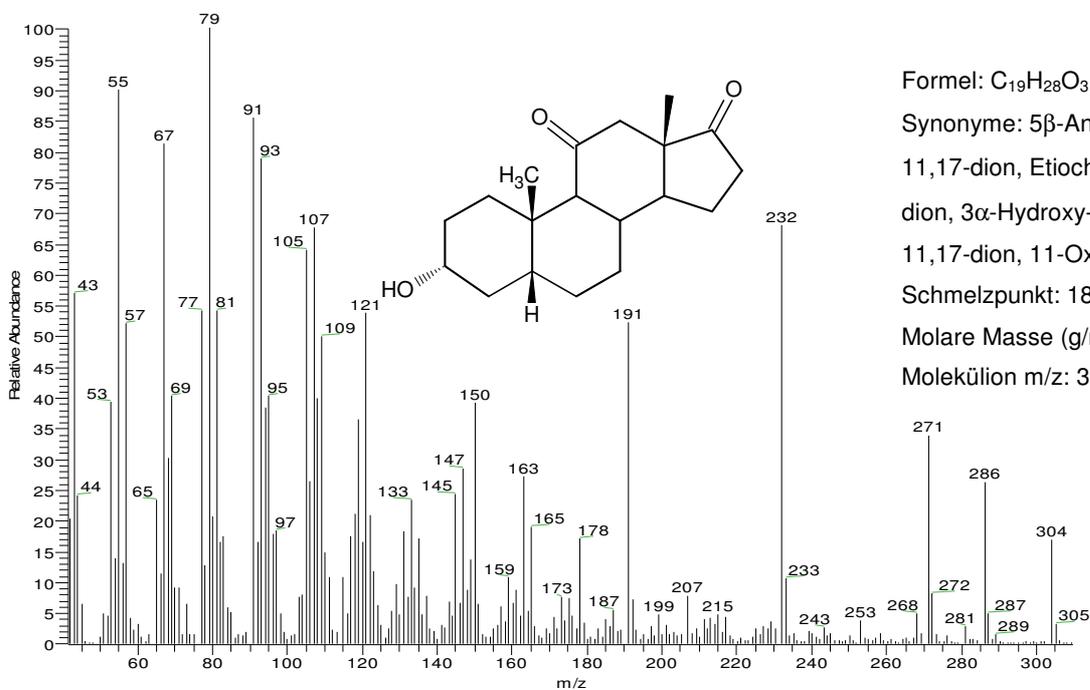


Abbildung 23-18: Massenspektrum: 11-Ketoetiocholanolon

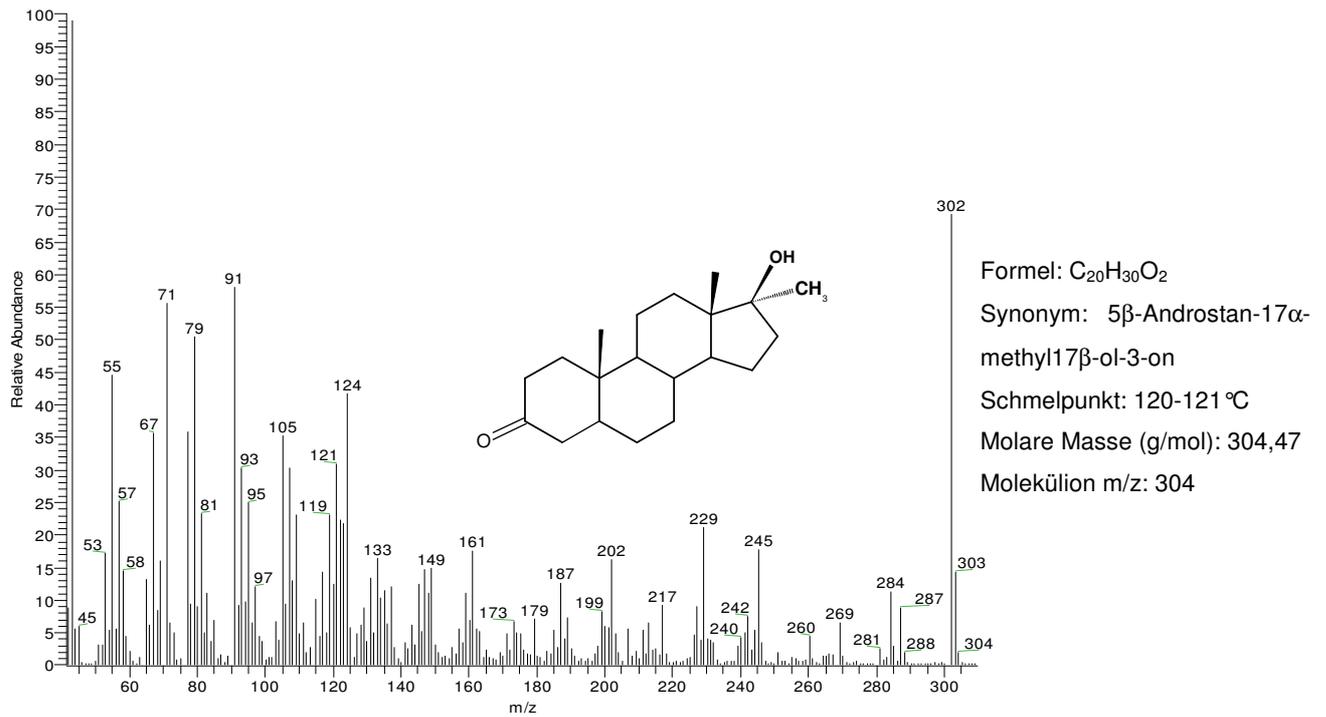


Abbildung 23-19: Massenspektrum: Methyltestosteron

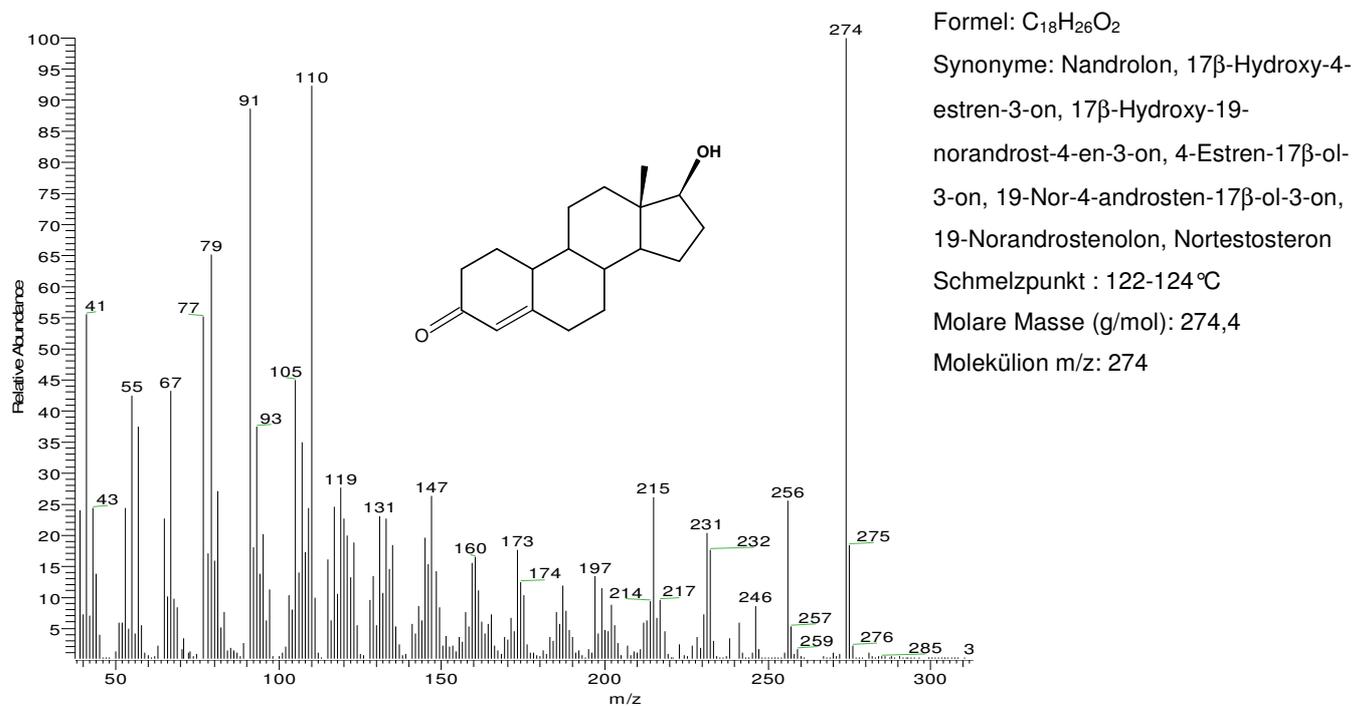


Abbildung 23-20: Massenspektrum: Nortestosteron

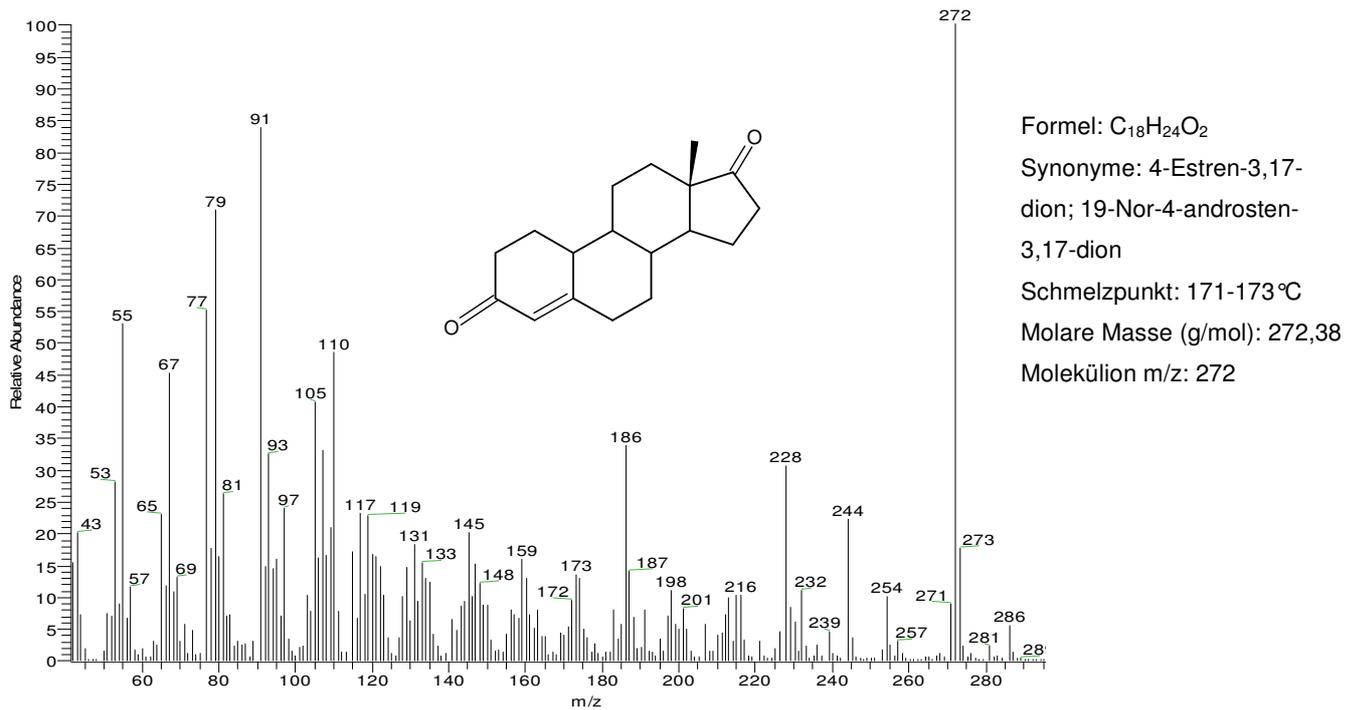


Abbildung 23-21: Massenspektrum: Norandrostendion

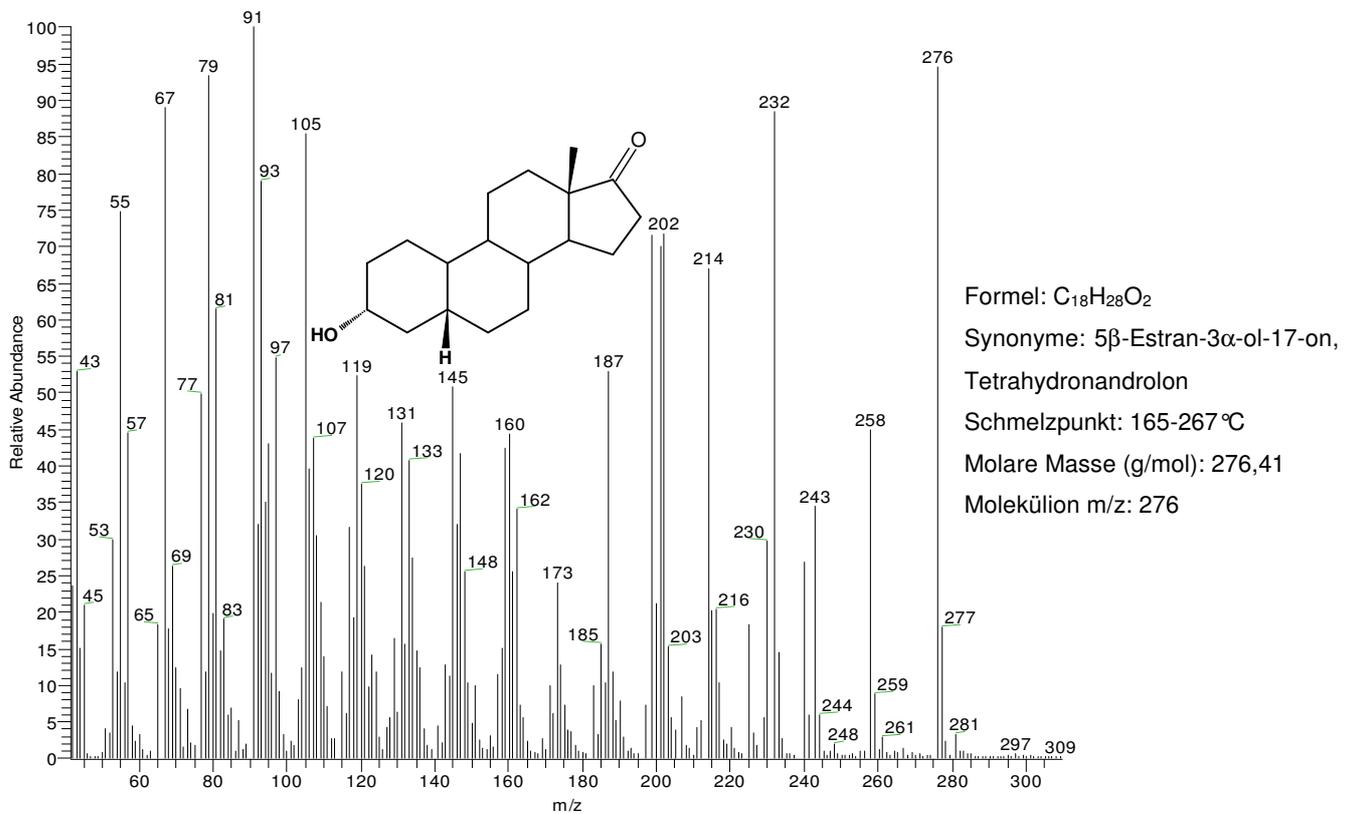


Abbildung 23-22: Massenspektrum: Noretiocholanolon

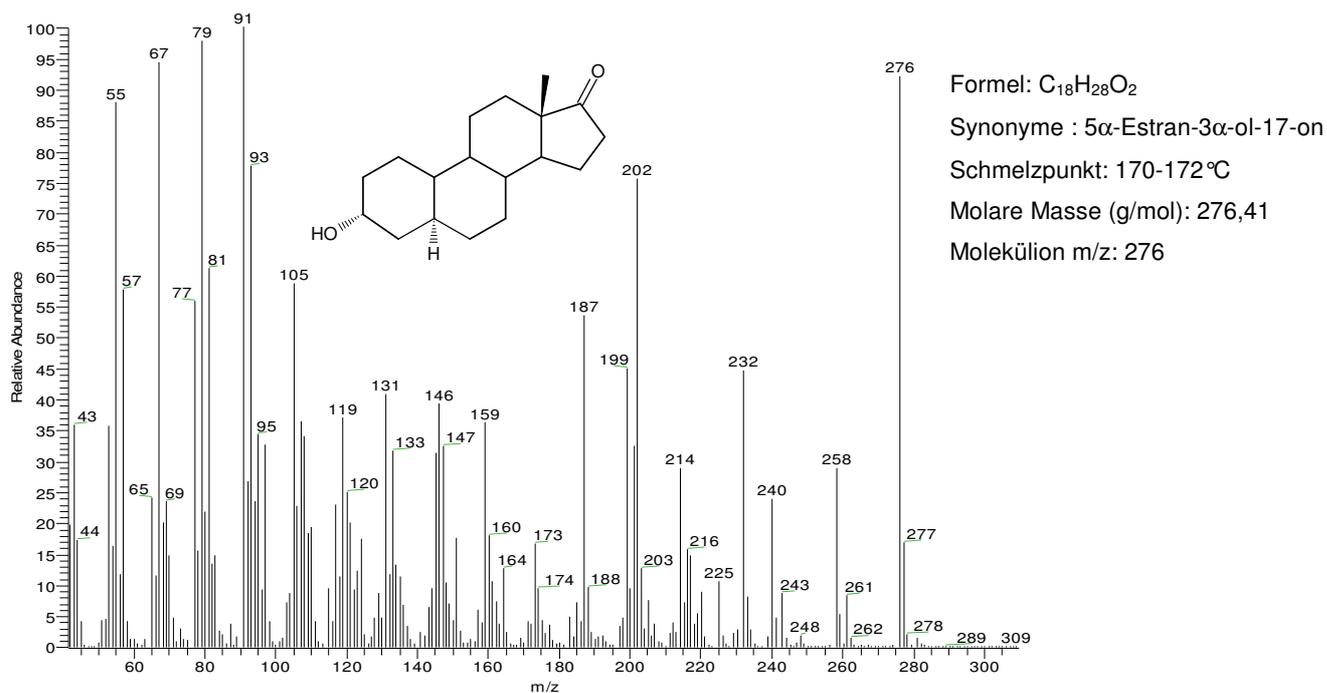


Abbildung 23-23: Massenspektrum: Norandrosteron

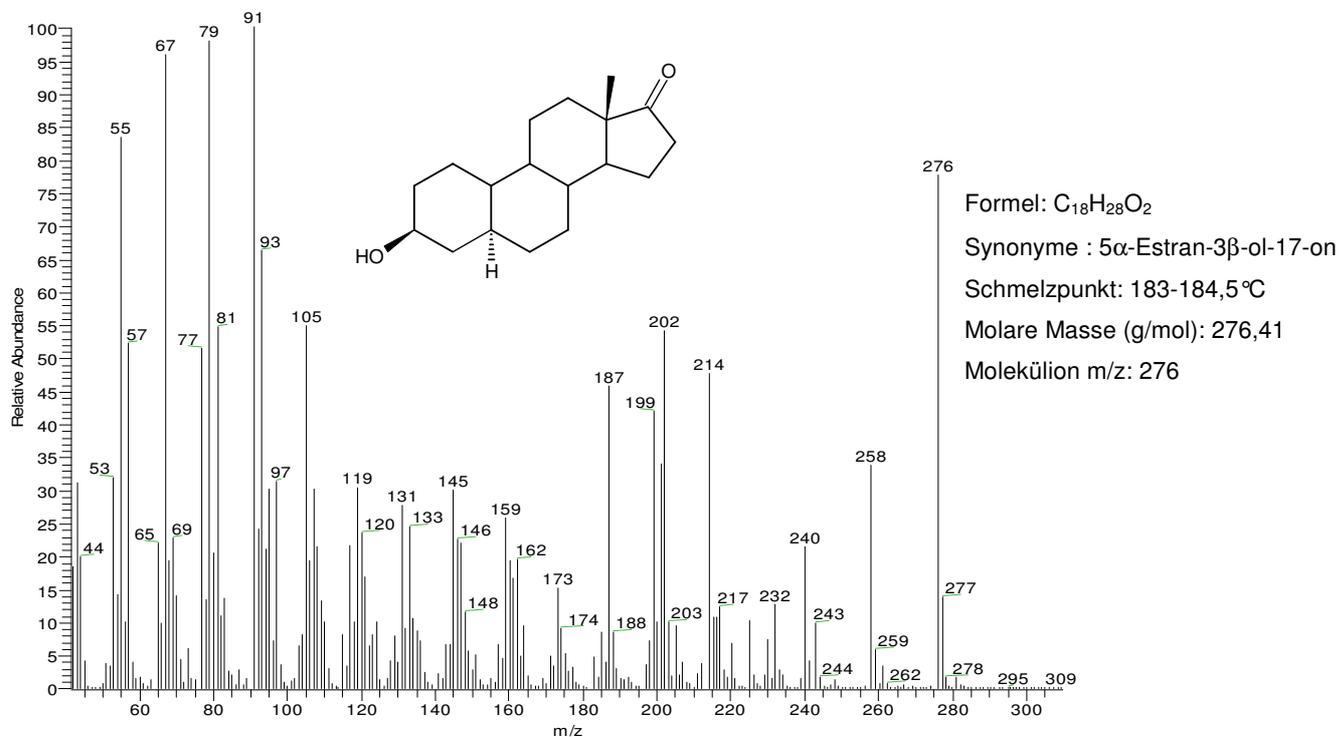
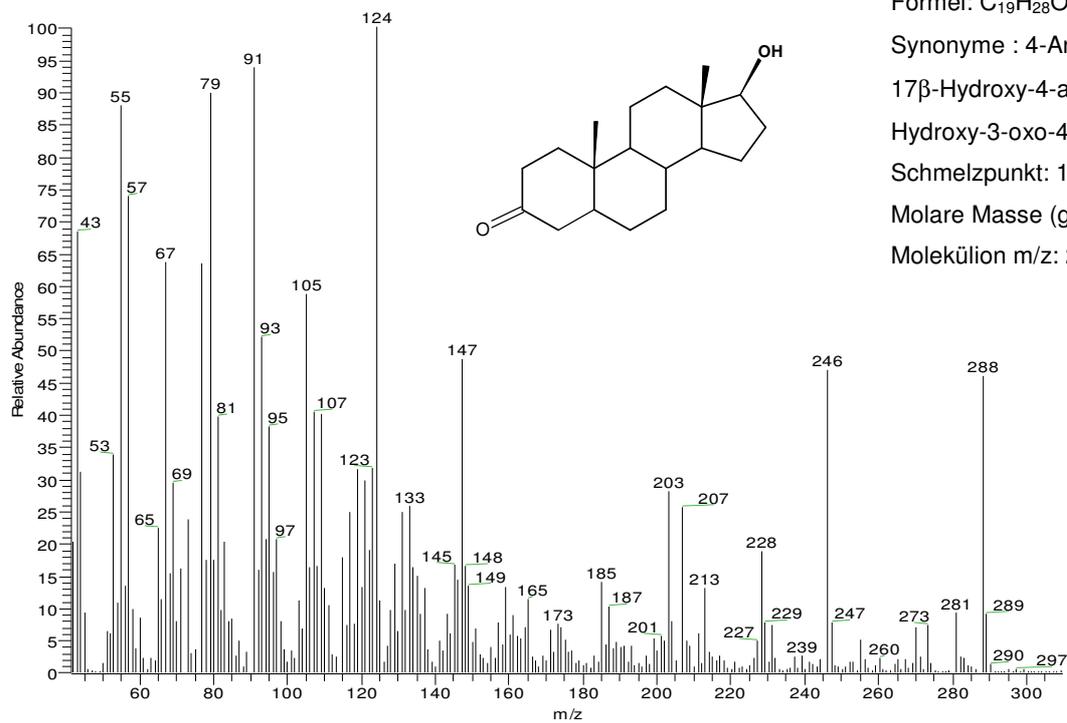


Abbildung 23-24: Massenspektrum: Norepiandrosteron



Formel: C₁₉H₂₈O₂

Synonyme : 4-Androsten-17β-ol-3-on,

17β-Hydroxy-4-androsten-3-on, 17β-

Hydroxy-3-oxo-4-androsten

Schmelzpunkt: 154-155 °C

Molare Masse (g/mol): 288,42

Molekülion m/z: 288

Abbildung 23-25: Massenspektrum: Testosteron

Literaturverzeichnis

- [1] Nandrolone Progress Report to the UK Sports Council from the Expert Committee on Nandrolone, February 2003
www.ukSPORT.gov.uk/pages/nandrolone_review_and_progress_report.
- [2] World Anti-Doping Agency: The World Anti-Doping Code. The 2006 prohibited List.
www.wada-ama.org/en
- [3] Ungemach F R and Nürnberger M C (1999). In Dietz O and Huskamp B (ed) Handbuch Pferdepraxis, Enke Verlag, Stuttgart, pp 65-80
- [4] ABL. EG L 125 vom 23.05.1996, S10
- [5] www.bvl.bund.de
- [6] Dehennin L, Bonnaire Y and Plou P (1999) J Chromatogr 721: 301-307
- [7] Ruokonen A and Vihko R (1974) J Steroid Biochemist 5: 33-38
- [8] Milewich L and Axelrod L R (1979) J Steroid Biochemist 10: 241-243
- [9] Sulcova J, Rafter J and Starka L (1979) Endocrinol Exp 13: 225-235
- [10] Silberzahn P, Dehennin L, Zwain I and Reiffensteck A (1985) Endocrinology 117: 2176-2181
- [11] Ryan K J and Short R V (1965) Endocrinology 76: 108-114
- [12] Houghton E, Ginn A, Teale P, Dumasia M and Copsey J (1989) J Chromatogr 479: 73-83
- [13] Dintinger T, Gaillard J-L, Zwain I, Bouhamidi R and Silberzahn P (1989) J Steroid Biochemist 32: 537-544
- [14] Reznik Y, Herrou M, Dehennin L, Lemaire M and Leymarie P (1987) J Clin Endocr Metab 64: 1086-1088
- [15] Le Bizec B, Monteau F, Gaudin I and André F (1999) J Chromatogr 723: 157-172
- [16] Baume N, Avois L, Schweizer C, Cardis C, Dvorak J, Cauderay M, Mangin P and Saugy M (2004) Clin Chem 50: 355-364
- [17] Farnsworth W E (1966) Steroids 8: 825-845
- [18] Osawa Y and Yarborough C (1983) Endocrinology 112: Abstract Nr. 664
- [19] Maghuin-Rogister G, Bosseloire A, Gaspar P, Dasnois C and Pelzer G (1988) Ann méd Vét 132: 437-440

-
- [20] Van Ginkel L, Stephany R, Zoonzjes W, Van Rossum H, Van Blitterswijk H and Zuidendorp J (1989) Ned Tijdschr Diergeneesk 114: 311-314
- [21] Debruyckere G, Van Peteghem C, De Brabander H and Debackere M (1990) Vet Quart 12: 246-250
- [22] Haasnoot W, Van Bruchem D, Paulussen R, Schilt R, Arts J, Dijkstra G and Meijer J (1990) Arch Lebensmittelhyg 41: 129-152
- [23] Rizzo F A, Alitupa E, Berg S and Hirvi T (1993). In Haagsma N, Ruiter A and Eysenberg C (ed) Proceedings of Euroresidue II, Conference of Residues of Veterinary Drugs in food, Veldhoven, University, Utrecht, pp 581-585
- [24] De Wasch K, Le Bizec B, Van Ginkel L, Lobeau P, Deceuninck Y, Serk S, Kadry a-R, Hoffmann K, M, Stephany R, Andre F and De Brabander H (2003) Proceedings Euro Food Chem XII, Brugges, Belgien 445-448
- [25] Rizzo F A, Alitupa E, Hirvi T, Berg S, Hirn J and Leinonen A (1993) Anal Chim Acta 275: 135-138
- [26] Vandenbroeck M, Van Vyncht G, Gaspar P, Dasnois C, Delahaut P, Pelzer G, De Graeve J and Maghuin-Rogister G (1991) J Chromatogr 564: 405-412
- [27] De Wasch K, Le Bizec B, De Brabander H, André F and Impens S (2001) Rapid Commun Mass Spectrom 15: 1442-1447
- [28] Metz C and Claus R (2003) Livest Prod Sci 81: 129-137
- [29] Claus R (1991) Journal für die Großtierpraxis 10: 6-14
- [30] Stamer S, Nürnberg K, Kanit W and Kalm E (1993) Züchtungskunde 65: 131-137
- [31] www.dpg-physik.de/gliederung/fv/p/info/plasmaphysiker/thomson.html
- [32] Aston F W (1923) Isotope. Verlag S. Hirzel, Leipzig
- [33] Brenna J T, Corso T N, Tobias H J and Caimi R J (1997) Mass Spectrom Rev 16: 227-258
- [34] Nier O A (1940) Rev Sci Instrum 11: 212-216
- [35] Nier O A (1947) Rev Sci Instrum 18: 398-411
- [36] Urey H C (1948) Science 108: 489-496
- [37] Mc Kinney C R, Mc Crea J M, Epstein S, Allen H A and Urey H C (1950) Rev Sci Instrum 21: 724-730
- [38] Matthews D, E and Hayes J M (1978) Anal Chem 50: 1465-1473
- [39] De Groot P A (2004) Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques, Vol.1. Elsevier, Amsterdam

-
- [40] Poorter H and Farquhar G (1994) *Aust J Plant Physiol* 21: 507-516
- [41] Schmidt T, Zwack L, Elsner M, Berg M, Meckenstock R and Haderlein S (2004) *Anal Bioanal Chem* 378: 283-300
- [42] Rundgespräche der Kommission für Ökologie, Band 30 (2005): Auf Spurensuche in der Natur. Schnyder, H und Schäufele, R: 13C- und ¹⁸O-Signatur des CO₂-Marker für CO₂-Flüsse im Ökosystem?, pp.83-91. Verlag Dr. Freidrich Pfeil, München
- [43] Freemann K, Hayes J M, Trendel J-M and Albrecht P (1990) *Nature* 343: 254-256
- [44] Schoell M, Schouten S, Sinninghe-Damste J S, De Leeuw J W and Summons R-E (1994) *Science* 263: 1122-1125
- [45] Reidy L J, Meier-Augenstein W and Kalin R M (2005) *Rapid Commun Mass Spectrom* 19: 1899-1905
- [46] Weckerle B, Richling E and Schreier P (2002) *Deut Lebensm-Rundsch* 98: 122-124
- [47] Braunsdorfer R, Hener U, Stein S and Mosandl A (1993) *Z Lebensm Unters For* 197: 137-141
- [48] Calderone G, Naulet N, Guillou C, Reniero F, Cortes I A and Cortes B (2005) *Rapid Commun Mass Spectrom* 19: 701-705
- [49] Schumacher K, Hener U, Patz C, Dietrich H and Mosandl A (1999) *Eur Food Res Technol* 12-15
- [50] Meier-Augenstein W (1999) *J Chromatogr* 842: 351-371
- [51] Pressemitteilung "Schwein gehabt, Eber" vom 11.5.2004 des Schweizer Tierschutzes; www.kagfreiland.ch
- [52] Bach S (2007) *Agrarzeitung Ernährungsdienst* vom 23.Mai 2007
- [53] Piatkowski B and Jung H (1965) *Arch Tierz* 9: 307-317
- [54] Hansen B C and Lewis J A (1993) *J Anim Sci* 71: 2110-2121
- [55] Tauson A, Chwalibog A, Jakobsen K and Thorbek G (1998) *Arch Anim Nutr* 51: 253-262
- [56] Schriftenreihe des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten/A, *Angewandte Wissenschaft*, 449 (1995): Die Ebermast. Hoppenbrock, K H: Mastleistung von Ebern, pp. 3-5. Landwirtschaftsverlag, Münster
- [57] Metz C (2003) Dissertation, Justus-Liebig-Universität Giessen
- [58] Claus R and Weiler U (1994) *Livest Prod Sci* 37: 245-260

-
- [59] Zeng X Y, Turkstra J A, Jongbloed a W, Van Diepen J T M, Meloen R H, Oonk H B, Guo D Z and Van Der Wiel D F M (2002) *Livest Prod Sci* 77: 1-11
- [60] Siers D G (1975) *J Anim Sci* 41: 522-526
- [61] Schriftenreihe des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten/A, *Angewandte Wissenschaft*, 449 (1995). Dobrowolski A, Höreth R, Brandscheid W: Der Schlachtkörper von Ebern und Börden und Probleme der Klassifizierung, pp. 6-13. Landwirtschaftsverlag, Münster
- [62] Fleischhygiene Verordnung - FIHV in der Fassung der Bekanntmachung vom 29.Juni 2001. BGBl. I S. 1366, zuletzt geändert am 04.11.2004 (BGBl. I S.2688)
- [63] Gower D B (1975). In Backwell (ed) *Biochemistry of steroid hormones*, Scientific Publications, London, pp 149-164
- [64] Fischer K (1999) *Lohmann Information* 1: 3-8
- [65] Matthews K R, Homer D B, Punter M-P, Beague M P, Gispert M, Kempster a J, Agerhem H, Claudi-Magnussen C, Fischer K, Siret F, Leask H, Furnols F and Bonneau M (2000) *Meat Sci* 54: 271-283
- [66] Römpp Lexikon Chemie. 10. Aufl., Bd. 3, Thieme, Stuttgart, New York
- [67] Hollemann A and Wiberg N (1985) *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. Walter de Gruyter, Berlin, New York
- [68] Rundgespräche der Kommission für Ökologie, Band 30 (2005): Auf Spurensuche in der Natur. Schmidt, H-L: Isotope-Nuklide des gleichen Elementes mit kleinen Verschiedenheiten, pp.13-16. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München
- [69] IUPAC Compendium of Chemical Terminology. 2nd. Edition, 1997, online version <http://sunsite.wits.ac.za/iupac/publications/compendium/index.html>
- [70] Kelly S, Heaton K and Hoogewerff J (2005) *Trends Food Sci Tech* 16: 555-567
- [71] Hoefs J (2004) *Stable isotope geochemistry*. Springer Verlag, Heidelberg
- [72] Schopf J W (1999) *Grade of Life: The discovery of Earth earliest fossils*. Princeton University Press, Princeton
- [73] Craig H (1957) *Geochim et Cosmochim Acta* 12: 133-149
- [74] Werner R and Brand W (2001) *Rapid Commun Mass Spectrom* 15: 501-519
- [75] IAEA-TECDOC-825: Reference and intercomparison materials for stable isotopes of light elements. Proceedings of a consultants meeting in Vienna, 1th-3th December 1993; www.iaea.org/programmes/aqcs/archive_other-reports.htm
- [76] Zhang Q-L and Li W-J (1990) *Chinese Sci Bull* 35: 290-296

-
- [77] Blunier T and Leuenberger M (2003) Skript zur Vorlesung im Sommersemester 2003: Stabile Isotope in der Umwelt. Philosophisch-naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bern
- [78] Mook W G and De Vries J J (2000) Environmental Isotopes in the Hydrological Cycle: Principles and Applications, Vol I. UNESCO/IAEA, Paris
www.iaea.org/programmes/ripc/ih/volumes/volumes.htm
- [79] Bigeleisen J (1965) *Science* 147: 463-471
- [80] Schmidt H-L (2003) *Naturwissenschaften* 90: 537-552
- [81] Farquhar G, Ehleringer J R and Hubick K T (1989) *Ann Rev Plant Phys* 40: 503-537
- [82] Stosch H-G (2004) Skript zur Vorlesung Mineralogie an der Universität Karlsruhe
- [83] O'Leary M H (1981) *Phytochemistry* 20: 553-567
- [84] Berry J A (1988). In Ehleringer J R, Rundel P W and Nagy K A (ed) *Stable isotope in ecological research*, Springer Verlag, New York, pp 82-94
- [85] Park R and Epstein S (1960) *Geochim et Cosmochim Acta* 21: 110-126
- [86] Farquhar G, O'Leary M H and Berry J A (1982) *Aust J Plant Physiol* 9: 121-137
- [87] O'Leary M H, Rife J E and Slater J D (1981) *Biochemist* 20: 7308-7314
- [88] Hayes J M (1993) *Mar Geol* 113: 111-125
- [89] Hare P E, Fogel M L, Stafford T W, Mitchell D A and Hoering T C (1991) *J Archaeol Sci* 18: 277-292
- [90] Stott W A, Davies E and Evershed R P (1997) *Naturwissenschaften* 84: 82-86
- [91] De Niro M, J and Epstein S (1977) *Science* 197: 261-263
- [92] Meier-Augenstein W (2002) *Anal Chim Acta* 465: 63-79
- [93] Ferchaud V, Le Bizec B, Monteau F and André F (2000) *Rapid Comm Mass Spectrom* 14: 652-656
- [94] Groß W, Ring C and Lodemann E (1989) *Physiologische Chemie*. VDH, Weinheim
- [95] Moss G P (1989) *Pure Appl Chem* 61: 1783-1822
- [96] Karlson P (1988) *Lehrbuch der Biochemie*. 13.Aufl., Georg Thieme, Stuttgart, New York
- [97] Snatzke G and Tschesche R (1965). In Foerst W (ed) *Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie*, 3. Aufl., Bd. 16. Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, pp 401-415

-
- [98] Eberhard B and Jung G (1983) Organische Chemie II. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- [99] Fieser L and Fieser M (1959) Steroide. Verlag Chemie, New York
- [100] Williams D A and Lemke T L (2002) Foye's Principles of Medical Chemistry. 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Philadelphia
- [101] Capro L (1988) Hormone. Spektrum Verlag, Heidelberg
- [102] Frey H-H and Löscher W (2002) Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Enke Verlag, Stuttgart
- [103] Voet D and Voet J, G (1992) Biochemie. VCH, Weinheim
- [104] Habermehl G, Hammann P E and Krebs H C (2002) Naturstoffchemie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- [105] Cupps P T (1991) Reproduction in domestic animals. 4th edition, Academic Press Limited, San Diego
- [106] Forth W, Henschler D, Rummel W and Starke K (1998) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7. Aufl. Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- [107] Koolman J and Röhm K-H (2003) Taschenatlas der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- [108] Döcke F (1975) Veterinärmedizinische Endokrinologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- [109] West D C, Damast B L, Sarro S D and Pearson O H (1956) J Biol Chem 218: 409-418
- [110] Engel L, Alexander J and Wheeler M (1958) J Biol Chem 321: 129-164
- [111] Kleemann A and Roth H J (1983) Arzneistoffgewinnung: Naturstoffe und Derivate. Thieme, Stuttgart
- [112] www0.fh-trier.de/~lorig/uni_erlangen
- [113] Copen J J W (1979) Trop Sci 21: 125-141
- [114] Ueki M and Okano M (1999) Rapid Commun Mass Spectrom 13: 2237-2243
- [115] Ferchaud V, Le Bizec B, Monteau F and André F (1998) Analyst 123: 2617-2620
- [116] Schänzer W (1996) Clin Chem 42: 1001-1020
- [117] Bentz H (1982) Veterinärmedizinische Pharmakologie. Gustav Fischer Verlag, Jena

-
- [118] Camerino B and Sciaky R (1975) *Pharmacol Therapeut* 1: 233-275
- [119] Löscher W, Ungemach F R and Kroker R (2003) *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. 6. aktualisierte Auflage, Blackwell Verlag GmbH, Berlin
- [120] Von Faber H (1995) *Endokrinologie*. Ulmer Verlag, Stuttgart
- [121] Hershberger L G, Shipley E G and Meyer R K (1953) *P Soc Exp Biol Med* 83: 175-180
- [122] Tóth M and Zakár T (1982) *Endokrinologie* 80: 163-172
- [123] Massa R and Martini L (1974) *J Steroid Biochemist* 5: 941-947
- [124] Snow D H (1993) *Vet Clin N Am-Equine* 9: 563-576
- [125] Snochowski M, Lundström A, Dahlberg E, Petersson H and Edqvist L-E (1981) *J Anim Sci* 53: 80-90
- [126] Merck Index. 12th (1996), Merck & Co., Inc, Whitehouse Station, N.J
- [127] Debruyckere G and Peteghem V (1991) *J Chromatogr* 564: 393-403
- [128] Plumb D C (1995) *Veterinary Drug Handbook*. 2nd ed., Iowa State University Press, Ames
- [129] Dirscherl W, Kraus J and Voss H E (1936) *H-S Z Physiol Chem* 241: 1-10
- [130] Birch A (1950) *J Chem Soc*: 367-368
- [131] Parkinson A and Evans N (2006) *Med Sci Sport Exer* 38: 644-651
- [132] Geyer H, Mareck-Engelke U, Reinhart Z, Thevis M and Schänzer W (2000) *Deut Z Sportmed* 51: 378-382
- [133] Zylka-Menhorn V (2006) *Deutsches Ärzteblatt* 103: A98-A100
- [134] Schänzer W, Breidbach A, Geyer H, Van Kuk C, Nolteernsting E and Thevis M (2000). In Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck-Engelke U (ed) *Proceedings of the 18th Manfred Donike Workshop on Dope Analysis, Recent Advances in Doping Analysis (8)*, Sport und Buch, Köln, pp 155-174
- [135] Houghton E (1977) *Xenobiotica* 7: 683-693
- [136] Rote Liste(R) 2007. Rote Liste^(R) Service GmbH, Frankfurt am Main
- [137] Delta- Index 2003/2004 Loseblattsammlung. Delta-Verlag, Berlin
- [138] Wellhörner H-H (1990) *Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- [139] ABL. EG L303 vom 06.11.1997, S12

-
- [140] Dehennin L, Bonnaire Y and Plou P (2002) *J Chromatogr* 766: 257-263
- [141] Khalil M W, Morley P, Glasier M A, Armstrong D T and Lang T (1989) *J Endocrinol* 120: 251-260
- [142] Dintinger T, Gaillard J-L, Moslemi S, Zwain I and Silberzahn P (1989) *J Steroid Biochemist* 33: 949-954
- [143] Raeside J I, Renaud R L and Friendship R M (1989) *J Steroid Biochemist* 32: 729-735
- [144] Dehennin L, Jondet M and Scholler R (1987) *J Steroid Biochemist* 26: 399-405
- [145] Lund H S, Jathun S, Fedorcsák P, Storeng R, Torjesen P and Hemmersbach P (2002). In Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck U (ed) *Proceedings of the 20th Manfred Donike Workshop on Dope Analysis, Recent Advances in Doping Analysis* (10), Sport und Buch Strauß, Köln, pp 23-33
- [146] Kao Y-C, Higashiyama T, Sun X, Okubo T, Yarborough C, Choi I, Osawa Y, Simmen F A and Chen S (2000) *Eur J Biochem* 267: 6134-6139
- [147] Hanukoglu I (1992) *J Steroid Biochem* 43: 779-804
- [148] Conley J A, Corbin C J, Hinshelwood M M, Liu Z, Simpson E R, Ford J J and Harada N (1996) *Biol Reprod* 54: 497-505
- [149] Gaillard J-L (1991) *Comp Biochem Physiol* 100B: 107-115
- [150] Moslemi S, Vibet A, Papadopoulos V, Camoin L, Silberzahn P and Gaillard J-L (1997) *Comp Biochem Physiol* 118B: 217-227
- [151] Graddy L G, Kowalski A, Simmen F A, Davis S L F, Baumgartner W W and Simmen R C M (2000) *J Steroid Biochem* 73: 49-57
- [152] persönliche Mitteilung von J. Raeside
- [153] Garrett W M, Hoover D J, Shackleton C H L and Anderson L D (1991) *Endocrinology* 129: 2941-2950
- [154] Lee C M H, Tekpetey, Armstrong D T and Khalil M W (1991) *J Endocrinol* 129: 233-243
- [155] Dumasia M, Houghton E and Jackiw M (1989) *J Endocrinol* 120: 223-229
- [156] Moslemi S, Silberzahn P and Gaillard J-L (1995) *J Endocrinol* 144: 5127-525
- [157] Wright F, Bricout V, Doukani A and Bongini M (2000) *Sci Sport* 15: 111-124
- [158] Caspi E, Dharmaratne H R W and Shackleton C (1989) *J Chem Soc Commun* 22: 1699-1700
- [159] Smith S J, Cox J E, Houghton E, Dumasia M and Moss M S (1987) *J Reprod Fert Suppl* 35: 71-78

-
- [160] Meyer H D, Falckenberg D, Janowski T, Rapp M and Rösel E F (1992) *Acta Endocrinol* 126: 369-373
- [161] Clouet A, Le Bizec B, Montrade M-P, Monteau F and André F (1997) *Analyst* 122: 471-474
- [162] Sterk S, Hebold H, Blokland M, Van Rossum H, Van Ginkel L and Stephany R (1998) *Analyst* 123: 2633-2636
- [163] Mc Evoy J D G, Cooper J, Mc Caughey J W, Kennedy D G and Mc Cartan B M (1999) *Vet Quart* 21: 8-15
- [164] Mc Evoy J D G, Mc Veigh C E, Hewitt S A and Mc Caughey W J (1999) *Vet Rec* 144: 729-730
- [165] Roig M, Segura J, Pérez B, López S, Medina M, Bosch J and Ventura R (2006) Poster contribution, 5th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, May 16-19, Antwerpen
- [166] Poelmans S, De Wasch K, Noppe H, Van Hoof N, Van Cruchten S, Le Bizec B, Deceuninck Y, Sterk S, Van Rossum H J, Hoffman M K and De Brabander H F (2005) *Food Addit Contam* 22: 808-815
- [167] Prévost S, Buisson C, Monteau F, André F and Le Bizec B (2004) *Proceedings EuroResidue V: Conference on residue of veterinary drugs in food, Nordwijkerhout, 10-12 May 2004, The Netherlands*, pp 777-782
- [168] Naumer H and Heller W (1997) *Untersuchungsmethoden in der Chemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- [169] Ott M (2000) *Analytische Chemie*. Wiley-VCH, Weinheim
- [170] Meyer V R (2004) *Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie*. 9.Aufl., Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- [171] Benoit E, Garnier F, Courtot D and Delatour P (1985) *Ann Rech Vét* 16: 379-383
- [172] Bruggeman V, Room G, Vanmontfort D, Verhoeven G and Decuypere E (2003) *Gen Comp Endocrinol* 131: 106-116
- [173] Grosse J, Anielski P, Hemmersbach P, Lund H S, Müller R K, Rautenberg C and Thieme D (2005) *Steroids* 70: 499-506
- [174] Roig M, Segura J and Ventura R (2007) *Anal Chim Acta* 586: 184-195
- [175] Seinsch I, Von Kuk C, Machnik M, Siebig G, Horning S, Sigmund G, Breidbach A and Schänzer W (1999). In Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck U (ed) *Proceedings of the 17th Manfred Donike Workshop on Dope Analysis, Recent Advances in Doping Analysis (7)*, Sport und Buch Strauß, Köln, pp 353-357

-
- [176] De Brabander H, F, Poelmans S, Schilt R, Stephany R, Le Bizec B, Draisci R, Sterk S, Van Ginkel L, Courtheyn D, Van Hoof N, Macri´ A and De Wasch K (2004) *Food Additives and Contaminants* 21: 515-525
- [177] Ayotte C, Goudreault D, Lajeunesse A, Cl´eroux M, Richard Y, Charlebois A, Couture J-P and Fakirian A (2001). In Schanzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck-Engelke U (ed) *Proceedings of the 19th Manfred Donike Workshop on Dope Analysis, Recent Advances in Doping Analysis (9)*, Sport & Buch Strauß, Koln, pp 133-143
- [178] Mathurin J-C, Herrou V, Bourgogne E, Pascaud L and Cheaurriz J (2001) *J Chromatogr* 759: 267-275
- [179] Becchi M, Aguilera R, Farizon Y, Flament M-M, Casabianca H and James P (1994) *Rapid Commun Mass Spectrom* 8: 304-308
- [180] Aguilera R, Becchi M, Casabianca H, Hatton C K, Catlin D, H, Starcevic B and Pope H, G (1996) *J Mass Spectrom* 31: 169-176
- [181] Shackleton C, Roitman E, Phillips A and Chang T (1997) *Steroids* 62: 665-673
- [182] Shackleton C, Phillips A, Chang T and Li Y (1997) *Steroids* 62: 379-387
- [183] Flenker U, Horning S, Nolteernsting E, Geyer H and Schanzer W (1999). In Schanzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck U (ed) *Proceedings of the 16th Manfred Donike Workshop on Dope Analysis, Recent Advances in Doping Analysis (6)*, Sport und Buch Strauß, Koln, pp 243-256
- [184] Prei-Weigert A and Fry H Vortrag bei der Ruckstandsfachtagung am BfR am 09.02.2006
- [185] Newman A (1996) *Analytical Chemistry News and Features* 1: 373-377
- [186] Aguilera R, Becchi M, Grenot C, Casabianca H and Hatton C K (1996) *J Chromatogr* 687: 43-53
- [187] Meier-Augenstein W (1997) *LC-GC International* 10: 17-25
- [188] Rieley G (1994) *Analyst* 119: 915-919
- [189] Jones D M, Carter J F, Eglinton G, Jumeau E J and S F C (1991) *Biol Mass Spectrom* 20: 641-646
- [190] Geisler C (2002) Diplomarbeit an der Deutschen Sporthochschule Koln (DSHS)
- [191] Le Bizec B, Le Boulaire S, Montrade M-P, Maume D, Monteau F, Audusseau G and Andr´e F (1996). In Haagsma N and Ruitter A (ed) *Proceedings of Euroresidue III, Conference of Residues of Veterinary Drugs in food*, Veldhoven, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht, pp 243-247
- [192] Horning S, Geyer H, Machnik M, Schanzer W, Hilker A and Oeelmann J (1996). In Schanzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck U (ed) *Proceedings of the*

13th Manfred Donike Workshop on Dope Analysis, Recent Advances in Doping Analysis (4), Sport und Buch Strauß, Köln, pp 275-283

[193] Matthiesen U and Staib W (1977) *Chromatographia* 10: 70-74

[194] Novakovic J and Tvrzicka E (1991) *J High Res* 14: 495-198

[195] Bright G, M, Parsons W, R, Darmaun D, Rodrigues A and Haymond M, W (1993) *J Chromatogr B* 621: 1-6

[196] Rautenschlein M, Habfast K and Brand W (1990). In Chapman T E, Berger R, Reijngoud D J and Okken A (ed) *Stable isotopes in paediatric nutritional and metabolic research*, Intercept, Andover, Hampshire, pp 133-146

[197] Ricci M, Merritt D A, Freeman K and Hayes J M (1994) *Org Geochem* 21: 561-571

[198] Brand W (1996) *J Mass Spectrom* 31: 225-235

[199] Meier-Augenstein W, Watt P W and Langhans C-D (1996) *J Chromatogr A* 752: 233-241

[200] Cherrah Y, Falconnet J B, Desage M, Brazier J, L, Zini R and Tillement J P (1987) *Biomed Environ Mass* 14: 653-657

[201] Maume B F, Bournot P, Lhuguenot J C, Baron C, Barbier F, Maume G, Prost M and Padieu P (1973) *Anal Chem* 45: 1073-1082

[202] Matucha M, Jockisch W, Verner P and Anders G (1991) *J Chromatogr* 588: 251-258

[203] Kolb B (2003) *Gaschromatographie in Bildern*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim

[204] Barrie A, Bricout J and Koziat J (1984) *Biomed Mass Spectrom* 11: 583-588

[205] Schwister K, Aust E, Duré G, Groteklaes M, Stephan R and Volgnandt P (1999) *Taschenbuch der Chemie*. Fachbuchverlag Leipzig im Carl Hanser Verlag, München, Wien

[206] Mohnke M and Heybey J (1989) *J Chromatogr* 471: 37-53

[207] Arbeitsanweisung des EU-Projektes "ISOSTER-Determination of the origin of hormones in cattle, Project No. GRD1-2001-40085

[208] Grob K and Blum W (1986) *Making and Manipulating Capillary Columns for Gas Chromatography*. Hüthig Verlag, Heidelberg

[209] Macherey-Nagel *Chromatographie Edition III*: 320

[210] Hebestreit M, Flenker U, Fußhöller G, Geyer H, Güntner U, Mareck U, Piper T, Thevis M, Ayotte C and Schänzer W (2006) *Analyst* 131: 1021-1026

-
- [211] Houghton E, Teale P and Dumasia M (1984) *Analyst* 109: 273-275
- [212] Kovarich E and Munari F (1982) *J High Res Chromatog* 5: 175-181
- [213] Grob K (1987) *On-Column Injection in capillary gas chromatography*. Hüthig Verlag, Heidelberg
- [214] Bretschneider W and Werkhoff P (1988) *J High Res Chromatog* 11: 543-546
- [215] Buisson C, Prévost S, Hebestreit M, Flenker U, Fry H, Banneke S, Schänzer W, Preiß-Weigert A, André F, Le Bizec B, Heinrich K and Houghton E (2005) *J Chromatogr* 1093: 69-80
- [216] www.zds-bonn.de/section_name_publicationen.html
- [217] BGBl. I S.146 vom 30.01.1998
- [218] PV 34P20202 Steroidhormone und Stilbene in Plasma, Muskulatur, Geflügel, Shrimps, Leber, Niere, Urin und Nahrungsergänzungsmitteln. Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg
- [219] Edelhäuser M (1989) *Deut Lebensm-Rundsch* 85: 30-84
- [220] ABL. EG L 221 vom 17.08.2002, S.8
- [221] PV 34P11401 Bestimmung von Nortestosteron in Fleisch. Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg
- [222] Le Bizec B, Montrade M-P, Monteau F and André F (1993) *Anal Chim Acta* 275: 123-133
- [223] Burstein S and Lieberman S (1958) *J Biol Chem* 233: 331-335
- [224] Teale P and Houghton E (1991) *Biol Mass Spectrom* 20: 109-114
- [225] Houghton E, Grainger L, Dumasia M and Teale P (1992) *Org Mass Spectrom* 27: 1061-1070
- [226] Shackleton C, H, Livingstone J, R, B and Mitchell F, L (1968) *Steroids* 11: 299-311
- [227] Messeri G, Cugnetto G, Moneti G and Serio M (1984) *J Steroid Biochem* 20: 793-796
- [228] Graef V, Furuya E and Nishikaze O (1975) *Endocrinol Japon* 22: 449-451
- [229] Graef V and Fuchs M (1975) *Z Klin Chem Klin Bio* 13: 163-167
- [230] Graef V, Furuya E and Nishikaze O (1977) *Clin Chem* 23: 532-535
- [231] Roy a, B (1956) *Biochem J* 62: 41-50
- [232] Shibasaki H, Tanabe C, Furuta T and Kasuya Y (2001) *Steroids* 66: 795-801

-
- [233] Hartmann S and Steinhardt H (1997) Arch Lebensmittelhyg 48: 97-120
- [234] Vanluchene E, Eechaute W and Vandekerckhove D (1982) J Steroid Biochemist 16: 701-703
- [235] Massé R, Ayotte C and Dugal R (1989) J Chromatogr 489: 23-50
- [236] Tang P W and Crone D L (1989) Anal Biochem 182: 289-294
- [237] PV 32P02001 Miniaturisierte Multimethode. Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg
- [238] Lewis K M and Archer R D (1979) Steroids 34: 485
- [239] Petz M (1984) Z Lebensm Unters For 180: 267-279
- [240] Prévost S, Nicol T, Monteau F, André F and Le Bizec B (2001) Rapid Commun Mass Spectrom 15: 2509-2514
- [241] Pflieger K, Maurer H H and Weber A (1992) Mass spectral and GC data of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites, Band 3. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- [242] Zaretski Z (1976) Mass Spectrometry of Steroids. Israel University Press, Jerusalem
- [243] Hayes J M, Freeman K, Popp B N and Hoham C H (1989) Org Geochem 16: 1115-1128
- [244] Clark F A, Raeside J I and Solomon S (1965) Endocrinology 76: 427-433
- [245] Huis in 't Veld L G, Louwerens B and Reilingh W (1961) Nature 191: 175-176
- [246] Claus R and Hoffmann B (1980) Acta Endocrinol 94: 404-411
- [247] Baulieu E-E, Fabre-Jung I and Veld H (1967) Endocrinology 81: 3-38
- [248] Cawley A, Kazlauskas R, Trout G J, Rogerson J H and George a V (2005) J Chromatogr Sci 43: 32-38
- [249] Trout G J, Rogerson J H, Cawley A and Alma C W (2003) Aust J Chem 56: 175-180
- [250] Gower D (1972) J Biol Chem 3: 45-103
- [251] Raeside J (1965) Acta Endocrinol 50: 611-620
- [252] Schänzer W (1996). In Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck-Engelke U (ed) Proceedings of the 4th Manfred Donike Workshop on Dope Analysis, Recent Advances in Doping Analysis (4), Sport und Buch Strauß, Köln, pp 185-201
- [253] Van Der Merwe P J and Grobbelaar E (2002). In Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A and Mareck U (ed) Proceedings of the 20th Manfred Donike Workshop

on Dope Analysis, Recent Advances in Doping Analysis (10), Sport und Buch
Strauß, Köln, pp 253-261

[254] Claus R, Hoffmann B and Karg H (1971) J Anim Sci 33: 1293-1297

[255] PV34P11402 19-Nortestosteron und 19-Norandrostendion in Muskulatur, Fisch
und Geflügel: Screeningverfahren gemäß Entscheidung 2002/657/EG, ersetzt PV
34P11401

[256] Römpp Lexikon Lebensmittelchemie. 9.Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart

[257] Biesalski H-K, Fürst P, Kasper H, Kluthe R, Pöler W, Puchstein C and Stählin
H B (1995) Ernährungsmedizin. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

[258] Laber K E, Whary M T, Bingel S A, Goodrich J A, Smith C A and Swindle M M
(2002). In Fox J G, Anderson L C, Loew F M and Quimby F W (ed) Laboratory
animal medicine, Academic Press, San Diego, California, pp 624-625

[259] Swindle M M (1998) Surgery, Anesthesia, & Experimental Techniques in
Swine. Iowa State University Press, Ames, Iowa

[260] Bollen P J A, Hansen K A and Rasmussen H J (2000) The Laboratory Swine.
CRC Press, Boca Rotan, Florida

[261] PV 5311801 Bestimmung des Kreatiningehaltes in Fleischbrühextrakten.
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg)

[262] Ayotte C, Goudreault D and Charlebois A (1996) J Chromatogr 687: 3-25

[263] Kromidas S (1999) Validierung in der Analytik. Wiley-VCH, Weinheim

[264] www.faes.de

[265] Flenker U, Hebestreit M and Schänzer W (2006) Bericht des ISOSTER-
Ringversuches

[266] Kaiser R E, Rieder R I, Leming L, Blomberg L and Kusz P (1985) J High Res
Chromatog 8: 580-584

[267] Horii Y, Kannan K, Petrick G, Gamo T, Falandysz J and Yamashita N (2005)
Environ Sci Technol 39: 4206-4212