

Herkunftsbestimmung ausgewählter urinärer Steroide anhand des Kohlenstoffisotopenverhältnisses

Nachweis des Missbrauchs von Testosteron und Estradiol in der Rindermast
Herkunftsbestimmung von urinärem Norandrosteron in der Dopinganalytik

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Georg Moritz Albert Hebestreit

aus

Bergheim

Bonn 2007

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Galensa
2. Gutachterin: Prof. Dr. Gabriele M. König
Tag der Promotion: 10.12.2007
Erscheinungsjahr: 2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Danksagung

Meinen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Rudolf Galensa des Instituts für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn für die Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit aussprechen. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schänzer des Instituts für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln für die Überlassung des Themas und für seine Betreuung und Unterstützung sowie zahlreiche wissenschaftliche Anregungen.

Mein besonderer Dank gebührt Ulrich Flenker, dessen Unterstützung in allen(!) Belangen sowohl des Zustandekommens als auch der komponentenspezifischen Bestimmung nicht nur von Kohlenstoffisotopenverhältnissen jederzeit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Weiterhin möchte ich Herrn Georg Opfermann danken, der mit seiner offenbar unerschöpflichen chemischen und massenspektrometrisch-analytischen Fachkenntnis maßgeblich zur erfolgreichen Entwicklung der Probenaufreinigung beigetragen hat.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Biochemie, die durch ihre Unterstützung und das stets angenehme Betriebsklima wesentlich zur Freude an der Arbeit beigetragen haben; insbesondere sind hier Dr. Gregor Fußhüller (u.a. für die Durchführung der Aktivitätstests), Vassilios Gougoulidis (nicht nur für DEN PowerBurger), Dr. Ute Güntner (neben steter gegenseitiger Schokoladeversorgung auch für das Korrekturlesen), Frank Hülsemann (der mir immer den Rücken freihielt), Thomas Piper (ebenfalls für das Korrekturlesen), Dr. Carsten von Kuk (für seine Hilfe bei der quantitativen Analyse) und Yvonne Schrader (für das Bereitstellen der Kontrollurine mit exogenem Norandrosteron) zu nennen.

Ferner gilt mein Dank Dr. Stefanie Banneke des Bundesinstituts für Risikobewertung in Berlin für die Durchführung der Tierexperimente und den zahlreichen bovinen Probanden, deren Namen aufzuzählen ich nicht im Stande bin, für die Bereitstellung der Ausscheidungsurine.

Schließlich gilt mein Dank meinen Eltern und natürlich Dir, liebe Janina!

**Wer noch nie einen Fehler gemacht hat,
hat sich noch nie an etwas Neuem versucht...**

Albert Einstein

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Steroidhormone in der Rindermast	1
1.2 Nandrolon und verwandte Prohormone als Dopingmittel	3
2 GRUNDLAGEN	5
2.1 Steroide	5
2.2 Steroidhormone	8
2.2.1 Androgene	9
2.2.2 Estrogene	11
2.2.3 Gestagene	13
2.3 Stabile Isotope des Kohlenstoffs	14
2.4 Kohlenstoffisotopenfraktionierung durch Landpflanzen	15
2.5 Kohlenstoffisotopenverhältnisse von Steroiden	20
2.6 GC/C/IRMS	21
3 STRATEGIE ZUR METHODENENTWICKLUNG	26
3.1 Hydrolyse von Steroidkonjugaten	26
3.2 Flüssig/flüssig Extraktion	26
3.3 Festphasenextraktion	27
3.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	27
3.5 Derivatisierung	27
3.6 Zielanalyten	29
3.6.1 Potenzielle Zielanalyten im Rinderurin für den Nachweis der Applikation von Testosteron mittels GC/C/IRMS	30

3.6.2	Potenzielle Zielanalyten im Rinderurin für den Nachweis der Applikation von Estradiol mittels GC/C/IRMS	31
3.6.3	Potenzielle Zielanalyten zur Herkunftsbestimmung urinären Norandrosterons mittels GC/C/IRMS	32
4	EXPERIMENTELLER TEIL	34
4.1	Probenmaterial	34
4.1.1	Rinderurinproben	34
4.1.2	Humanurinproben	34
4.2	Methode zur Analyse von Rinderurinproben	35
4.3	Methodenentwicklung zur Aufarbeitung von Rinderurin	36
4.3.1	Quantifizierung der potenziellen Zielanalyten mittels GC/MS	37
4.3.2	Enzymatische Hydrolyse urinärer Steroidkonjugate	37
4.3.2.1	Kombinierte Hydrolyse von Glucuronid- und Sulfatkonjugaten	38
4.3.2.2	Hydrolyse von Glucuronidkonjugaten	38
4.3.3	Umkehr-Phasen Festphasenextraktion	38
4.3.4	Flüssig/flüssig Extraktion: Unterteilung in Androgene, Estrogene und Sulfatkonjugate	39
4.3.5	Chemische Hydrolyse der Sulfatkonjugate	39
4.3.6	Normal-Phasen Festphasenextraktion	39
4.3.6.1	Androgene	40
4.3.6.2	Estrogene	40
4.3.7	Erste semipräparative HPLC	40
4.3.7.1	Aufreinigung auf RP ₁₈ -Phase	41
4.3.7.2	Aufreinigung auf Aminopropyl-Phase	41
4.3.7.3	Aufreinigung auf Dimethylaminopropyl-Phase	42
4.3.8	Acetylierung	43
4.3.8.1	Überprüfung der Acetylierung	43
4.3.8.2	Überprüfung der kommerziell verfügbaren Acetanhydride auf Diketen als Verunreinigung	43
4.3.9	GC/MS-Analyse	44
4.3.10	Zweite semipräparative HPLC	44
4.3.11	GC/C/IRMS-Analyse	44

4.4	Methode zur Herkunftsbestimmung von Norandrosteron aus dem Humanurin	45
4.4.1	Umkehr-Phasen Festphasenextraktion	46
4.4.2	Enzymatische Hydrolyse der Glucuronide	46
4.4.3	Flüssig/flüssig Extraktion	46
4.4.4	Erste semipräparative HPLC	47
4.4.5	Zweite semipräparative HPLC	48
4.4.6	GC/C/IRMS-Analyse	49
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	51
5.1	Methodenentwicklung für die Herkunftsbestimmung von Steroiden im Rinderurin mittels GC/C/IRMS	51
5.1.1	Auswahl der Zielanalyten mittels quantitativer GC/MS-Analyse	51
5.1.1.1	Endogene Referenzverbindungen	51
5.1.1.1.1	Androstendiol	52
5.1.1.1.2	DHEA	56
5.1.1.2	Testosteron-Metaboliten	60
5.1.1.2.1	Etiocholanolon	61
5.1.1.2.2	Epitestosteron	62
5.1.1.2.3	Epiandrosteron	64
5.1.1.2.4	5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol	65
5.1.1.2.5	5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol	66
5.1.1.3	Estradiol-Metaboliten	68
5.1.1.4	Zusammenfassung der Zielanalyten	70
5.1.2	Kalkulation des Aufarbeitungsvolumens	72
5.1.3	Hydrolyse der Steroidkonjugate	72
5.1.4	Umkehr-Phasen Festphasenextraktion	76
5.1.5	Flüssig/flüssig Extraktion: Unterteilung in Androgene, Estrogene und Sulfatkonjugate	76
5.1.6	Normal-Phasen Festphasenextraktion	77
5.1.7	Erste semipräparative HPLC	85
5.1.7.1	Aufreinigung auf RP ₁₈ -Phase	85
5.1.7.2	Aufreinigung auf Aminopropyl-Phase	86
5.1.7.3	Aufreinigung auf Dimethylaminopropyl-Phase	91

5.1.8	Acetylierung _____	96
5.1.9	GC/MS-Analyse _____	100
5.1.10	Zweite semipräparative HPLC auf RP ₁₈ -Phase _____	101
5.1.11	Optimierung der Anwendung des KAS für die GC/C/IRMS _____	104
5.2	Validierung der Methode zur Herkunftsbestimmung der ausgewählten Steroide im Rinderurin mittels GC/C/IRMS _____	107
5.2.1	Spezifität _____	107
5.2.2	Präzision der Bestimmung der ¹³ C/ ¹² C-Verhältnisse von acetylierten Steroid-Standards _____	107
5.2.3	Präzision der Bestimmung der ¹³ C/ ¹² C-Verhältnisse der acetylierten Zielanalyten in Rinderurinproben _____	108
5.2.4	Referenzbereiche für die $\Delta\delta$ -Werte zwischen den Metaboliten und den endogenen Referenzverbindungen _____	111
5.2.4.1	Etiocholanolon-acetat und DHEA-acetat _____	113
5.2.4.2	Epitestosteron-acetat und DHEA-acetat _____	114
5.2.4.3	Epiandrosteron-acetat und DHEA-acetat _____	115
5.2.4.4	5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat _	116
5.2.4.5	5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat _	117
5.2.4.6	17 α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat _____	118
5.2.4.7	Zusammenfassung der Referenzbereiche _____	118
5.3	Anwendung der Methode zum Nachweis der Applikation von Testosteron und Estradiol aus dem Rinderurin _____	120
5.3.1	Testosteronnachweis anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen Etiocholanolon-acetat und DHEA-acetat _____	120
5.3.2	Testosteronnachweis anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen Epitestosteron-acetat und DHEA-acetat _____	123
5.3.3	Testosteronnachweis anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen Epiandrosteron-acetat und DHEA-acetat _____	124
5.3.4	Testosteronnachweis anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat _____	126
5.3.5	Testosteronnachweis anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen 5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat _____	128

5.3.6	Estradiolnachweis anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen 17α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat	130
5.3.7	Zusammenfassung der Nachweisbarkeit der Applikation von Testosteron oder Estradiol mittels GC/C/IRMS	132
5.4	Validierung der Methode zur Herkunftsbestimmung von Norandrosteron im Humanurin	135
5.4.1	Spezifität	136
5.4.2	Wiederholbarkeit	139
5.4.3	Reproduzierbarkeit	140
5.4.4	Richtigkeit	144
5.4.5	Analyse von Dopingkontrollproben	146
6	ZUSAMMENFASSUNG	151
6.1	Nachweis des Missbrauchs von Testosteron und Estradiol in der Rindermast	151
6.2	Herkunftsbestimmung von urinärem Norandrosteron in der Dopinganalytik	155
7	LITERATURVERZEICHNIS	157
8	VORVERÖFFENTLICHUNGEN	166
8.1	Publikationen	166
8.2	Tagungsbeiträge	166
9	ANHANG	167
9.1	Urinproben und Ausscheidungsversuche von Rindern	167
9.2	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$-Werte der acetylierten Zielanalyten in Rinderurinproben	173
9.3	Humanurinproben	176
9.3.1	Kontrollproben mit Norandrosteron bekannter Herkunft	176
9.3.2	Dopingkontrollproben	176

9.4	Reagenzien, Lösungsmittel und Geräte	178
9.5	Abbildungsverzeichnis	184
9.6	Tabellenverzeichnis	191
10	LEBENS LAUF	193

Abkürzungsverzeichnis

α	Fraktionierungsfaktor
a	Fraktionierung bei der Diffusion von atmosphärischem CO ₂ in die Spaltöffnung der Pflanze
AND	Androsteron
Androstendiol	Androst-5-en-3 β ,17 α -diol
b	Fraktionierung von CO ₂ bei der Carboxylierung
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
CoC	Cool on Column
DHEA	Dehydroepiandrosteron
EI	Elektronenstoß (für <i>electron impact</i>)
EpiA	Epiandrosteron
EpiT	Epitestosteron
ERC	endogene Referenzverbindung (für <i>endogenous reference compound</i>)
ETIO	Etiocholanolon
FG-Fraktion	„freie“ (nicht konjugierte) und glucuronidierte Steroide enthaltende Fraktion
GC/C/IRMS	Gaschromatographie/Verbrennung/Isotopenverhältnismassenspektrometrie (für <i>gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (für <i>high performance liquid chromatography</i>)
KAS	Kaltaufgabesystem
LLE	flüssig/flüssig Extraktion (für <i>liquid/liquid extraction</i>)
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
M	molar
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid
M _w	Molekulargewicht
N	Anzahl
NA	19-Norandrosteron
NE	19-Noretiocholanolon
NP	Polare Phase (für <i>normal phase</i>)

p_a	CO ₂ -Partialdruck der die Pflanze umgebenden Luft
p_i	interzellulärer CO ₂ -Partialdruck
PDB	<i>Pee Dee Belemnite</i>
PEPC	Phosphoenolpyruvat-carboxylase
R	Verhältnis der Anzahl des selteneren zum häufigeren Isotop
RP	Umkehr-Phase (für <i>reversed phase</i>)
RT	<i>Retention</i>
RUBISCO	Ribulosebisphosphat-carboxylase/-oxygenase
S-Fraktion	Sulfatierte Steroide enthaltende Fraktion
SPE	Festphasenextraktion (für <i>solid phase extraction</i>)
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
VPDB	<i>Vienna Pee Dee Belemnite</i>
WADA	Welt Anti-Doping Agentur

1 Einleitung

Natürlich vorkommende Steroidhormone üben sowohl beim Menschen als auch im Tier- und Pflanzenreich verschiedene regulative Funktionen aus. Hierzu gehören bei Säugetieren vor allem die Sexualhormone und die Corticosteroide. Einige der körpereigenen Steroidhormone weisen proteinanabole und damit muskelaufbauende Wirkung auf. Daher kommen sie sowohl als Masthilfsmittel in der Viehwirtschaft als auch im Sport zur Leistungssteigerung zur Anwendung.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der exogenen oder endogenen Herkunft ausgewählter urinärer Steroide anhand der komponentenspezifischen Analyse der Verhältnisse der stabilen Kohlenstoffisotope, um einerseits den Nachweis einer Anwendung von Testosteron oder Estradiol als Masthilfsmittel beim Rind in der Viehwirtschaft und andererseits über die Herkunft urinären Norandrosterons den Nachweis der Anwendung von Nandrolon oder verwandten Prohormonen als Dopingmittel im Sport zu erbringen.

1.1 ***Steroidhormone in der Rindermast***

Sowohl die weiblichen Sexualhormone, die Estrogene, als auch die männlichen Sexualhormone, die Androgene, werden seit mehreren Jahrzehnten in der Rindermast eingesetzt (Rumsey *et al.* 1999; ZoBell *et al.* 2000). In Abhängigkeit von Geschlecht, Alter und Nahrung können sie die Futterumsetzung, Stickstoffretention und Proteinsynthese vor allem bei Rindern mit geringer endogener Hormonproduktion wie beispielsweise Ochsen, Kälbern und Färsen verbessern sowie die Fettdepotbildung reduzieren (u.a. Meyer 2001; van der Wal und Berende 1983).

Im Gegensatz zu einigen Ländern wie Kanada oder den USA wurde in der EU die Anwendung hormonaler Wachstumsförderer in der Tiermast aufgrund des vorsorglichen gesundheitlichen Verbraucherschutzes und möglicher Beeinträchtigungen der Qualität des Fleisches zunächst eingeschränkt (Richtlinie 81/602/EWG) und schließlich verboten (Richtlinie 88/146/EWG). Diese Richtlinien wurden 1996 ersetzt und zusammengefasst (Richtlinie 96/22/EG) und im Jahr 2003 ergänzt (Richtlinie 2003/74/EG). In Folge dieser Richtlinien kam es aufgrund eines Importverbots hormonbehandelter Rinder bzw. deren Produkten seit 1989 zu einem Handelsstreit zwischen der EU und insbesondere Kanada und den USA u.a. vor der

WTO. Durch den Abschluss des WTO-Streitbeilegungsverfahrens ist diese Auseinandersetzung zu einem (vorläufigen) Ruhepunkt gekommen. Ausführlich ist dieser Streit in der Literatur beschrieben, insbesondere auch im Hinblick auf die Schwierigkeiten einer Risikobewertung durch hormonale Wachstumsförderer in der Tiermast für den Verbraucher (u.a. Europäische Kommission; Schröter 2002).

Die Kontrolle der Einhaltung der Regelungen sowohl innerhalb der EU als auch bezüglich der Einfuhr aus Drittländern bedarf geeigneter Methoden zum Nachweis einer Hormonbehandlung. Während sich der Nachweis xenobiotischer Hormone z.B. durch massenspektrometrische Identifikation nach chromatographischer Trennung dieser körperfremden Stoffe oder deren Metaboliten relativ einfach gestaltet, bedarf der Nachweis einer Testosteron- oder Estradiolbehandlung einer anderen Strategie, da der Körper diese Steroide auch selbst produziert. Absolute Grenzwerte bezüglich dieser Hormone oder deren Metaboliten in verschiedenen Geweben oder Exkrementen erscheinen aufgrund der natürlichen Schwankungen in Abhängigkeit von den speziellen Umständen jedes einzelnen Tiers (Alter, Geschlecht, Nahrung etc.) kaum sinnvoll. Zu Screeningzwecken ist eine Diskriminanzanalyse über das Steroidprofil denkbar. Im Dopingbereich gilt beispielsweise ein erhöhtes Testosteron/Epitestosteron-Verhältnis im Urin von derzeit größer als vier als verdächtig (WADA 2007). Bei Rindern haben hierzu ebenfalls Untersuchungen stattgefunden (u.a. Angeletti *et al.* 2006; Arts *et al.* 1990; Arts *et al.* 1991), allerdings mit nur mäßigem Erfolg, da mit diesem Quotienten kaum ein Schluss auf eine Hormonbehandlung gezogen werden konnte. Der Grund hierfür ist sicherlich darin zu finden, dass bei Rindern im Gegensatz zum Menschen der Metabolismus zum Epitestosteron (EpiT) nicht unabhängig vom Testosteron ist. Auch im Dopingbereich gilt das genannte Testosteron/Epitestosteron-Verhältnis nicht als Nachweis. Bis vor kurzem bedurfte es bei einem erhöhten Verhältnis (bis Ende 2004 größer als sechs) aufwändiger endokrinologischer Untersuchungen mit dem Athleten, um den Ursprung dieses abnormen Verhältnisses unzweifelhaft zu klären und physiologische oder pathologische Ursachen von Doping zu unterscheiden.

Eine vielversprechende Strategie zum Nachweis einer Applikation natürlicher Steroide ist die komponentenspezifische Kohlenstoffisotopenanalyse. Anhand des Vergleichs des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses ausgesuchter Verbindungen mit denjenigen endogener Referenzverbindungen (ERC für *endogenous reference compound*) lässt sich die körpereigene oder körperfremde Herkunft dieser Verbindungen bestimmen

(Schmidt *et al.* 1993). Im Dopingbereich wurde diese Strategie erfolgreich umgesetzt (Becchi *et al.* 1994) und findet in den Regeln der Welt Anti-Doping Agentur (WADA) Anwendung. Im Bereich der hormonalen Masthilfsmittel beim Rind gibt es einleitende Untersuchungen, die zeigen, dass die Anwendung dieser Strategie auf Rinderurin (Ferchaud *et al.* 1998; Ferchaud *et al.* 2000b; Prévost *et al.* 2001) oder Galle (Mason *et al.* 1998) zum Nachweis einer Testosteron-Applikation grundsätzlich möglich ist.

Das erste Ziel dieser Arbeit ist es, im Rahmen des EU-Projekts „ISOSTER – Determination of the Origin of Hormones in Cattle“ (Funded by the European Commission under the Competitive and Sustainable Growth Programme, Project No. GRD1-2001-40085) auf Basis der vorhandenen Arbeiten eine Aufreinigungsprozedur zur anschließenden Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse ausgewählter urinärer Steroide mittels Gaschromatographie/Verbrennung/Isotopenverhältnismassenspektrometrie (GC/C/IRMS für *gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry*) zu entwickeln. Weiterführend soll anhand des Vergleichs dieser Isotopenverhältnisse der Missbrauch sowohl von Testosteron als auch von Estradiol in der Rindermast nachgewiesen werden.

1.2 Nandrolon und verwandte Prohormone als Dopingmittel

Versuche, den Begriff Doping umfassend zu definieren, sind an Formulierungsschwierigkeiten gescheitert, da es nicht gelingt, die Inhalte der verbotenen Wirkstoffe und Methoden der unphysiologischen oder unfairen Leistungssteigerung zusammenzufassen und von physiologischen Methoden und Wirkstoffen (z.B. die Aufnahme von Nahrung oder Nahrungsergänzungsmitteln) oder notwendigen medizinischen Behandlungen zweifelsfrei abzugrenzen. Die WADA hat dieses Problem dadurch umgangen, dass sie Doping als Verstoß gegen die eigenen Regeln definiert (WADA 2003). Als Verstoß gegen diese Anti-Doping-Bestimmungen gilt u.a. die Anwendung von verbotenen Wirkstoffen bzw. das Vorhandensein solcher Wirkstoffe oder Metaboliten in den Körperflüssigkeiten (z.B. Urin, Blut) eines Athleten. Zu diesen Wirkstoffen gehören die anabolen androgenen Steroide wie z.B. das 19-Nortestosteron (WADA 2007), die seit den olympischen Spielen von 1976 in Montréal verboten sind. Die proteinanabole Wirkung des 19-Nortestosteron bzw. Nandrolon ist seit den 1930er Jahren bekannt (Butenandt und Tscherning 1934). Die Anwendung durch Athleten wurde in den späten 1950er Jahren aufgrund der leistungssteigernden Wirkung populär (Haupt und Rovere 1984).

Sowohl Nandrolon als auch die ebenfalls missbräuchlich anwendbaren verwandten Prohormone wie z.B. 19-Norandrostendiol oder 19-Norandrostendion werden, im Falle der Prohormone ebenfalls über das Nandrolon (Schrader und Schänzer 2004; Schrader *et al.* 2006), hauptsächlich zu 19-Norandrosteron (NA) und 19-Noretiocholanolon (NE) metabolisiert. Sie werden zumeist als Konjugate ausgeschieden (Schänzer *et al.* 2000). Ein Dopingverstoß gilt dann als erwiesen, wenn die urinäre NA-Konzentration (nach eventueller Dichtekorrektur) 2 ng/mL überschreitet, da der menschliche Körper diese Mengen unter normalen physiologischen Umständen nicht selbst synthetisieren kann (WADA 2004a). Zusätzlich muss bei Dopingkontrollproben weiblicher Athleten zum einen über das humane Choriongonadotrophin eine Schwangerschaft als mögliche Ursache für die Bildung von endogenem NA ausgeschlossen werden. Zum anderen tritt NA als Nebenmetabolit des in vielen Kontrazeptiva vorhandenen 19-Norethisterons auf (de Boer *et al.* 1988); diese NA-Herkunft kann allerdings über den Hauptmetaboliten Tetrahydronorethisteron nachgewiesen werden und auf diese Weise von einem Dopingverstoß abgegrenzt werden (WADA 2004a).

Die Frage, inwieweit 19-Norsteroiden wie NA endogener Herkunft sein können, wurde intensiv diskutiert und umfassend dargelegt (Bricout und Wright 2004). Jüngste Erkenntnisse zeigen jedoch, dass neben den in Betracht gezogenen möglichen Ursachen (z.B. intensive körperliche Anstrengung, Intermediate während der Biosynthese der Estrogene) in sehr seltenen Fällen eine demethylierende Aktivität im Urin vorhanden sein kann, die endogene Steroide wie Androsteron (AND) oder Etiocholanolon (ETIO) in die entsprechenden 19-Norsteroiden (NA bzw. NE) umzuwandeln vermag (Grosse *et al.* 2005; Thieme *et al.* 2004). NA-Konzentrationen in Dopingkontrollproben von bis zu 2,2 ng/mL wurden auf diese demethylierende Aktivität zurückgeführt.

Das zweite Ziel dieser Arbeit ist die Erarbeitung einer Methode zur Bestimmung des Kohlenstoffisotopenverhältnisses von urinärem NA im unteren ng/mL-Bereich. Anhand des Vergleichs mit Androsteron als ERC soll, wie in Kap. 1.1 dargelegt, die endogene oder exogene Herkunft von urinärem NA ermittelt werden, um ein Dopingvergehen eindeutig von physiologischen Ursachen zu unterscheiden.

2 Grundlagen

2.1 Steroide

Allen Steroiden gemein ist das tetracyclische Ringsystem des Gonans (s. Abb. 1).

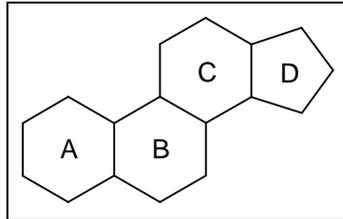


Abb. 1: Steroidgrundgerüst des Gonans

Sie liegen weitgehend planar in der thermodynamisch stabilen sog. Sesselkonformation vor. Ausgehend von dieser Konformation wird konventionsgemäß der untere Halbraum als α -Halbraum und der obere als β -Halbraum bezeichnet und entsprechende funktionelle Gruppen als α - bzw. β -ständig. Man unterscheidet die sog. 5α -Reihe, in der die Ringe A und B (s. Abb. 1) eine *trans*-Verknüpfung aufweisen von der 5β -Reihe, in der die beiden Ringe *cis*-verknüpft vorliegen (s. Abb. 2).

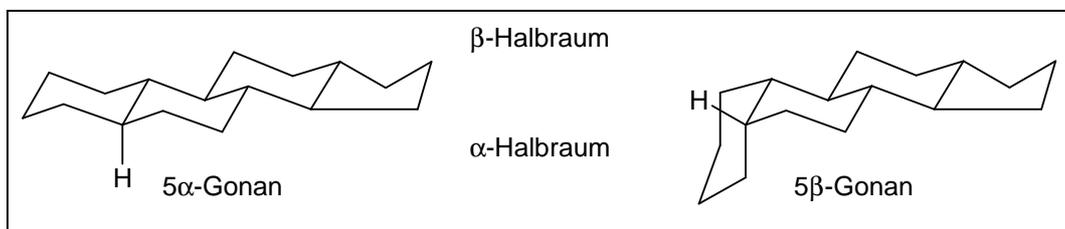


Abb. 2: Konformationsbezeichnung des α - bzw. β -Halbraums am Beispiel des Gonans

Abb. 3 zeigt sowohl die Strukturformel als auch beispielhaft die Nummerierung der Kohlenstoffatome anhand des Cholesterins; neben dem Trivialnamen ist auch die Bezeichnung Cholest-5-en-3 β -ol korrekt.

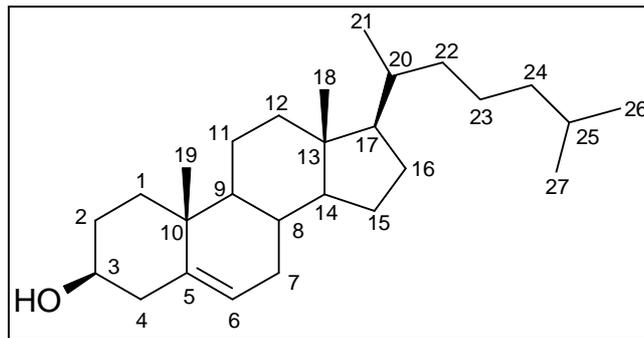


Abb. 3: Strukturformel des Cholesterins

Cholesterin ist das wichtigste Steroid der Wirbeltiere und kommt in allen Organen vor. Es weist keine nennenswerten physiologischen Wirkungen auf, ist aber Ausgangspunkt für die Synthese aller weiteren endogenen Steroide. Sofern nicht über die Nahrung aufgenommen erfolgt die Biosynthese aus Acetyl-Coenzym A (vgl. Michal 1999).

Zunächst wird aus Acetyl-Coenzym A über Mevalonat nach anschließender Decarboxylierung Isopentenylidiphosphat gebildet, welches im Gleichgewicht mit Dimethylallyldiphosphat steht. Die beiden letztgenannten Moleküle bilden zunächst das Terpen Geranylidiphosphat und nach der Addition eines weiteren Isopentenylidiphosphat-Moleküls das Sesquiterpen Farnesylidiphosphat (s. Abb. 4).

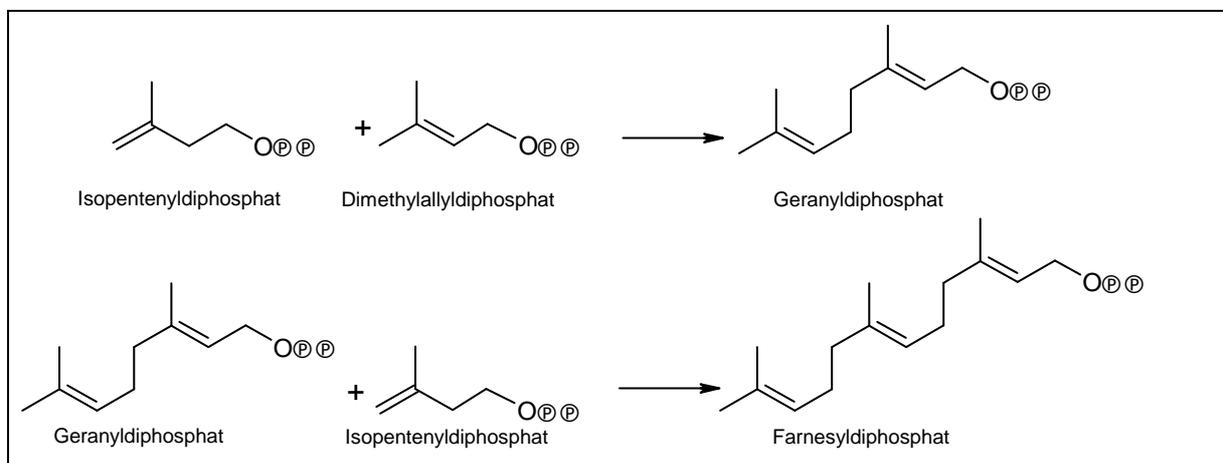


Abb. 4: Biosynthese des Farnesylidiphosphats über Geranylidiphosphat

Eine Schwanz-Schwanz-Kondensation zweier Moleküle Farnesylidiphosphat ergibt als wichtiges Zwischenprodukt das Triterpen Squalen (Abb. 5).

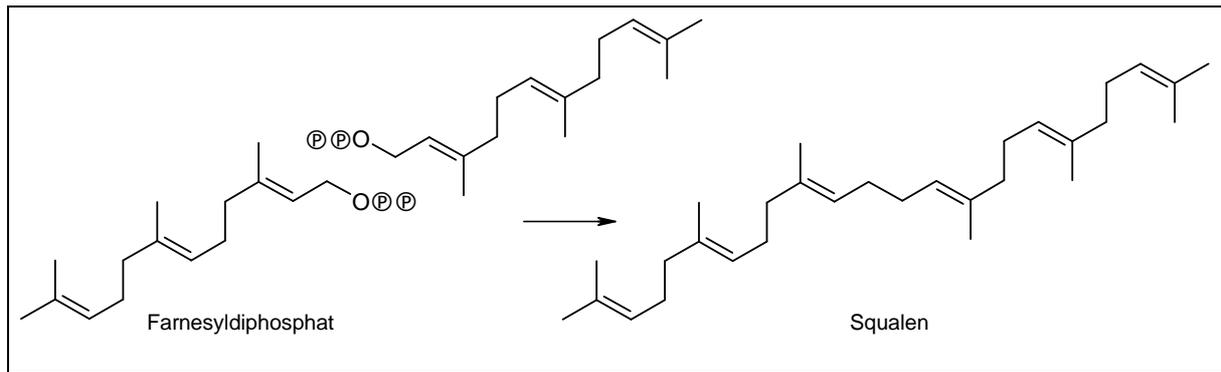


Abb. 5: Biosynthese des Squalens

Die weiteren Biosyntheseschritte des Cholesterins verlaufen bei grünen Pflanzen über Cycloartenol und bei Tieren über Lanosterin (Abe *et al.* 1993).

Abb. 6 zeigt die Biosynthese des Lanosterins aus dem Epoxid des Squalens.

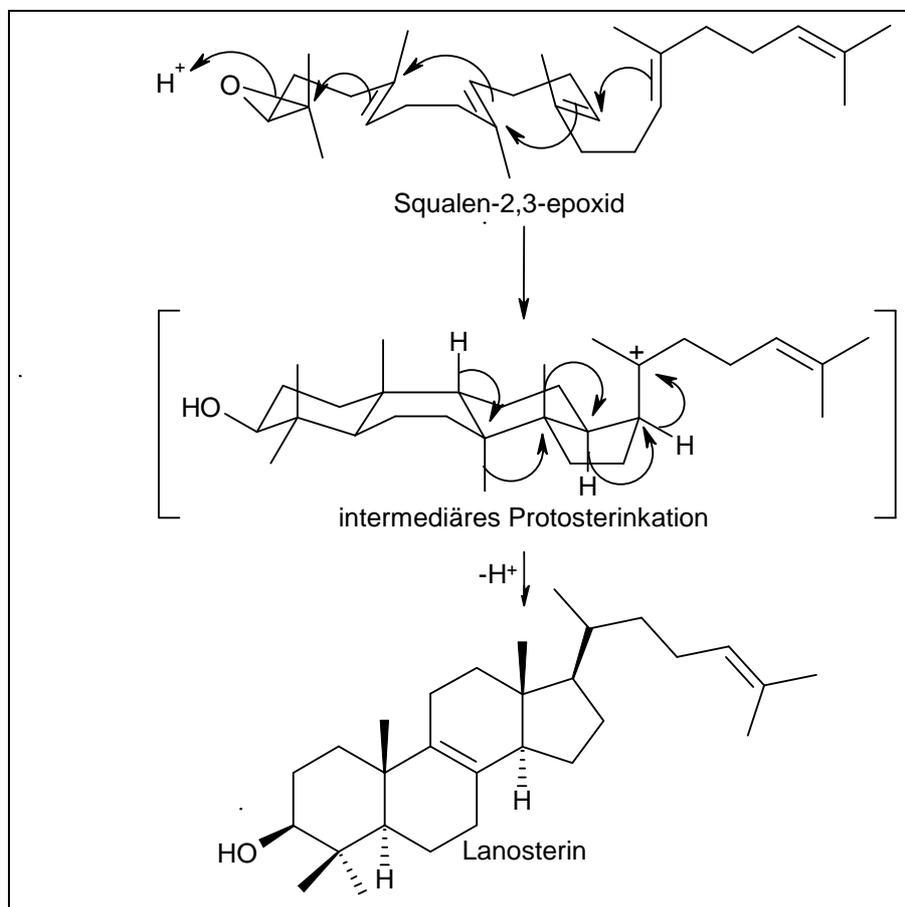


Abb. 6: Biosynthese des Lanosterins

Die nach enzymatischer Epoxidierung und geeigneter Faltung des Squalens erfolgende Ringbildung führt zunächst zu einem intermediären Protosterinkation und nach mehrfacher Wagner-Meerwein-Umlagerung zum Lanosterin (vgl. Wendt *et al.* 2000). Ausgehend vom Lanosterin erfolgt die weitere Biosynthese nach dreifacher

Demethylierung über zahlreiche Hydrierungs- und Dehydrierungsreaktionen in 19 Schritten schließlich zum Cholesterin (s. Abb. 3).

2.2 Steroidhormone

Der Phase-I Metabolismus des Cholesterins, also derjenige am Steroidgerüst, ist für Wirbeltiere gut beschrieben (z.B. Michal 1999). Er führt neben den in dieser Arbeit weniger interessanten Gallensäuren oder Vitamin D-Metaboliten nach dem partiellen Entfernen der Seitenkette des Cholesterins über Pregnenolon (vgl. Abb. 7, S. 10) zu den Steroidhormonen.

Es werden die Mineralo- und Glucocorticosteroide mit 21 Kohlenstoffatomen, die hauptsächlich in der Nebennierenrinde gebildet werden, von den aufgrund ihrer möglichen proteinanabolen Wirkung hier interessierenden Sexualhormonen unterschieden. Neben den in Kap. 1.1 erwähnten Androgenen (19 Kohlenstoffatome) und Estrogenen (18 Kohlenstoffatome) sind die Schwangerschaftshormone, die sog. Gestagene, mit 21 Kohlenstoffatomen zu nennen. Die Sexualhormone steuern u.a. die Ausbildung der primären und sekundären Geschlechtsorgane und üben verschiedene Funktionen während der Schwangerschaft aus.

Bei Säugetieren erfolgt die Aktivierung der Steroidhormone in der Regel über eine dreistufige Kaskade, die vom Hypothalamus ausgeht, der sog. Releasing-Hormone freisetzt. Dadurch kommt es im Hypophysenvorderlappen zur Freisetzung trophischer Hormone, die über das Blut zu den peripheren Geweben (hauptsächlich Nebennieren, Hoden und Ovarien) transportiert werden und dort die Sekretion der Steroidhormone auslösen. Der Transport zu den unterschiedlichen Erfolgsorganen, wo dasselbe Hormon verschiedene Gene aktivieren kann, erfolgt über das Blut, in dem die lipophilen Steroide an Plasma-Trägerproteine gebunden sind. Die Sexualhormone üben neben den primären Funktionen zusätzlich einen Rückkopplungseffekt auf Hypothalamus und Hypophyse aus, so dass die genannte Reaktionskaskade nur kurzzeitig aktiviert ist und der Konzentrationsanstieg der Hormone begrenzt ist. Im Phase-II Metabolismus werden die fettlöslichen Steroide durch Sulfatierung oder Glucuronidierung harngängig und können über die Niere ausgeschieden werden. Steroide liegen im Urin also zumeist als Glucuronide oder Sulfate vor; die Polareren werden zum Teil auch nicht konjugiert ausgeschieden.

2.2.1 Androgene

Bei männlichen Säugetieren entsteht der überwiegende Anteil der Androgene in den Leydig-Zellen der Hoden. Geringe Mengen können zudem in der Nebennierenrinde und bei weiblichen Säugetieren auch in den Ovarien und der Plazenta gebildet werden. Sie gelten als Zwischenprodukte bei der Biosynthese der Estrogene in den entsprechenden Organen. Physiologische Wirkung üben Androgene u.a. bei der sexuellen Differenzierung im Embryo aus oder bei der Ausbildung und Funktion vieler Organe (z.B. Leber, Gehirn, Hoden). Die missbräuchliche Anwendung der Androgene sowohl als Dopingmittel im Leistungssport als auch als Masthilfsmittel resultiert, wie in Kap. 1.1 und 1.2 bereits erwähnt, aus der möglichen proteinanabolen, also muskelaufbauenden Wirkung, woraus sich der Begriff *anabole androgene Steroide* ableitet.

Natürliche androgene Steroide besitzen in der Regel 19 Kohlenstoffatome, da die Seitenkette an Position 17 vollständig entfernt ist. Funktionelle Gruppen (zumeist Alkohole oder Ketone) befinden sich vorwiegend an den Positionen 3 und 17. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass künstliche anabole Steroide auch Heteroatome (z.B. Stanozolol) oder mehr oder weniger als 19 Kohlenstoffatome (z.B. 18 Kohlenstoffatome im Falle des Nandrolons) enthalten können. Als wichtigstes körpereigenes männliches Sexualhormon ist das Testosteron zu nennen, wengleich 5α -Dihydrotestosteron als Intermediat häufig einen stärkeren androgenen Effekt erzielt als das Testosteron. Die wichtigsten Schritte der Biosynthese des Testosterons sind Abb. 7 zu entnehmen (u.a. Forest 1989; Michal 1999; Mutschler 1996).

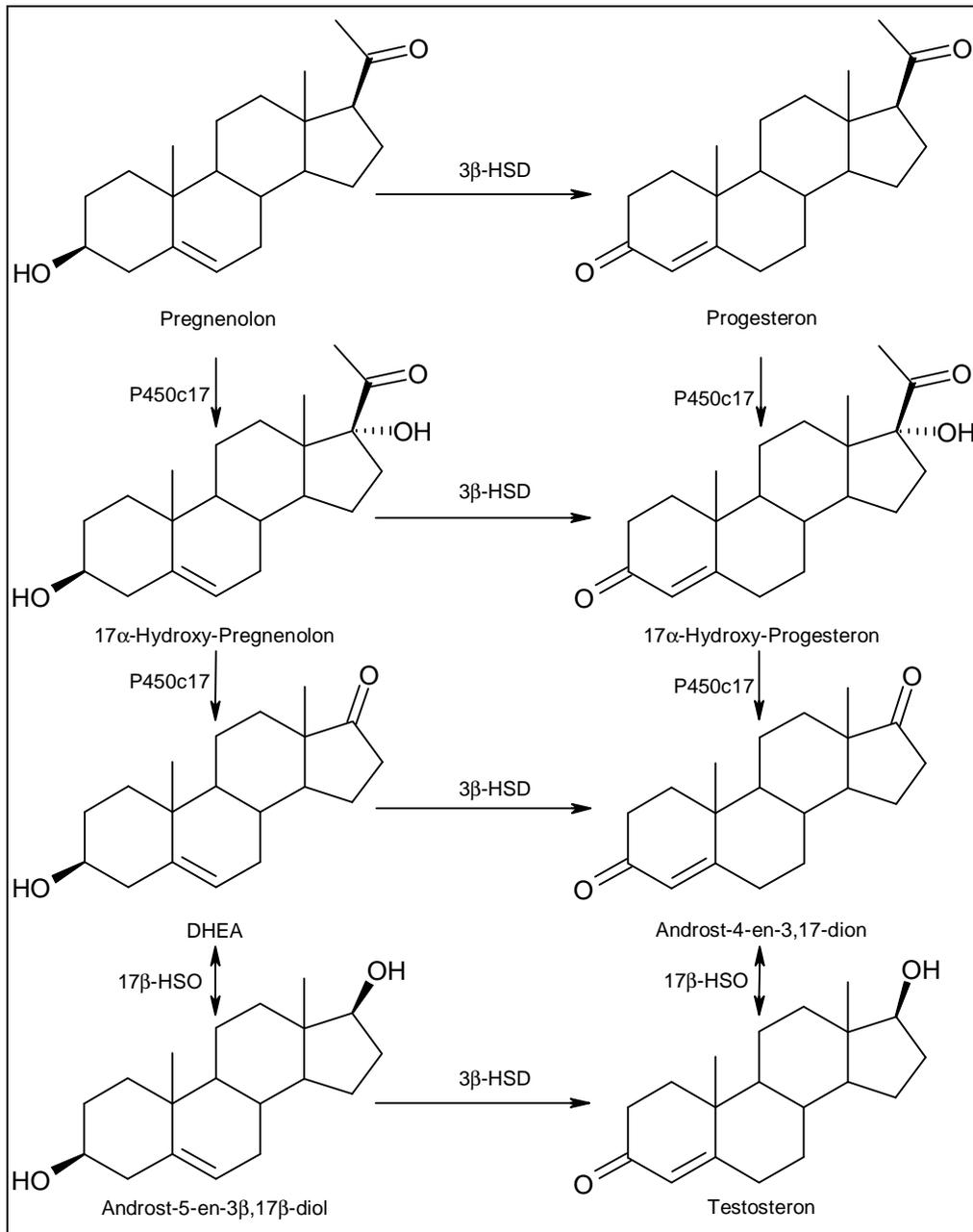


Abb. 7: Biosynthese des Testosterons; die abgekürzten Enzyme sind die 17α -Hydroxylase der Zytochrom P450-Enzymreihe (P450c17), die 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Isomerase (3β -HSD) und die 17β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase (17β -HSD)

Testosteron kann aus Pregnenolon über den sog. Δ^5 -Weg oder aus Progesteron über den sog. Δ^4 -Weg synthetisiert werden. In beiden Fällen erfolgt zunächst durch die 17α -Hydroxylase der Zytochrom P450-Enzymreihe in Position 17 eine Hydroxylierung, was zu 17α -Hydroxy-Pregnenolon bzw. 17α -Hydroxy-Progesteron führt. Die Seitenkette wird durch dasselbe Enzym oxidativ entfernt und liefert Androst-4-en-3,17-dion (Δ^4 -Weg) als letzte Zwischenstufe zum Testosteron und entsprechend Dehydroepiandrosteron (DHEA) auf dem Δ^5 -Weg. DHEA wird über

Androst-5-en-3 β ,17 β -diol zum Testosteron metabolisiert. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die enzymatisch katalysierten Reaktionen der Ketogruppen an Position 17 zum jeweiligen Alkohol durch die 17 β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase reversibel sind; die Reaktionen vom Δ 5-Weg mittels 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Isomerase zum Δ 4-Weg hingegen sind irreversibel (Forest 1989). An Position 5 ungesättigte Androgene wie DHEA können also keine Metaboliten von den an Position 4 ungesättigten Androgenen wie Testosteron darstellen. Letzteres ist für die Auswahl der endogenen Referenzverbindungen beim Testosteronnachweis zu beachten.

2.2.2 Estrogene

Die weiblichen Sexualhormone werden überwiegend in den Granulosazellen der Ovarien gebildet. Zu einem geringen Teil werden sie auch in der Nebennierenrinde und in den Sertoli-Zellen der Hoden synthetisiert. Die periphere Estrogensynthese findet in Fettgewebe, Muskeln, Leber und Gehirn (beim männlichen Geschlecht die wichtigste Estrogenquelle (Michal 1999)) statt. Physiologische Wirkung üben Estrogene u.a. bei der Entwicklung der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale aus und im Zusammenspiel mit den Gestagenen beim Menstruationszyklus. Die missbräuchliche Anwendung von Estrogenen in der Rindermast beruht, wie in Kap. 1.1 bereits erwähnt, auf der in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Nahrung möglichen proteinanabolen Wirkung, erhöhter Stickstoffretention und somit besserer Futterverwertung (Rumsey und Hammond 1990; Rumsey *et al.* 1999; ZoBell *et al.* 2000).

Natürliche Estrogene werden aus den Androgenen in der sog. Aromatasereaktion synthetisiert. Sie sind an Position 10 demethyliert und bestehen aus 18 Kohlenstoffatomen. Die Estrogene weisen einen aromatischen A-Ring auf, eine phenolische OH-Gruppe an Position 3 und mindestens eine weitere funktionelle Gruppe an Position 17. Als wichtigste körpereigene Estrogene sind das 17 β -Estradiol mit der höchsten Estrogenaktivität und das Estron zu nennen, deren Biosynthese aus Testosteron bzw. Androst-4-en-3,17-dion in Abb. 8 vereinfacht dargestellt ist.

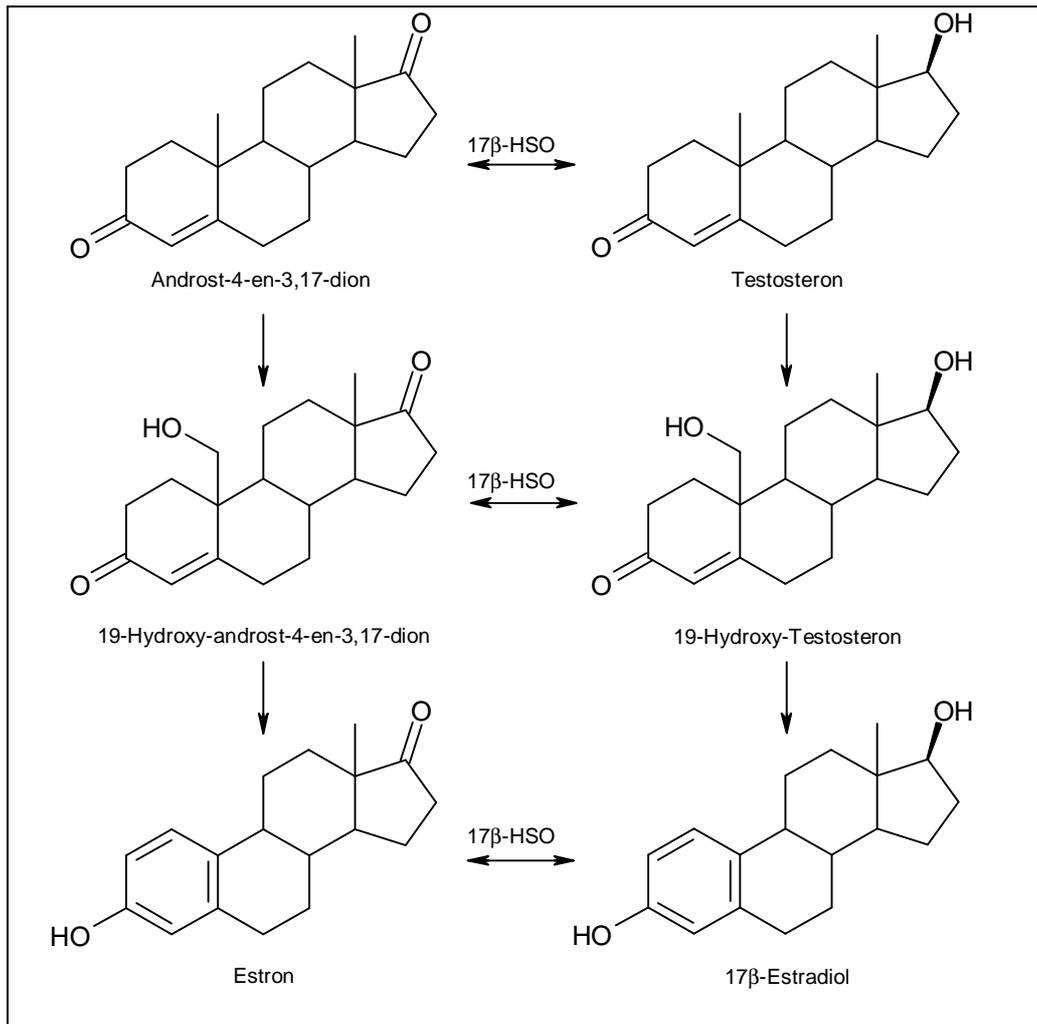


Abb. 8: Übersicht der Aromatasereaktion zur Biosynthese des Estrons und des 17β -Estradiols; das abgekürzte Enzym ist die 17β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase (17β -HSD)

Die gezeigte Reaktion wird von oben nach unten über die sog. Aromatase (einem Zytochrom P450-Enzymkomplex) katalysiert und ist irreversibel. Es erfolgt zunächst eine Hydroxylierung am Kohlenstoff 19 zu 19-Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion bzw. 19-Hydroxy-Testosteron. Die anschließende Oxidation und Formiateliminierung geht einher mit der Aromatisierung des A-Rings und Reduktion der 3-Ketofunktion zum Alkohol. Diese komplexe enzymatische Reaktion ist nicht vollständig geklärt. Sie führt zu Estron bzw. 17β -Estradiol. Die enzymatisch durch die 17β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase katalysierte Umwandlung der 17-Ketogruppe in die 17-OH-Gruppe verläuft, wie bei den Androgenen in Abb. 7 (S. 10), reversibel. Der Vollständigkeit halber ist als weiteres Estrogen das Estriol (16-Hydroxy-Estradiol) zu nennen, welches aus DHEA über eine ähnliche Reaktion oder aus Estron während der Schwangerschaft gebildet wird.

2.2.3 Gestagene

Als einziges aktives Gestagen bei weiblichen Säugern spielt Progesteron eine entscheidende Rolle (Strukturformel in Abb. 7, S. 10). Es wird aus Pregnenolon (ebenfalls in Abb. 7) synthetisiert und im Gelbkörper der Ovarien oder während der Schwangerschaft in der Plazenta gebildet. Physiologische Wirkung hat es zum einen in der zweiten Hälfte des weiblichen Zyklus bei der Vorbereitung des Uterus für die Einnistung der befruchteten Eizelle und zum anderen zu verschiedenen Zwecken während der Schwangerschaft. Bei männlichen Säugern ist es nur als Zwischenprodukt der Biosynthese anderer Steroide bekannt.

Teil des ISOSTER-Projekts war es ursprünglich, einen Nachweis für die Verabreichung von Progesteron als hormonelles Masthilfsmittel an Rinder zu realisieren. In Verbindung mit 17β -Estradiol führt es zu schnellerer Gewichtszunahme und effektiverer Futtermittelverwertung, während eine alleinige Behandlung mit Progesteron keinen Effekt bewirkt (Lone 1997). Der Mechanismus der Wirkung von Progesteron bezüglich einer Gewichtszunahme während der Mast ist weitgehend unbekannt. Ebenso sind urinäre Progesteron-Metaboliten nicht publiziert und auch eigene Messungen zu Beginn des Projekts konnten keine nennenswerten Mengen an Progesteron oder möglichen Metaboliten im Rinderurin nach Applikation nachweisen. Dies liegt u.a. sicherlich daran, dass Gestagene nur zu 6% über den Urin ausgeschieden werden und zu 94% über die Faeces (vgl. Lange *et al.* 2002). Für diese Möglichkeit spricht, dass im Rahmen des ISOSTER-Projekts nach entsprechender Applikation eine Erhöhung der Progesterongehalte in Rinderfaeces von 10 ng/g auf bis zu 250 ng/g festgestellt wurde (Weltring 2004) und Urin somit zu diesem Zweck eine ungeeignete Matrix darstellt. Wie oben bereits erwähnt, macht eine Progesteronbehandlung nur in Verbindung mit 17β -Estradiol Sinn. Dementsprechend ist Progesteron z.B. in den USA ausschließlich als Kombinationspräparat mit 17β -Estradiol zugelassen (Meyer und Karg 1999). Der Nachweis einer Applikation von 17β -Estradiol schließt somit in aller Regel den Missbrauch von Progesteron ein, wenngleich eine Differenzierung zwischen der alleinigen Anwendung von 17β -Estradiol und der Kombination mit Progesteron auf diese Weise nicht zu realisieren ist.

2.3 Stabile Isotope des Kohlenstoffs

Die mittlere Häufigkeit der beiden stabilen Isotope des Kohlenstoffs wird mit $98,93\% \pm 0,08\%$ (^{12}C) zu $1,07\% \pm 0,08\%$ (^{13}C) angegeben (De Laeter *et al.* 2003). Durch ihre unterschiedlichen Massen weisen sie unterschiedliche chemische und physikalische Eigenschaften auf. Da die mittlere kinetische Energie allein durch die Temperatur bestimmt wird, gilt, dass schwerere Isotopologe (identische Moleküle mit unterschiedlicher Isotopenzusammensetzung wie z.B. $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ und $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$) weniger mobil sind als die leichteren. Daher nimmt die Kollisionswahrscheinlichkeit als Voraussetzung für eine chemische Reaktion ab und die leichteren Isotopologe reagieren in der Regel schneller; d.h. es wird gegen das schwerere Isotop diskriminiert. Als weiterer Effekt kommt hinzu, dass das schwerere Isotopolog im Allgemeinen eine höhere Bindungsenergie aufweist (u.a. Hoefs 1997; Melander und Saunders 1980). Diese kinetische Isotopenfraktionierung bzw. Gleichgewichts isotopenfraktionierung führt bei unvollständigen oder gleichgewichtsbasierten biologischen, chemischen und physikalischen Prozessen zu unterschiedlich ausgeprägten Isotopenverteilungen zwischen z.B. den Edukten und Produkten einer chemischen Gleichgewichtsreaktion oder der Gasphase und der flüssigen Phase in einem geschlossenen Behälter.

Isotopenverhältnisse eines bestimmten Elements werden konventionsgemäß als Verhältnis R der Anzahl N des selteneren zum häufigeren Isotop angegeben; im Falle der beiden stabilen Isotope des Kohlenstoffs gilt also:

Gleichung 1

$$R = \frac{N^{13}\text{C}}{N^{12}\text{C}}$$

Diese Verhältnisse werden dann mit einem allgemein akzeptierten Standard der Internationalen Atomenergieorganisation verglichen. Natürliche Kohlenstoffisotopenverhältnisse wurden ursprünglich mit einem Carbonat aus der *Pee Dee* Formation in *South Carolina*, dem sog. *Pee Dee Belemnite*-Standard (PDB-Standard) mit einem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von 0,0112372 (Craig 1957) verglichen. In der Natur sind die Unterschiede des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses zu diesem Standard normalerweise gering. Daher wird die sog. δ -Notation per Konvention angewendet. Sie bezeichnet das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis der Probe als Promill (‰) Abweichung gegenüber dem Standard, welcher den Nullpunkt dieser Skala definiert. Zur Berechnung wird folgende Formel angewendet:

Gleichung 2

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}(\text{Probe}) = \left(\frac{R_{\text{Probe}} - R_{\text{PDB}}}{R_{\text{PDB}}} \right) \cdot 10^3 = \left(\frac{R_{\text{Probe}}}{R_{\text{PDB}}} - 1 \right) \cdot 10^3$$

Die Einheit (‰) ist also dimensionslos. Ein positiver $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Wert entspräche einer Anreicherung des schwereren ^{13}C gegenüber dem Standard. Die in dieser Arbeit vorgestellten Werte hingegen sind ausschließlich negativ und entsprechen damit einer mehr oder minder starken Abreicherung von ^{13}C gegenüber dem Standard. Im Folgenden wird synonym auch „isotopisch schwerer“ für weniger abgereichert und „isotopisch leichter“ für stärker abgereichert verwendet.

Der Vollständigkeit halber muss erwähnt werden, dass mangels Material des ursprünglichen PDB-Standards derzeit $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse einer Probe über den Nachfolgestandard NBS-19 der Internationalen Atomenergieorganisation bestimmt werden. Dieser weist einen $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Wert von 1,95‰ auf (Gonfiantini *et al.* 1995) und dient als Standard für die Vienna-PDB-Skala (VPDB-Skala). Diese Skala ist mathematisch identisch mit der PDB-Skala, weist also denselben Nullpunkt auf; einzig die Kalibrierung erfolgt über NBS-19. Dementsprechend werden die Kohlenstoffisotopenverhältnisse in dieser Arbeit als $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte angegeben.

2.4 Kohlenstoffisotopenfraktionierung durch Landpflanzen

Der überwiegende Anteil des biogenen Kohlenstoffs in der Nahrung stammt aus der CO_2 -Fixierung der Landpflanzen, während die marine Photosynthese nur eine untergeordnete Rolle spielt. Verschiedene Pflanzengruppen diskriminieren bei der Fixierung von Kohlendioxid aus der Atmosphäre für die Photosynthese unterschiedlich stark gegen schwerere Isotope. Entsprechend deutlich können sich die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse der endogenen Steroide in Abhängigkeit der Nahrung von denen der applizierten Steroide in Abhängigkeit der Ausgangsstoffe der Synthese unterscheiden. Die Nachweismöglichkeit der Applikation von Steroiden anhand der Bestimmung von $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnissen beruht also primär auf den unterschiedlichen Arten der Photosynthese. Man unterscheidet C_3 -, C_4 - und CAM-Pflanzen, je nachdem, wie das Kohlendioxid gebunden wird.

C_3 -Pflanzen fixieren CO_2 im sog. *Calvin*-Zyklus zunächst über die Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RUBISCO) an ein C_5 -Molekül (Ribulose-1,5-bisphosphat), welches als erstes stabiles Produkt der Photosynthese in zwei den

Namen erklärende C₃-Moleküle zerfällt (3-Phosphoglycerinsäure). Diese stehen dann der Pflanze für den weiteren Stoffwechsel zur Verfügung.

Im Verlauf der Evolution haben sich zwei Varianten entwickelt, die den transpirationsbedingten Wasserverlust bei der Kohlendioxidassimilation reduzieren. Sowohl bei der C₄- als auch bei der CAM-Photosynthese (für *Crassulacean Acid Metabolism*) wird dem *Calvin*-Zyklus die CO₂-Fixierung an Phosphoenolpyruvat mittels Phosphoenolpyruvat-carboxylase (PEPC) vorangestellt. Dieses wird zunächst zu Oxalessigsäure und dann zu einer stabilen C₄-Dicarbonsäure (zumeist Äpfelsäure) umgewandelt. Das bei der folgenden Decarboxylierung gelieferte CO₂-Molekül wird erst danach über die RUBISCO dem *Calvin*-Zyklus zugeführt. Der wesentliche Unterschied zwischen C₄- und CAM-Pflanzen besteht darin, dass bei C₄-Pflanzen die primäre CO₂-Fixierung an das Phosphoenolpyruvat und die sekundäre CO₂-Fixierung an das Ribulose-1,5-bisphosphat gleichzeitig, aber durch Verteilung auf verschiedene Gewebe räumlich voneinander getrennt stattfinden. In CAM-Pflanzen hingegen laufen diese beiden Prozesse in den gleichen Zellen ab, aber in Abhängigkeit der äußeren Bedingungen zeitlich getrennt voneinander (z.B. Lüttge *et al.* 1994).

Wie erwähnt, wird während der verschiedenen Photosyntheseschritte unterschiedlich stark gegen ¹³C diskriminiert. Eine bimodale Verteilung der ¹³C/¹²C-Verhältnisse von Pflanzen ist seit den 1950er Jahren beobachtet worden (u.a. Craig 1953; Wickman 1952). Erst später wurde dieser Unterschied auf die unterschiedlichen Photosynthesetypen von C₃- und C₄-Pflanzen zurückgeführt (Bender 1968; Bender 1971). O'Leary (1988) gibt auf dieser Grundlage einen mittleren δ¹³C_{PDB}-Wert von -27,1‰ ± 2,0‰ für C₃-Pflanzen und -13,1‰ ± 1,2‰ für C₄-Pflanzen an. CAM-Pflanzen hingegen zeigen ¹³C/¹²C-Verhältnisse in Abhängigkeit dessen, ob die CO₂-Fixierung bei Tag (im Hellen) oder bei Nacht (im Dunklen) stattfindet. Findet sie ausschließlich tagsüber statt, zeigen sie ¹³C/¹²C-Verhältnisse von C₃-Pflanzen, während die nächtliche CO₂-Fixierung zu einer geringeren Isotopenfraktionierung wie bei C₄-Pflanzen führt (Winter und Holtum 2002).

Zum genaueren Verständnis der Kohlenstoffisotopenfraktionierung zwischen Atmosphäre und Pflanze wird auf die Literatur verwiesen (u.a. Farquhar *et al.* 1982; Keeling 1961; O'Leary 1981; Peisker 1982). Einführend seien aber einige Grundlagen erwähnt.

Isotopenfraktionierung im Gleichgewicht wird durch den Fraktionierungsfaktor α quantifiziert (Gleichung 3). Er beschreibt das Verhältnis R (vgl. Gleichung 1, S. 14) in zwei Verbindungen bzw. Phasen A und B und kann über Gleichung 2 (S. 15) aus den δ -Werten bestimmt werden.

Gleichung 3

$$\alpha_{A/B} = \frac{R_A}{R_B} = \frac{\delta_A + 10^3}{\delta_B + 10^3}$$

Der Faktor der kinetischen Isotopenfraktionierung wird häufig in der gleichen Form angegeben, hat aber genau genommen nur Gültigkeit, wenn sich die Menge des Edukts A bei der Bildung des Produkts B nur unwesentlich ändert.

Praktische Bedeutung hat dies für diese Arbeit u.a. bei der Derivatisierung der Steroide (z.B. bei der Acetylierung), die einen großen Überschuss an Derivatisierungsmittel (z.B. Acetanhydrid) erfordert, um möglichst konstante Isotopenverhältnisse in den zusätzlich eingeführten Kohlenstoffatomen der einzelnen Verbindungen in den verschiedenen Probenmatrices zu erreichen.

Nach Farquhar und Richards (1984) können übereinstimmend mit chemischen Reaktionen auch biologische Prozesse wie die CO₂-Fixierung von Pflanzen aus der Luft nach Gleichung 3 beschrieben werden oder aber auch eine mögliche Isotopenfraktionierung während des Steroidmetabolismus, was für die Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit von Bedeutung ist. Aufgrund der in der Regel geringen biologischen Faktoren ist die Angabe der Diskriminierung auch hier in ‰ als sog. $\Delta\delta$ -Wert anschaulicher und lässt sich analog zu Gleichung 3 aus den δ -Werten bestimmen:

Gleichung 4

$$\Delta\delta_{A/B} = (\alpha_{A/B} - 1) \cdot 10^3 = \left(\frac{R_A}{R_B} - 1 \right) \cdot 10^3 = \left(\frac{\delta_A + 10^3}{\delta_B + 10^3} - 1 \right) \cdot 10^3$$

Gleichung 4 kann umgeformt werden zu:

Gleichung 5

$$\Delta\delta_{A/B} = \frac{(\delta_A - \delta_B) \cdot 10^3}{\delta_B + 10^3} = \frac{\delta_A - \delta_B}{\delta_B \cdot 10^{-3} + 1}$$

Da der Nenner auf der rechten Seite in Gleichung 5 ($\delta_B \cdot 10^{-3} + 1$) in aller Regel hinreichend gegen 1 tendiert, kann zu praktischen Zwecken vereinfacht werden:

Gleichung 6

$$\Delta\delta_{A/B} \approx \delta_A - \delta_B$$

Beispielhaft sei aber darauf hingewiesen, dass für zwei Substanzen „A“ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -22\text{‰}$) und „B“ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -26\text{‰}$) gemäß Gleichung 6 nur näherungsweise gilt, dass „B“ 4‰ isotopisch leichter als „A“ ist bzw. „A“ 4‰ isotopisch schwerer ist als „B“ (vgl. Flenker und Schänzer 2003). Da es sich bei δ -Werten um Quotienten handelt, ist es ein Unterschied, von welcher „Seite“ Gleichung

5 betrachtet wird. Es ergibt sich $\Delta\delta_{A/B} = \frac{(-22 + 26)}{-26 \cdot 10^{-3} + 1} \text{‰} = 4,1068 \text{‰}$ und

$$\Delta\delta_{B/A} = \frac{(-26 + 22)}{-22 \cdot 10^{-3} + 1} \text{‰} = -4,0900 \text{‰}; \text{ „A“ ist also genau genommen } 4,1068 \text{‰}$$

isotopisch schwerer als „B“ und „B“ nur 4,0900‰ isotopisch leichter als „A“. Mit Hinblick auf die Präzision moderner GC/C/IRMS-Systeme sind diese beiden Werte allerdings quasi identisch und gemäß Gleichung 6 näherungsweise 4‰.

Der bisher gezeigte Ansatz integriert zusammenfassend den gesamten Fraktionierungsprozess, berücksichtigt und gewichtet aber nicht die einzelnen Effekte der Diffusions- und Reaktionsschritte zwischen der Aufnahme von Kohlendioxid und der letztendlichen Fixierung während der Carboxylierung. Farquhar *et al.* (1982) entwickelten ein inzwischen gut validiertes Modell (Beerling und Royer 2002), welches in der einfachen Version folgende Form hat:

Gleichung 7

$$\Delta\delta_{\text{CO}_2/\text{Pflanze}} = a + (b - a) \cdot \frac{p_i}{p_a}$$

a ist hier die Fraktionierung bei der Diffusion von atmosphärischem CO_2 in die Spaltöffnung der Pflanze (maximal 4,4‰, s. Tabelle 1) und b die Fraktionierung bei der Carboxylierung. p_i ist der interzelluläre CO_2 -Partialdruck und p_a der CO_2 -Partialdruck der die Pflanze umgebenden Luft. Es wird deutlich, dass die Netto-Fraktionierung in der Photosynthese nicht die Summe der einzelnen Fraktionierungen darstellt. Gleichung 7 gibt vielmehr den Einfluss des reaktionslimitierenden Vorgangs bei der CO_2 -Aufnahme wieder, der entweder auf der Seite der Diffusion in die Pflanze (a) oder auf der Seite der Carboxylierung (b) liegt. Wenn z.B. bei geöffneten Stomata der Quotient p_i/p_a gegen 1 tendiert, nähert sich $\Delta\delta_{\text{CO}_2/\text{Pflanze}}$ dem Wert von b (maximal 27‰ für C_3 -Pflanzen) an. Schließen sich

hingegen die Stomata, nähert sich $\Delta\delta_{\text{CO}_2/\text{Pflanze}}$ dem Wert von a an (4,4‰), da p_i und somit auch der Quotient p_i/p_a gegen 0 tendiert. Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass der limitierende Schritt bei C_3 -Pflanzen in der Regel bei der Carboxylierung liegt. Wenn p_i/p_a gegen 0 tendiert, kann man sich vereinfacht vorstellen, dass jegliches CO_2 , welches in die Spaltöffnungen diffundiert, von der Pflanze vollständig genutzt wird. Bei vollständigen Reaktionen kann es aber zu keiner Isotopenfraktionierung kommen.

Von praktischer Bedeutung war dies hier bei der Ernährung der Rinder. Im heißen Jahr 2003 (u.a. Deutscher Wetterdienst 2003a; Deutscher Wetterdienst 2003b; Wikipedia 2007) war zunächst das Gras als Ernährungsgrundlage und in der Folge die endogenen Steroide der Rinder isotopisch schwerer als im vergleichsweise kühleren Jahr 2005 (u.a. Deutscher Wetterdienst 2005). Erklärt werden kann dieser Effekt, wie bereits angedeutet, anhand von Gleichung 7. Im Jahr 2003 waren die Stomata des Grases aufgrund der Hitze und des Wassermangels im Durchschnitt vermutlich länger geschlossen als im Jahr 2005, somit p_i/p_a und in der Folge $\Delta\delta_{\text{CO}_2/\text{Pflanze}}$ ebenfalls geringer.

Bei C_4 -Pflanzen und CAM-Pflanzen setzt sich der Faktor b komplizierter aus den in Tabelle 1 genannten Faktoren in Abhängigkeit der äußeren Bedingungen (z.B. Wasserstress) zusammen. In der Praxis tendiert $(b-a) \cdot \frac{p_i}{p_a}$ im Falle der C_4 -Pflanzen allerdings häufig recht unabhängig gegenüber äußeren Faktoren in der Summe gegen null (Farquhar *et al.* 1989). Die Fraktionierung gegenüber atmosphärischem CO_2 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} \approx -8\text{‰}$, (Allison *et al.* 2003)) von C_4 -Pflanzen ist also hauptsächlich durch die Diffusion in die Spaltöffnung (a) bedingt, was zu isotopisch schwereren und auch konstanteren Werten führt als bei C_3 -Pflanzen. Wie oben bereits erwähnt, diskriminieren CAM-Pflanzen gegen ^{13}C in Abhängigkeit dessen, ob sie CO_2 tagsüber (wie C_3 -Pflanzen) oder nachts (wie C_4 -Pflanzen) fixieren (Nalborczyk *et al.* 1975; Nalborczyk 1978).

Tabelle 1: Isotopeneffekte verschiedener Schritte der photosynthetischen CO_2 -Fixierung (nach Farquhar *et al.* 1989)

Prozess	Fraktionierungsfaktor (α)	Diskriminierung (‰)	Symbol	Literaturzitat
Diffusion von atmosphärischem CO_2 in die Spaltöffnungen ^(a)	1,0044	4,4	a	(Craig 1954)

Prozess	Fraktionierungs- faktor (α)	Diskrimi- nierung (‰)	Symbol	Literaturzitat
Diffusion von atmosphärischem CO ₂ durch die Grenzschicht zu den Spaltöffnungen ^(a)	1,0029	2,9	a_b	(Farquhar 1983)
Diffusion von gelöstem CO ₂ in Wasser	1,0007	0,7	a_1	(O'Leary 1984)
Netto C ₃ -Fixierung in Abhängigkeit von p_i	1,027	27	b	(Farquhar und Richards 1984)
Fixierung von gasförmigem CO ₂ durch RUBISCO (pH = 8) ^(b)	1,030	30	b_3	(Roeske und O'Leary 1984)
Fixierung von gasförmigem CO ₂ durch RUBISCO (pH = 8,5)	1,029	29	b_3	(Guy <i>et al.</i> 1987)
Fixierung von HCO ₃ ⁻ durch PEPC	1,0020	2	b_4^*	(O'Leary <i>et al.</i> 1981)
Fixierung von gasförmigem CO ₂ (im Gleichgewicht mit HCO ₃ ⁻ bei 25 °C) durch PEPC	0,9943	-5,7	b_4	(Farquhar 1983)
Hydratation von CO ₂ im Gleichgewicht	0,991	-9,1	e_b	(Emrich und Vogel 1970)
Lösung von CO ₂ in Wasser im Gleichgewicht	1,0011	1,1	e_s	(O'Leary 1984)

^(a) theoretischer Wert

^(b) korrigiert für die Löslichkeit von CO₂

2.5 Kohlenstoffisotopenverhältnisse von Steroiden

Endogene Steroide werden, wie in Kap. 2.1 erläutert, aus dem biogenen Kohlenstoff der Nahrung gebildet, die in aller Regel ein Gemisch aus C₃- und C₄-Pflanzen darstellt. Entsprechend des Anteils der CO₂-Fixierung über den C₃- bzw. C₄-Weg sind demzufolge auch die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der endogenen Steroide zu erwarten. Künstliche Steroide hingegen werden überwiegend partialsynthetisch aus den bis zu 6% Diosgenin enthaltenden Wurzeln von *Dioscorea* spp. oder aus Soja hergestellt (Kleemann und Roth 1983). Hierbei handelt es sich um C₃-Pflanzen und dementsprechend sind niedrige $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von etwa -28‰ (de la Torre *et al.* 2001) für die verabreichten Steroide zu erwarten. Dies ist durch regelmäßige Analysen sowohl von entsprechenden Medikamenten als auch von Standardsubstanzen bestätigt (unveröffentlichte Daten). In der Folge sind die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der Metaboliten der angewendeten Steroide ebenfalls niedrig, während die Vorläufersubstanzen oder metabolisch unbeeinflusste Steroide weiterhin endogene ¹³C/¹²C-Verhältnisse aufweisen. Die Herkunftsbestimmung körpereigener Steroide per GC/C/IRMS beruht entsprechend auf dem Vergleich der endogenen $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte geeigneter ERCs mit denen der ggf. beeinflussten

Metaboliten. Weisen die Werte dieser Substanzen zu große Unterschiede auf, ist die exogene Herkunft der Metaboliten und damit der Nachweis der Applikation von Steroiden erbracht. Seit der Einführung 1994 (Becchi *et al.*) in den Bereich der Dopingkontrolle hat sich diese Art des Nachweises des Missbrauchs synthetisch hergestellter aber auch endogen vorkommender Steroide bewährt.

2.6 GC/C/IRMS

Natürliche $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse aus Verbrennungsgasen bzw. CO_2 sind seit der Entwicklung der ersten Gasisotopenmassenspektrometer von Nier (1947) und McKinney *et al.* (1950) hinreichend präzise bestimmbar. Der prinzipielle Aufbau dieser Massenspektrometer (schematisch Abb. 9, S. 22, zu entnehmen) bestehend aus der Elektronenstoß-Ionenquelle (EI für *electron impact*), dem Sektorfeld als Analysator und den *Faraday-Cups* als Detektor hat sich bis heute nicht geändert. Zur Messung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse werden die mengenmäßig relevanten Isotopologe des CO_2 mit den Massen 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ und $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$) sowie 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$) simultan gemessen. Die Masse 46 wird benötigt, um den Anteil an Masse 45 zu kalkulieren, der aus ^{17}O und nicht ^{13}C resultiert und dementsprechend das 45/44-Verhältnis bzw. das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis gemäß Santrock *et al.* (1985) zu korrigieren. Die Kopplungsmöglichkeiten der IRMS-Systeme sind mittlerweile vielfältig, befinden sich aber teilweise immer noch im Entwicklungszustand. Um den Vergleich der Isotopenverhältnisse urinärer Steroide zu realisieren, ist für diese Arbeit die komponentenspezifische Isotopenverhältnismassenspektrometrie Mittel der Wahl. Das IRMS ist entsprechend mit einem chromatographischen System gekoppelt, in diesem Falle dem GC. Die per GC getrennten Komponenten müssen kontinuierlich zu CO_2 verbrannt und das bei dieser Oxidation entstehende H_2O entfernt werden, um Wechselwirkungen mit dem CO_2 zu vermeiden, was die Ergebnisse verfälschen würde. Allgemein gebräuchlich für diese Art der Kopplung ist die Abkürzung GC/C bzw. GC/C/IRMS für das komplette System. Mit den ersten GC/C-Kopplungen an ein konventionelles Sektorfeld-MS wurde eine Präzision von 5‰ relativer Standardabweichung (Matthews und Hayes 1978) und mit den ersten GC/C/IRMS-Geräten eine von 1‰ erreicht (Barrie *et al.* 1984). Seit 1988 sind diese Kopplungen kommerziell verfügbar (vgl. Brand 1996). Abb. 9 zeigt schematisch das zu Anfang dieser Arbeit verwendete System gemäß Brand (1994). Lediglich der ursprünglich verwendete Reduktionsreaktor wurde entfernt sowie eine

Aceton/Trockeneis-Wasserfalle anstelle einer Nafion-Membran zur Entfernung von Wasser eingebaut.

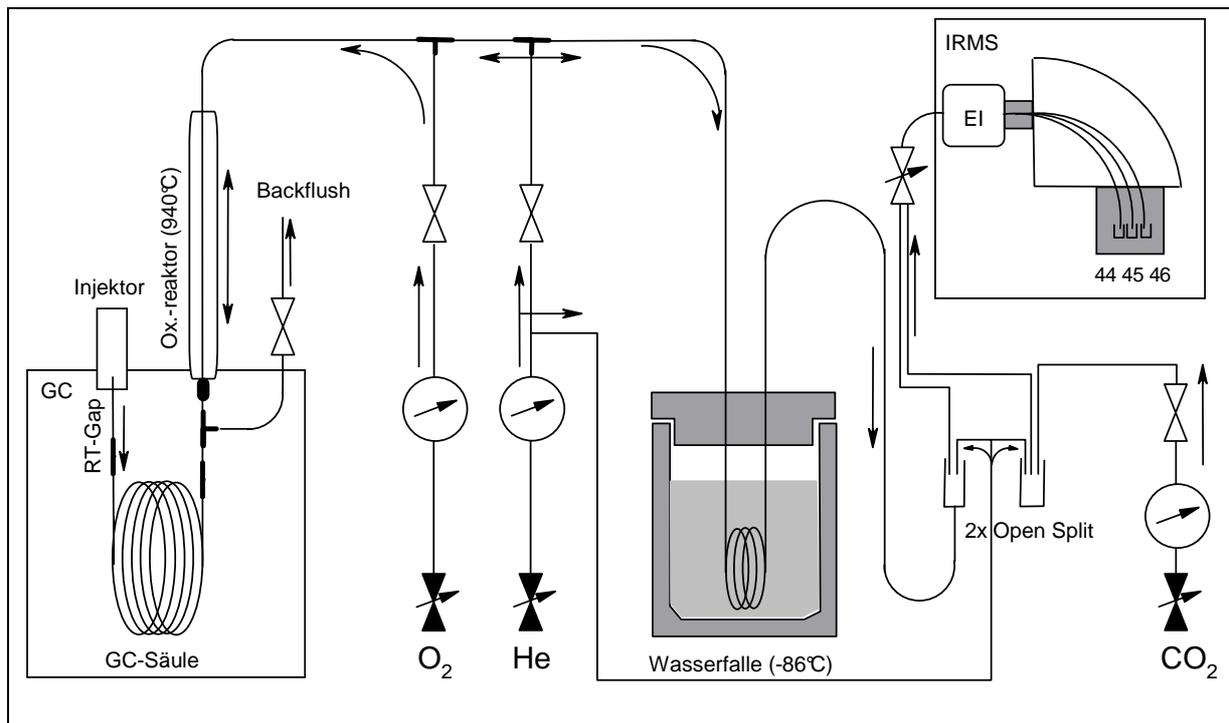


Abb. 9: Prinzipieller Aufbau des verwendeten GC/C/IRMS-Systems

Entsprechend Abb. 9 wird die Probe entweder *Splitless* oder *Cool on Column* (CoC) zunächst auf ein mit der analytischen Säule verbundenes *Retention (RT) Gap* injiziert. Im Anschluss an die darauf folgende gaschromatographische Trennung werden die organischen Verbindungen bei 940 °C im Oxidationsreaktor (einem mit Pt-, CuO- und NiO-Drähten versehenen Al₂O₃-Rohr) vollständig zu CO₂, H₂O und ggf. Stickoxiden verbrannt. Da die Oxidationskapazität des Reaktors begrenzt ist, wird das Lösungsmittel im Helium-Gegenstrom über das sog. *Backflush*-Ventil abgetrennt. In diesem *Backflush*-Modus lässt sich der Oxidationsreaktor durch Zuschalten von O₂ regenerieren, ohne dass der zugeführte Sauerstoff auf die oxidationsempfindliche GC-Säule gelangt. Nach Abtrennung des Lösungsmittels wird der Helium-Gegenstrom abgeschaltet, so dass der analytische Gasstrom im sog. *Straight*-Modus den Oxidationsreaktor passieren kann und die getrennten Substanzen verbrannt werden. Zur Eliminierung des bei der Oxidation entstandenen Wassers wird der Gasstrom durch eine Aceton/Trockeneis-Wasserfalle geführt. Anschließend wird über eine sog. *Open Split* Verbindung ein stetiger Anteil des analytischen Gasstroms über eine Schnüffelkapillare dem IRMS zugeführt. Eine zweite *Open Split* Verbindung wird für den Referenzgaseinlass benötigt. Dessen

$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert ist durch Kalibrierung z.B. gegen die kommerziell verfügbaren *n*-Alkane von Schimmelmann (2004) hinreichend bekannt, so dass über geeignete Referenzgaspeaks im Chromatogramm das Kohlenstoffisotopenverhältnis der einzelnen Komponenten kalkuliert wird. Bei dieser Kalkulation ist zu beachten, dass während der GC-Trennung eine Isotopenverteilung stattfindet und die schwereren Isotopologe etwas früher von der GC-Säule eluieren als die leichteren. Somit muss für die Massen 44, 45 und 46 jeweils der komplette Peak integriert werden, was weitestgehende Basislinientrennung der einzelnen Substanzen und eine dementsprechend leistungsfähige Probenaufreinigung (Flenker *et al.* 1999; Newman 1996) voraussetzt.

Infolge der genannten Anforderungen für die GC/C/IRMS werden gute chromatographische Bedingungen benötigt, da zudem die Retentionszeit der einzige Hinweis auf die Identität einer Komponente ist. Abb. 9 ist allerdings zu entnehmen, dass im Gegensatz zu herkömmlichen GC/MS-Systemen eine Reihe von zusätzlichen Verbindungen vorhanden ist. Zu nennen sind diesbezüglich die benötigten sog. *Pressfits* vor und nach der analytischen Säule zum Anschluss des RT-Gaps sowie den Verbindungen zum *Backflush* und zum Oxidationsreaktor. Speziell die im GC-Ofen thermisch belasteten Verbindungen führen regelmäßig trotz akkuratem Einbau zu Totvolumina oder auch kleinen Lecks. Dies kann gerade bei schwer flüchtigen Substanzen wie den Steroiden erheblichen Substanzverlust oder Peakverbreiterung zur Folge haben, was eine Auswertung der Messungen ggf. unmöglich werden lässt. Regelmäßige Fehler- bzw. Lecksuche und mehr oder minder intensive Reparatur- und Wartungsarbeiten sind die Folge, was die Probenanzahl im Routinebetrieb gegenüber anderen GC-Systemen erheblich reduziert.

Zur Verbesserung der Chromatographie und der Robustheit des in Abb. 9 gezeigten Systems ist eine Reduzierung der genannten Verbindungen nötig. Bei Verwendung eines Kaltaufgabesystems (KAS) anstelle des *Split/Splitless*- bzw. CoC-Injektors wird das injizierte Lösungsmittel über die Splitleitung entfernt. Da es somit nicht auf die analytische Säule gelangt, können sowohl das RT-Gap sowie das *Backflush*-System und entsprechend die störanfälligen *Pressfit*-Verbindungen weitgehend entfernt werden. Auf Grundlage dieser theoretischen Überlegungen wurde eine neuartige GC/C-Kopplung unter Verwendung eines KAS mitentwickelt. Abb. 10 zeigt schematisch das patentrechtlich geschützte Verfahren (Flenker 2006),

das im Jahr 2006 vorgestellt wurde (Flenker *et al.* 2006). Mit diesem Verfahren wurden die meisten der Rinderurinproben analysiert, während die Humanproben auf dem herkömmlichen System gemessen wurden.

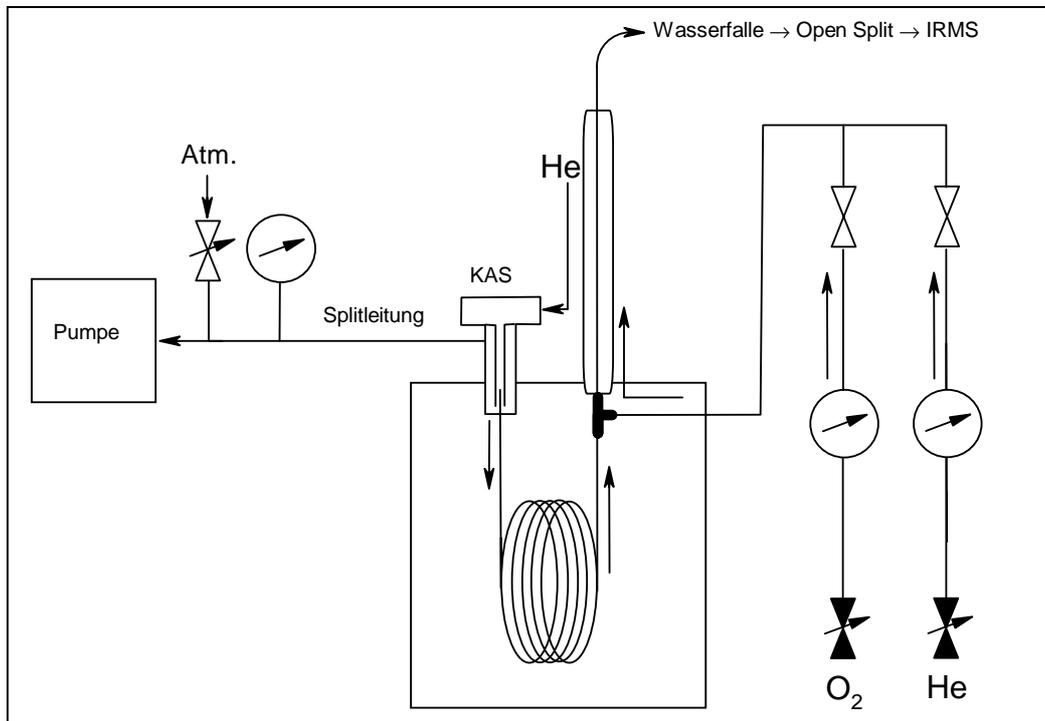


Abb. 10: Prinzipieller Aufbau der mitentwickelten GC/C-Kopplung mit Kaltaufgabesystem

Ein weiterer Vorteil eines KAS gegenüber den herkömmlichen Injektoren besteht darin, dass die Menge an injiziertem Lösungsmittel nicht begrenzt ist und sog. *Large-Volume* Injektionen möglich sind. Dazu wird das Lösungsmittel bei niedriger Injektor-Temperatur und hohem Trägergas-Fluss über die Splitleitung entfernt, während die Analyten im Injektor verbleiben. Durch den Anschluss der per Software schaltbaren Pumpe lässt sich ein leichtes Vakuum anlegen, was zu einem geringen Rückfluss durch die GC-Säule führt. Dadurch werden auch die Reste an Lösungsmittel, die bei Atmosphärendruck auf die Säule diffundieren würden, komplett entfernt. Anschließend wird die Pumpe abgeschaltet und die Splitleitung geschlossen. Der Injektor wird mit bis zu 12 °C/s aufgeheizt, so dass die Analyten vollständig auf die GC-Säule gelangen und chromatographisch getrennt werden. Wie erwähnt, sind ein *RT-Gap* und die zugehörige Verbindung nicht mehr nötig. Ebenso sind das *Backflush*-Ventil und die zugehörigen Verbindungen hinter der GC-Säule obsolet, da das Lösungsmittel, welches die Oxidationskapazität des Reaktors empfindlich reduzieren würde, bereits vollständig entfernt wurde. Über einen sog. Makeup-Gas Adapter wird sowohl der Oxidationsreaktor mit der analytischen Säule verbunden als auch der zur Regeneration des Reaktors benötigte O₂-Anschluss realisiert. Des

Weiteren kann über diese Verbindung ein konstanter Heliumfluss zugeführt werden, um ein mögliches Totvolumen dieser Verbindung kontinuierlich zu spülen. Im Anschluss an den Oxidationsreaktor wird der analytische Gasstrom ohne weitere Verbindungen über die Wasserfalle der *Open Split* Verbindung und wie gehabt dem IRMS-System zugeführt.

Zusammenfassend ist durch diese neuartige Kopplung aufgrund des installierten KAS und der reduzierten Anzahl der Verbindungsstellen das gesamte GC/C/IRMS-System deutlich weniger störanfällig, die Chromatographie ist signifikant verbessert und der Probentransfer ist durch die Möglichkeit von *Large-Volume* Injektionen optimiert (Flenker *et al.* 2007).

3 Strategie zur Methodenentwicklung

Die Aufreinigung der Urine muss den hohen Anforderungen der GC/C/IRMS genügen, um Basislinientrennung der Analyten von anderen Matrixkomponenten zu gewährleisten (vgl. Kap. 2.5). Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass für die verlässliche Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von Steroiden per GC/C/IRMS ein Minimum von etwa 10 ng pro Zielanalyt injiziert werden muss (Horning *et al.* 1997; Sessions 2006) und somit ggf. weitgehend verlustfrei aufzuarbeiten ist.

3.1 Hydrolyse von Steroidkonjugaten

Da Steroide aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaft im Urin überwiegend konjugiert als Sulfate oder Glucuronide ausgeschieden werden (vgl. Kap. 2.2), müssen diese zunächst hydrolysiert werden. Gängig ist die enzymatische Hydrolyse der Glucuronide mit β -Glucuronidase von *Escherichia coli* (z.B. von Kuk *et al.* 2003) oder *Helix Pomatia* (z.B. Ferchaud *et al.* 1998). Das letztgenannte Enzym besitzt zudem Arylsulfataseaktivität, weshalb es auch zur Hydrolyse z.B. von DHEA-sulfat eingesetzt wird. Eine chemische Hydrolyse der Steroid-sulfate nach möglicher Abtrennung der nicht konjugiert vorliegenden und ggf. hydrolysierten Steroid-glucuronide mittels flüssig/flüssig Extraktion (LLE für *liquid/liquid extraction*) ist hier ebenfalls üblich (z.B. von Kuk *et al.* 2003).

3.2 Flüssig/flüssig Extraktion

Die hydrolysierten Steroide lassen sich aufgrund ihrer Fettlöslichkeit per LLE von polarer Matrix separieren. Die als Sulfat oder als Glucuronid vorliegenden Steroide hingegen verbleiben in der polaren wässrigen Phase. Wie in Kap. 3.1 erwähnt, lässt sich dies zur Trennung der verschiedenen Konjugate einsetzen, indem zunächst ausschließlich die Glucuronide und erst dann die Steroid-sulfate hydrolysiert und ausgeschüttelt werden. Ebenso ist die mögliche Abtrennung der Estrogene von den Androgenen mittels LLE zu berücksichtigen. Im Alkalischen liegen diese aufgrund der relativ sauren phenolischen Hydroxy-Gruppe an Position 3 im Steroidgerüst als Phenolate vor (Lewis und Archer 1979) und gehen somit bei der LLE nicht in die organische Phase über.

3.3 Festphasenextraktion

Weiterhin gängig ist die Aufreinigung mit Festphasen (SPE für *solid phase extraction*). Polare (NP für *normal phase*) als auch chemisch modifizierte apolare (RP für *reversed phase*) Kieselgelphasen werden verwendet (Ferchaud *et al.* 1998; Flenker *et al.* 1999). Die SPE wird auch zum Beseitigen des bei der chemischen Hydrolyse der Steroid-sulfate störenden Wassers angewendet (von Kuk *et al.* 2003).

3.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Zur Eliminierung weiterer störender Matrixkomponenten ist die semipräparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC für *high performance liquid chromatography*) in Betracht zu ziehen, bei der die Substanzen im Anschluss an die Chromatographie wieder aufgefangen werden. Sowohl die NP-HPLC als auch die RP-HPLC sind die gängigen Verfahren zur Probenaufreinigung (Ferchaud *et al.* 1998; Flenker *et al.* 1999). Es ist allerdings zu beachten, dass auf der HPLC-Säule Isotopenfraktionierung zwischen Anfang und Ende eines Peaks auftritt (Baumann *et al.* 1992; Caimi und Brenna 1997; Flenker *et al.* 1999; Gensler *et al.* 1995). Daher muss jeweils der komplette Analyt gesammelt werden, um die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte nicht durch die Aufarbeitung zu beeinflussen.

3.5 Derivatisierung

Abschließend muss eine Derivatisierung der finalen Extrakte erwogen werden, um die Zielanalyten leichter GC-gängig zu machen. Die Derivatisierung von Hydroxygruppen zu Acetaten (z.B. Becchi *et al.* 1994; Shackleton *et al.* 1997) bzw. die Einführung von Trimethylsilyl-Gruppen (TMS-Gruppen) an Hydroxy- und Ketogruppen (z.B. Prévost *et al.* 2001) sind die für die GC/C/IRMS von Steroiden bekannten Verfahren. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass durch eine Derivatisierung Kohlenstoffatome in das Zielmolekül eingeführt werden, welche das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis beeinflussen und die Differenzen in den Isotopenverhältnissen zweier Substanzen grundsätzlich verringern. Beispielhaft sei hier der Einfluss einer einfachen Acetylierung und derjenige einer zweifachen Trimethylsilylierung auf die $\Delta\delta$ -Werte zwischen DHEA (-22‰) und ETIO (-26‰) berechnet und mit dem $\Delta\delta$ -Wert der freien Verbindungen verglichen. Der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert einer derivatisierten Substanz lässt sich anteilig aus den Werten der freien Substanz zuzüglich dem der neu eingefügten Kohlenstoffatome nach Gleichung 8 berechnen.

Gleichung 8

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}(A_Deriv.)} = \frac{N_A}{N_{A_Deriv.}} \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}(A)} + \frac{N_{Deriv.}}{N_{A_Deriv.}} \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}(Deriv.)}$$

$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}(A_Deriv.)}$ bezeichnet den Wert einer derivatisierten Verbindung „A“, $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}(A)}$ denjenigen der underivatisierten Verbindung „A“ und $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}(Deriv.)}$ den Wert der bei der Derivatisierung neu eingeführten Kohlenstoffatome. N_A , $N_{Deriv.}$ und $N_{A_Deriv.}$ geben entsprechend die Anzahl der Kohlenstoffatome der Verbindung „A“, der bei der Derivatisierung neu eingefügten Kohlenstoffatome und die Gesamtkohlenstoffanzahl der derivatisierten Verbindung „A“ an. Die neuen Kohlenstoffatome der TMS- als auch der Acetat-Gruppe sollen einen identischen und praxisnahen $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert von -50‰ aufweisen. Zu den 19 C-Atomen der freien Steroide müssen entweder zwei zusätzliche C-Atome für die Acetylierung oder sechs C-Atome für die zweifache Trimethylsilylierung berücksichtigt werden. Gemäß Gleichung 8 resultieren folgende Ergebnisse:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}(\text{DHEA_acetat})} = \frac{19}{21} \cdot (-22\text{‰}) + \frac{2}{21} \cdot (-50\text{‰}) = -24,67\text{‰}$$

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}(\text{ETIO_acetat})} = \frac{19}{21} \cdot (-26\text{‰}) + \frac{2}{21} \cdot (-50\text{‰}) = -28,29\text{‰}$$

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}(\text{DHEA_bis-TMS})} = \frac{19}{25} \cdot (-22\text{‰}) + \frac{6}{25} \cdot (-50\text{‰}) = -28,72\text{‰}$$

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}(\text{ETIO_bis-TMS})} = \frac{19}{25} \cdot (-26\text{‰}) + \frac{6}{25} \cdot (-50\text{‰}) = -31,76\text{‰}$$

Nach Gleichung 6 (S. 18) ergibt sich für die freien Verbindungen ein $\Delta\delta$ -Wert von 4,00‰. Für die acetylierten Verbindungen beträgt die Differenz noch 3,62‰ und bei den TMS-Derivaten nur noch 3,04‰. Die Werte der derivatisierten Steroide können zwar mathematisch korrigiert werden; eine präzise und richtige Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werts der eingefügten Kohlenstoffatome ist jedoch aufgrund kinetischer Isotopeneffekte nicht trivial. Zudem birgt dies die Gefahr systematischer Fehler (Docherty *et al.* 2001). Während eine unpräzise Korrektur der eingefügten Kohlenstoffatome bezüglich des oben genannten Beispiels nur einen äußerst geringen Fehler in der Bildung der $\Delta\delta$ -Werte ausmacht, da sowohl die Ausgangsverbindungen und die derivatisierten Verbindungen gleich viele Kohlenstoffatome aufweisen, führt diese Korrektur bei dem Vergleich von z.B. einfach und doppelt derivatisierten Verbindungen zu einem deutlicheren Fehler in der

Differenzbildung nach Gleichung 6 (S. 18). Zudem muss eine gewisse Unsicherheit berücksichtigt werden. Diese lässt sich für die Differenz zweier Werte aus der Wurzel der Summe der quadrierten Unsicherheiten jedes Einzelwerts berechnen. Für eine empirische Messunsicherheit von etwa $\pm 0,3\%$ je Analyt ergibt sich für die $\Delta\delta$ -Werte eine Unsicherheit von $\pm \sqrt{0,3^2 + 0,3^2} = \pm 0,42\%$. Diese ist zwar unabhängig von einer Derivatisierung, jedoch geht sie in Relation verstärkt in die durch die Einführung neuer Kohlenstoffatome verringerten $\Delta\delta$ -Werte ein. Für das oben genannte Beispiel der Trimethylsilylierung verbleibt unter Einbeziehung des genannten Fehlers nur noch eine Restdifferenz von 2,60%.

Zusammenfassend führt eine Derivatisierung in jedem Fall zu einer Verkleinerung der ursprünglichen Differenzen der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte, deren mathematische Korrektur eine Erhöhung der Unsicherheit zur Folge hat. Dies zeigt, dass die Messung underivatisierter Analyten (z.B. Flenker *et al.* 1999) derjenigen derivatisierter Verbindungen vorzuziehen ist, sofern dies chromatographisch machbar ist.

3.6 Zielanalyten

Zur Anwendung der Strategie des Nachweises von Testosteron oder Estradiol als Masthilfsmittel beim Rind bzw. des Nachweises von Nandrolon oder seinen Prohormonen als Dopingmittel ist es erforderlich, geeignete ERCs und Metaboliten zu analysieren. Ein Steroid ist als ERC geeignet, wenn es aus dem applizierten Steroid nicht metabolisiert werden kann, das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis daher unbeeinflusst bleibt, und wenn es für die GC/C/IRMS-Analyse in ausreichender Menge vorhanden ist. Dies können sog. *Precursor*, also Vorläufersubstanzen, sein oder aber Steroide, die auf einem anderen Weg im Metabolismus synthetisiert werden wie z.B. Corticosteroide. Zur Bestimmung der ggf. synthetischen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse ist die Analyse der Metaboliten der verabreichten Steroide in der Regel besser geeignet als die der applizierten Substanz, da diese stark metabolisiert und nur in geringen Mengen ausgeschieden wird. Daten bezüglich der Mengen endogener urinärer Steroide bzw. des Testosteron- und Estradiol-Metabolismus beim Rind sind in der Literatur rar (Lange *et al.* 2002). Beim Menschen hingegen ist der Metabolismus zum NA sowohl aus endogenen Steroiden als auch aus Nandrolon und Prohormonen gut beschrieben (z.B. Bricout und Wright 2004; Grosse *et al.* 2005; Hemmersbach *et al.* 2006; Schänzer *et al.* 2000; Schrader *et al.* 2006).

3.6.1 Potenzielle Zielanalyten im Rinderurin für den Nachweis der Applikation von Testosteron mittels GC/C/IRMS

Samuels *et al.* (1998) beschreiben ETIO und drei nicht näher identifizierte Isomere des Androstandiols als wesentliche urinaire Testosteron-Metaboliten. Für einleitende Untersuchungen zum Nachweis einer Applikation von Testosteron als Masthilfsmittel aus dem Rinderurin mittels GC/C/IRMS wurden zunächst EpiT und ETIO als Testosteron-Metaboliten und DHEA als ERC beschrieben (Ferchaud *et al.* 1998). Diese Zielanalyten wurden im Jahr 2000 (Ferchaud *et al.*) durch Epiandrosteron (EpiA) und 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol als Metaboliten und Androst-5-en-3 β ,17 α -diol (kurz Androstendiol) als weiteren ERC ergänzt. Bei entsprechenden Untersuchungen zum Testosteronnachweis aus Rindergalle wird zudem 5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol als Hauptmetabolit des Testosterons erwähnt (Mason *et al.* 1998).

Abb. 11 zeigt die ERCs oberhalb und die Metaboliten unterhalb des Testosterons.

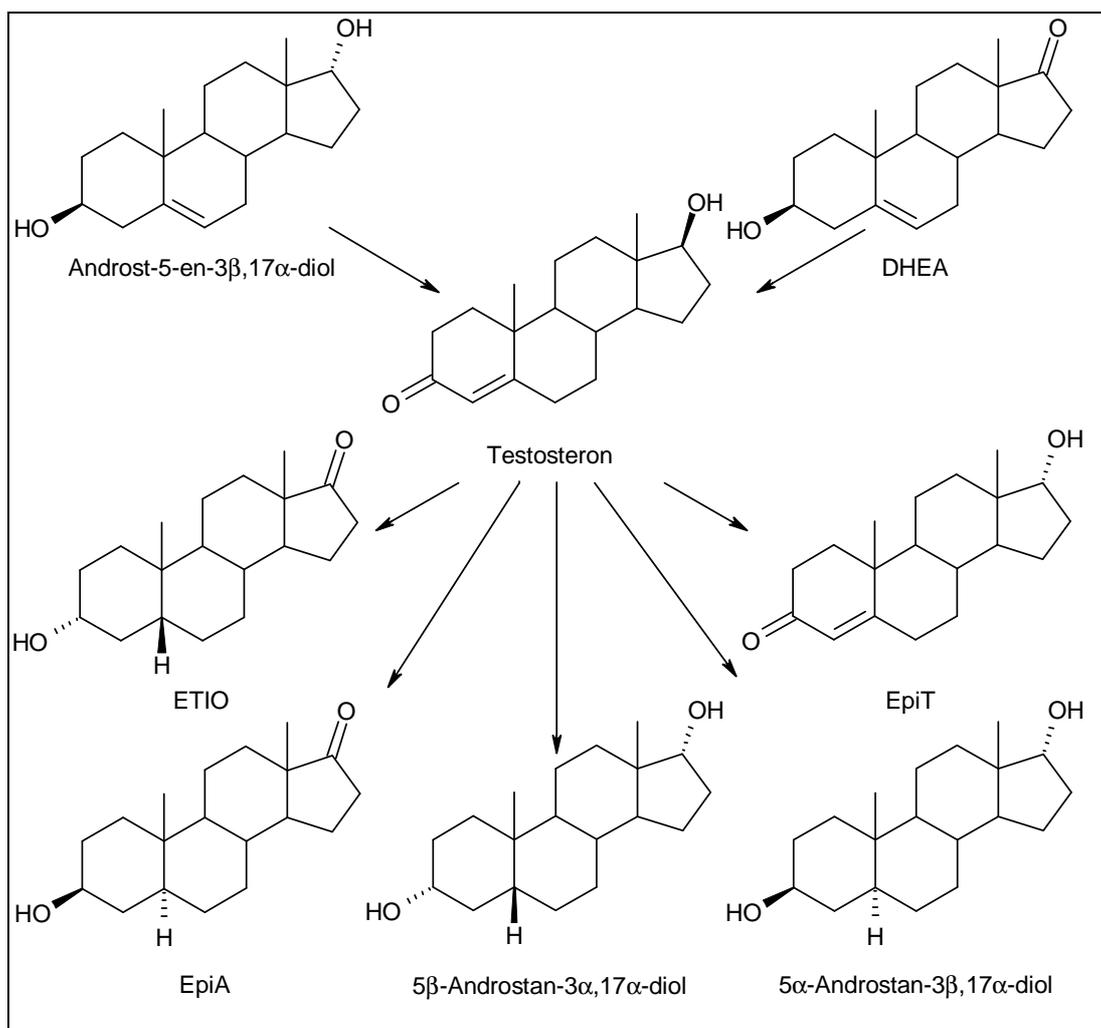


Abb. 11: Potenzielle Zielanalyten zum Testosteronnachweis mittels GC/C/IRMS; ERCs oberhalb und Metaboliten unterhalb des Testosterons

3.6.2 Potenzielle Zielanalyten im Rinderurin für den Nachweis der Applikation von Estradiol mittels GC/C/IRMS

Zum Nachweis der Applikation von 17β -Estradiol als Masthilfsmittel beim Rind mittels GC/C/IRMS sind bisher keine Untersuchungen veröffentlicht. Der Versuch des Nachweises beschränkte sich seit den 1970er Jahren auf die Quantifizierung verschiedener Estrogene zur Ermittlung von Grenzwerten mittels der herkömmlichen Techniken per HPLC-Radioimmunoassay (u.a. Arts *et al.* 1990; Arts *et al.* 1991; Hoffmann *et al.* 1976) oder GC/MS (u.a. Ferchaud *et al.* 2000a; Schilt *et al.* 1998). Diese Untersuchungen ergeben, dass 17α -Estradiol der Hauptmetabolit des 17β -Estradiols ist (Ferchaud *et al.* 2000a; Hoffmann *et al.* 1976; Mellin *et al.* 1965; Mellin und Erb 1965; Rico 1983; Schilt *et al.* 1998), während Estron weniger bedeutend zu sein scheint.

Abb. 12 zeigt das 17β -Estradiol sowie die beiden möglichen Metaboliten.

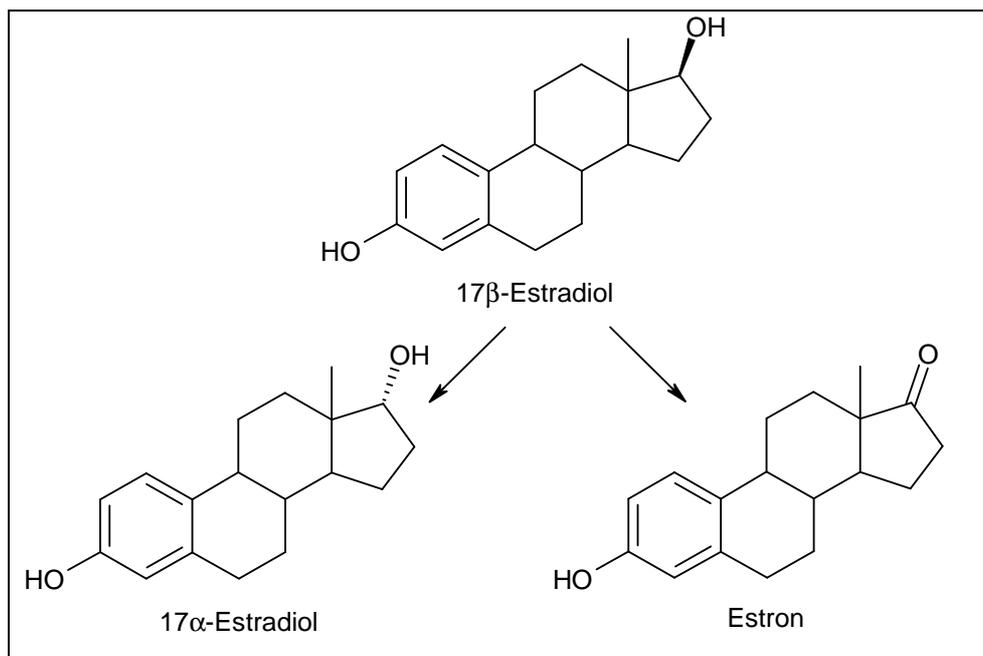


Abb. 12: Potenzielle Metaboliten zum Estradiolnachweis mittels GC/C/IRMS

Da Estrogene Stoffwechselprodukte der Androgene sind (vgl. Abb. 8, S. 12), werden für den Nachweis von Estradiol mittels GC/C/IRMS dieselben ERCs verwendet wie für den Testosteronnachweis.

3.6.3 Potenzielle Zielanalyten zur Herkunftsbestimmung urinären Norandrosterons mittels GC/C/IRMS

Wie in Kap. 1.2 erwähnt, ist NA der wichtigste Metabolit des Nandrolons (u.a. Baume *et al.* 2004; Ozer und Temizer 1997; Schänzer und Donike 1993; Schänzer 1996; Schänzer *et al.* 2000) und entsprechend der Prohormone 19-Norandrostendion und 19-Norandrostendiol (Schänzer *et al.* 2000; Schrader und Schänzer 2004; Schrader *et al.* 2006; Tseng *et al.* 2006) als auch ein Nebenmetabolit des in vielen Kontrazeptiva enthaltenen Gestagens 19-Norethisteron (de Boer *et al.* 1988). In geringen Mengen unterhalb des WADA-Grenzwerts von 2 ng/mL (WADA 2004b) wird NA auch unter normalen physiologischen Bedingungen vor allem von Frauen, wahrscheinlich als Nebenprodukt bei der Estrogenbiosynthese, ausgeschieden (u.a. de Geus *et al.* 2004; Hemmersbach *et al.* 2006; Van Eenoo *et al.* 2001). Während der Schwangerschaft kann es auch in größeren Mengen im Urin vorkommen (Ayotte *et al.* 2002; Mareck-Engelke *et al.* 2000). Die genannten Ursachen für urinäres NA sind mittels der herkömmlichen Techniken ggf. nach Ausschluss einer Schwangerschaft über das humane Choriongonadotrophin bzw. nach Ausschluss von Norethisteron über den Hauptmetaboliten Tetrahydronorethisteron eindeutig identifizierbar. Wie bereits in Kap. 1.2 erwähnt, wurde ab dem Jahr 2004 allerdings bekannt, dass endogene Steroide wie AND oder ETIO in sehr seltenen Fällen im Urin in geringen Mengen zu den entsprechenden 19-Norsteroiden demethyliert werden (Grosse *et al.* 2005; Thieme *et al.* 2004). NA-Konzentrationen in Dopingkontrollproben von bis zu 2,2 ng/mL konnten auf diese Demethylierungsreaktion zurückgeführt werden. Ursache und Mechanismus dieses Phänomens sind weitgehend unerforscht. Diese Möglichkeit der NA-Bildung im Urin ist mit den herkömmlichen Methoden nicht zweifelsfrei von Doping abzugrenzen. Über die Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse mittels GC/C/IRMS hingegen lässt sich die endogene oder exogene Herkunft von Steroiden nachweisen.

Abb. 13 zeigt verkürzt die zu Grunde liegende Fragestellung und die genannten potenziellen Zielanalyten.

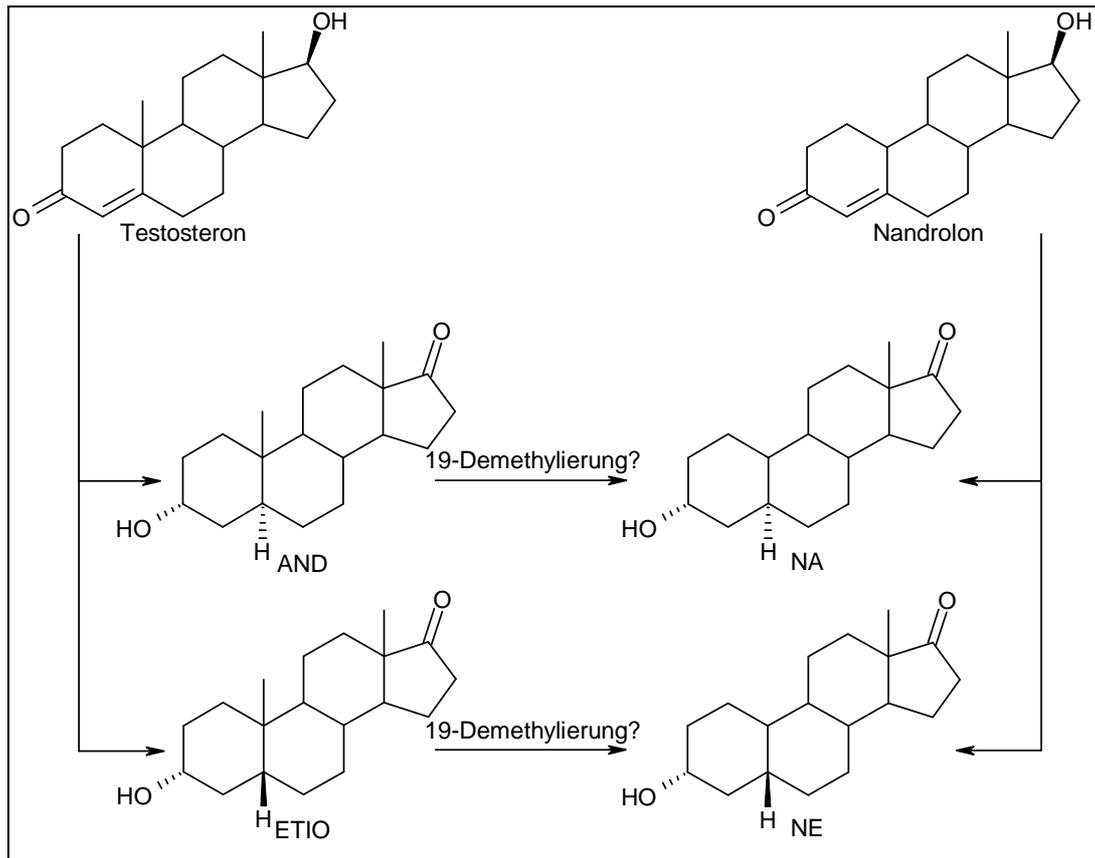


Abb. 13: Vereinfachte Fragestellung und potenzielle Zielanalyten zur Herkunftsbestimmung urinären Norandrosterons

Als Zielanalyten dienen entsprechend in erster Linie NA und AND. AND ist hier der mögliche *Precursor* von NA und somit die endogene Referenz. NA hingegen ist entweder Metabolit der künstlichen Steroide mit analogem niedrigem $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert oder Demethylierungsprodukt des endogenen AND mit zu erwartendem endogenem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis. Die Analyse weiterer Steroide wie NE als Metabolit oder ETIO als ERC kann ggf. zusätzlich hilfreich sein.

Bei gleichzeitiger Einnahme von Testosteron oder anderen zu AND verstoffwechselten Steroiden ist zu beachten, dass das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von AND bereits beeinflusst wurde. In solch einem Fall ist kein signifikanter $\Delta\delta$ -Wert zwischen NA und AND zu erwarten. Zum Nachweis des Dopingvergehens werden dann ERCs verwendet, die nicht durch Testosteron oder seine Prohormone beeinflusst werden und vorzugsweise mit AND als Metabolit verglichen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Probenmaterial

4.1.1 Rinderurinproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 228 Proben von 49 Rindern untersucht (s. Tabelle 20, S. 167). Mit Ausnahme von vier Proben (P224-P227) vom französischen Partnerlabor des ISOSTER-Projekts fanden Design und Durchführung der Tierversuche sowie das Sammeln der Proben am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin statt. Alle Proben wurden bei -20 °C gelagert und unter Einhaltung der Kühlkette verschickt. Einige Proben wurden vom BfR im Verlauf des Projekts u.a. für Ringversuche mehrfach versendet. Deren Identität wurde erst nach Analyse übermittelt. Bis auf das aus Frankreich stammende Rind waren alle Tiere Holstein-Friesian-Rinder. Die verschiedenen Medikamente wurden als ölige Lösung in den Nacken der Tiere injiziert. Estradiol von Schering (Berlin, Deutschland) wurde als Valerat in einer Menge von 0,05 mg pro kg Körpergewicht appliziert. Testosteron wurde entweder als ein Gemisch aus Enantat und Propionat im Verhältnis von vier zu eins bezüglich freien Testosterons (Testoviron von Schering, Berlin, Deutschland) in einer Menge von 0,6 mg pro kg Körpergewicht oder als reines Enantat (Testosteron-Depot von Jenapharm, Jena, Deutschland) in einer Menge von 0,5 mg pro kg Körpergewicht gegeben. Auch Progesteron von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) wurde in gleicher Menge von 0,5 mg pro kg Körpergewicht appliziert. Die Tierversuche entsprachen dem Tierschutzgesetz und waren durch die zuständige Behörde genehmigt und überwacht (Tierversuchserlaubnis Nr. G 0060/02). Die Grundlage der Ernährung der Tiere bestand entweder ausschließlich aus Gräsern (C₃-Pflanzen) oder enthielt verschiedene Anteile an Mais (C₄-Pflanze). Eine ausschließlich auf Mais basierende Diät hat nicht stattgefunden, da dies der Gesundheit der Tiere aufgrund einer Mangelernährung wahrscheinlich abträglich gewesen wäre.

4.1.2 Humanurinproben

Zur Überprüfung der Richtigkeit der Methode wurden die Urinproben K1 bis K11 aus Tabelle 22 (S. 176) mit geringer NA-Konzentration bekannter Herkunft analysiert.

Des Weiteren wurden die in Tabelle 23 (S. 177) gezeigten 25 Dopingkontrollproben analysiert.

4.2 Methode zur Analyse von Rinderurinproben

Die entwickelte Methode zur Analyse der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von ausgesuchten Steroiden im Rinderurin ist in Abb. 14 als Flussdiagramm dargestellt.

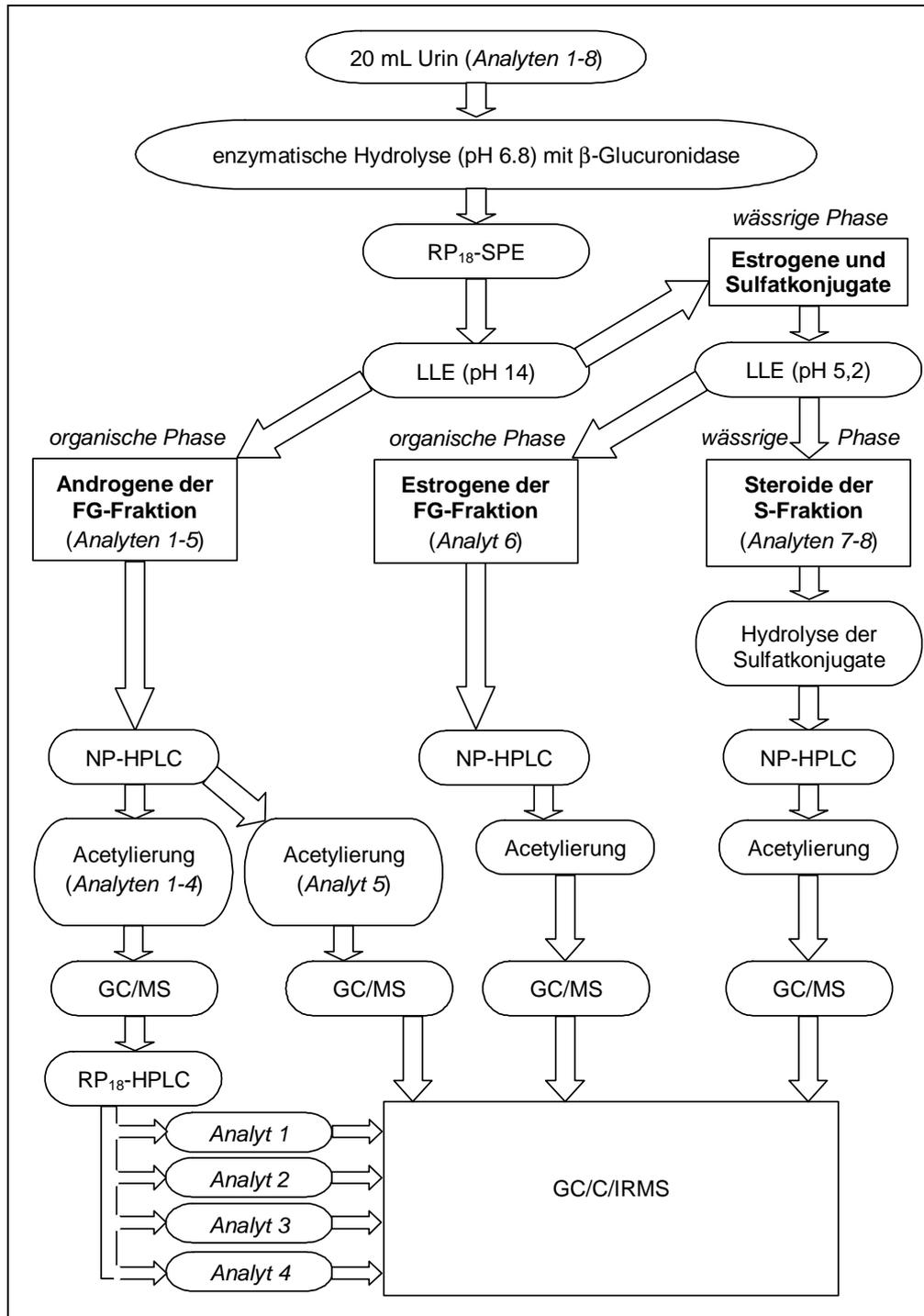


Abb. 14: Flussdiagramm der entwickelten Methode für den Rinderurin; die durchnummerierten Analyten sind EpiT (1), ETIO (2), Androstendiol (3), 5α -Androstan- 3β , 17α -diol (4), 5β -Androstan- 3α , 17α -diol (5), 17α -Estradiol (6), DHEA (7) und EpiA (8)

Den urinären Zielanalyten sind in Abb. 14 aus Gründen der Übersichtlichkeit fortlaufende Nummern zugewiesen. Diese sind an den Stellen in der Methode gezeigt, wo eine Verteilung der verschiedenen Steroide in mehrere Fraktionen stattfindet. Die verschiedenen Analyten sind EpiT (1), ETIO (2), Androstendiol (3), 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol (4), 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol (5), 17α -Estradiol (6), DHEA (7) und EpiA (8).

Zur Hydrolyse der Glucuronidkonjugate aus 20 mL Urin kam die enzymatische Spaltung nach Kap. 4.3.2.2 zum Einsatz. Die SPE auf RP₁₈-Material ist in Kap. 4.3.3 beschrieben. Die anschließende Trennung der Androgene (EpiT, ETIO, Androstendiol sowie die beiden Androstandiole) und Estrogene (17α -Estradiol) aus der die „freien“ (nicht konjugierten) und hydrolysierten Steroid-glucuronide enthaltenden Phase (FG-Fraktion) sowie die Abtrennung der Sulfatkonjugate (DHEA und EpiA aus der sog. S-Fraktion) erfolgte nach Kap. 4.3.4. Im Anschluss an die Hydrolyse der Sulfatkonjugate in der letztgenannten Fraktion gemäß Kap. 4.3.5 erfolgte die NP-HPLC für die drei verschiedenen Fraktionen gemäß Kap. 4.3.7.3 mit dem dort gezeigten Lösungsmittelgradienten auf der Dimethylaminopropyl-Säule mit dem größeren Innendurchmesser von 0,46 cm. Während DHEA zusammen mit EpiA aus der S-Fraktion und 17α -Estradiol aus der Estrogen-Fraktion jeweils in einer Fraktion gesammelt wurden, fand bei den Androgenen der FG-Fraktion zusätzlich eine Abtrennung des 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diols von den anderen Androgenen statt. Im Anschluss an die Acetylierung gemäß Kap. 4.3.8 der nun vier Fraktionen wurden die Zielanalyten mittels GC/MS nach Kap. 4.3.9 ggf. qualitativ analysiert und deren Konzentration semiquantitativ mittels externer Standards bestimmt. Die Androgene der verbliebenen Mischfraktion wurden zur abschließenden Aufreinigung mittels HPLC auf RP₁₈-Material gemäß Kap. 4.3.10 vereinzelt, während die Analyten der anderen drei Fraktionen keiner weiteren Aufreinigung bedurften. Abschließend wurden die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse der Zielanalyten aus den insgesamt sieben Fraktionen per GC/C/IRMS nach Kap. 4.3.11 bestimmt.

4.3 Methodenentwicklung zur Aufarbeitung von Rinderurin

Die der Methode zu Grunde liegende Strategie zur Aufarbeitung von Rinderurin für die GC/C/IRMS ist in Kap. 3 beschrieben. Darauf basierend wurde die in Kap. 4.2 gezeigte Methode anhand der folgenden Experimente entwickelt.

4.3.1 Quantifizierung der potenziellen Zielanalyten mittels GC/MS

Zur Bestimmung der zu erwartenden Steroidkonzentrationen wurden die Proben aus den ersten Tierversuchen quantitativ analysiert. Dies diente sowohl der Identifizierung von ERCs und Metaboliten nach Verabreichung von Testosteron oder Estradiol als auch der Abschätzung des für die GC/C/IRMS einzusetzenden Probenvolumens.

Es wurde eine auf GC/MS basierende, vormals zu Metabolismus-Studien im Humanbereich entwickelte Methode angewendet (von Kuk *et al.* 2003). Diese lieferte differenziert Ergebnisse für die FG-Fraktion und die S-Fraktion. Die Messungen erfolgten im *selected ion monitoring* Modus. Tabelle 2 zeigt die Zielanalyten und die für die Quantifizierung verwendeten Ionen.

Tabelle 2: Ionen und Zielanalyten der quantitativen GC/MS-Analysen

Analyt (jeweils als bis-TMS-Derivat)	Verhältnis Masse zu Ladung (m/z) des verwendeten Ions
$^2\text{H}_5$ -AND-glucuronid (Kontrolle der Hydrolyse der Steroid-glucuronide)	439
$^2\text{H}_4$ -ETIO (interner Standard)	438
$^2\text{H}_4$ -AND-sulfat (Überprüfung der Hydrolyse der Steroid-sulfate)	438
ETIO; EpiA; Androst-5-en-3 β ,17 α -diol; AND; Androst-5-en-3 β ,17 α -diol	434
DHEA, EpiT, Testosteron	432
5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol; 5 α -Androstan-3 β ,17 β -diol	421
17 α -Estradiol; 17 β -Estradiol	416
Estron	414
5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol	346

Das zu Grunde liegende GC/MS-System ist in Tabelle 32 (S. 181) beschrieben. Die weiteren Details sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Parameter der quantitativen GC/MS-Analysen

Injektionsmodus	<i>Split</i> im Verhältnis 1:10
Injektionsvolumen	2 μL
GC-Säule	J&W Ultra 1 von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland); Länge: 17 m; Innendurchmesser: 0,2 mm; Filmdicke: 0,11 μm
Temperaturprogramm	180 $^{\circ}\text{C}$ (0 min); 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis 230 $^{\circ}\text{C}$; 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis 310 $^{\circ}\text{C}$; 2 min halten
MS-Modus	<i>selected ion monitoring</i>

4.3.2 Enzymatische Hydrolyse urinärer Steroidkonjugate

Zur Ermittlung einer geeigneten Hydrolyse-Strategie der verschiedenen Steroidkonjugate im Rinderurin wurde die in Kap. 4.3.1 beschriebene Methode nach

von Kuk *et al.* (2003) zur Quantifizierung von Steroiden mittels GC/MS mit den beiden in Kap. 4.3.2.1 und 4.3.2.2 gezeigten enzymatischen Hydrolysemöglichkeiten kombiniert. Zwölf Proben der Rinder R297 (Proben P8, P10, P19 und P21), R303 (Proben P53 und P55), R304 (Proben P74 und P77) und R773 (Proben P191, P192, P202 und P204) wurden jeweils zeitgleich entweder mit der Enzymlösung von *Helix Pomatia* oder mit β -Glucuronidase von *Escherichia coli* hydrolysiert.

Die chemische Hydrolyse der Sulfatkonjugate nach Kap. 4.3.5 wurde im Anschluss an die LLE auf die zweimal zwölf verbliebenen wässrigen Phasen angewendet.

Die Zielanalyten wurden sowohl in den beiden FG-Fractionen als auch in den beiden S-Fractionen quantitativ bestimmt.

4.3.2.1 Kombinierte Hydrolyse von Glucuronid- und Sulfatkonjugaten

Die Proben wurden pro mL Urin mit 42 μ L 0,2 molarem (M) Natriumacetatpuffer (pH 5,2 \pm 0,2) und 10 μ L der in Tabelle 27 (S. 179) beschriebenen Enzymlösung von *Helix Pomatia* mit Glucuronidase- und Sulfataseaktivität versetzt. Anschließend wurde 16 Stunden bei 52 $^{\circ}$ C inkubiert.

4.3.2.2 Hydrolyse von Glucuronidkonjugaten

Zum Vergleich der Enzyme wurden die Proben zunächst pro mL Urin mit 0,3 mL 0,8 M Phosphatpuffer (pH 6,8 \pm 0,2) und 25 μ L der in Tabelle 27 (S. 179) beschriebenen β -Glucuronidase von *Escherichia coli* versetzt. Anschließend wurde bei 37 $^{\circ}$ C über Nacht (mindestens 5 Stunden) inkubiert.

Im Verlauf des Projekts wurde die Enzymmenge auf 5 μ L Enzymlösung pro mL Rinderurin reduziert.

4.3.3 Umkehr-Phasen Festphasenextraktion

Die RP₁₈-SPE-Säulen von UCT (Bristol, Großbritannien) aus Tabelle 37 (S. 183) wurden nacheinander mit 10 mL Methanol und 10 mL Wasser konditioniert. Nach Zentrifugation der hydrolysierten Urinproben (10 min bei 1200-facher Erdbeschleunigung) wurde der flüssige Überstand auf die Säule aufgegeben und nacheinander mit je 10 mL Wasser und *n*-Hexan gewaschen. Die Analyten wurden mit 5 mL einer Methanol/Ethylacetat-Mischung (30/70; v/v) eluiert.

4.3.4 Flüssig/flüssig Extraktion: Unterteilung in Androgene, Estrogene und Sulfatkonjugate

Nach vollständiger Evaporation der Lösungsmittel aus dem Eluat der SPE wurde mit 2 mL 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf pH 14 eingestellt. Die Androgene aus dieser FG-Fraktion wurden zweimal mit 5 mL *n*-Pentan ausgeschüttelt und in spitz zulaufende Reagenzgläser überführt. Nach Einstellen des pH-Werts der wässrigen Phase auf 5,2 durch Zugabe von 150 µL Essigsäure wurden die Estrogene der FG-Fraktion ebenfalls zweimal mit 5 mL *n*-Pentan ausgeschüttelt und in spitz zulaufende Reagenzgläser überführt. Beide organische Phasen wurden zur Trockene eingengt. Die verbliebene wässrige Phase enthielt die weiterhin konjugierten Steroid-sulfate und stellte somit die S-Fraktion dar.

4.3.5 Chemische Hydrolyse der Sulfatkonjugate

Die in Kap. 4.3.3 gezeigte SPE wurde im Anschluss an die LLE aus Kap. 4.3.4 mit der S-Fraktion wiederholt. Vor der Elution wurde die SPE-Säule hier für mindestens 3 Stunden über *di*-Phosphorpentoxid unter Vakuum getrocknet, um letzte Wasserrückstände vollständig zu beseitigen. Nach Elution der Analyten wurde 2 mL Ethylacetat/Schwefelsäure (100 mL/200 mg) hinzugefügt und zur Hydrolyse der Sulfatkonjugate für eine Stunde auf 55 °C erwärmt. Nach Zugabe von 0,75 mL 1 M Natriumhydroxid-Lösung zur Neutralisation der Schwefelsäure wurden die organischen Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt (wässriger Rest von etwa 0,75 mL). Anschließend wurde mit 1 mL 1 M Natriumhydroxid-Lösung ein alkalischer pH-Wert eingestellt. Die hydrolysierten Androgene der S-Fraktion wurden zweimal mit 5 mL *n*-Pentan ausgeschüttelt, in spitz zulaufende Reagenzgläser überführt und zur Trockene eingengt.

4.3.6 Normal-Phasen Festphasenextraktion

Zunächst wurde die im Folgenden beschriebene SPE auf die verschiedenen Fraktionen angewendet. Im Verlauf des Projekts wurde der Erfolg dieses Aufreinigungsschrittes anhand des Vergleichs verschiedener Proben überprüft und konnte schließlich gestrichen werden.

Die NP-SPE-Säulen wurden mit 18 mL *n*-Hexan konditioniert. Die drei Extrakte aus Kap. 4.3.4 (Androgene und Estrogene aus der FG-Fraktion) und 4.3.5 (Androgene aus der S-Fraktion) wurden jeweils in 75 µL Ethylacetat aufgenommen und auf dem Vortex geschüttelt. Nach Hinzufügen von 425 µL *n*-Hexan wurde erneut geschüttelt. Die weitere NP-SPE war für Androgene und Estrogene unterschiedlich.

4.3.6.1 Androgene

Die beiden die Androgene enthaltenden Extrakte wurden auf je eine konditionierte NP-SPE-Säule aufgebracht. Die Rückstände wurden jeweils in 9 mL *n*-Hexan/Ethylacetat (85/15; v/v) aufgenommen und ebenfalls aufgebracht. Nach dem Durchlauf des Lösungsmittels wurden die Androgene aus der FG- und der S-Fraktion getrennt voneinander mit jeweils 13 mL *n*-Hexan/Ethylacetat (60/40; v/v) eluiert und anschließend zur Trockene eingengt.

4.3.6.2 Estrogene

Der die Estrogene enthaltende Extrakt wurde auf eine konditionierte NP-SPE-Säule aufgebracht. Der Rückstand wurde in 3 mL *n*-Hexan/Ethylacetat (85/15; v/v) aufgenommen und ebenfalls aufgebracht. Nach dem Durchlauf des Lösungsmittels wurde mit 11 mL *n*-Hexan/Ethylacetat (60/40; v/v) eluiert und anschließend zur Trockene eingengt.

4.3.7 Erste semipräparative HPLC

Zwecks Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC mussten die Retentionszeiten der verschiedenen Zielanalyten unter den gegebenen Bedingungen bestimmt werden. Zur Ermittlung dieses Sammelschemas wurden zunächst 50 µL des jeweiligen Lösungsmittels zur Equilibrierung des Systems injiziert. Vor dem Fraktionieren der biologischen Proben wurden hintereinander zweimal die verschiedenen Steroid-Standards der Konzentration 100 ng/µL zur Festlegung der Fraktionsgrenzen injiziert. Die Bestimmung der Retentionszeiten der Standards im Anschluss an biologische Proben erlaubte Rückschlüsse darauf, ob das jeweilige System robust arbeitete oder ob die Bedingungen, z.B. durch Kontamination, nicht konstant blieben und sich die Chromatographie veränderte.

Die drei Extrakte aus Kap. 4.3.6.1 und 4.3.6.2 wurden jeweils in 100 µL Methanol aufgenommen, auf dem Vortex kräftig geschüttelt und in je eine HPLC-Gewindeflasche mit Mikroinsatz überführt. Zwecks quantitativer Überführung wurde dies ein zweites Mal mit 100 µL Methanol wiederholt und anschließend im Vakuum über *di*-Phosphorpentoxid getrocknet. Vor der Injektion wurde dieser Rückstand in 50 µL des jeweiligen Lösungsmittels aufgenommen. Nach Verschließen der Probengefäße wurde auf dem Vortex geschüttelt und vollständig in das HPLC-System injiziert.

Anschließend wurden die mittels Fraktionssammler nach dem entsprechenden Sammelschema aufgefangenen Urin-Extrakte oder Standards am

Rotationsverdampfer getrocknet und ggf. derivatisiert. Es wurde zweimal mit 50 μL Cyclohexan oder, nach Anschluss des KAS sowie Fertigstellung der modifizierten GC/C-Kopplung, zweimal mit 50 μL Aceton quantitativ in GC-Gewindeflaschen mit Mikroeinsatz überführt. Nach Verschließen mit einem Schraubdeckel mit Teflon-Septum wurde gemäß Kap. 4.3.9 mittels GC/MS analysiert. Zur Ermittlung der Wiederfindung nach Aufreinigung per HPLC wurde ggf. zu quantitativen Zwecken mit 5 α -Androstan-3 β -ol-Standard der Konzentration 100 ng/ μL statt mit dem reinen Lösungsmittel überführt und anschließend per GC/MS analysiert.

Zur Ermittlung eines geeigneten HPLC-Systems kamen die folgenden Säulen und Lösungsmittel zum Einsatz.

4.3.7.1 Aufreinigung auf RP₁₈-Phase

Zur Aufreinigung der urinären Zielanalyten wurde das in Tabelle 30 (S. 180) gezeigte HPLC-System unter den in Tabelle 4 beschriebenen Bedingungen eingesetzt.

Tabelle 4: HPLC-Parameter zum Einsatz der RP₁₈-Phase

HPLC-Säule	LiChroCart 250-4 LiChrospher 100 RP ₁₈ EC (5 μm) + Vorsäule LiChroCart 25-4 LiChrospher 100 RP ₁₈ (5 μm) von Merck (Darmstadt, Deutschland)
Injektionsvolumen	50 μL
Lösungsmittel zum Anlösen des Extrakts	Methanol
Säulenofen	24 $^{\circ}\text{C}$
Lösungsmittel A	Wasser
Lösungsmittel B	Acetonitril
Gradient (v/v)	70% A und 30% B innerhalb von 20 min 100% B 5 min 70% A und 30% B (Reequilibrierung)
Flussrate	1 mL/min
UV-Detektion	200 nm

4.3.7.2 Aufreinigung auf Aminopropyl-Phase

Zur Aufreinigung der urinären Zielanalyten wurde das in Tabelle 30 (S. 180) gezeigte HPLC-System zunächst unter den in Tabelle 5 beschriebenen Bedingungen eingesetzt.

Tabelle 5: HPLC-Parameter zum Einsatz der Aminopropyl-Phase

HPLC-Säule	EC 250/4,6 Nucleosil 100-5 NH ₂ von Macherey Nagel (Düren, Deutschland)
Injektionsvolumen	50 μL
Lösungsmittel zum Anlösen des Extrakts	<i>n</i> -Hexan/Tetrahydrofuran (THF)/Isopropanol 90/7,5/2,5 (v/v/v)

Säulenofen	24 °C
Lösungsmittel A	<i>n</i> -Hexan/THF/Isopropanol 90/7,5/2,5 (v/v/v)
Lösungsmittel B	Isopropanol
Gradient (v/v)	100% A (bis zur Elution der Analyten) 5 min 50% A und 50% B (Spülen der Säule) 7 min 100% A (Reequilibrierung)
Flussrate	2 mL/min
UV-Detektion	200 nm

Später wurden die Lösungsmittel und die Temperatur des Säulenofens gemäß Tabelle 6 modifiziert.

Tabelle 6: Modifizierte Lösungsmittel zum Einsatz der Aminopropyl-Phase

Säulenofen	50 °C
Lösungsmittel A	<i>n</i> -Hexan
Lösungsmittel B	Isopropanol
Lösungsmittel zum Anlösen des Extrakts	<i>n</i> -Hexan/Isopropanol 90/10 (v/v)
Gradient (v/v)	96% A und 4% B (bis zur Elution der Analyten) 5 min 50% A und 50% B (Spülen der Säule) 7 min 96% A und 4% B (Reequilibrierung)

Zur Klärung der Fragestellung von beobachteten niedrigen Wiederfindungsraten der Zielanalyten bei Verwendung der Aminopropyl-Phase wurde das Lösungsmittel A aus Tabelle 6 mit verschiedenen Mengen zwischen 1‰ und 5% (jeweils v/v) *n*-Butylamin versetzt. Verschiedene Standards wurden injiziert und die gesammelten Fraktionen nach Trocknung und Überführen in GC-Gewindeflaschen per GC/MS gemäß Kap. 4.3.9 analysiert.

4.3.7.3 Aufreinigung auf Dimethylaminopropyl-Phase

Zur Aufreinigung der Fraktionen, die Androgene enthalten, wurde das in Tabelle 30 (S. 180) gezeigte HPLC-System zunächst unter den in Tabelle 7 beschriebenen Bedingungen eingesetzt.

Tabelle 7: HPLC-Parameter zum Einsatz der Dimethylaminopropyl-Phase zur Aufreinigung der Androgene

HPLC-Säule	EC 250/4,0 Nucleosil 100-5 N(CH ₃) ₂ + Vorsäule CC 8/4 Nucleosil 100-5 N(CH ₃) ₂ von Macherey Nagel (Düren, Deutschland)
Injektionsvolumen	50 µL
Lösungsmittel zum Anlösen des Extrakts	<i>n</i> -Hexan/Isopropanol 90/10 (v/v)
Säulenofen	50 °C
Lösungsmittel A	<i>n</i> -Hexan
Lösungsmittel B	Isopropanol

Gradient (v/v)	96% A und 4% B (bis zur Elution der Analyten) 7 min 20% A und 80% B (Spülen der Säule) 9 min 96% A und 4% B (Reequilibrierung)
Flussrate	1 mL/min
UV-Detektion	200 nm

Zur Aufreinigung der Fraktionen, die Estrogene enthalten, wurden gegenüber Tabelle 7 folgende Parameter gemäß Tabelle 8 verändert.

Tabelle 8: HPLC-Parameter zum Einsatz der Dimethylaminopropyl-Phase zur Aufreinigung der Estrogene

Lösungsmittel zum Anlösen des Extrakts	<i>n</i> -Hexan/Isopropanol 86/14 (v/v)
Gradient (v/v)	0 min 96% A und 4% B innerhalb von 15 min 80 % A und 20% B 7 min 20% A und 80% B (Spülen der Säule) 9 min 96% A und 4% B (Reequilibrierung)
UV-Detektion	280 nm

Später wurde aufgrund höherer Robustheit die gleiche HPLC-Säule mit einem etwas größeren Innendurchmesser von 0,46 cm verwendet. Aus demselben Grund wurde der in Tabelle 8 angeführte Lösungsmittelgradient auch für die Androgene eingesetzt. Die anderen Parameter aus Tabelle 7 und Tabelle 8 blieben unverändert.

4.3.8 Acetylierung

Zur Acetylierung wurden die getrockneten Extrakte oder Standards mit jeweils 100 µL Pyridin und 100 µL Acetanhydrid versetzt und für 45 min auf 60 °C erhitzt. Nachdem die Derivatisierungsreagenzien am Rotationsverdampfer vollständig entfernt wurden, wurden die Extrakte, wie in Kap. 4.3.7 beschrieben, quantitativ in GC-Gewindeflaschen mit Mikroinsert überführt.

4.3.8.1 Überprüfung der Acetylierung

Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Acetylierung und der Sauberkeit der Derivatisierungsreagenzien wurden jeweils 5 µg der Steroid-Standards mit den verschiedenen Acetanhydriden aus Tabelle 29 (S. 180) derivatisiert und per GC/MS nach Kap. 4.3.9 analysiert.

4.3.8.2 Überprüfung der kommerziell verfügbaren Acetanhydride auf Diketen als Verunreinigung

Zur Überprüfung der kommerziell verfügbaren Acetanhydride auf Diketen als Verunreinigung wurde ein Aliquot des mit Wasser versetzten und anschließend destillierten Acetanhydrids aus Tabelle 29 (S. 180) mit 1‰ Diketen (v/v) versetzt und zur Derivatisierung gemäß Kap. 4.3.8 von jeweils 5 µg DHEA und Testosteron

eingesetzt. Die Extrakte wurden mit 100 μL 5α -Androstan- 3β -ol-Standard der Konzentration 50 ng/ μL (gelöst in Cyclohexan) in Autosampler-Gewindflaschen überführt und per GC/MS nach Kap. 4.3.9 analysiert.

4.3.9 GC/MS-Analyse

Nach Fraktionierung der Extrakte oder Standards mittels HPLC und ggf. Derivatisierung wurden diese zur Überprüfung der Reinheit, der Schnittgrenzen des jeweiligen Sammelschemas und zur Semiquantifizierung der Zielanalyten anhand externer Standards sowie ggf. zur Bestimmung der Wiederfindung der jeweiligen HPLC-Aufreinigung per GC/MS mit dem in Tabelle 32 (S. 181) gezeigten GC/MS-System analysiert. Die dort nicht aufgeführten Parameter sind Tabelle 9 zu entnehmen und entsprachen weitestgehend denjenigen der GC/C/IRMS-Analyse.

Tabelle 9: GC/MS-Parameter zur Überprüfung der HPLC-Aufreinigung

Injektionsmodus	<i>Splitless</i> (für 90 s)
Injektionslösungsmittel	Cyclohexan oder Aceton
Injektionsvolumen	1 μL
GC-Säule	J&W HP-5MS von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland); 30 m Länge; 0,25 mm Innendurchmesser; 0,25 μm Filmdicke; zur Verbesserung der Chromatographie bei <i>Splitless</i> -Injektion wurde der analytischen Säule ein <i>RT-Gap</i> vorgeschaltet (s. Tabelle 33, S. 181)
Temperaturprogramm	60 $^{\circ}\text{C}$ (90 s); 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis 225 $^{\circ}\text{C}$; 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis zur Elution der Analyten; 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis 300 $^{\circ}\text{C}$; mind. 90 s isotherm
MS-Modus	<i>Scan</i> (m/z 40-500)

4.3.10 Zweite semipräparative HPLC

Zur abschließenden Aufreinigung des Androgen-Extrakts aus der FG-Fraktion, der die acetylierten Zielanalyten von ETIO, EpiT, Androstendiol und 5α -Androstan- 3β , 17α -diol enthielt, wurde eine zweite semipräparative HPLC auf RP_{18} -Material mit dem in Tabelle 30 (S. 180) gezeigten System gemäß Tabelle 4 (S. 41) eingesetzt. Lediglich der Lösungsmittelgradient war um 10 min bei 100% Acetonitril von 20 min bis 30 min verlängert und das Injektionslösungsmittel war Acetonitril/Isopropanol 50/50 (v/v) an Stelle von Methanol. Vor den biologischen Proben wurden einmal das Lösungsmittel und anschließend zur Bestimmung der Fraktionsgrenzen zweimal die acetylierten Standards injiziert. Der Aufreinigungserfolg dieses Schrittes wurde per GC/MS nach Kap. 4.3.9 überprüft.

4.3.11 GC/C/IRMS-Analyse

Aus der Semiquantifizierung mittels GC/MS wurde die Menge des Lösungsmittels sowie das Injektionsvolumen bestimmt, so dass nach Möglichkeit 100 ng der

Zielanalyten in das GC/C/IRMS-System injiziert wurden. Aus praktischen Gründen betrug die Menge des Lösungsmittels mindestens 10 µL. Zur Überprüfung der Stabilität des Systems und somit der Validität der Ergebnisse wurden vor, zwischen und nach biologischen Extrakten innerhalb einer Sequenz acetylierte Standards gemessen. Dies diente insbesondere der Kontrolle der Oxidationskapazität des Reaktors.

Zur Analyse der Kohlenstoffisotopensignatur der urinären Zielanalyten kam zunächst das in Tabelle 33 (S. 181) beschriebene GC/C/IRMS-System zum Einsatz. Nach Einbau des KAS und der Fertigstellung der modifizierten GC/C-Kopplung (s. Abb. 10, S. 24) wurden die meisten Proben mit dem gemäß Tabelle 34 (S. 182) veränderten System analysiert. Zur Kalkulation der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der Analyten dienten Referenzgaspulse mit Kohlendioxid bekannter Isotopensignatur. Diese wurden bei der Anwendung des herkömmlichen Systems zum einen im sog. *Backflush*-Modus zu Beginn und am Ende einer Analyse gesetzt und zum anderen im sog. *Straight*-Modus vor und nach den Zielanalyten, um dem durch das System (insbesondere durch die GC-Säule) verursachten Hintergrund gerecht zu werden. Bei Verwendung des modifizierten GC/C/IRMS-Systems nach Tabelle 34 (S. 182) wurden die Referenzgaspulse zum einen zu Anfang der Analyse noch vor die Retentionszeit des Lösungsmittels gesetzt und zum anderen ebenfalls vor und nach den Zielanalyten.

Als Injektions-Lösungsmittel für das herkömmliche System wurde Cyclohexan verwendet, während bei Anwendung des KAS wegen des niedrigeren Siedepunkts Aceton benutzt wurde. Aufgrund der teilweise im Vergleich zu den Zielanalyten sehr intensiven biologischen Matrix wurde das Temperaturprogramm des KAS optimiert. Im Anschluss an die Lösungsmittelausblendung bei 40 °C erfolgte eine zweite Haltetemperatur bei 85 °C, um diese relativ früh eluierenden Matrix-Komponenten weitgehend zu entfernen. Dieses Temperaturprogramm ist in Tabelle 34 (S. 182) dargestellt und wurde für die weiteren Analysen angewendet.

4.4 Methode zur Herkunftsbestimmung von Norandrosteron aus dem Humanurin

Wie in Kap. 3.6.3 beschrieben, sollte die endogene oder exogene Herkunft von urinärem NA im Humanurin anhand des Vergleichs der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von NA und AND bestimmt werden. Die der Methode zu Grunde liegende Strategie zur

Aufarbeitung der Humanurinproben ist in Kap. 3 beschrieben. Im Speziellen musste hier das NA zum einen weitgehend verlustfrei aufgereinigt und zum anderen von dem im Urin weitaus konzentrierteren AND abgetrennt werden, damit letztendlich ähnliche Mengen dieser Analyten in das GC/C/IRMS-System injiziert werden konnten. Um das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von NA ab einer Konzentrationen von 2 ng/mL verlässlich zu bestimmen, wurden nach Möglichkeit mindestens 10 mL Urin aufgearbeitet. Zur Sicherstellung der Validität der Analyse wurde zusätzlich zu den zu analysierenden Proben ein Blankurin mit charakterisiertem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis für AND und ETIO sowie ein Kontrollurin aufgearbeitet. Der Kontrollurin war ein weiterer Blankurin, der mit NA-glucuronid in einer Konzentration von 2 ng/mL, 4 ng/mL, 6 ng/mL oder 8 ng/mL bezüglich des freien Steroids versetzt wurde.

Die Möglichkeit der Analyse des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses von ETIO ergab sich aus der nachfolgend beschriebenen Aufarbeitung. Bei uneindeutigen Ergebnissen konnte dieses Ergebnis als weiterer Parameter zur Beurteilung der Probe hinzugezogen werden.

4.4.1 Umkehr-Phasen Festphasenextraktion

Zunächst wurde eine SPE an RP₁₈-Material durchgeführt, um polare Matrixkomponenten zu entfernen. Die Urinproben wurden auf die mit nachfolgend je 2 mL Methanol und Wasser konditionierten RP₁₈-SPE-Säulen von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) aus Tabelle 37 (S. 183) aufgegeben. Es wurde mit 2 mL Wasser gewaschen und anschließend mit 2 mL Methanol eluiert.

4.4.2 Enzymatische Hydrolyse der Glucuronide

Die im Urin hauptsächlich als Glucuronide vorliegenden Steroide wurden enzymatisch mit β -Glucuronidase von *Escherichia Coli* hydrolysiert. Die am Rotationsverdampfer getrockneten Eluate wurden mit 2 mL 0,2 M Phosphatpuffer versetzt, um einen neutralen pH-Wert einzustellen. Zur Hydrolyse wurde mit 50 μL β -Glucuronidase versetzt und eine Stunde bei 50 °C inkubiert.

4.4.3 Flüssig/flüssig Extraktion

Es wurde mit 250 μL Carbonatpuffer (s. Tabelle 28, S. 179) ein alkalischer pH-Wert eingestellt. Zur weitestgehend vollständigen Überführung der hydrolysierten Steroide wurde zweimal mit 5 mL *tert*-Butylmethylether ausgeschüttelt, in spitz zulaufende Reagenzgläser überführt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Anschließend wurden die Extrakte mit 100 μL Methanol versetzt, auf dem Vortex kräftig geschüttelt und in eine HPLC-Gewindflasche mit Mikroinsert

überführt. Zwecks quantitativer Überführung wurde dies ein weiteres Mal mit 100 μL Methanol wiederholt und anschließend im Exsikkator unter Vakuum über *di*-Phosphorpentoxid getrocknet.

4.4.4 Erste semipräparative HPLC

Ziel der ersten semipräparativen NP-HPLC war es, NA zusammen mit AND von ETIO abzutrennen und den Extrakt weiter aufzureinigen. Es wurde das für die Aufreinigung der Androgene im Rinderurin in Kap. 4.3.7.3 beschriebene HPLC-System mit der Dimethylaminopropyl-Säule (0,46 cm Innendurchmesser) von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) und dem dort in Tabelle 8 (S. 43) gezeigten Lösungsmittelgradienten angewendet. Zur Bestimmung der Retentionszeiten und der Schnittgrenzen wurde zunächst zweimal ein Gemisch von je 5 μg NA, AND und ETIO in 50 μL *n*-Hexan/Isopropanol 90/10 (v/v) angelöst und vollständig injiziert.

In Abb. 15 sind der entsprechende Ausschnitt des HPLC/UV-Chromatogramms sowie die Schnittgrenzen für die nachfolgend fraktionierten Probenextrakte gezeigt.

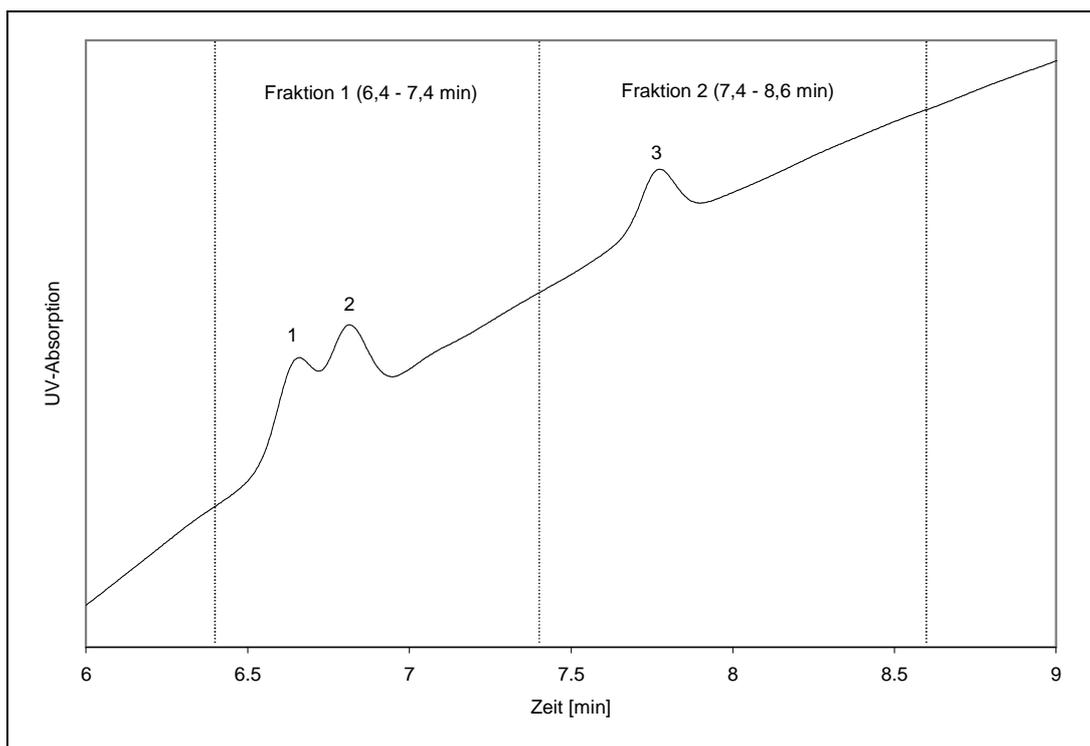


Abb. 15: Ausschnitt des HPLC/UV-Chromatogramms auf Dimethylaminopropyl-Phase bei 200 nm der Standards NA (1), AND (2) und ETIO (3) mit entsprechendem Sammelschema

Die getrockneten Probenextrakte wurden in 50 μL *n*-Hexan/Isopropanol 90/10 (v/v) aufgenommen, mit Schraubdeckel versehen und auf dem Vortex kräftig geschüttelt. Sie wurden in der Reihenfolge Kontrollurin, Blankurin, Probe(n) vollständig injiziert und gemäß den in Abb. 15 gezeigten Schnittgrenzen in spitz zulaufenden

Reagenzgläsern gesammelt. Anschließend wurden die Extrakte am Rotationsverdampfer getrocknet. Die NA und AND enthaltende Fraktion 1 wurde in 100 μL Methanol angelöst, auf dem Vortex kräftig geschüttelt und in eine HPLC-Gewindeflasche mit Mikroinsert überführt. Zwecks quantitativer Überführung wurde dies ein weiteres Mal mit 100 μL Methanol wiederholt und anschließend im Exsikkator unter Vakuum über *di*-Phosphorpentoxid getrocknet. Die ETIO enthaltende Fraktion 2 war für die GC/C/IRMS ausreichend aufgereinigt.

4.4.5 Zweite semipräparative HPLC

Der abschließende HPLC-Aufreinigungsschritt diente der Trennung von NA und AND sowie der Entfernung weiterer Matrixkomponenten. Es wurde das in Kap. 4.3.7.1 beschriebene HPLC-System angewendet. Zur Bestimmung der Retentionszeiten und der Schnittgrenzen wurde zweimal ein Gemisch von je 5 μg NA und AND in 50 μL Methanol vollständig injiziert.

Abb. 16 zeigt den entsprechenden Ausschnitt des HPLC/UV-Chromatogramms sowie die daraus resultierenden Schnittgrenzen für die nachfolgend fraktionierten Probenextrakte.

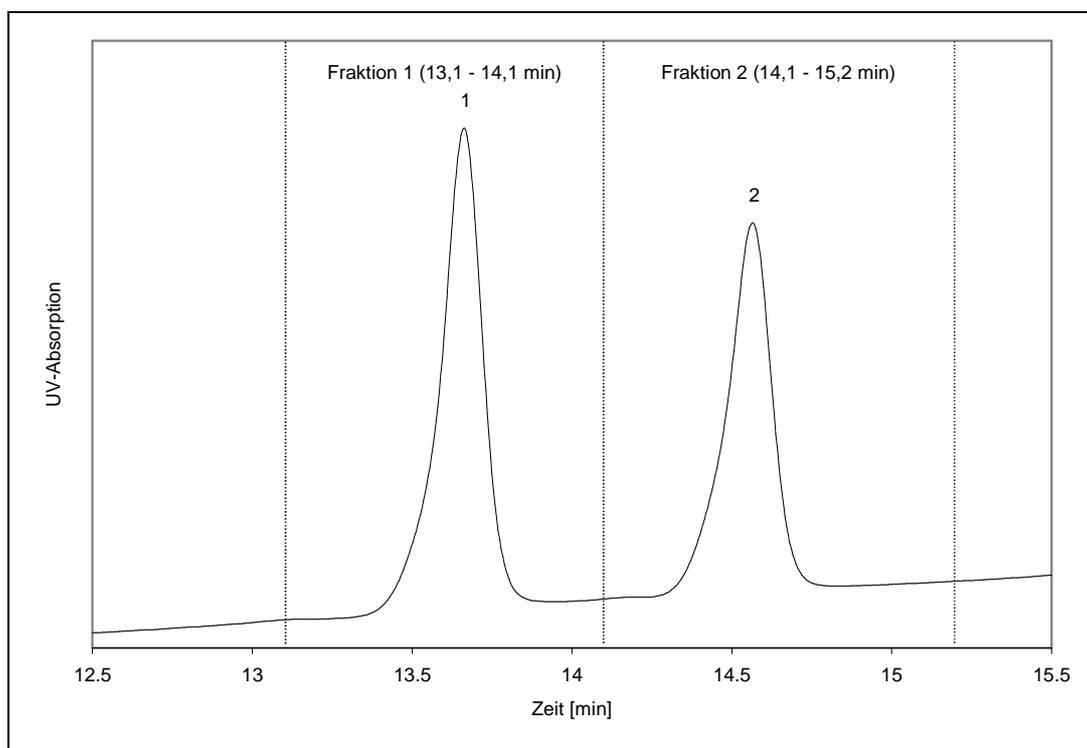


Abb. 16: Ausschnitt des HPLC/UV-Chromatogramms auf RP_{18} -Phase bei 200 nm von NA (1) und AND (2) sowie das entsprechende Sammelschema

Die NA und AND enthaltenden Probenextrakte wurden in 50 μL Methanol aufgenommen, mit Schraubverschluss versehen und auf dem Vortex kräftig

geschüttelt. Sie wurden in der Reihenfolge Kontrollurin, Blankurin, Probe(n) vollständig injiziert und gemäß den nach Abb. 16 festgelegten Schnittgrenzen in spitz zulaufenden Reagenzgläsern gesammelt. Nach dem Trocknen am Rotationsverdampfer war die Aufarbeitung abgeschlossen.

Identität und Aufreinigung der NA enthaltenden Fraktion wurde aufgrund der niedrigen Konzentration dieses Analyten in allen Proben mittels GC/MS-Analyse unter mit der GC/C/IRMS-Analyse vergleichbaren Bedingungen überprüft. Ggf. wurden auch die anderen Fraktionen mittels GC/MS analysiert; aufgrund der weitaus höheren Konzentration von AND und ETIO war dies in der Regel nicht erforderlich.

4.4.6 GC/C/IRMS-Analyse

Die Analysen der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse der Zielanalyten fanden auf dem in Tabelle 35 (S. 182) beschriebenen GC/C/IRMS-System 2 statt. Zunächst wurden die Analysen mit *Split/Splitless*-Injektor durchgeführt, während später aufgrund verbesserter Robustheit des Systems der CoC-Injektor zur Anwendung kam. Es wurden die zwei in Tabelle 35 (S. 182) beschriebenen GC-Säulen verwendet, die unter den gegebenen Bedingungen vergleichbare chromatographische Eigenschaften aufwiesen.

Vor der Untersuchung biologischer Proben wurde die Eignung des GC/C/IRMS-Systems anhand der Injektion isotopisch charakterisierter Standards sichergestellt. Die Injektion von 1 μL eines Gemischs aus 5α -Androstan- 3β -ol, ETIO, AND, 5β -Pregnan- $3\alpha,20\alpha$ -diol und 5α -Androstan- $3\alpha,11\beta$ -diol-17-on der Konzentration 100 ng/ μL diente der Überprüfung der allgemeinen Parameter des Systems. Mit der Injektion von jeweils 1 μL NA der Konzentration 10 ng/ μL sowie 5α -Androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol-diacetat der Konzentration 100 ng/ μL hingegen wurde die Eignung des Systems für Messungen am unteren Limit des Messbereichs sichergestellt.

Die Extrakte wurden aus praktischen Gründen in mindestens 5 μL des entsprechenden Lösungsmittels aufgenommen und, je nach Injektortyp, maximal 3 μL (*Split/Splitless*) bzw. 2 μL (CoC) injiziert. Zur Sicherstellung der Validität der kalkulierten Isotopenverhältnisse von NA wurden 0,5 μL eines isotopisch charakterisierten 5α -Androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol-diacetat-Standards der Konzentration 100 ng/ μL als Referenz koinjiziert. Zur Vermeidung von Verlusten wurde zumeist manuell injiziert. Bei der Analyse von AND und ETIO wurde 1 μL 5α -Androstan- 3β -ol-Standard der Konzentration 100 ng/ μL als Referenz koinjiziert. Aufgrund der ungleich höheren Konzentration von AND und ETIO im Gegensatz zu NA wurde überwiegend

der Autosampler verwendet. Die Kalkulation der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte erfolgte über Referenzgaspulse mit Kohlendioxid bekannter Isotopensignatur zum einen im *Backflush*-Modus zu Beginn und am Ende einer Analyse und zum anderen im sog. *Straight*-Modus vor und nach den Zielanalyten, um dem durch das System verursachten Hintergrund gerecht zu werden. Die biologischen Proben wurden in der Reihenfolge Kontrollurin, Blankurin, Probe(n) injiziert.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Methodenentwicklung für die Herkunftsbestimmung von Steroiden im Rinderurin mittels GC/C/IRMS

5.1.1 Auswahl der Zielanalyten mittels quantitativer GC/MS-Analyse

Um eine Entscheidung über die Auswahl der Zielanalyten für die GC/C/IRMS-Methode zu treffen, ist zunächst die quantitative Bestimmung der möglichen Steroide geeignet. Die in Kap. 4.3.1 gezeigte Methode wird auf die Proben der ersten Tierversuche mit den Tieren R297 (je ein Ausscheidungsversuch mit Estradiol und Testosteron; Proben P8-P35), R298 (Misch-Applikation von Estradiol und Testosteron; Proben P36-P45), R303 (Testosteron-Applikation; Proben P49-P67), R304 (Misch-Applikation von Estradiol und Progesteron; Proben P70-P84), R305 (keine Applikation; Proben P86-P99), R306 (Estradiol-Applikation; Proben P104-P117), R773 (je ein Ausscheidungsversuch mit Estradiol und Progesteron; Proben P191-P208) und Mamie (Testosteron-Applikation; Proben P224-P227) angewendet (vgl. Tabelle 20, S. 167). Zudem werden die Proben P5 (trächtige Kuh) und P216-P219 (Mischproben aus den in Tabelle 20 genannten Kategorien) analysiert. Es sei darauf hingewiesen, dass der Datensatz nicht hinsichtlich jedes Analyten in den beiden Fraktionen vollständig ist. Diesbezüglich ist zu beachten, dass der Einfachheit halber in der Legende der folgenden Abbildungen je Ausscheidungsversuch nur die erste und die letzte Probe angegeben ist, während die Proben dazwischen nicht immer vollständig sind.

Durch die Bestimmung der Konzentration der Zielanalyten soll zum einen überprüft werden, welche Analyten in für die GC/C/IRMS hinreichender Menge ausgeschieden werden, um vorzugsweise 100 ng, zumindest aber 10 ng je Analyt zu injizieren (vgl. Kap. 3). Zum anderen sollen die ERCs und Testosteron- bzw. Estradiol-Metaboliten über die möglichen Konzentrationsveränderungen nach Applikation identifiziert werden. Des Weiteren ist für die GC/C/IRMS-Methode zu berücksichtigen, ob die jeweiligen Zielanalyten eher nicht konjugiert bzw. glucuronidiert oder sulfatiert ausgeschieden werden.

5.1.1.1 Endogene Referenzverbindungen

In Kap. 2.2.1 ist erwähnt, dass die Reaktion der an Position 5 ungesättigten Steroide zu den an Position 4 ungesättigten Verbindungen wie Testosteron und

Progesteron irreversibel ist. In Abb. 8 (S. 12) ist zudem gezeigt, dass Androgene keine Metaboliten von Estrogenen sind, da der Metabolismus irreversibel in die Richtung von den Androgenen zu den Estrogenen verläuft und nicht umgekehrt. In Kap. 3.6.1 wurden die an Position 5 ungesättigten Androgene Androstendiol und DHEA als geeignete ERCs genannt. Andere an Position 5 ungesättigte Androgene wie z.B. das Androst-5-en-3 β ,17 β -diol werden nur in sehr geringen Mengen gefunden und nicht weiter berücksichtigt. Eine weitgehende Unabhängigkeit zwischen Ausscheidungsmenge und einer Applikation von Estradiol, Testosteron oder Progesteron würde die Eignung der genannten Verbindungen als ERCs bestätigen. Ob die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von DHEA und Androstendiol tatsächlich weitgehend unbeeinflusst von den genannten Hormonen bleiben, kann allerdings nur mittels GC/C/IRMS bestimmt werden.

5.1.1.1.1 Androstendiol

Die Analyse der bei der Methode erhaltenen verschiedenen Fraktionen zeigt zunächst, dass das Androstendiol zu 83% ($\pm 3,7\%$; $N = 54$) nicht konjugiert bzw. glucuronidiert ausgeschieden wird. Die nachfolgenden Abbildungen beziehen sich daher auf die FG-Fraktion.

Abb. 17 zeigt die urinaire Konzentration des Androstendiols in verschiedenen Blankurinen der Tiere R297 und R305.

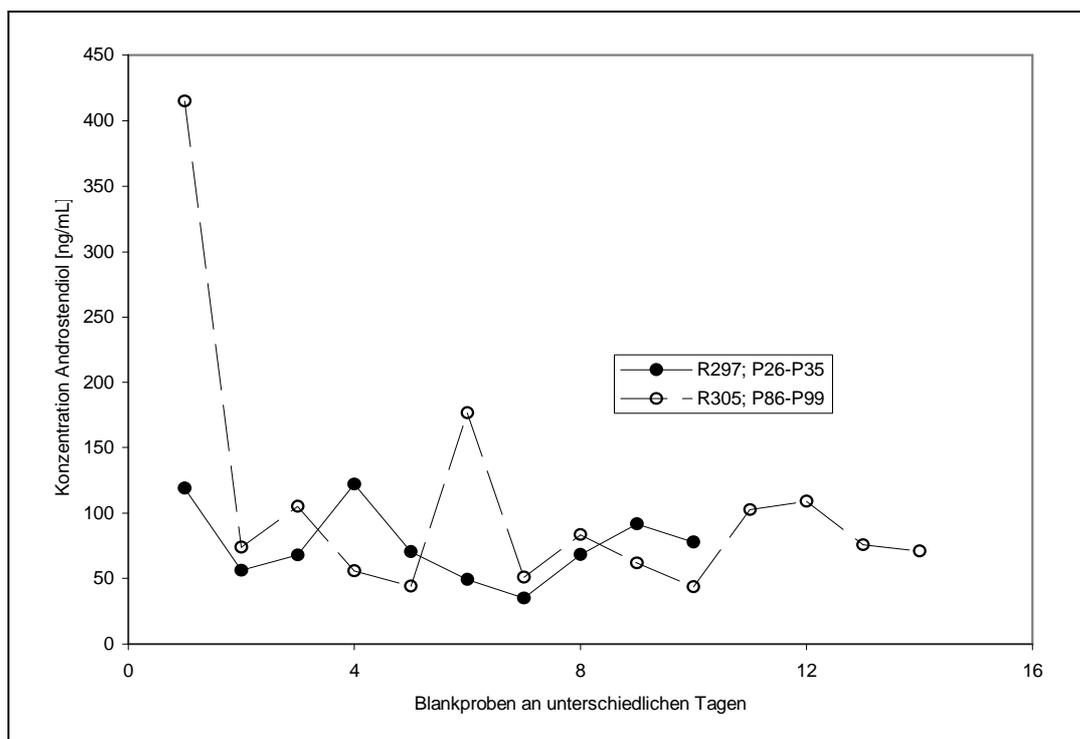


Abb. 17: Urinäre Konzentration von Androstendiol in Blankproben der Tiere R297 und R305

In den Proben von Rind R297 beträgt der Gehalt dieses ERCs im Mittel 76 ng/mL und schwankt zwischen 35 ng/mL und 122 ng/mL. Die Proben von Rind R305 weisen einen mittleren Gehalt von 105 ng/mL und schwanken zwischen 44 ng/mL und 415 ng/mL. Die starken Schwankungen lassen sich, wie in Kap. 1.1 bereits erwähnt, durch die speziellen Umstände jedes einzelnen Tiers erklären, insbesondere mit der Wasseraufnahme und der damit verbundenen Dichte des Urins. Die ermittelten Konzentrationen sind bei entsprechendem Aufarbeitungsvolumen in allen Fällen als ausreichend für die GC/C/IRMS anzusehen.

Abb. 18 zeigt den Verlauf der urinären Konzentration des Androstendiols dreier Testosteron-Ausscheidungsversuche mit den Tieren R297, R303 und Mamie.

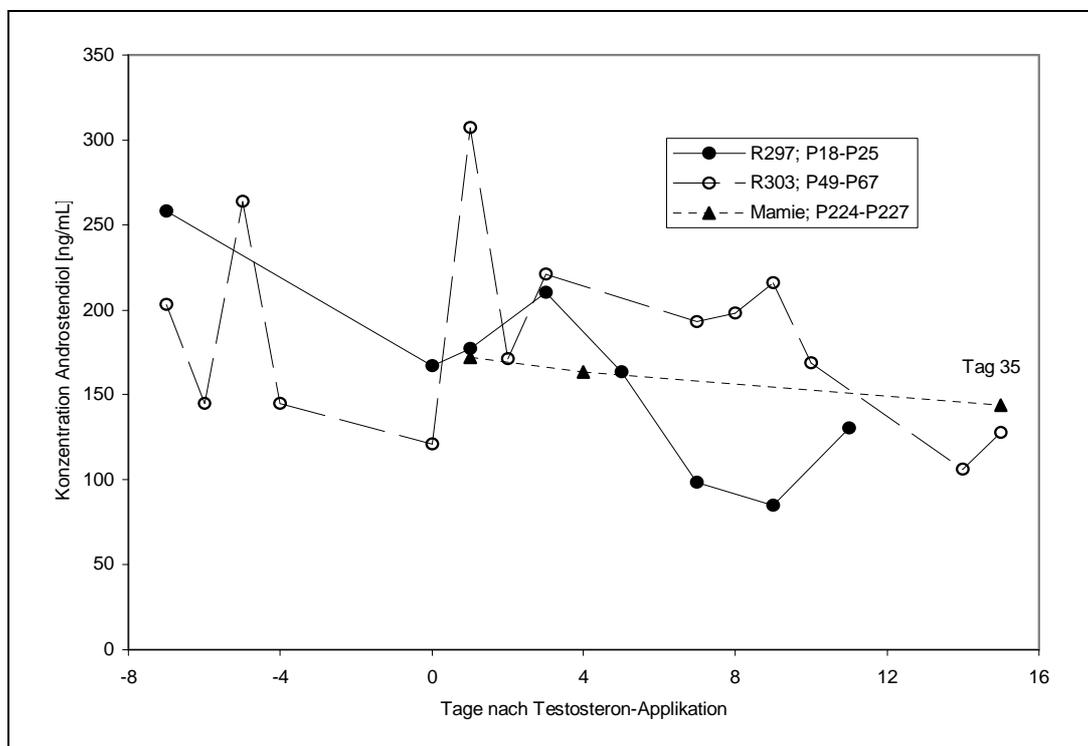


Abb. 18: Urinäre Konzentration von Androstendiol in Proben der Tiere R297, R303 und Mamie vor bzw. nach Testosteron-Applikation

Für Rind R297 beträgt der mittlere Gehalt an Androstendiol 161 ng/mL (85 ng/mL bis 258 ng/mL), für Rind R303 beträgt er 185 ng/mL (106 ng/mL bis 307 ng/mL) und für Mamie 160 ng/mL (144 ng/mL bis 173 ng/mL). Auch diese Ergebnisse zeigen eine ausreichende Konzentration dieses Analyten für die GC/C/IRMS. Eine Abhängigkeit der Konzentration zwischen Androstendiol und Testosteron-Gabe ist in den drei Tierversuchen nicht feststellbar.

Abb. 19 zeigt den Verlauf der urinären Konzentration des Androstendiols dreier Estradiol-Ausscheidungsversuche mit den Tieren R297, R306 und R773. Bei den

Tieren R297 und R773 ist zu beachten, dass am siebten Tag nach der ersten Applikation eine weitere Estradiol-Injektion durchgeführt wurde.

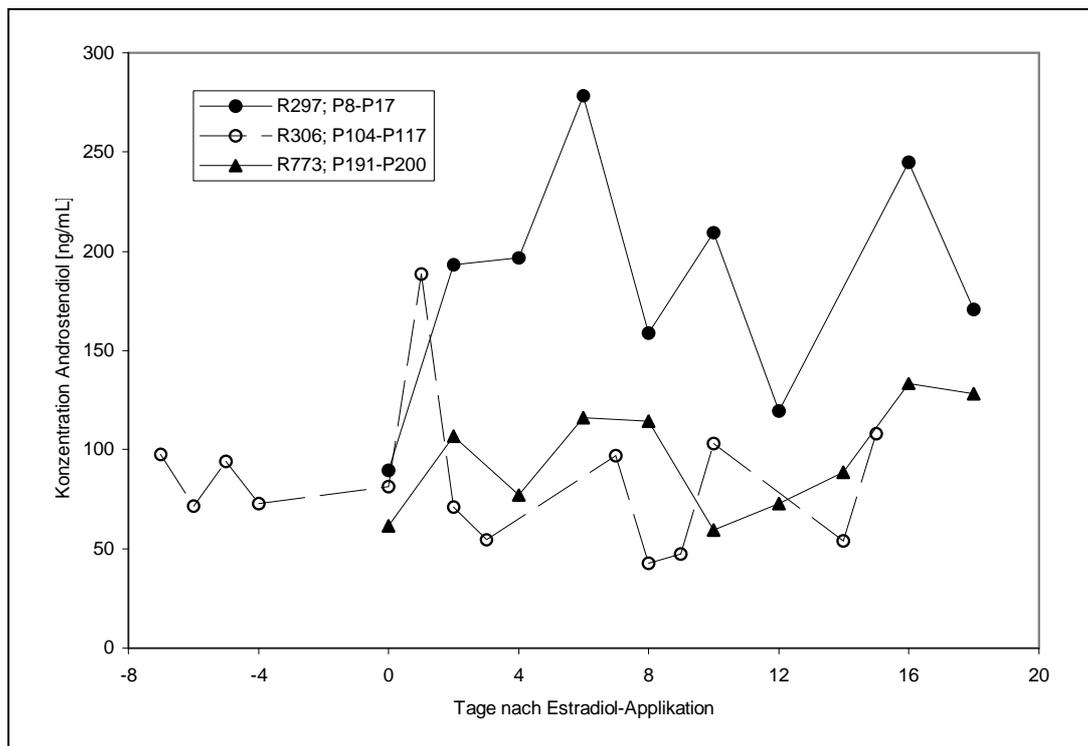


Abb. 19: Urinäre Konzentration von Androstendiol in Proben der Tiere R297, R306 und R773 vor bzw. nach Estradiol-Applikation

Bezüglich der Estradiol-Applikation beträgt für Rind R297 der mittlere Gehalt an Androstendiol 185 ng/mL (89 ng/mL bis 278 ng/mL), für Rind R306 sind dies 85 ng/mL (43 ng/mL bis 189 ng/mL) und für Rind R773 sind es 96 ng/mL (60 ng/mL bis 133 ng/mL). Neben der wiederum ausreichenden Konzentration ist auch hier eine Abhängigkeit zwischen dem Androstendiolgehalt im Urin und einer Estradiol-Applikation nicht festzustellen.

Abb. 20 zeigt den Verlauf der urinären Konzentration des Androstendiols des Tiers R773 nach Progesteron-Applikation.

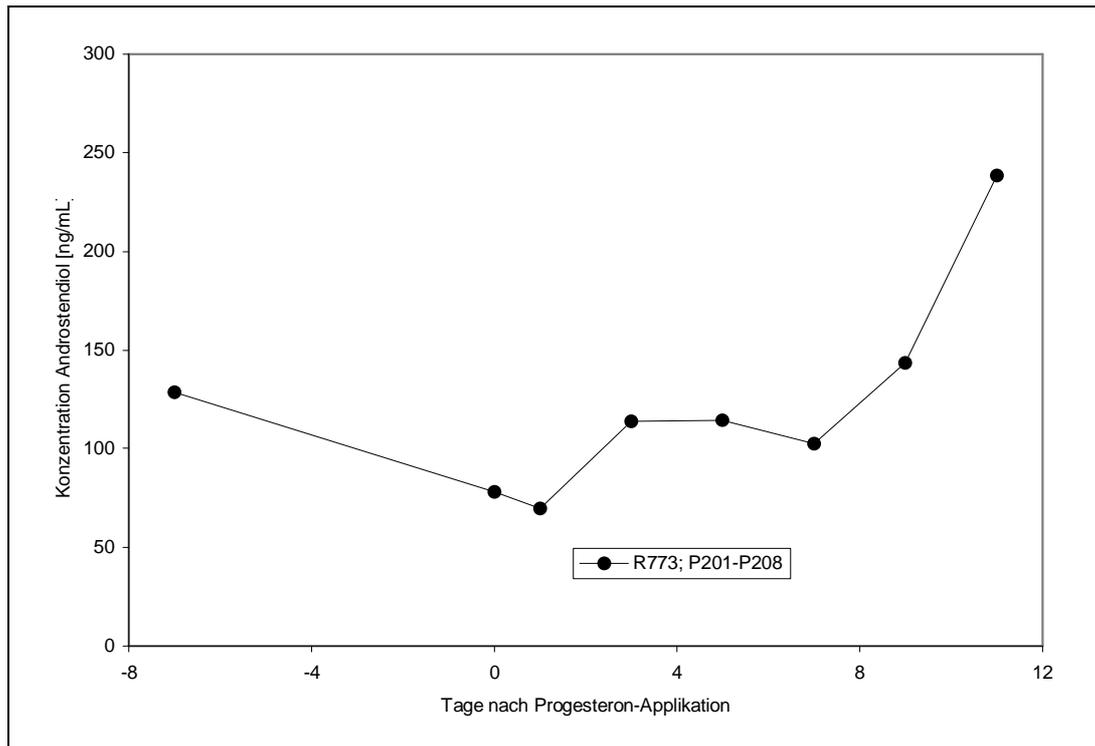


Abb. 20: Urinäre Konzentration von Androstendiol in Proben des Tiers R773 vor bzw. nach Progesteron-Applikation

Der mittlere Gehalt an Androstendiol für Rind R773 nach Progesteron-Applikation beträgt 124 ng/mL (70 ng/mL bis 239 ng/mL). Neben der für die GC/C/IRMS ausreichenden Menge an Androstendiol zeigt Abb. 20 wiederum keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Konzentration an Androstendiol und Progesterongabe.

In Abb. 21 ist der Verlauf der Konzentration des Androstendiols nach Misch-Applikation von Estradiol und Testosteron an Rind R298 sowie nach Misch-Applikation von Estradiol und Progesteron an Rind R304 gezeigt.

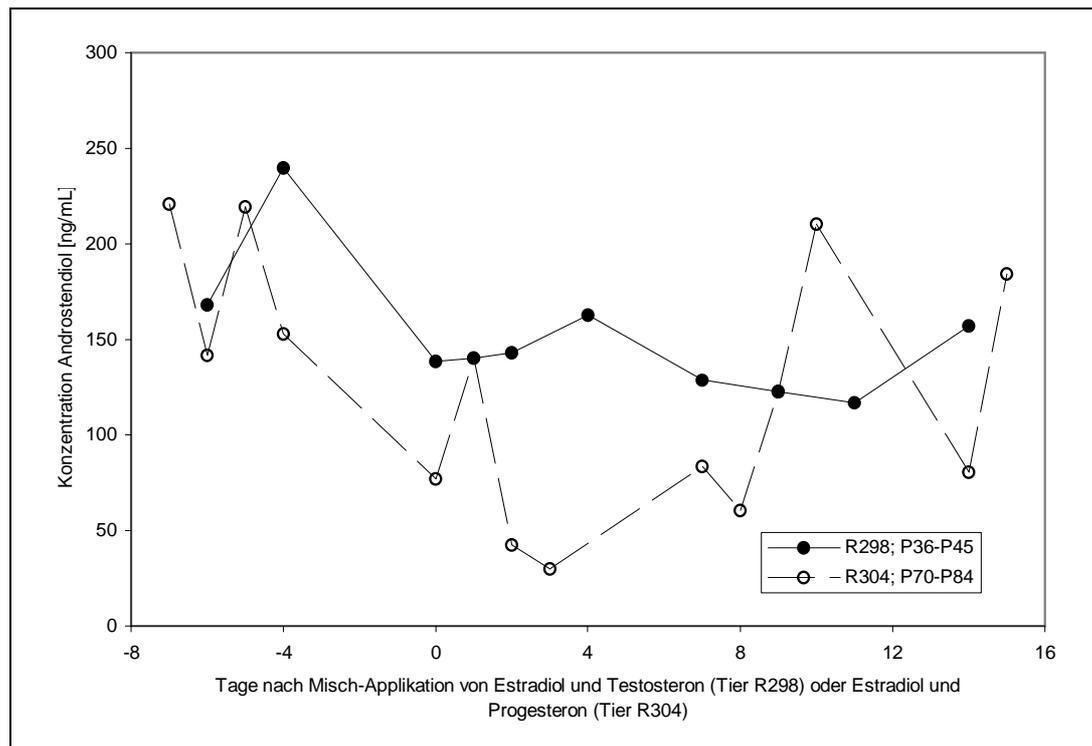


Abb. 21: Urinäre Konzentration von Androstendiol in Proben des Tiers R298 (Estradiol und Testosteron) und des Tiers R304 (Estradiol und Progesteron) vor bzw. nach Applikation

Im Urin von Rind R298 beträgt der mittlere Gehalt an Androstendiol 152 ng/mL (117 ng/mL bis 240 ng/mL) während er im Urin von Rind R304 126 ng/mL (30,1 ng/mL bis 221 ng/mL) beträgt. Die Ergebnisse aus Abb. 17 bis Abb. 20 werden auch hier bestätigt. Eine Auswirkung auf die Ausscheidung von Androstendiol ist auch nach den genannten Misch-Applikationen nicht feststellbar und der Analyt ist in allen Proben ausreichend konzentriert.

Zusammenfassend kann für die verschiedenen Ausscheidungsstudien konstatiert werden, dass Androstendiol als ERC geeignet ist. Es ist zum einen ausreichend konzentriert und zum anderen gibt es keine Hinweise darauf, dass das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis durch Gabe der genannten Steroide beeinflusst wird; dies muss per GC/C/IRMS überprüft und abschließend bewertet werden.

5.1.1.1.2 DHEA

DHEA ist die zweite endogene Referenzverbindung. Auch hier gilt es, eine ausreichende Konzentration und weitgehende Nichtbeeinflussung durch die Ausscheidungsversuche zu zeigen. Im Gegensatz zu Androstendiol wird DHEA zu 88% ($\pm 5,7\%$; $N = 98$) als Sulfat ausgeschieden. Die nachfolgenden fünf Abbildungen beziehen sich daher auf die S-Fraktion und sind analog zu Abb. 17 bis Abb. 21.

Unterschiede in der Abszisse resultieren daher, dass der Datensatz für diese Fraktion weniger vollständig ist als für die FG-Fraktion.

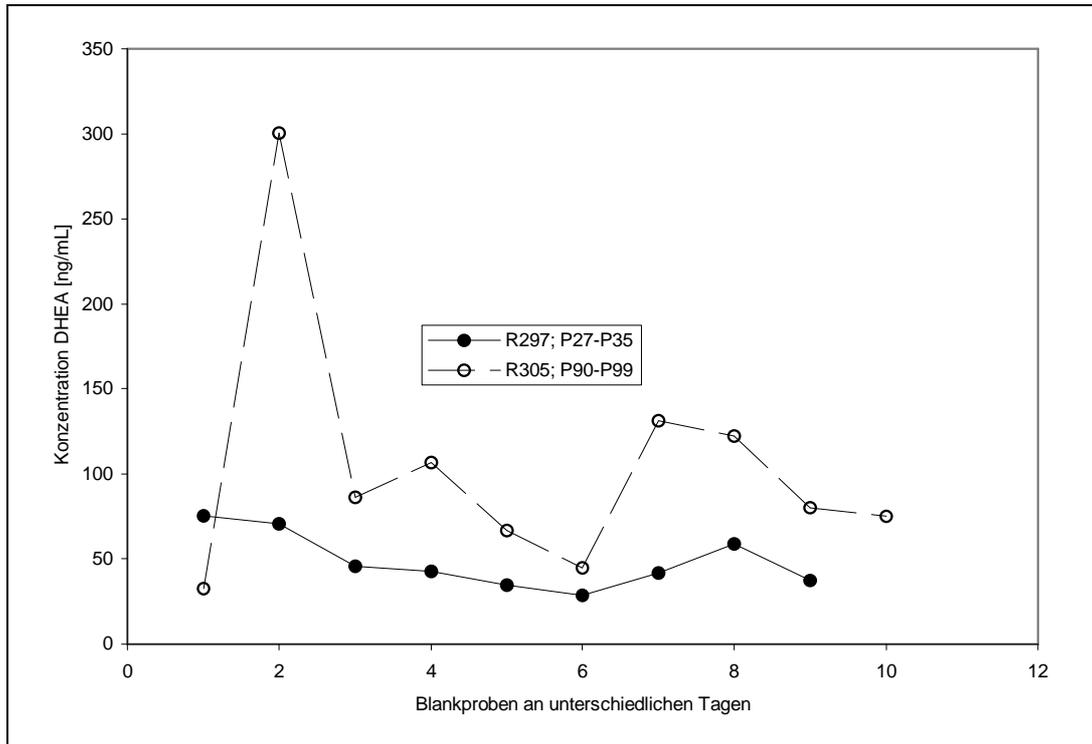


Abb. 22: Urinäre Konzentration von DHEA in Blankproben der Tiere R297 und R305

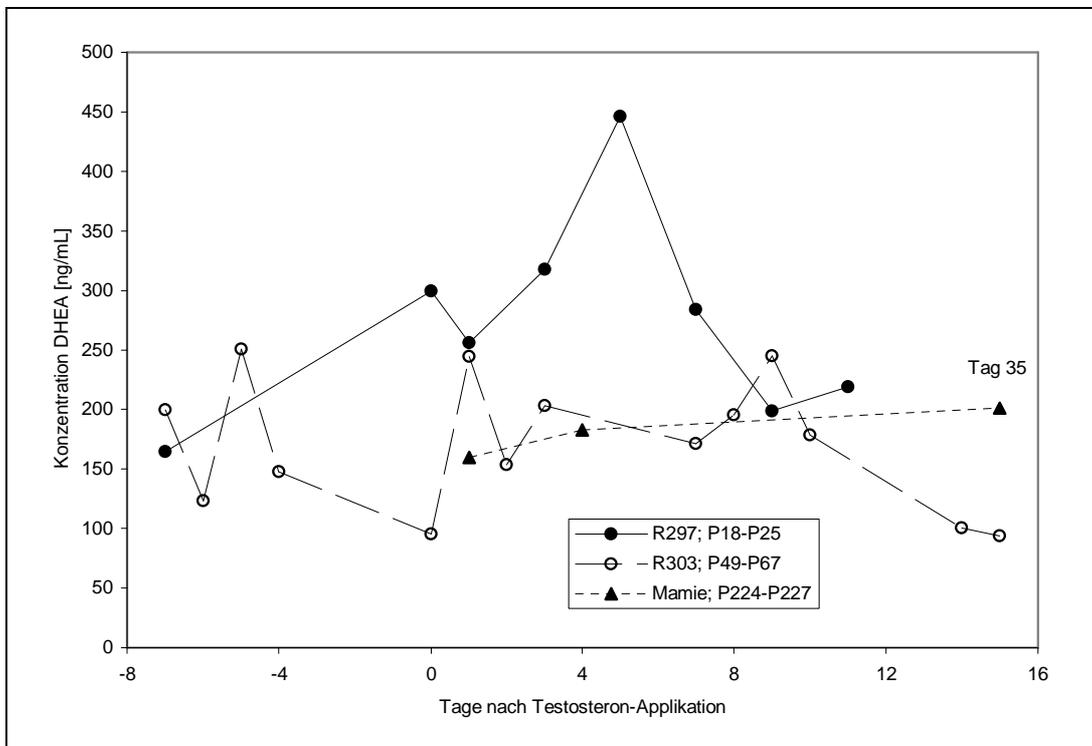


Abb. 23: Urinäre Konzentration von DHEA in Proben der Tiere R297, R303 und Mamie vor bzw. nach Testosteron-Applikation

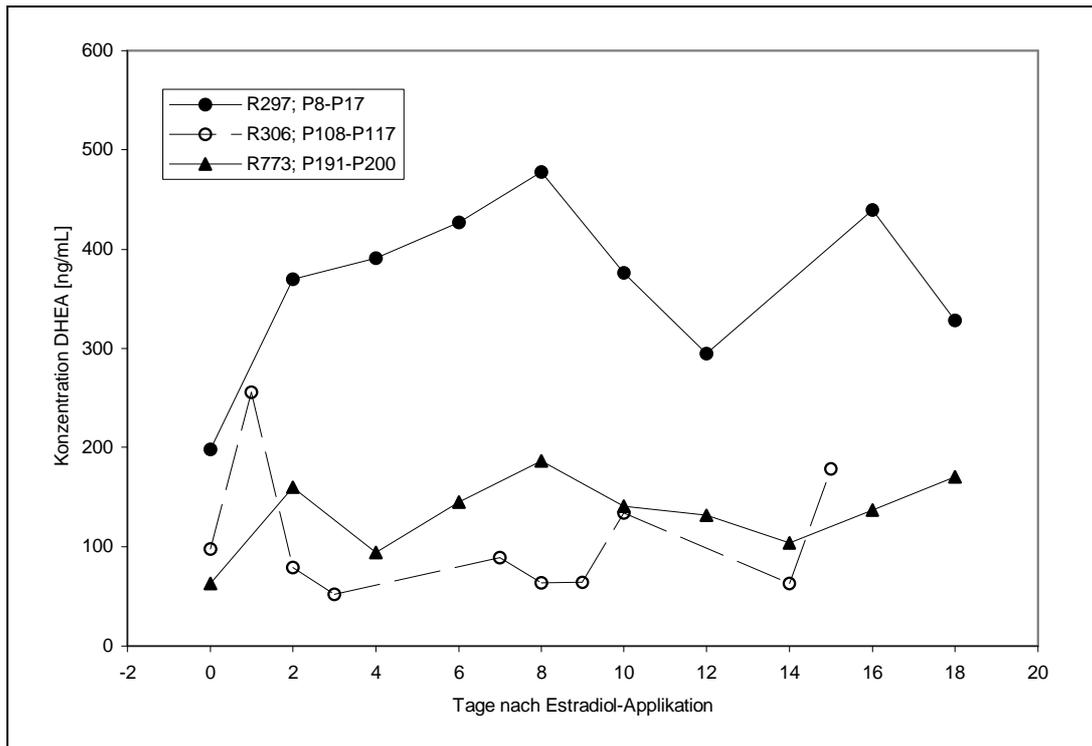


Abb. 24: Urinäre Konzentration von DHEA in Proben der Tiere R297, R306 und R773 vor bzw. nach Estradiol-Applikation

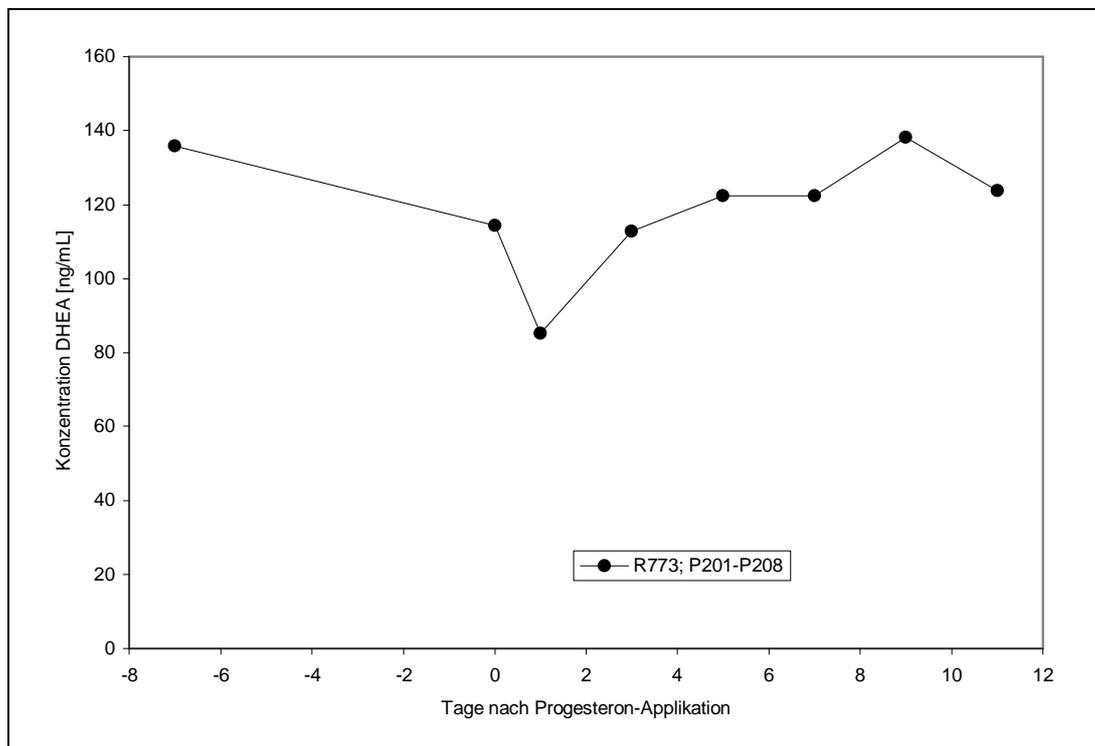


Abb. 25: Urinäre Konzentration von DHEA in Proben des Tiers R773 vor bzw. nach Progesteron-Applikation

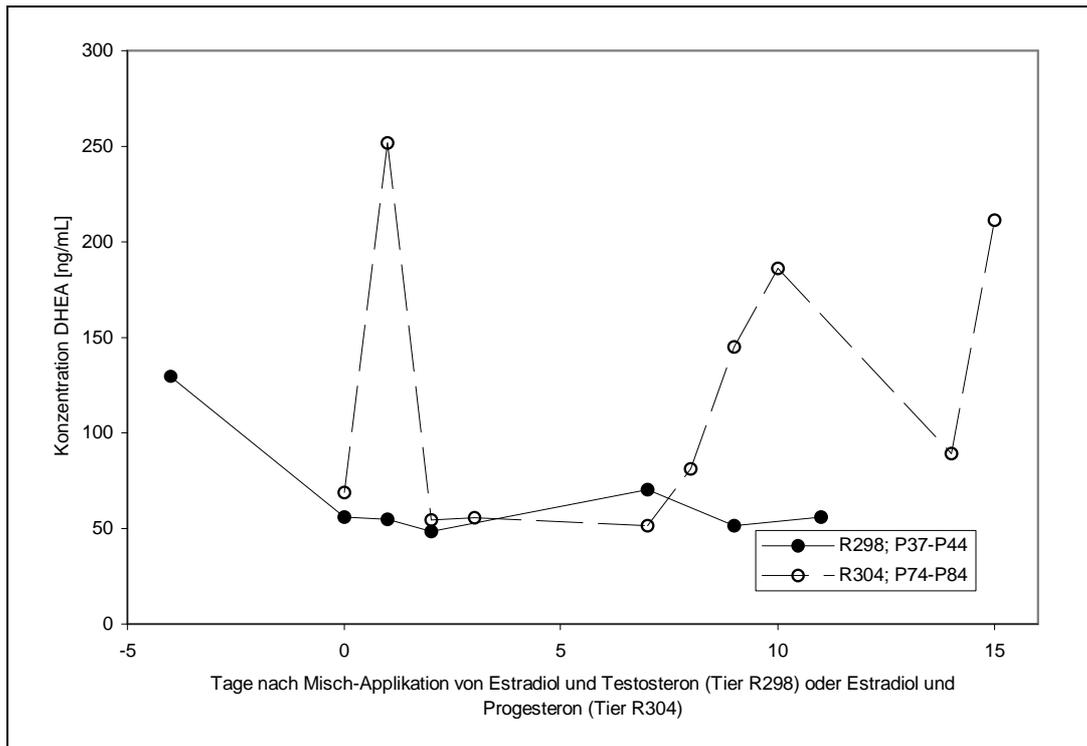


Abb. 26: Urinäre Konzentration von DHEA in Proben des Tiers R298 (Estradiol und Testosteron) und des Tiers R304 (Estradiol und Progesteron) vor bzw. nach Applikation

Die Ergebnisse für DHEA aus Abb. 22 bis Abb. 26 sind vergleichbar mit denen für Androstendiol aus Abb. 17 bis Abb. 21. Der Übersichtlichkeit halber sind sowohl die Mittelwerte als auch die Minima und Maxima der urinären DHEA-Konzentrationen aus Abb. 22 bis Abb. 26 in Tabelle 10 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 10: DHEA-Konzentrationen der verschiedenen Tierversuche aus Abb. 22 bis Abb. 26

Abbildung	Tier	Konzentration DHEA [ng/mL]		
		Mittelwert	Minimum	Maximum
Abb. 22	R297	48	29	75
	R305	105	33	300
Abb. 23	R297	283	164	446
	R303	172	94	251
	Mamie	181	160	201
Abb. 24	R297	367	198	478
	R306	108	52	255
	R773	133	63	186
Abb. 25	R773	119	85	138
Abb. 26	R298	67	48	130
	R304	120	52	252

Die Konzentrationsunterschiede zwischen den Proben desselben Tiers sind unabhängig von einer Steroid-Applikation wieder relativ groß. So ist der größte

Unterschied zwischen zwei Urinen desselben Tiers an aufeinander folgenden Tagen in den Blankproben P90 und P91 in Abb. 22 zu sehen. Innerhalb eines Tages steigt die Konzentration hier von 33 ng/mL auf 300 ng/mL an. Eine Abhängigkeit zwischen der urinären Konzentration an DHEA und der Gabe von Testosteron, Estradiol oder Progesteron ist nicht erkennbar. Entsprechend ist festzustellen, dass DHEA als ERC geeignet zu sein scheint und in allen Proben der verschiedenen Tiere ausreichend konzentriert ist.

5.1.1.2 Testosteron-Metaboliten

Zur Identifizierung der Testosteron-Metaboliten ist zunächst zu erwähnen, dass im Urin von Rindern die 17-OH-Gruppe der Androgene fast ausschließlich α -ständig ist. Dementsprechend werden, auch in Folge einer Applikation, nur äußerst geringe Konzentrationen an Testosteron oder 5α -Androstan- $3\beta,17\beta$ -diol gefunden. Ebenso ist AND in der Regel nur in geringsten Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze der Methode zu finden. Hieraus ergibt sich für die Konzentration dieser Analyten in den Proben eine schiefe Häufigkeits-Verteilung, die ihr Maximum nahe dem Nullpunkt hat. Um dem gerecht zu werden ist im Folgenden häufig der Median, also die Mitte der Wahrscheinlichkeits-Verteilung, an Stelle des Mittelwerts angegeben, da letzterer durch wenige höhere Konzentrationen unverhältnismäßig stark beeinflusst ist. In Tabelle 11 sind entsprechend die Mediane sowie die maximalen Konzentrationen dieser Analyten aus der FG-Fraktion aufgelistet.

Tabelle 11: Mediane und maximale Konzentrationen nicht geeigneter Zielanalyten

Analyt	Konzentration [ng/mL]	
	Median	Maximum (Probe)
Testosteron	1,2	6,9 (P21)
AND	1,5	7,2 (P21)
5α -Androstan- $3\beta,17\beta$ -diol	1,6	6,5 (P55)

Diese Konzentrationen sind in fast allen Fällen nicht ausreichend. Allein die Konzentrationsmaxima in den ersten Tagen nach Testosteron-Applikation von jeweils etwa 7 ng/mL können für die GC/C/IRMS ausreichend sein. Da keine weiteren auffälligen Signale in den GC/MS-Chromatogrammen identifiziert werden, beschränkt sich die weitere Analytik auf die fünf in Abb. 11 (S. 30) erwähnten literaturbekannten Testosteron-Metaboliten. Im Einzelnen sind dies ETIO, EpiT, EpiA, 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol und 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol.

Aufgrund der für die ERCs in Kap. 5.1.1.1.1 und 5.1.1.1.2 gezeigten und ebenfalls für die anderen Zielanalyten erwarteten natürlichen Konzentrationsunterschiede in den Urinproben ist für die Testosteron-Metaboliten eine andere Darstellung als für die ERCs zu wählen. Um die Ausscheidungskurven zu glätten ist daher in den folgenden Abbildungen der Quotient der Konzentrationen als prozentualer Anteil des jeweiligen möglichen Metaboliten zum ERC gezeigt. Als ERC ist Androstendiol gewählt, da der Datensatz zu diesem Analyten größer ist als zu DHEA.

5.1.1.2.1 Etiocholanolon

ETIO wird urinär zu 93% ($\pm 4,6\%$; $N = 75$) nicht konjugiert bzw. glucuronidiert ausgeschieden. Die weitere Analyse bezieht sich somit auf die FG-Fraktion. Der Median der urinären Konzentration in den Blankproben liegt bei 11 ng/mL ($N = 44$). Diese Konzentration ist als ausreichend für die GC/C/IRMS anzusehen. In den meisten der unbehandelten Tiere sollte also der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert bestimmbar sein.

In Abb. 27 ist der Verlauf des prozentualen Konzentrationsverhältnisses von ETIO zu Androstendiol vor und nach Testosteron-Applikation an die Rinder R297, R298, R303 und Mamie gezeigt.

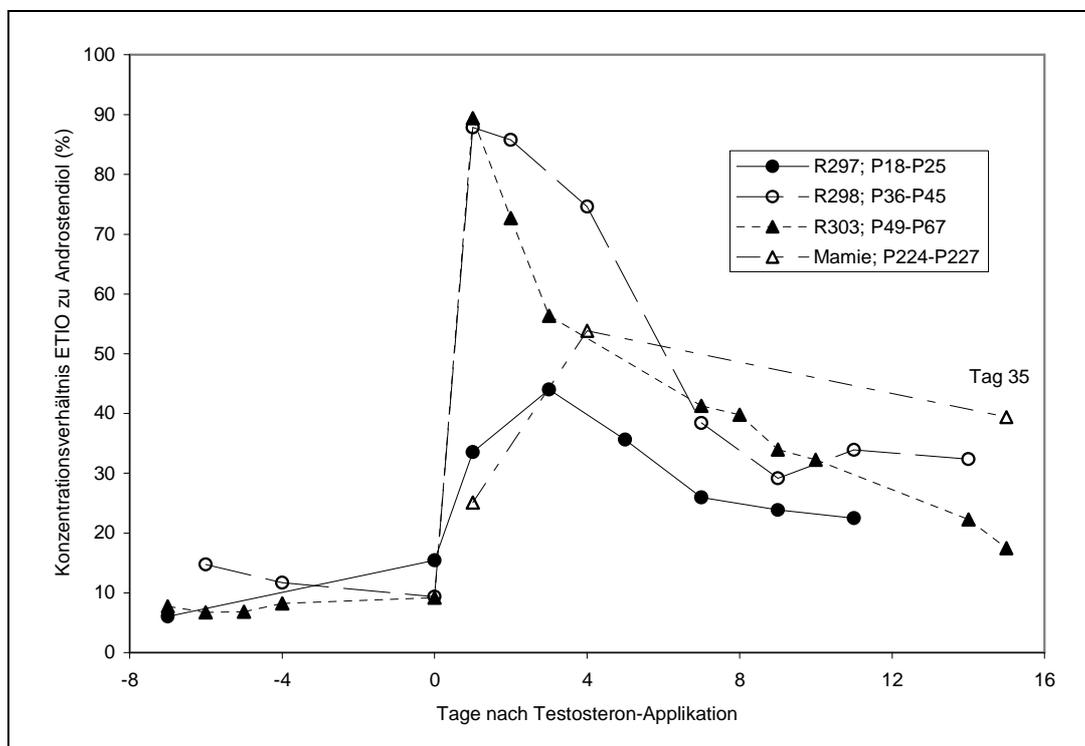


Abb. 27: Verlauf des Konzentrationsverhältnisses von ETIO zu Androstendiol vor und nach Testosteron-Applikation ($N = 4$)

Der Gehalt von ETIO im Verhältnis zu Androstendiol vor Applikation liegt für die Blankproben der Tiere R297, R298 und R303 aus Abb. 27 konstant unter 20%. Nach Testosteron-Gabe steigt dieser bei den Tieren R298 und R303 am ersten Tag nach Applikation auf knapp 90% an. Tier R297 zeigt ebenfalls einen deutlichen Anstieg des besagten Verhältnisses, der jedoch etwas langsamer verläuft und am dritten Tag ein Maximum von 44% aufweist. Im Vergleich zu den Blankproben sind die maximalen Verhältnisse der Tiere R298 und R303 etwa neun- bis zehnmal höher als die Ausgangswerte. Bei Tier R297 ist das Verhältnis auf den etwa vierfachen Wert gestiegen. Die Proben des französischen Rinds zeigen ähnliche Werte und weisen ein Maximum von 54% am vierten Tag auf, können aber mangels Blankproben nicht mit den Ausgangswerten desselben Tiers verglichen werden. Bei allen Proben ist festzustellen, dass auch nach Beendigung des Ausscheidungsversuchs elf bis 15 Tage oder sogar 35 Tage (Mamie) nach Applikation das Verhältnis von ETIO zu Androstendiol erhöht bleibt. Es ist anzunehmen, dass das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis ähnlich lange beeinflusst ist. Natürlich tendieren gegen Ende der Ausscheidungsversuche die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von ETIO durch den wieder steigenden endogenen Anteil zu den ursprünglichen Werten. Die Konzentration von ETIO beträgt nach Applikation in keiner Probe weniger als 20 ng/mL und ist demzufolge ausreichend für die GC/C/IRMS. Die Maximalkonzentrationen liegen bei 93 ng/mL (Rind R297), 123 ng/mL (Rind R298), 275 ng/mL (Rind R303) und 88 ng/mL (Rind Mamie).

Zusammenfassend ist ETIO als ein für die GC/C/IRMS geeigneter Testosteron-Metabolit zu bestätigen.

5.1.1.2.2 *EpiTestosteron*

EpiT kommt im Rinderurin zu 89% ($\pm 6\%$; $N = 67$) nicht konjugiert bzw. glucuronidiert vor. Die folgenden Ergebnisse beziehen sich entsprechend auf die FG-Fraktion. Der Median der Konzentrationsverteilung dieses Analyten beträgt in den Blankproben 6,5 ng/mL ($N = 44$). Diese Konzentration ist deutlich niedriger als diejenige von ETIO und als grenzwertig für die GC/C/IRMS zu betrachten. Eine Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses von EpiT aus diesen Proben ist entsprechend schwierig.

Abb. 28 zeigt den Verlauf des Konzentrationsverhältnisses von EpiT zu Androstendiol vor und nach Testosteron-Applikation an die Rinder R297, R298, R303 und Mamie.

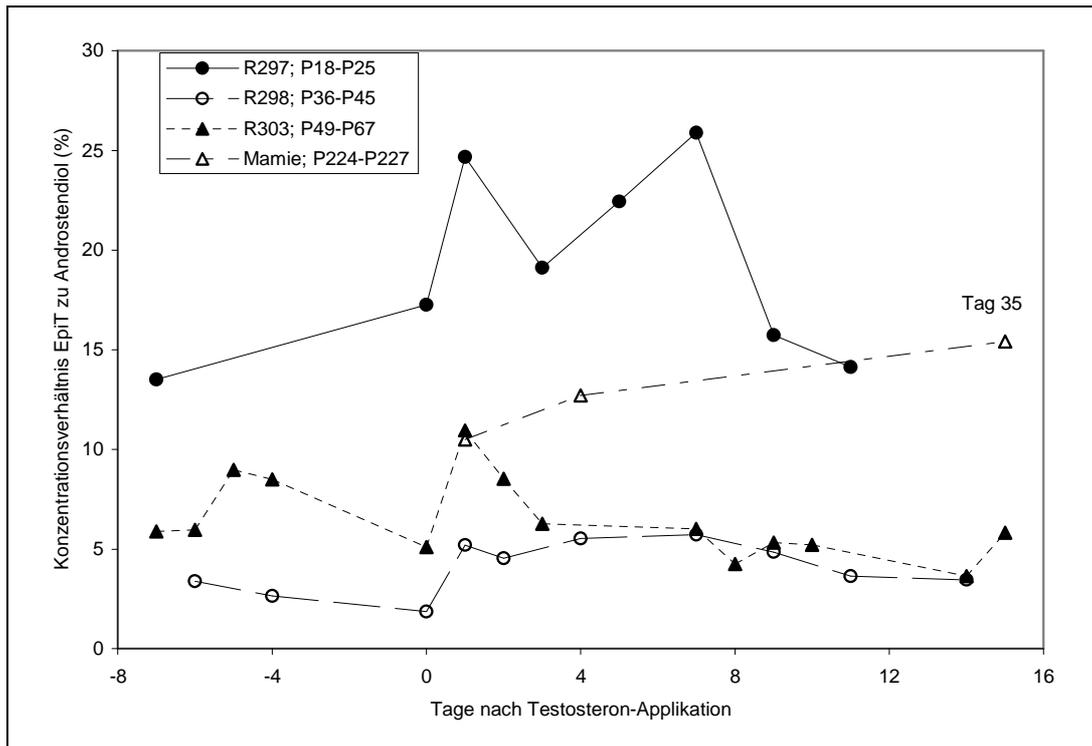


Abb. 28: Verlauf des Konzentrationsverhältnisses von EpiT zu Androstendiol vor und nach Testosteron-Applikation ($N = 4$)

Die prozentualen Konzentrationsverhältnisse von EpiT zu Androstendiol liegen für die Blankproben des Rinds R297 etwa bei 15%, bei Rind R298 unter 5% und bei Rind R303 zwischen 5% und 10%. Nach Testosteron-Gabe steigen die Verhältnisse nur schwach an. Bei Rind R297 beträgt das maximale Verhältnis sieben Tage nach Applikation 26%. Es ist also knapp doppelt so hoch wie der Ausgangswert von etwa 15%. Bei Rind R298 ist das Maximum von 5,7% dieses Verhältnisses ebenfalls am siebten Tag nach Testosteron-Injektion erreicht. Auch dieses Maximum ist im Gegensatz zu den Ausgangswerten nur wenig erhöht. Ebenso kann für Rind R303 kaum ein Anstieg des Verhältnisses von EpiT zu Androstendiol auf maximal 11% am ersten Tag nach Testosteron-Gabe gezeigt werden. Die Ergebnisse für die drei Proben des Rinds Mamie liegen mit Werten zwischen 11% und 15% ebenfalls nahe beieinander. Die maximalen Konzentrationen an EpiT im Urin betragen 44 ng/mL (Rind R297), 9 ng/mL (Rind R298), 34 ng/mL (Rind R303) und 22 ng/mL (Mamie).

Zusammenfassend ist für EpiT zu konstatieren, dass es als Testosteron-Metabolit für die GC/C/IRMS nicht besonders geeignet zu sein scheint. In allen Proben sind zum einen eher geringe Konzentrationen nachweisbar und zum anderen sind die Veränderungen im Verhältnis zum ERC durch die Testosteron-Gabe nicht sehr ausgeprägt. Trotzdem bleibt dieser Analyt, der in der Literatur häufig als

Hauptmetabolit des Testosterons im Rinderurin beschrieben ist (u.a. Angeletti *et al.* 2006; Draisci *et al.* 2000; Starka 2003) und auch bei ersten GC/C/IRMS-Versuchen zum Testosteronnachweis verwendet wurde (Ferchaud *et al.* 1998; Ferchaud *et al.* 2000b; Prévost *et al.* 2001), in der weiteren Methodenentwicklung berücksichtigt.

5.1.1.2.3 Epiandrosteron

Wahrscheinlich kommt EpiA überwiegend in der FG-Fraktion vor (62%; $\pm 25\%$; $N = 75$). Eine genauere Aussage ist aufgrund der niedrigen Konzentrationen und der damit verbundenen hohen Schwankungsbreite nicht möglich. So liegt der Median der Konzentrationsverteilung der Blankproben nur bei 1,0 ng/mL.

Abb. 29 zeigt den Verlauf der prozentualen Konzentrationsverhältnisse von EpiA zu Androstendiol vor und nach Applikation von Testosteron an die Rinder R298 und R303.

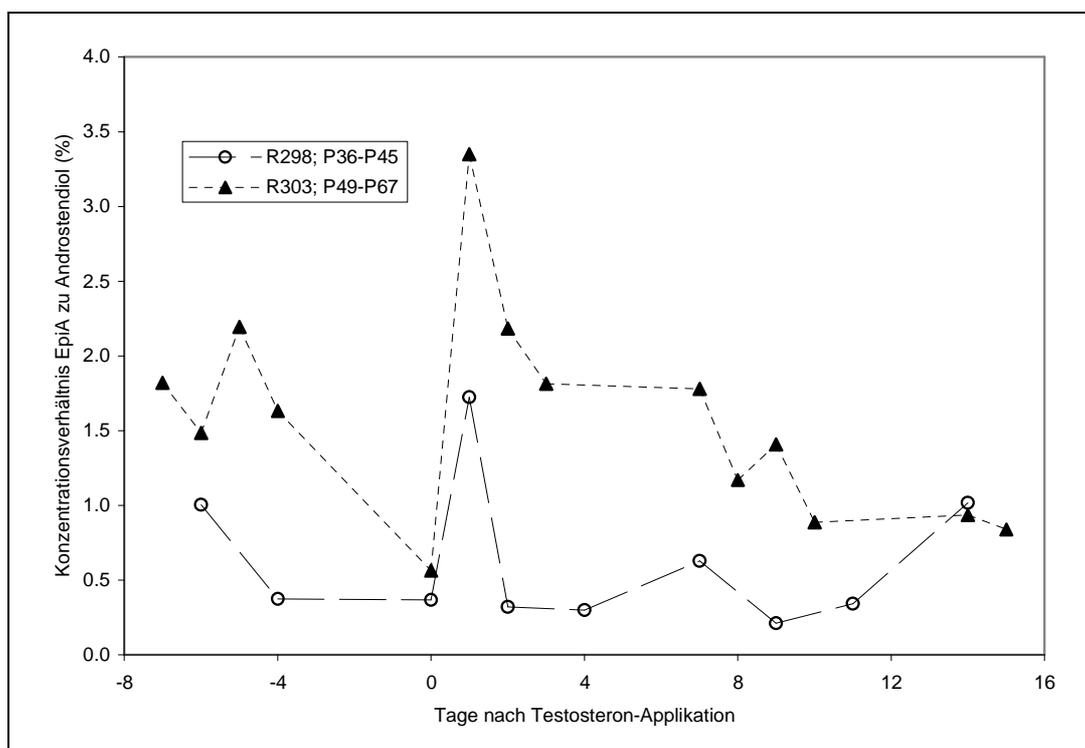


Abb. 29: Verlauf des Konzentrationsverhältnisses von EpiA zu Androstendiol vor und nach Testosteron-Applikation ($N = 2$)

Die gezeigten Konzentrationsverhältnisse der Blankproben schwanken etwa zwischen 0,5% und 2%. Maximale Verhältnisse sind am ersten Tag nach Testosteron-Applikation zu sehen, fallen aber mit 3,3% (Rind R298) bzw. 1,7% (Rind R303) nicht sehr deutlich aus. Die maximalen Konzentrationen aus Abb. 29 betragen 2,4 ng/mL (Rind R298) und 10,3 ng/mL (Rind R303).

Insgesamt ist festzustellen, dass EpiA in fast allen Proben auch nach Testosteron-Applikation für die GC/C/IRMS zu gering konzentriert ist. Ein Zusammenhang zwischen Testosteron-Gabe und urinärer EpiA-Ausscheidung ist anhand der vorliegenden Daten kaum zu bestätigen. Entsprechend ist es als urinärer Testosteron-Metabolit für die GC/C/IRMS nicht sehr geeignet. In der Methodenentwicklung wird es dennoch nicht komplett außer Acht gelassen, da es bereits als Analyt für die GC/C/IRMS verwendet wurde (Prévost *et al.* 2001).

5.1.1.2.4 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol

5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol wird urinär zu 89% ($\pm 5,0\%$; $N = 58$) nicht konjugiert bzw. glucuronidiert ausgeschieden. Im Folgenden wird entsprechend die FG-Fraktion in Betracht gezogen. Der Median der Konzentrationsverteilung dieses Analyten liegt in den Blankproben bei 15 ng/mL ($N = 24$). Dies ist als ausreichend für die GC/C/IRMS anzusehen, so dass das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis dieses Analyten in den meisten Blankproben bestimmbar sein sollte.

Abb. 30 zeigt den Verlauf des Konzentrationsverhältnisses von 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol zu Androstendiol vor und nach Testosteron-Applikation an die Rinder R298 und R303.

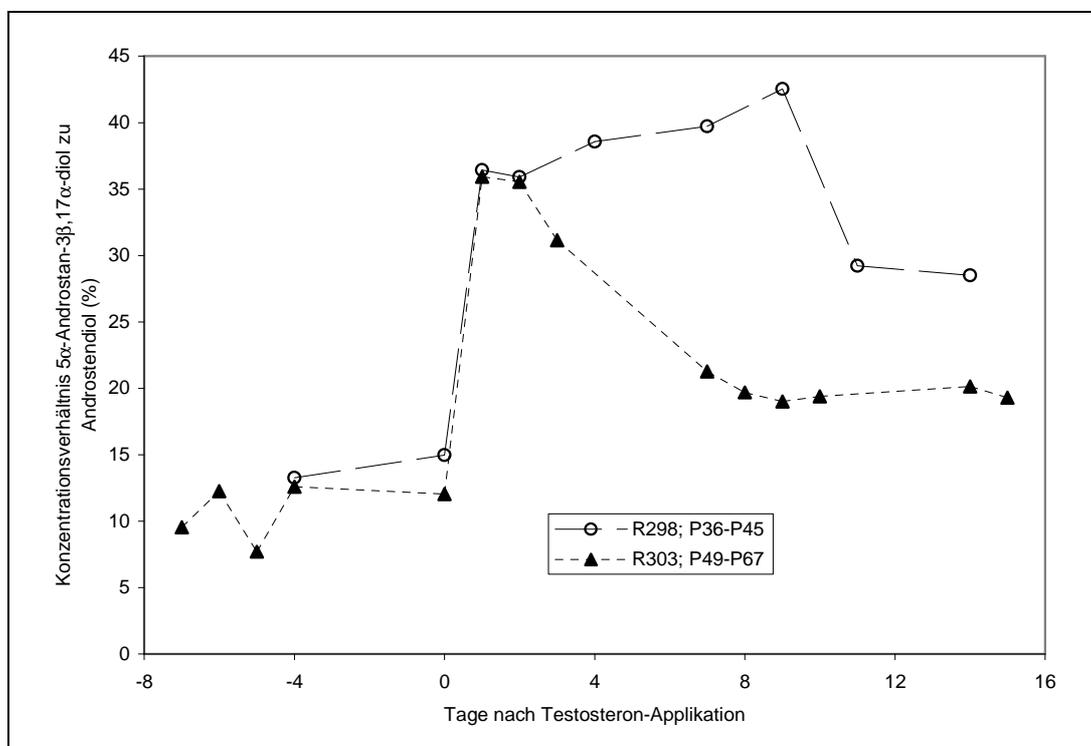


Abb. 30: Verlauf des Konzentrationsverhältnisses von 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol zu Androstendiol vor und nach Testosteron-Applikation ($N = 2$)

Der prozentuale Gehalt des 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diols im Verhältnis zum Androstendiol liegt in den Blankproben aus Abb. 30 mit maximal 15% in einer ähnlichen Größenordnung wie das zuvor in Abb. 27 (S. 61) gezeigte Verhältnis von ETIO zu Androstendiol. Der Anstieg des in Abb. 30 gezeigten Verhältnisses auf jeweils etwa 35% bei beiden Rindern am ersten Tag nach Testosteron-Applikation fällt jedoch etwas kleiner aus als derjenige in Abb. 27. Im Vergleich zu den Ausgangsverhältnissen der Blankproben steigt das Verhältnis für beide Tiere auf den etwa dreifachen Wert an. Beachtenswert ist, dass bei Rind R298 erst am neunten Tag nach Applikation das maximale Verhältnis von 43% erreicht wird. Ebenso wie für ETIO ist für diesen Analyten festzustellen, dass das gezeigte Verhältnis bis über das Ende des Ausscheidungsversuchs hinaus deutlich höher liegt als das der Blankproben. Entsprechend lange Auswirkungen auf das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis dieses Metaboliten sind zu erwarten. Die Konzentration dieses Androstandiols beträgt nach Testosteron-Applikation wiederum nicht weniger als 20 ng/mL und weist Maxima von 63 ng/mL (Rind R298) bzw. 110 ng/mL (Rind R303) auf.

Diese Ergebnisse belegen, dass das 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol ein für die GC/C/IRMS geeigneter Testosteron-Metabolit ist.

5.1.1.2.5 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol

5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol wird urinär zu 92% ($\pm 5,7\%$; $N = 25$) nicht konjugiert bzw. glucuronidiert ausgeschieden. Die folgenden Ergebnisse beziehen sich entsprechend auf die FG-Fraktion. Der Median der urinären Konzentration dieses Analyten liegt in den Blankproben bei 10,4 ng/mL ($N = 32$). In den meisten Blankproben sollte das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis bestimmbar sein.

In Abb. 31 ist der Verlauf des Konzentrationsverhältnisses von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol zu Androstendiol vor und nach Testosteron-Applikation an die Rinder R297, R298, R303 und Mamie gezeigt.

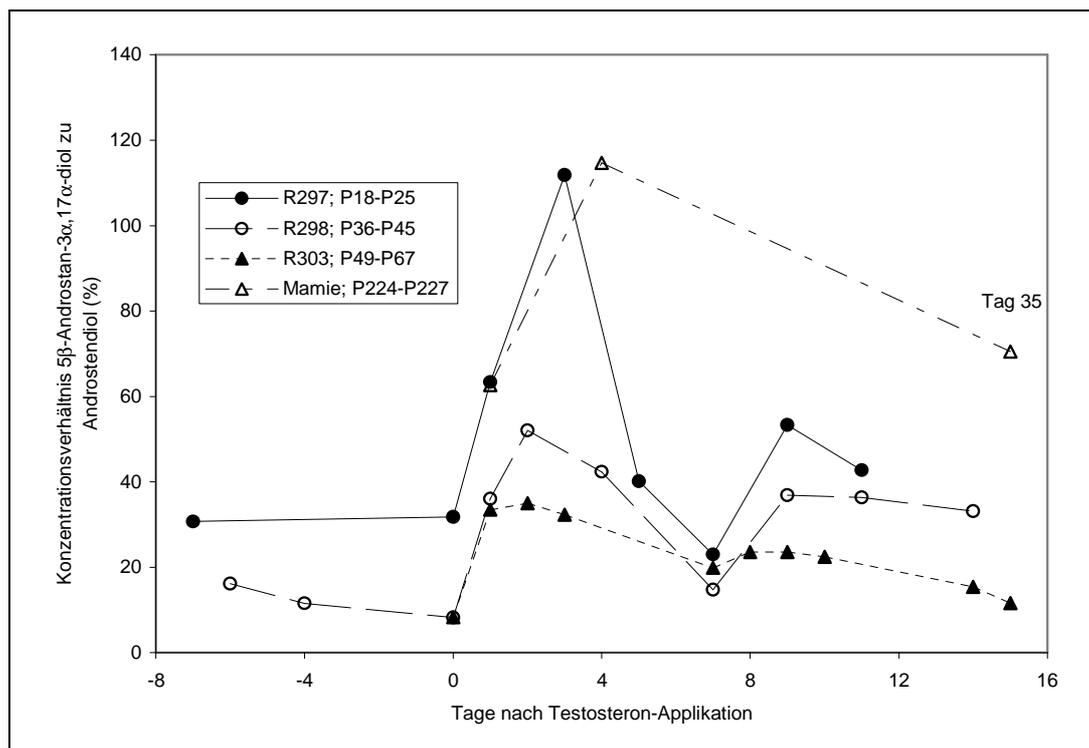


Abb. 31: Verlauf des Konzentrationsverhältnisses von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol zu Androstendiol vor und nach Testosteron-Applikation ($N = 4$)

Vor Testosteron-Gabe beträgt das Konzentrationsverhältnis von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol zu Androstendiol in Proben der Tiere R298 und R303 weniger als 20%. Bei Proben von Tier R297 liegt es mit ca. 30% etwas höher. Alle Proben der vier Tiere zeigen einen deutlichen Anstieg des gezeigten Verhältnisses nach Testosteron-Gabe. Für Tier R297 wird ein Maximum von 112% am dritten Tag registriert, bei Tier R298 beträgt das Maximum am zweiten Tag 52% und bei Tier R303 beträgt es ebenfalls am zweiten Tag 35%. Im Vergleich zu den Blankproben steigt das Verhältnis bei den Tieren R297, R298 und R303 jeweils auf etwa den drei- bis vierfachen Ausgangswert an. Die Werte für Proben des französischen Tiers sind vergleichbar mit denen von Rind R297 und steigen am vierten Tag auf maximal 115% an, können aber mangels Blankproben nicht mit den Ausgangswerten desselben Tiers verglichen werden. Kaum zu erklären ist, dass am siebten Tag nach Applikation das Verhältnis von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol zu Androstendiol bei den Tieren R297, R298 und R303 eine Art temporäres Minimum aufzuweisen scheint. Wiederum gilt für alle Urinproben, dass das besagte Verhältnis bis zum Ende des Ausscheidungsversuchs erhöht bleibt und entsprechende Auswirkungen auf die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte zu erwarten sind. Die geringsten Konzentrationen nach Applikation betragen für Proben der Rinder R297 und R298 jeweils am siebten Tag 22 ng/mL

(Rind R297) und 19 ng/mL (Rind R298). Bei den Rindern R303 und Mamie liegen die Minima der Konzentrationen mit 15 ng/mL (Rind R303) und 101 ng/mL (Mamie) jeweils am Ende des Ausscheidungsversuchs. In allen Fällen sollten diese Konzentrationen den Anforderungen des GC/C/IRMS-Systems genügen. Die jeweiligen maximalen Konzentrationen liegen bei 235 ng/mL (Rind R297), 69 ng/mL (Rind R298), 103 ng/mL (Rind R303) und 188 ng/mL (Rind Mamie).

Zusammenfassend bestätigen die gezeigten Konzentrationsverhältnisse die Eignung von 5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol als Testosteron-Metabolit für die GC/C/IRMS-Analyse.

5.1.1.3 Estradiol-Metaboliten

In Kap. 5.1.1.2 ist bereits erwähnt, dass die 17-Hydroxy-Gruppe der urinären Androgene beim Rind fast ausschließlich α -ständig ist. Dies gilt ebenso für die Estrogene, so dass auch nach entsprechender Injektion kaum 17 β -Estradiol im Urin nachzuweisen ist. So liegt der Median der Konzentrationsverteilung des 17 β -Estradiols sowohl in der FG- als auch in der S-Fraktion bei unter 1 ng/mL und eine maximale Konzentration von 8 ng/mL (Proben P109 und P192; FG-Fraktion) wird nicht überschritten. Ebenso ist Estron als Metabolit von 17 β -Estradiol nur sehr gering konzentriert, denn auch hier liegt der Median der Konzentrationsverteilung für beide Fraktionen jeweils bei unter 1 ng/mL. Die Maximalkonzentration von 19,3 ng/mL am ersten Tag nach Estradiol-Applikation (Probe P109, FG-Fraktion) sinkt innerhalb eines Tages bereits auf 2,8 ng/mL (Probe P110). Diese beiden Analyten sind aufgrund der niedrigen urinären Konzentration für die GC/C/IRMS nicht geeignet.

Schon seit den 1960er Jahren ist hingegen das biologisch weitgehend inaktive 17 α -Estradiol als urinärer Hauptmetabolit des 17 β -Estradiols bekannt (Mellin *et al.* 1965; Mellin und Erb 1965). Es kommt zu 89% (\pm 11%; $N = 53$) in der FG-Fraktion vor, weshalb sich die weitere Analyse auf diese Fraktion bezieht. Der Median der urinären Konzentrationsverteilung in den Blankproben liegt bei 2,4 ng/mL ($N = 44$). Die Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses urinären 17 α -Estradiols unbehandelte Tiere stellt somit eine Herausforderung dar.

Abb. 32 zeigt den Verlauf des prozentualen Konzentrationsverhältnisses von 17 α -Estradiol zu Androstendiol vor und nach Estradiol-Applikation an die Rinder R197, R298, R304, R306 und R773.

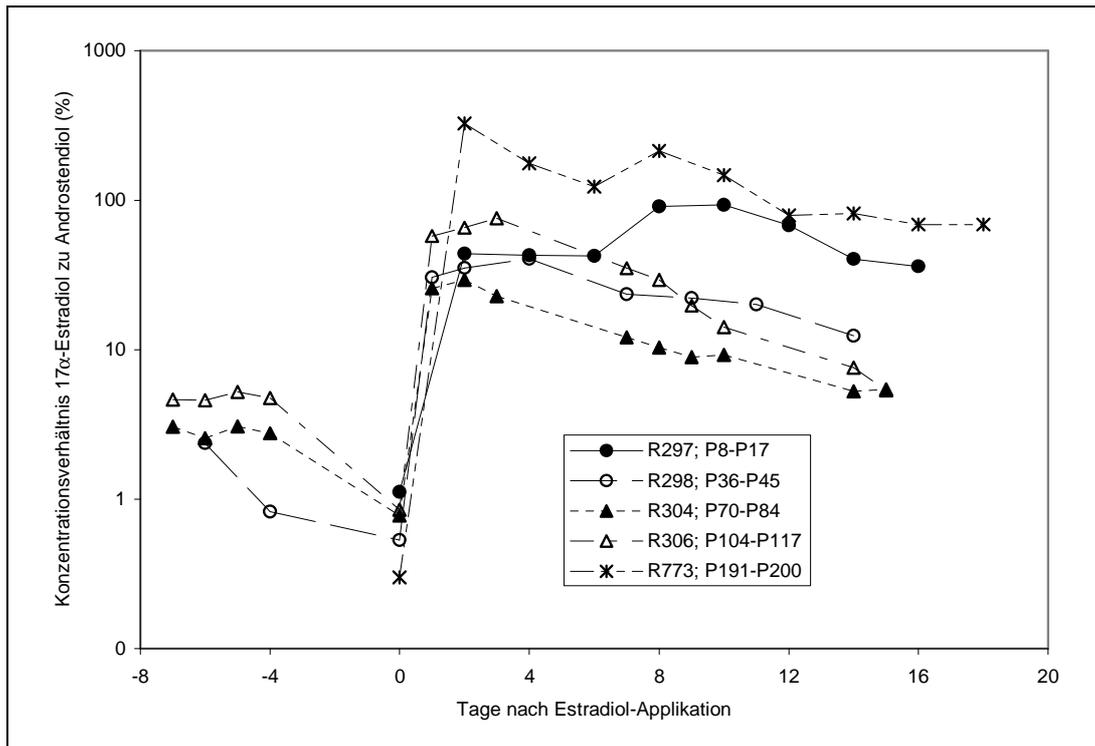


Abb. 32: Verlauf des logarithmisch dargestellten Konzentrationsverhältnisses von 17α -Estradiol zu Androstendiol vor und nach Estradiol-Applikation ($N = 5$)

Aufgrund der großen Änderungen des gezeigten Verhältnisses erscheint für die Ordinate eine logarithmische Auftragung der Ergebnisse angebracht. So liegt der gezeigte Quotient der Blankproben für alle Tiere bei maximal 5%. Nach Gabe von 17β -Estradiol steigt das gezeigte Verhältnis in allen Proben auf ein Vielfaches des Ausgangswerts an. Bei den Tieren R297 und R773 ist ein zweiter Anstieg an Tag acht aufgrund einer zweiten Applikation von 17β -Estradiol zu erkennen. Die maximalen Konzentrationsverhältnisse der ersten Applikation an weibliche Tiere betragen spätestens am vierten Tag zwischen 30% (Tier R304; Probe P77) und 76% (Tier R306; Probe P111). Die zweite Injektion an Tier R297 führt zu einem erneuten Anstieg auf etwa 90% an den Tagen acht und zehn bzw. am ersten und dritten Tag nach wiederholter Gabe von 17β -Estradiol (Proben P12 und P13). Die größte Veränderung im Konzentrationsverhältnis von 17α -Estradiol zu Androstendiol ist bei dem kastrierten männlichen Rind R773 zu sehen. Während in den Blankproben kaum 17α -Estradiol nachweisbar ist und das gezeigte Verhältnis entsprechend wenig größer als Null ist, steigt es am zweiten Tag nach Applikation auf 327% (Probe P192) an. Das zweite Maximum am ersten Tag nach erneuter Applikation liegt bei 214% (Probe P195). Für die Tiere R298, R304 und R306 nähert sich das Verhältnis zwei Wochen nach Gabe von 17β -Estradiol wieder dem Ausgangswert an. Bei den Tieren

R297 und R773 ist am Ende des Ausscheidungsversuchs elf Tage nach der zweiten Applikation noch ein deutlich erhöhtes Verhältnis festzustellen. Es ist anzunehmen, dass die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte des 17α -Estradiols zu Anfang des Ausscheidungsversuchs durch die geringe endogene Produktion fast ausschließlich durch die externe Zufuhr beeinflusst sind, während ca. zwei Wochen nach Applikation wieder vermehrt das endogene Isotopenverhältnis des Kohlenstoffs zu finden sein wird. Wie lange eine Applikation von 17β -Estradiol durch die Analyse des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses von 17α -Estradiol nachweisbar ist, wird auch durch die Empfindlichkeit des GC/C/IRMS-Systems limitiert, da die Konzentrationen gegen Ende des Ausscheidungsversuchs mit teilweise weniger als 5 ng/mL wieder sehr niedrig sind. Die jeweiligen Maximalkonzentrationen betragen 195 ng/mL für Rind R297 (Probe P13), 66 ng/mL für Rind R298 (Probe P41), 36 ng/mL für Rind R304 (Probe P75), 109 ng/mL für Rind R306 (Probe P109) und 349 ng/mL für Rind R773 (Probe P192).

17α -Estradiol ist als Zielanalyt für den Nachweis einer Applikation von 17β -Estradiol mittels GC/C/IRMS geeignet, während andere Estrogene eine für diesen Zweck zu geringe Konzentration aufweisen.

5.1.1.4 Zusammenfassung der Zielanalyten

Hinsichtlich der in Kap. 3.6 besprochenen sowie speziell in Abb. 11 (S. 30) und Abb. 12 (S. 31) gezeigten potenziellen Zielanalyten kann über deren Quantifizierung in Blankproben und Urinen von Ausscheidungsversuchen mit 17β -Estradiol und Testosteron die Eignung für den entsprechenden Nachweis mittels GC/C/IRMS festgestellt werden. Tabelle 12 zeigt zusammenfassend die wichtigsten Zielanalyten, deren Funktion für den Nachweis per GC/C/IRMS sowie die erwarteten $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse.

Tabelle 12: Durch Quantifizierung ermittelte urinaire Zielanalyten und deren Eigenschaften für den Nachweis der Applikation von Estradiol und Testosteron mittels GC/C/IRMS

Zielanalyt	Funktion für die GC/C/IRMS	erwartete $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte
DHEA	ERCs	beeinflusst durch die Nahrung; unbeeinflusst durch Applikation von Testosteron, Estradiol oder Progesteron
Androst-5-en-3 β ,17 α -diol		
ETIO	Testosteron-Metaboliten	beeinflusst durch die Nahrung; ggf. isotopisch leichter als ERCs nach Testosteron-Applikation
5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol		
5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol		
17 α -Estradiol	17 β -Estradiol-Metabolit	beeinflusst durch die Nahrung; ggf. isotopisch leichter als ERCs nach Estradiol-Applikation

Die Eignung von DHEA und Androstendiol als ERCs sollte mittels GC/C/IRMS bestätigt werden können. Die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte werden unabhängig von einer Gabe von Testosteron, Estradiol oder Progesteron entsprechend der Nahrungszusammenstellung erwartet. Ebenso sind ETIO und 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol als zweckdienliche Testosteron-Metaboliten zu bestätigen. Deren $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse werden zum einen ebenfalls in Abhängigkeit der Nahrung erwartet. Zum anderen werden nach Gabe von Testosteron entsprechend dessen $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert isotopisch leichtere Werte und parallel im Vergleich zu den Blankproben veränderte $\Delta\delta$ -Werte zwischen Metabolit und ERC erwartet. Die vier bisher genannten Analyten wurden neben EpiA und EpiT in den ersten Versuchen zum Nachweis von Testosteron mittels GC/C/IRMS urinärer Steroide bereits verwendet (Ferchaud *et al.* 1998; Ferchaud *et al.* 2000b; Prévost *et al.* 2001). Für die beiden letztgenannten Steroide ist festzustellen, dass sie als urinaire Testosteron-Metaboliten aufgrund gleich bleibend niedriger Konzentrationen nicht sehr geeignet sind. Gerade in Bezug auf EpiT ist dies nicht erwartet worden, da die Versuche zum Nachweis von Testosteron mittels quantitativer Analyse bis dato (Angeletti *et al.* 2006) maßgeblich auf dieses Steroid als Metabolit des Testosterons fokussiert waren.

Als neuer urinärer Zielanalyt für die GC/C/IRMS ist das 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol zu nennen, welches einen weiteren Metaboliten des Testosterons darstellt. Dessen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse sind bisher aus Galle bestimmt worden (Mason *et al.* 1998), nicht aber aus Urin. Sie werden entsprechend den $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werten von ETIO und 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol erwartet.

17α -Estradiol kann als urinärer Hauptmetabolit des 17β -Estradiols bestätigt werden; bislang sind zu diesem Analyten allerdings keine Daten bezüglich der Bestimmung der Isotopenverhältnisse mittels GC/C/IRMS zum Nachweis einer Hormonbehandlung veröffentlicht. Die erwarteten $\Delta\delta$ -Werte zwischen 17α -Estradiol und den ERCs unbehandelter Tiere sollten nur geringe Beträge aufweisen. Aufgrund der niedrigen Konzentration dieses Analyten in Blankurinen wird eine Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse hier allerdings schwierig. Eine Applikation von 17β -Estradiol sollte zu signifikant größeren Differenzen zwischen den entsprechenden $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werten führen.

Da die gezeigten Konzentrationsverhältnisse zwischen den jeweiligen Metaboliten und Androstendiol der Urinproben aus den Tierversuchen in der Regel auch zwei Wochen nach Applikation der in Kap. 4.1 genannten Depotpräparate von Estradiol

und Testosteron noch erhöht sind, wird eine ähnlich lange Möglichkeit des Nachweises mittels GC/C/IRMS erwartet.

5.1.2 Kalkulation des Aufarbeitungsvolumens

Zur Kalkulation des Aufarbeitungsvolumens sind zunächst die Blankproben zu betrachten, in denen die Testosteron- und Estradiol-Metaboliten am geringsten konzentriert sind und deren $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte entsprechend am schwierigsten zu bestimmen sind. Die Konzentrationen der ERCs sowie der Metaboliten nach Hormongabe liegen um ein Vielfaches höher, so dass diese in die Kalkulation nicht einzubeziehen sind. Die Mediane der Konzentrationsverteilungen der Blankproben für die drei Testosteron-Metaboliten aus Tabelle 12 (S. 70) liegen, wie in Kap. 5.1.1.2.1 bis 5.1.1.2.5 gezeigt, zwischen 10 ng/mL und 15 ng/mL. Auf Grundlage dieser Konzentrationen erscheint ein Aufarbeitungsvolumen von 20 mL Rinderurin sinnvoll, was einer absoluten Menge dieser Zielanalyten von mindestens 200 ng für die meisten Blankproben entspricht. Bei ordentlicher Wiederfindung, einem praktikablen Endvolumen von mindestens 10 μL , in dem die finalen Extrakte aufgenommen werden und einer Standardinjektion von 1 μL sollte die Mindestmenge von etwa 10 ng Steroid pro Injektion in das GC/C/IRMS erreicht werden. Die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der Testosteron-Metaboliten in den Blankproben sind also bei ausreichender Aufreinigung in der Regel bestimmbar sowie natürlich in den Urinproben der Ausscheidungsversuche. Die Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von 17α -Estradiol der Blankproben hingegen wird häufig schwerlich möglich, da der Median der Konzentrationsverteilung, wie in Kap. 5.1.1.3 erwähnt, nur bei 2,4 ng/mL liegt. Ein entsprechendes Aufarbeitungsvolumen von 100 mL erscheint nicht praktikabel. Bei Verwendung des in Abb. 10 (S. 24) gezeigten Systems hingegen ist diese Bestimmung aufgrund des möglichen höheren Injektionsvolumens und dem dadurch verbesserten Probentransfer manchmal auch aus dem Probenvolumen von 20 mL möglich, für das sich letztendlich entschieden worden ist.

5.1.3 Hydrolyse der Steroidkonjugate

Bis auf das DHEA, welches weitgehend als Sulfatkonjugat ausgeschieden wird, liegen alle Zielanalyten überwiegend nicht konjugiert oder als Glucuronid vor. Zur Spaltung dieser Konjugate sind in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben. Sie beruhen vornehmlich auf enzymatischer Hydrolyse mit Glucuronidase, Sulfatase oder einer chemischen Spaltung. Die ersten Untersuchungen zur Bestimmung von Kohlenstoffisotopenverhältnissen aus Steroiden im Rinderurin beruhten auf

kombinierter Hydrolyse von Sulfaten und Glucuroniden mittels aufgereinigtem Enzym von *Helix Pomatia* (Ferchaud *et al.* 2000b; Ferchaud *et al.* 2000a; Prévost *et al.* 2001). Ebenfalls gängig ist die enzymatische Spaltung der Glucuronide mittels β -Glucuronidase von *Escherichia coli*, gefolgt von einer chemischen Hydrolyse der Sulfatkonjugate (von Kuk *et al.* 2003).

Zur Überprüfung, welche dieser beiden Möglichkeiten für den Rinderurin geeignet ist, werden diese in Kap. 4.3.2.1 und 4.3.2.2 beschriebenen enzymatischen Spaltungen auf Aliquote der zwölf in Kap. 4.3.2 genannten Proben angewendet. Anschließend erfolgt die in Kap. 4.3.1 beschriebene Quantifizierung sowohl in der FG-Fraktion als auch in der S-Fraktion. Aus dem Vergleich der quantitativen Ergebnisse der jeweils zwölf Proben wird die Vollständigkeit der Dekonjugation mit den verschiedenen Enzymen bestimmt.

AND gilt gemeinhin als das enzymatisch am schwersten zu hydrolysierende Glucuronid. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Hydrolyse wird es daher in der Quantifizierungs-Methode als deuteriertes Glucuronid zugefügt und mit dem internen Standard $^2\text{H}_4$ -ETIO verglichen.

Während die Hydrolyse mit β -Glucuronidase von *Escherichia Coli* für $^2\text{H}_5$ -Androsteron-glucuronid erwartet vollständig ist, wird es mit dem Enzym von *Helix Pomatia* nur wenig gespalten. Für die Darstellung der Vollständigkeit der Hydrolyse werden die Ergebnisse der Dekonjugation mit β -Glucuronidase von *Escherichia Coli* gefolgt von der chemischen Hydrolyse der Sulfatkonjugate entsprechend gleich 100% gesetzt. Abb. 33 zeigt diese Ergebnisse für die jeweiligen Analyten zusammenfassend als sog. Boxplots. Diese beinhalten innerhalb des Rechtecks, welches durch das 25%-Quantil sowie das 75%-Quantil begrenzt ist, die Hälfte aller Daten sowie den Median der Verteilung. Zusätzlich sind den Boxplots jeweils Minimum und Maximum zu entnehmen.

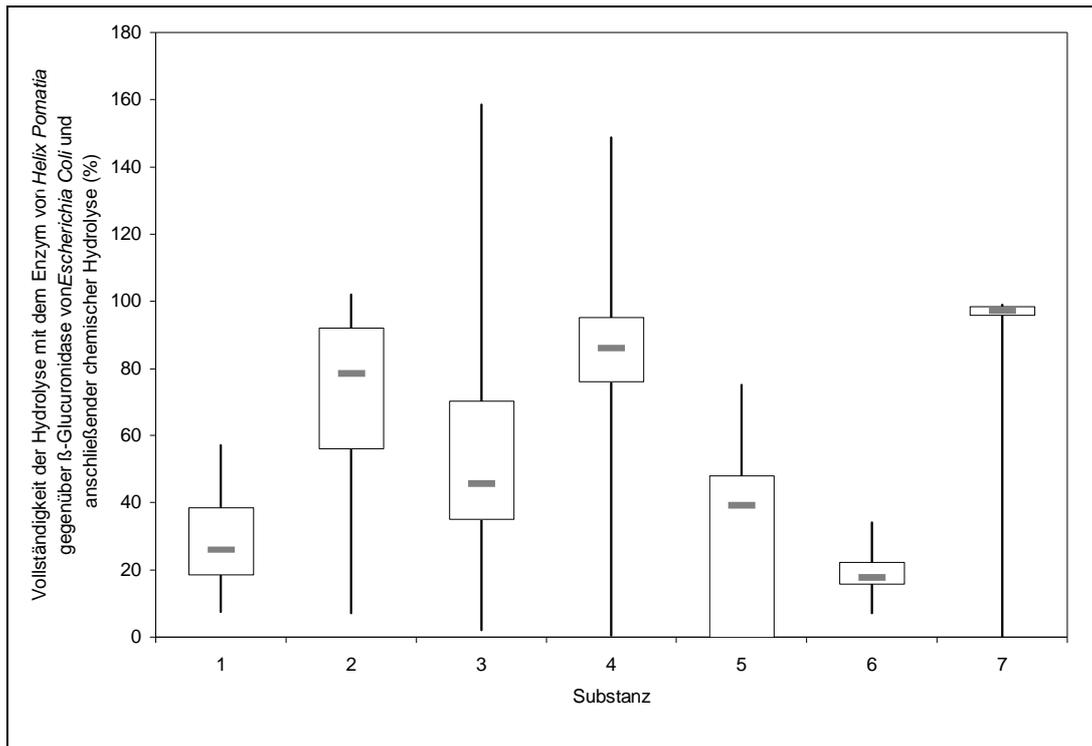


Abb. 33: Boxplots der Vollständigkeit der Hydrolyse mit dem Enzym von *Helix Pomatia* gegenüber β -Glucuronidase von *Escherichia coli* und anschließender chemischer Hydrolyse; die nummerierten Verbindungen sind der zugesetzte Standard $^2\text{H}_5$ -Androsteron-glucuronid (1) und die endogenen Steroide Androstendiol (2), ETIO (3), 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol (4), 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol (5), DHEA (6) und 17α -Estradiol (7)

Bei den in Abb. 33 gezeigten Substanzen handelt es sich um den zugesetzten deuterierten Standard $^2\text{H}_5$ -Androsteron-glucuronid (1), die ERCs Androstendiol (2) und DHEA (6), die Testosteron-Metaboliten ETIO (3), 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol (4) und 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol (5) sowie um 17α -Estradiol (7).

Wie oben bereits erwähnt, wird der zugesetzte Standard $^2\text{H}_5$ -Androsteron-glucuronid durch das Enzym von *Helix Pomatia* nur unzureichend zu etwa einem Drittel dekonjugiert (je nach Probe zwischen 8% und 58%). Da AND allerdings im Rinderurin keinen wichtigen Zielanalyten für die GC/C/IRMS darstellt, werden zur weiteren Beurteilung der Hydrolyse die endogenen Steroide betrachtet.

Die Quantifizierung des Androstendiols aus der FG-Fraktion zeigt für beide Hydrolyseversuche in den meisten Fällen ähnliche Ergebnisse. Je nach Probe wird mit dem Enzym von *Helix Pomatia* eine Vollständigkeit von bis zu 100% erreicht. Der Median liegt für die zwölf Proben bei 80%. In einigen Fällen allerdings ist diese Hydrolyse sehr unvollständig (mindestens 7,1% bei Probe P21), so dass für diesen

Analyten die Hydrolyse mit β -Glucuronidase von *Escherichia Coli* insgesamt robuster ist.

Die Quantifizierung der Testosteron-Metaboliten (Substanzen 3 bis 5 in Abb. 33) aus der FG-Fraktion liefert ähnliche Ergebnisse wie von Androstendiol. Die Mediane für die Vollständigkeit der Hydrolyse mit dem Enzym von *Helix Pomatia* liegen für ETIO und die beiden Androstandiole zwischen knapp 40% und 85%. Die Schwankungen sind bedingt durch die teilweise sehr niedrigen Konzentrationen und die dadurch relativ hohen Unsicherheiten in der Quantifizierung recht groß. Es ist also nicht davon auszugehen, dass die Hydrolyse mit dem Enzym von *Helix Pomatia* tatsächlich bis zu 160% gegenüber derjenigen mit β -Glucuronidase von *Escherichia Coli* beträgt, sondern dass es sich um einzelne Ausreißer handelt. Zudem sind die niedrigen Werte auch bei den höher konzentrierten Urinproben nach Testosteron-Applikation zu finden wie z.B. bei den Proben P21 und P55. Während die Konzentrationen von ETIO nach Hydrolyse mit β -Glucuronidase von *Escherichia Coli* 104 ng/mL (Probe P21) bzw. 360 ng/mL (Probe P55) betragen, werden mit dem anderen Enzym nur 2% (Probe P21) bzw. 34% (Probe P55) dieses Analyten nachgewiesen. Die Hydrolyse nach Kap. 5.1.3 ist also auch für diese Analyten nicht robust und führt zu Substanzverlust bei der Aufarbeitung der Androgene aus der FG-Fraktion, so dass die Hydrolyse mit β -Glucuronidase von *Escherichia Coli* vorzuziehen ist.

Zur Überprüfung der Vollständigkeit der chemischen Hydrolyse der Sulfatkonjugate wird den Urinproben in der Quantifizierungsmethode $^2\text{H}_4$ -Androsteronsulfat als Standard zugesetzt. In beiden Hydrolyseversuchen ist die Wiederfindung des genannten Standards in der S-Fraktion mit 98% ($\pm 3,5\%$; $N = 24$) nahezu vollständig. Es wird also, wie erwartet, nicht durch die Arylsulfataseaktivität des Enzyms von *Helix Pomatia* gespalten.

Die Hauptmengen an DHEA werden in beiden Hydrolyseversuchen in den S-Fractionen wiedergefunden, so dass sich die jeweiligen Konzentrationen nur geringfügig unterscheiden. Durch die Verwendung des Enzyms von *Helix Pomatia* wird DHEA-sulfat also unvollständig dekonjugiert. Insgesamt schwanken die Ergebnisse durch die höhere Konzentration dieses Analyten und dem daraus resultierenden kleineren relativen Fehler sehr viel weniger als bei den vorherigen Analyten. Der in Abb. 33 gezeigte Median bezüglich der Vollständigkeit der Hydrolyse liegt nur bei 18% und 35% werden nicht überschritten. Die daraus

resultierenden Verluste sind für die Aufreinigung der Analyten nicht akzeptabel, so dass die Sulfatkonjugate chemisch hydrolysiert werden müssen.

Lediglich die Konjugate von 17α -Estradiol als letztem Zielanalyt werden bei beiden Hydrolyseversuchen vollständig gespalten. Die Darstellung in Abb. 33 ist etwas irreführend, da dieser Analyt nur in sieben der zwölf Proben quantifiziert werden kann und sich die Ergebnisse in sechs dieser Proben kaum unterscheiden. Das Minimum bei 0% ist hier als Ausreißer zu bewerten und nicht als tatsächliche Hydrolysehemmung.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass die vormals eingesetzte Hydrolyse mit dem Enzym von *Helix Pomatia* (Ferchaud *et al.* 2000b; Prévost *et al.* 2001) für die Androgene nicht vollständig ist und zu großen Verlusten führt. Die von Ferchaud *et al.* in deren Methode beschriebene schlechte Wiederfindung von nur 16% ($\pm 7\%$; $N = 50$) lässt sich zum Teil also auf die Hydrolyse zurückführen. Für die hier zu entwickelnde Methode wird die Hydrolyse mit β -Glucuronidase von *Escherichia Coli*, kombiniert mit der chemischen Hydrolyse der Sulfatkonjugate gewählt, was sich als robust und zuverlässig erweist. Die absolute Menge des verwendeten Enzyms konnte durch die ISOSTER-Partner im Verlauf des Projekts auf ein ausreichendes Volumen von 5 μ L Enzymlösung pro mL Urin reduziert werden.

5.1.4 Umkehr-Phasen Festphasenextraktion

Die in Kap. 4.3.3 gezeigte Festphasenextraktion nach Ferchaud *et al.* (1998) erweist sich im Verlauf der Methodenentwicklung als robust und zuverlässig. Sie wird sowohl zur ersten Aufreinigung für die Analyten der FG-Fraktion als auch für DHEA aus der S-Fraktion zur Wasserabtrennung vor der chemischen Hydrolyse nach Kap. 4.3.3 eingesetzt.

5.1.5 Flüssig/flüssig Extraktion: Unterteilung in Androgene, Estrogene und Sulfatkonjugate

Die in Kap. 4.3.4 gezeigte Unterteilung in Androgene und Estrogene der FG-Fraktion sowie in Sulfatkonjugate ist aus pragmatischen Überlegungen entstanden und hat sich in der Praxis trotz des dadurch bedingten Mehraufwands in der Aufarbeitung der Urinproben bewährt.

Zunächst führt eine LLE in alkalischem Milieu zu saubereren Extrakten als im Neutralen, da die sauren Bestandteile der Matrix deprotoniert vorliegen und als Anionen nicht in die organische Phase übergehen. Aufgrund der relativ sauren phenolischen OH-Gruppe des 17α -Estradiols liegt dieser Zielanalyt bei pH 14

ebenfalls deprotoniert vor (s. Lewis und Archer 1979). Bei der Einstellung des pH-Werts ist die vollständige Entfernung von Ethylacetat wichtig, da es unter alkalischen Bedingungen hydrolysieren würde. Eine gewisse Pufferung durch das entstehende Acetat und demzufolge nicht konstante pH-Werte wären die Folge, wodurch nicht reproduzierbare Mengen an 17α -Estradiol in die organische Phase übergehen können. Neben dem 17α -Estradiol liegen die sulfatierten Steroide wie das DHEA ebenfalls als Anionen vor und verbleiben in der wässrigen Phase. Die anderen Androgene aus der FG-Fraktion lassen sich hingegen aufgrund ihrer unpolaren Eigenschaften vollständig in die *n*-Pentan-Phase ausschütteln und auf diese Weise von den anderen Zielanalyten abtrennen.

Durch die Zugabe von Essigsäure wird ein leicht saurer Acetatpuffer gebildet (pH-Wert etwa 5,2). Bei diesem pH-Wert lassen sich die nun neutral vorliegenden Estrogene mit *n*-Pentan komplett in die organische Phase überführen, während die Sulfatkonjugate weiterhin als Anionen in der wässrigen Phase verbleiben. Die so erfolgte Abtrennung der Estrogene ist notwendig, da sich 17α -Estradiol unter den in Kap. 4.3.5 gezeigten Hydrolysebedingungen teilweise zersetzt.

Die sich anschließende Hydrolyse des DHEA-sulfats in der wässrigen Phase erfolgt unter den bekannten Bedingungen (von Kuk *et al.* 2003); diese werden lediglich durch den bereits gezeigten Einsatz der hier verwendeten RP₁₈-SPE aus Kap. 4.3.3 modifiziert.

5.1.6 Normal-Phasen Festphasenextraktion

Die bisherigen Methoden der Aufarbeitung von Rinderurin zur Messung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse endogener Steroide (Ferchaud *et al.* 1998; Ferchaud *et al.* 2000b; Prévost *et al.* 2001) beinhalten jeweils einen Aufreinigungsschritt mit NP-SPE auf nicht modifiziertem Kieselgel. Der in Kap. 4.3.6 gezeigte Schritt entspricht demjenigen von Prévost *et al.* (2001); lediglich bei der Probenüberführung wird auf Dichlormethan verzichtet und die Eluenten sind ggf. an 17α -Estradiol angepasst. Nachdem die sich anschließende Aufreinigung mittels semipräparativer NP-HPLC gemäß Kap. 4.3.7.3 aufgrund der in Kap. 5.1.7 diskutierten Ergebnisse Anwendung fand, wurde diese SPE bezüglich des Aufreinigungserfolgs überprüft. Gemäß Abb. 14 (S. 35) werden im Anschluss an die NP-HPLC und Acetylierung vier verschiedene Fraktionen erhalten und mittels GC/MS nach Kap. 4.3.9 miteinander verglichen. Die in den folgenden Abbildungen gezeigten Chromatogramme stammen beispielhaft von Probe P166, die einmal mit und einmal ohne NP-SPE aufgereinigt ist. Die auf

diese Weise erhaltenen Chromatogramme sind für die vier Fraktionen jeweils übereinander gelegt und weisen auf der Intensitätsskala pro Abbildung denselben Bereich auf. Einzig die Basislinien sind der Übersichtlichkeit halber verschoben, so dass sich die Leistungsfähigkeit dieses Aufreinigungsschrittes besser beurteilen lässt.

Abb. 34 zeigt die Mischfraktion der Androgene aus der FG-Fraktion (vgl. Flussdiagramm in Abb. 14, S. 35).

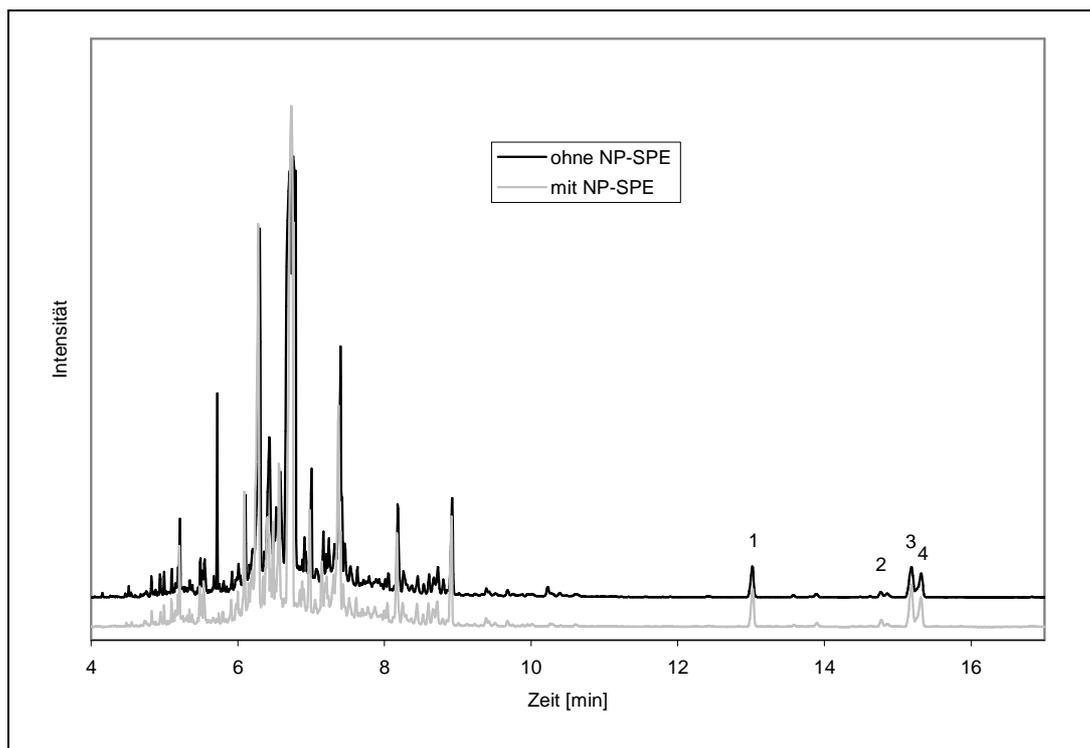


Abb. 34: GC/MS-Chromatogramme (*Scan Modus, m/z 40-500*) der Mischfraktion der acetylierten Androgene ohne bzw. mit NP-SPE-Aufreinigung; ETIO (1), EpiT (2), Androstendiol (3) und 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol (4)

Zu Beginn der Aufzeichnung nach dem Lösungsmittelpeak sind die leichter flüchtigen Matrixkomponenten hauptsächlich zwischen Minute 4 und Minute 10 zu sehen. Der Vergleich der beiden Aufreinigungen zeigt hier kaum Unterschiede. Relevant für die Beurteilung der Aufreinigung hinsichtlich der GC/C/IRMS-Analyse ist im Wesentlichen der Bereich der Zielanalyten ETIO-acetat (1), EpiT-acetat (2), Androstendiol-diacetat (3) und 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat (4).

Abb. 35 zeigt dementsprechend den Ausschnitt zwischen Minute 12,5 und Minute 16.

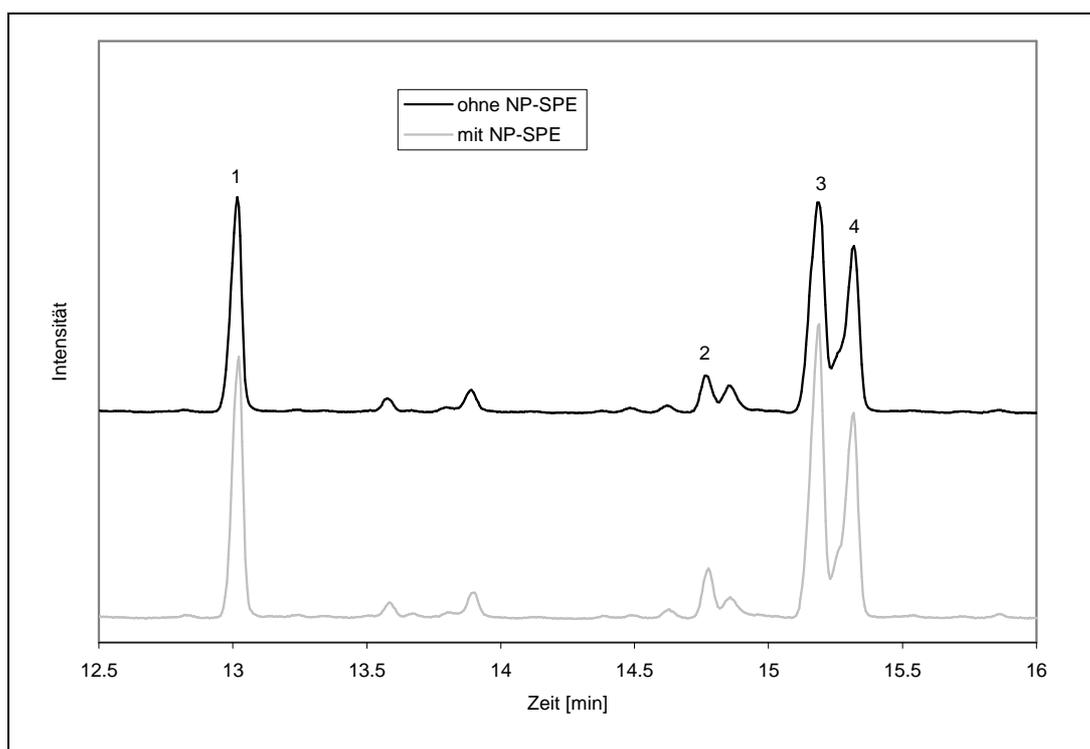


Abb. 35: Ausschnittsvergrößerung der Zielanalyten aus Abb. 34

In dieser Ausschnittsvergrößerung ist eine relevante Aufreinigung durch die NP-SPE nicht zu erkennen. Beide Chromatogramme sind quasi identisch und unterscheiden sich in den jeweiligen Intensitäten der Zielanalyten nur minimal. Für diese Fraktion scheint der hier zu beurteilende Aufreinigungsschritt nicht notwendig zu sein. Während ETIO-acetat (1) keiner weiteren Aufreinigung für die GC/C/IRMS bedarf, da es basisliniengetrennt von den Matrixkomponenten ist, trifft dies auf die anderen Zielanalyten in dieser Fraktion zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu. Valide Messungen der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte sind zu diesem Punkt der Aufreinigung also nur von ETIO bestimmbar, nicht aber von EpiT, Androstendiol und 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol. Speziell auf eine koeluiierende Verbindung zwischen den Diolen wird bei der Entwicklung der zweiten Aufreinigung mittels HPLC auf unpolarer RP_{18} -Phase gemäß Kap. 4.3.10 genauer eingegangen.

Abb. 36 zeigt die Androgenfraktion mit dem Diacetat von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol als Zielanalyt.

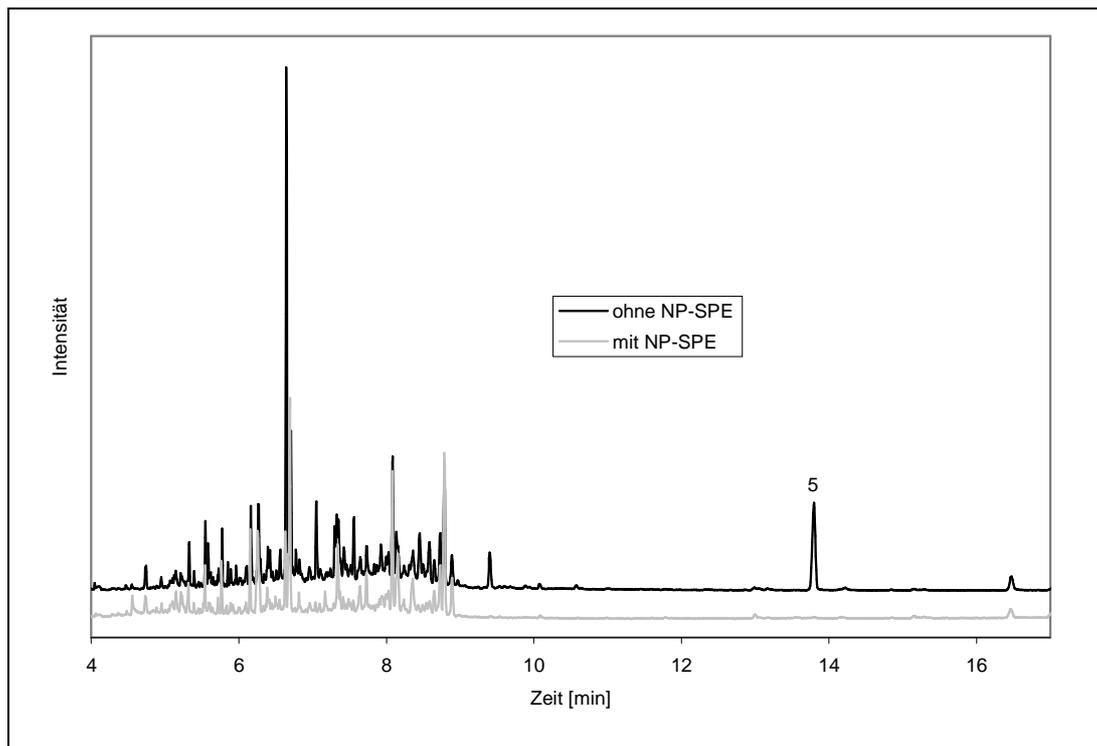


Abb. 36: GC/MS-Chromatogramme (Scan Modus, m/z 40-500) der 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat (5) enthaltenden Fraktion ohne bzw. mit NP-SPE-Aufreinigung

Im Bereich der leichter flüchtigen Matrixkomponenten ist eine Aufreinigung durch die NP-SPE zu erkennen. Der Zielanalyt hingegen ist durch die NP-SPE fast komplett entfernt, was in der Ausschnittsvergrößerung in Abb. 37 verdeutlicht ist.

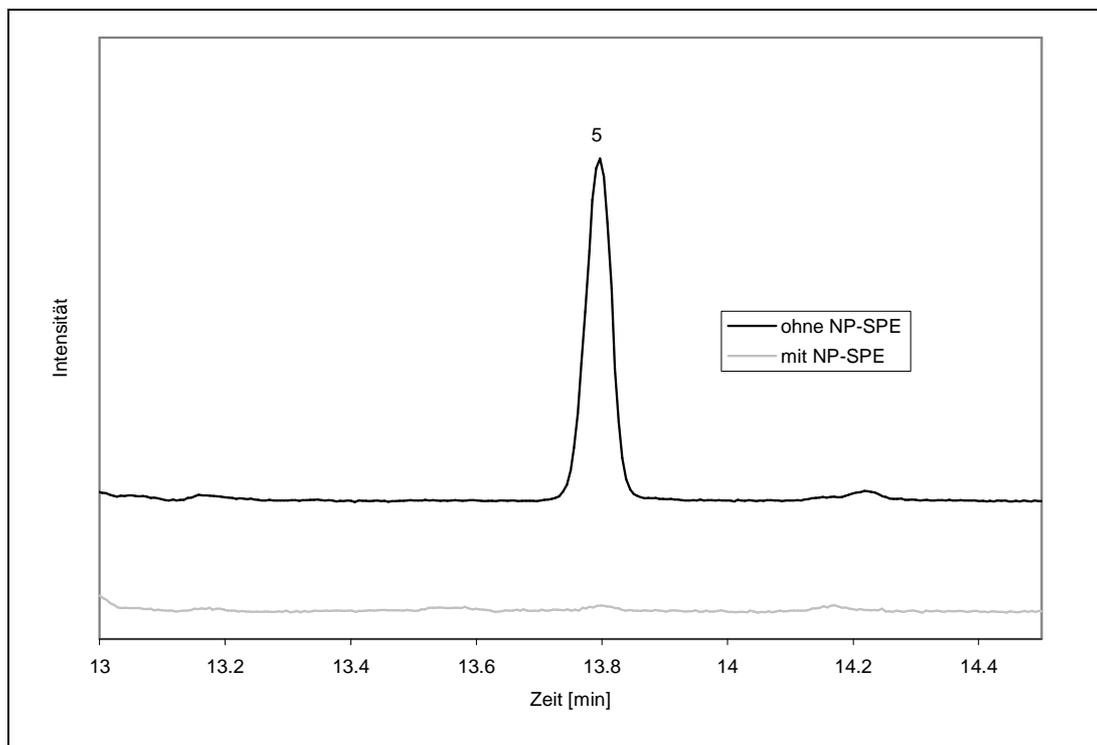


Abb. 37: Ausschnittsvergrößerung des Peaks von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat aus Abb. 36

Für beide Aufreinigungen gilt, dass in Abb. 37 kaum Matrixkomponenten zu erkennen sind. Die einzige signifikante „Aufreinigung“ durch die NP-SPE ist in diesem Bereich die Entfernung des 5 β -Androstan-3 α ,17 α -diols (5), das offenbar aufgrund der im Vergleich zu den anderen Analyten höheren Polarität unter den in Kap. 4.3.6.1 gegebenen Bedingungen auf der Festphase verbleibt. Das Anpassen der Eluenten für diesen Zielanalyten wäre zwar möglich, einfacher aber ist es, diesen Schritt aus der Aufarbeitung zu streichen. Das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis dieses Zielanalyten in Form des Diacetats ist bereits valide bestimmbar, da keine mit dem 5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol-diacetat koeluiierenden Matrixkomponenten erkennbar sind.

Abb. 38 zeigt das GC/MS-Chromatogramm der DHEA-Fraktion der Sulfatkonjugate.

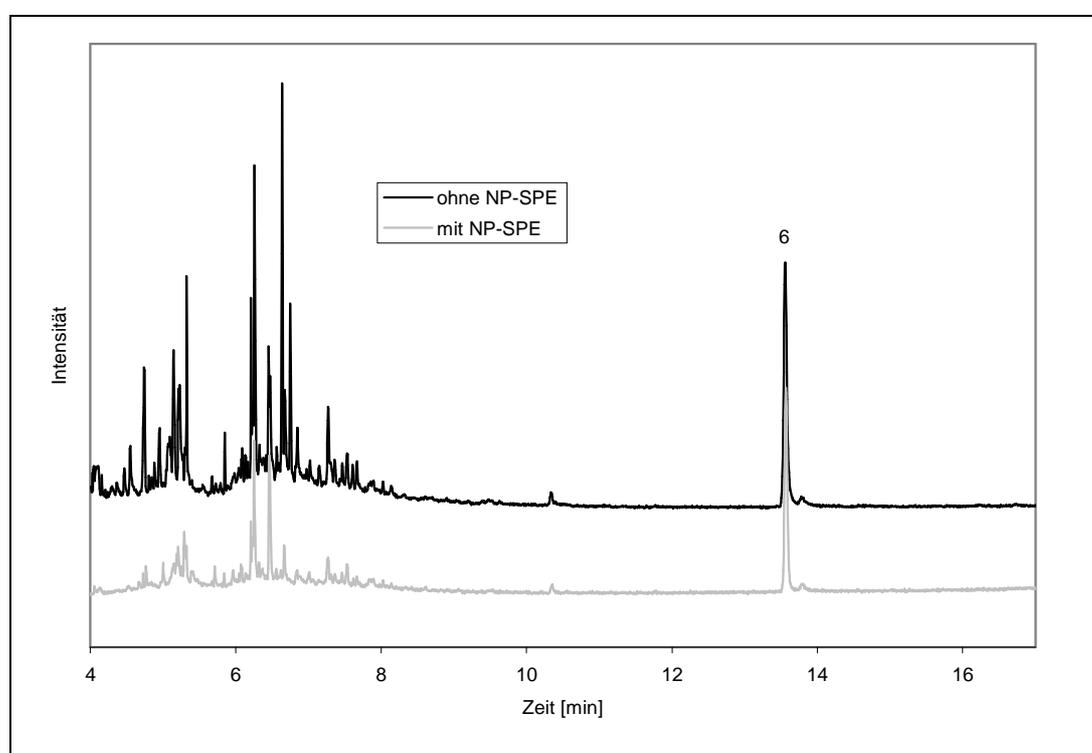


Abb. 38: GC/MS-Chromatogramme (Scan Modus, m/z 40-500) der DHEA-acetat (6) enthaltenden Fraktion ohne bzw. mit NP-SPE-Aufreinigung

Im vorderen Bereich des Chromatogramms ist eine gewisse Aufreinigung der biologischen Matrix durch den NP-SPE-Schritt erkennbar. Die Aufreinigung zur Retentionszeit von DHEA-acetat (6) erscheint in beiden Fällen weitgehend zufriedenstellend für die GC/C/IRMS. Zu erwähnen ist, dass der kleine Peak direkt im Anschluss an das DHEA-acetat (6) von EpiA-acetat herrührt, dessen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis auf diese Weise in manchen Proben in Abhängigkeit der jeweiligen Menge aus der S-Fraktion bestimmbar ist.

Abb. 39 zeigt die Ausschnittsvergrößerung zur Retentionszeit von DHEA-acetat von Minute 13 bis Minute 14,5.

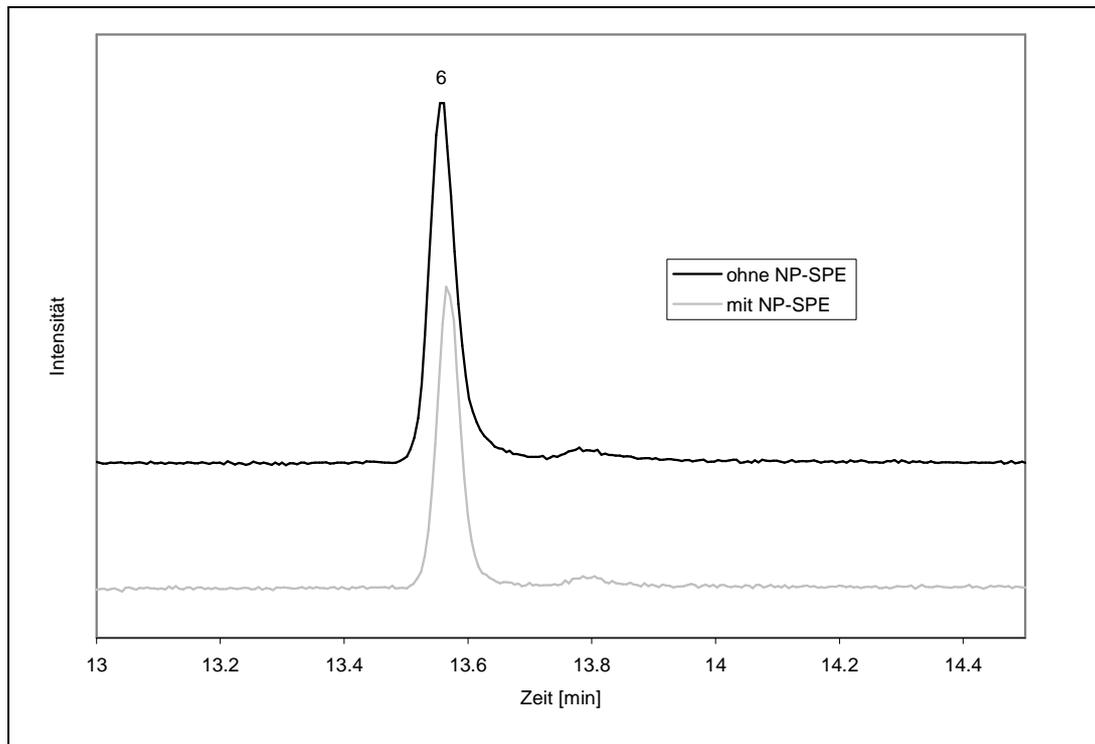


Abb. 39: Ausschnittsvergrößerung des Peaks von DHEA-acetat aus Abb. 38

In diesem Bereich ist auch für die DHEA-Fraktion keine signifikante Aufreinigung durch den hier zu beurteilenden Schritt erkennbar, da beide Chromatogramme annähernd identisch sind. Die NP-SPE bringt also auch für die S-Fraktion keine Vorteile, so dass auf sie in der Aufarbeitung verzichtet werden kann. Eine Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses von DHEA mittels GC/C/IRMS ist ohne weitere Aufreinigung möglich, da bis auf das EpiA-acetat keine Matrixkomponenten in der Nähe des DHEA-acetats erkennbar sind. Die chromatographische Trennung dieser beiden Substanzen ist, wenn auch grenzwertig, ausreichend für die GC/C/IRMS. Die Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werts von EpiA hingegen ist aufgrund der allgemein geringen Konzentration nur in seltenen Fällen möglich.

Abb. 40 zeigt die Estrogen-Fraktion mit und ohne Aufreinigung durch die NP-SPE als GC/MS-Vergleich.

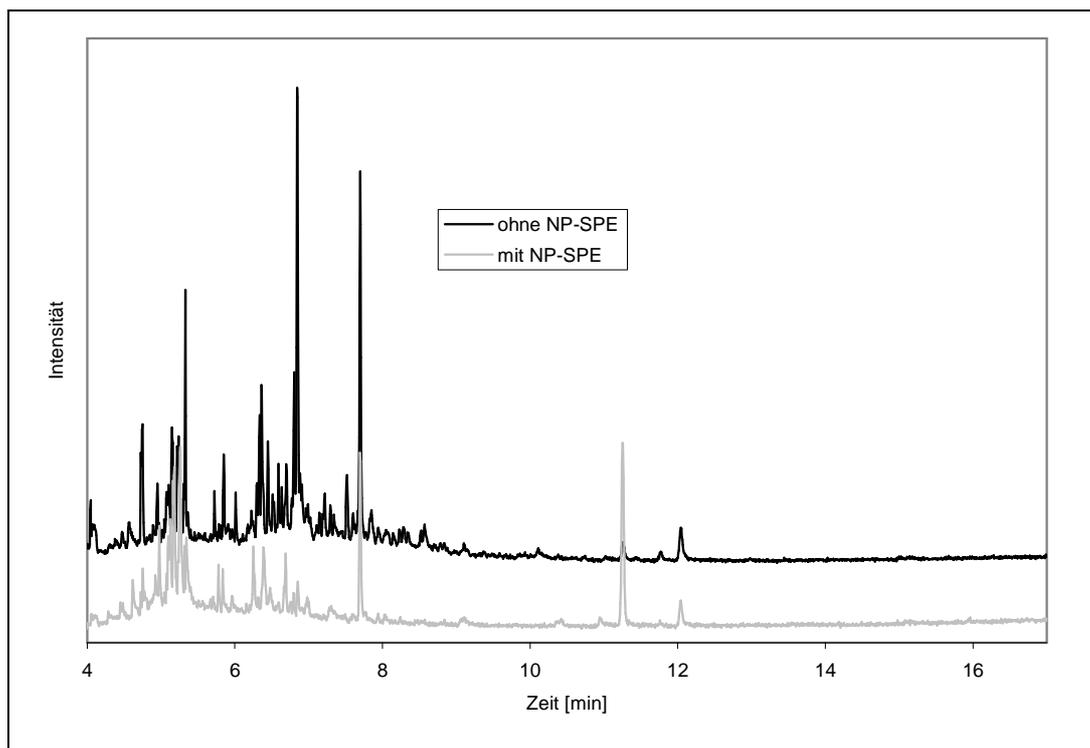


Abb. 40: GC/MS-Chromatogramme (*Scan Modus, m/z* 40-500) der acetylierten Estrogen-Fraktion ohne bzw. mit NP-SPE-Aufreinigung

Da es sich bei der beispielhaft ausgesuchten Probe P166 um den Urin eines unbehandelten männlichen Tiers handelt, weist der gezeigte Extrakt kein 17α -Estradiol-diacetat auf. Zur Beurteilung des Aufreinigungserfolgs durch die NP-SPE sind die gezeigten Chromatogramme entsprechend hauptsächlich für den vorderen Bereich der leichter flüchtigen Matrixkomponenten beispielhaft und aussagekräftig. Hier ist ein gewisser Aufreinigungserfolg durch die NP-SPE zu erkennen. Der hintere Bereich zur theoretischen Retentionszeit von 15,6 min für 17α -Estradiol-diacetat ist hingegen unabhängig von der NP-SPE weitgehend frei von biologischer Matrix.

Zur Beurteilung des Aufreinigungserfolgs der Estrogen-Fraktion ohne NP-SPE ist in Abb. 41 die Ausschnittsvergrößerung für 17α -Estradiol von Minute 15 bis Minute 16,5 des nach Kap. 4.3.9 erhaltenen GC/MS-Chromatogramms von Probe P192 gezeigt.

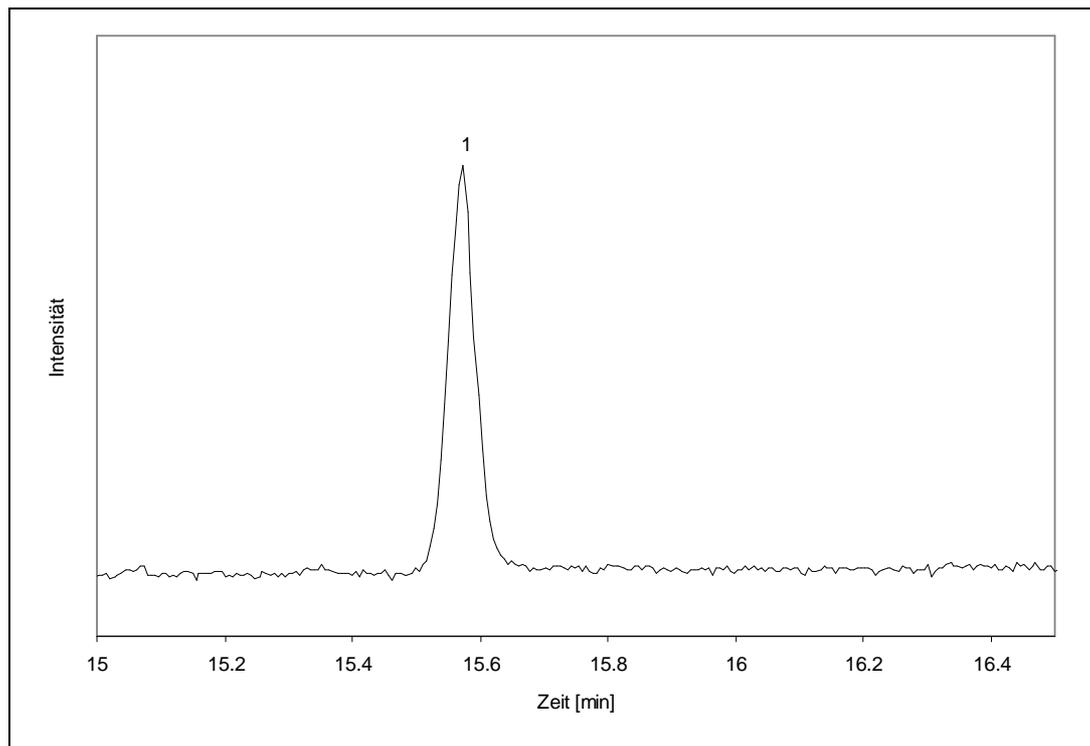


Abb. 41: Ausschnittsvergrößerung im Bereich des Peaks von 17α -Estradiol-diacetat (1) des GC/MS-Chromatogramms (Scan Modus, m/z 40-500) der acetylierten Estrogen-Fraktion von Probe P192 ohne Aufreinigung mittels NP-SPE

Da es sich bei Probe P192 um den Urin eines mit Estradiol behandelten Ochsens handelt, ist 17α -Estradiol in dieser Probe enthalten. Der gezeigte Ausschnitt ist weitgehend frei von störenden Matrixkomponenten. Somit wird auch an der Estrogen-Fraktion deutlich, dass durch die NP-SPE keine zusätzliche Aufreinigung im Bereich der Zielanalyten erreicht wird und dieser Schritt entsprechend überflüssig ist. Das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von 17α -Estradiol-diacetat ist ohne weitere Aufreinigung mittels GC/C/IRMS valide bestimmbar.

Zusammenfassend bietet die in den bisherigen Methoden (Ferchaud *et al.* 1998; Ferchaud *et al.* 2000b; Prévost *et al.* 2001) zur Aufarbeitung von Rinderurin angewendete und hier zu beurteilende Aufreinigung mittels NP-SPE für keine der genannten Fraktionen klare Vorteile. Während für die meisten Zielanalyten keine erkennbaren Verluste auftreten, ist dieser Schritt zur Aufarbeitung von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol nicht geeignet, da es vollständig entfernt wird und nicht zur weiteren Analyse zur Verfügung steht. Aufgrund dieses zunächst durchgeführten Schritts ist der vorhandene Datensatz für die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat weniger umfassend als für die anderen Analyten. Bezüglich des Aufreinigungserfolgs in den vorderen Bereichen der gezeigten Chromatogramme ist

allerdings zu erwähnen, dass dies bei der Verwendung des herkömmlichen GC/C/IRMS-Systems durch die Ausblendung mittels *Backflush* (vgl. Abb. 9, S. 22) keine Vorteile bringt. Bei der Verwendung des modifizierten Systems (vgl. Abb. 10, S. 24) hingegen werden Matrixkomponenten, die in größeren Mengen zu einer schnellen Reduzierung der Kapazität des Oxidationsreaktors führen, einzig durch die Splitleitung, durch die auch das Lösungsmittel ausgeblendet wird, beseitigt. Durch die Anwendung eines geeigneten Temperaturprogramms des KAS (s. Tabelle 34, S. 182) wird ein Großteil dieser Matrix allerdings entfernt, so dass die NP-SPE keine weitere Anwendung in der entwickelten Methode findet.

5.1.7 Erste semipräparative HPLC

Die in der Literatur beschriebene weitere Aufreinigung von Urinproben mittels semipräparativer HPLC basiert entweder auf C₁₈-Säulen unter Umkehr-Phasen-Bedingungen (z.B. Balizs *et al.* 2005; Flenker *et al.* 1999) oder auf Aminopropyl-Säulen unter Normal-Phasen-Bedingungen (z.B. Ferchaud *et al.* 1998; Ferchaud *et al.* 2000b; Prévost *et al.* 2001).

5.1.7.1 Aufreinigung auf RP₁₈-Phase

Die Verwendung der in Kap. 4.3.7.1 beschriebenen RP₁₈-Säule zu diesem Zeitpunkt der Aufarbeitung weist entscheidende Nachteile auf. Unter den gegebenen Bedingungen wird sie durch unpolare Matrixverbindungen der biologischen Probe mehr oder minder irreversibel kontaminiert, weshalb die Retentionszeiten der Standards nach wenigen Proben nicht mehr konstant sind und sich sukzessive nach vorne verschieben. Wie in Kap. 3.4 erwähnt, muss aufgrund der Isotopendiskriminierung zwischen Beginn und Ende eines HPLC-Peaks jeweils der komplette Analyt gesammelt werden, um die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte nicht zu beeinflussen. Durch nicht konstante Retentionszeiten ist diese Voraussetzung kaum zu erfüllen. Zwar lassen sich die besagten unpolaren Verbindungen der urinären Matrix von der Säule waschen, jedoch durch zeitaufwändiges 50-minütiges Spülen bei einem Lösungsmittelfluss von 1 mL/min reinem Acetonitril. Zudem ist die Aufreinigung der verschiedenen Fraktionen im Vergleich zur nachfolgend getesteten Aminopropyl-Phase wesentlich schlechter.

Zusammenfassend ist die Anwendung der RP₁₈-Phase zu diesem Zeitpunkt der Aufarbeitung nicht praktikabel.

5.1.7.2 Aufreinigung auf Aminopropyl-Phase

Zunächst wird die von Ferchaud *et al.* (1998) vorgeschlagene HPLC-Methode auf der Aminopropyl-Phase gemäß Tabelle 5 (S. 41) eingesetzt. Das verwendete THF weist unterhalb einer Wellenlänge von etwa 220 nm (Meyer 1988) eine hohe UV-Absorption auf, so dass bis auf die ungesättigten Zielanalyten keine Retentionszeiten per UV-Detektor zu ermitteln sind. Die Analyse mittels GC/MS nach Kap. 4.3.9 von minutenweise gesammelten Fraktionen injizierter Misch-Standards zeigt ein ausgeprägtes *Tailing* vor allem für die Steroide mit einer Ketofunktion. Ein robustes Sammelschema ist auf dieser Grundlage nicht möglich.

Das Lösungsmittelgemisch aus 90% *n*-Hexan, 7,5% THF und 2,5% Isopropanol wird entsprechend Tabelle 6 (S. 42) zu 96% *n*-Hexan und 4% Isopropanol vereinfacht, welches eine ähnliche Elutionskraft aufweist, aber eine UV-Detektion der meisten Steroide bei einer unspezifischen Wellenlänge von 200 nm zulässt. Des Weiteren wird die Temperatur des Säulenofens auf 50 °C gesetzt, um den Pumpendruck beim Waschen der Säule mit erhöhtem Isopropanol-Anteil zu reduzieren.

Abb. 42 zeigt das HPLC/UV-Chromatogramm der Analyten mit Ketofunktion, die ausgeprägtes *Tailing* gezeigt haben, sowie das angewendete Sammelschema.

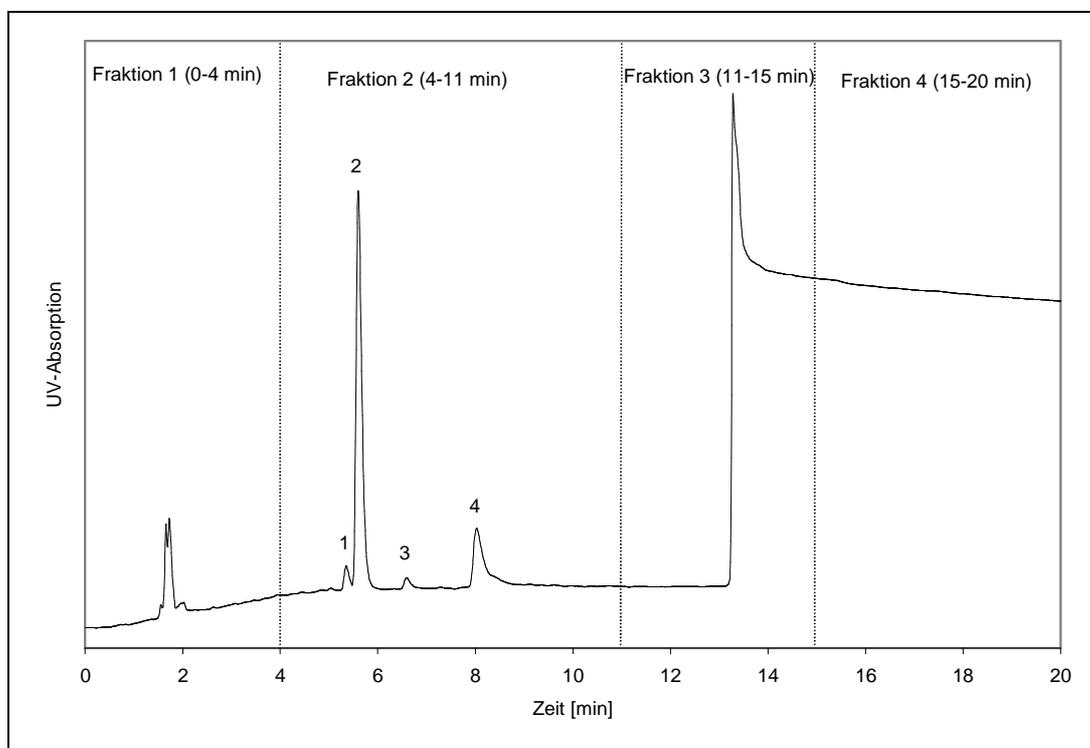


Abb. 42: HPLC/UV-Chromatogramm auf Aminopropyl-Phase bei 200 nm von EpiA (1), DHEA (2), ETIO (3) und EpiT (4) sowie das entsprechende Sammelschema

Jeweils 5 µg Substanz in 50 µL *n*-Hexan/Isopropanol (90/10; v/v) wurden injiziert. Die hohe Absorption ab etwa Minute 13 ist durch den Wechsel des Lösungsmittelgradienten von 4% auf 50% Isopropanol zu erklären, welches das Licht der angewendeten Wellenlänge ebenfalls absorbiert. Die Intensität der UV-Absorption von EpiA (1) und ETIO (3) mit jeweils einer Ketogruppe ist erwartungsgemäß ähnlich. Für EpiT (4) hingegen ist die UV-Absorption sehr viel geringer als für DHEA (2), obwohl beide Steroide jeweils einfach ungesättigt sind und bei der unspezifischen Wellenlänge von 200 nm ähnlich absorbieren sollten. Dies deutet auf chromatographische Probleme hin, die im Folgenden diskutiert werden.

Aufgrund entsprechender Erfahrungen umfasst das in Abb. 42 gezeigte Sammelschema das komplette Chromatogramm von 0-20 min. Fraktion 1 von 0-4 min beinhaltet den Injektionspeak bei knapp 2 min, ausschließlich in Fraktion 2 von 4-11 min sollten die Zielanalyten EpiA (1), DHEA (2), ETIO (3) und EpiT (4) enthalten sein, während in den Fraktionen 3 (11-15 min) und 4 (15-20 min) keine Analyten mittels anschließender Analyse per GC/MS nachweisbar sein sollten.

Abb. 43 zeigt die mittlere Wiederfindung der Zielanalyten sowie die Standardabweichung aus einer Doppelbestimmung für Fraktion 2 aus Abb. 42.

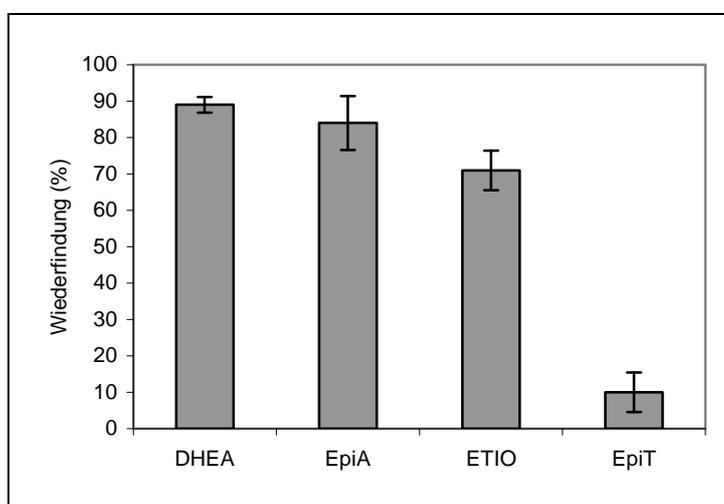


Abb. 43: Mittlere Wiederfindung der angegebenen Steroide der Fraktion 2 aus Abb. 42

Die Wiederfindung für DHEA und EpiA ist mit 89% bzw. 84% weitgehend vollständig. Die Wiederfindung für ETIO hingegen beträgt nur 71% und diejenige für EpiT ist mit 10% ungenügend. Mittels GC/MS sind auch in den Fraktionen 1, 3 und 4 aus Abb. 42 alle Analyten mit geringer Intensität nachweisbar. Eine mögliche Erklärung ist, dass die stationäre Phase gegenüber den Analyten chemisch nicht

inert ist. Der Vergleich der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der mit dieser HPLC fraktionierten Standards mit denjenigen ohne HPLC-Fraktionierung unterstützt diese Annahme.

Tabelle 13 zeigt die entsprechenden $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der verschiedenen Analyten und die Standardabweichung aus der innerhalb einer Sequenz durchgeführten Doppelbestimmung.

Tabelle 13: $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von Standards mit bzw. ohne HPLC-Fraktionierung gemäß Abb. 42

Analyt	mittlerer $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert (‰) \pm Standardabweichung			
	DHEA	EpiA	ETIO	EpiT
ohne HPLC	-33,9 (\pm 0,1)	-33,2 (\pm 0,2)	-33,5 (\pm 0,2)	-29,1 (\pm 0,2)
mit HPLC	-33,7 (\pm 0,3)	-33,1 (\pm 0,1)	-33,3 (\pm 0,2)	-27,7 (\pm 0,1)

DHEA, EpiA und ETIO weisen vor und nach dem Schneiden mittels HPLC keine signifikanten Unterschiede in den Isotopenverhältnissen auf. EpiT hingegen ist nach der HPLC etwa um 1,4‰ schwerer als zuvor. Dies weist darauf hin, dass die stationäre Phase chemisch nicht inert gegenüber den Zielanalyten ist, insbesondere nicht gegenüber EpiT. Wie in Kap. 2.1 bereits erwähnt, reagieren die leichteren Isotopologe schneller als die schwereren, so dass in diesem Fall die Mehrzahl der isotopisch schwereren EpiT-Moleküle gesammelt werden, während die leichteren womöglich eine chemische Bindung mit den Aminogruppen der stationären Phase eingegangen sind.

Zur Überprüfung dieser Möglichkeit und zur Veranschaulichung des Effekts der stationären Phase wird dem *n*-Hexan als maßgeblichem Eluenten gemäß Kap. 4.3.7.2 verschiedene Mengen an *n*-Butylamin zugesetzt.

Abb. 44 zeigt die entsprechenden übereinander gelegten HPLC/UV-Chromatogramme von EpiT als am stärksten betroffenen Analyten.

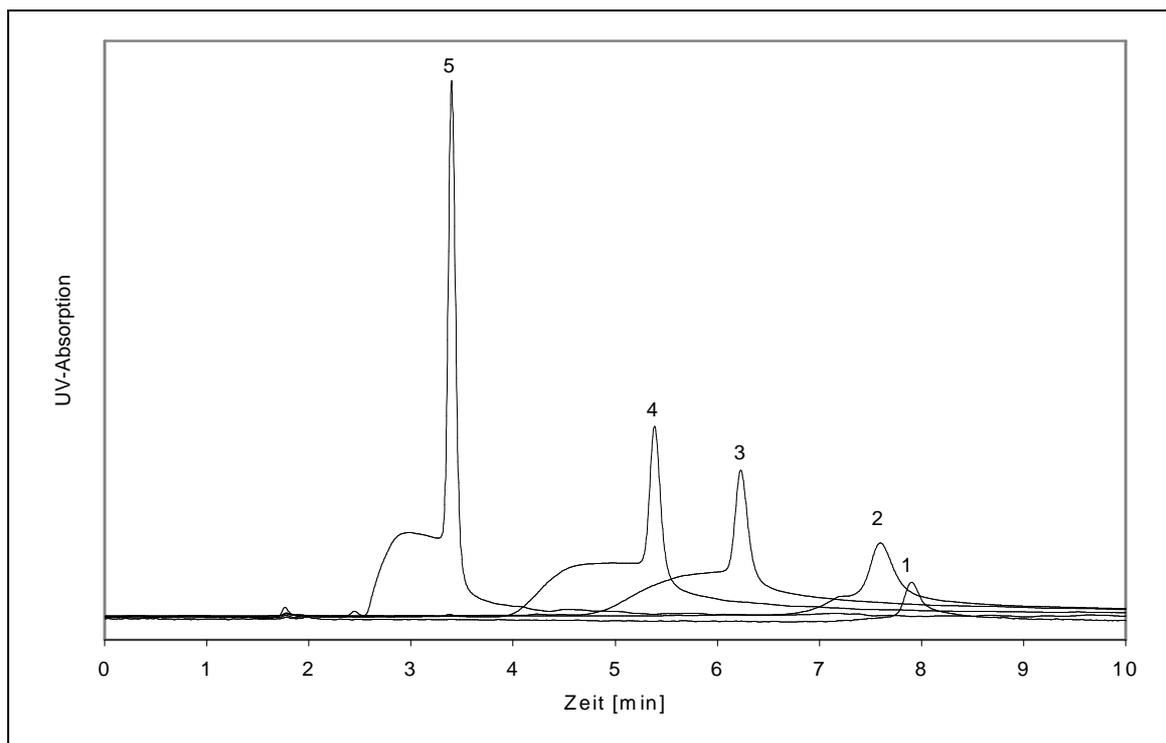


Abb. 44: HPLC/UV-Chromatogramme auf Aminopropyl-Phase bei 245 nm von jeweils 5 μg EpiT ohne (1), mit 1‰ (2), mit 5‰ (3), mit 1% (4) oder mit 5% (5) *n*-Butylamin im *n*-Hexan

Es ist die UV-Absorption bei einer für EpiT charakteristischen Wellenlänge von 245 nm gegen die Zeit aufgetragen. Die Nummerierung zeigt die Peaks von EpiT des jeweiligen Chromatogramms mit keinem Zusatz des primärenamins (1) bzw. einem Zusatz von 1‰ (2), 5‰ (3), 1% (4) oder 5% (5). Durch diesen Zusatz verschiebt sich die Retentionszeit erwartungsgemäß nach vorne. Zudem nimmt die Intensität der UV-Absorption von EpiT mit steigendem *n*-Butylamin-Gehalt deutlich zu. Eine kürzere Verweildauer des EpiT auf der HPLC-Säule verringert die zur Verfügung stehende Reaktionszeit. Die höhere UV-Absorption gibt also tatsächlich eine größere Menge an EpiT am Detektor wieder. Zudem ist starkes *Tailing* in Verbindung mit sonderbarem *Fronting* in Abhängigkeit des Anteils an primärem Amin im Lösungsmittel zu erkennen. Dies deutet ebenfalls auf eine chemische Reaktion hin, bei der das Reaktionsprodukt mit niedrigerer Polarität stetig abgeführt wird.

Zum Abschluss dieser Versuchsreihe wird mit 5% *n*-Butylamin im *n*-Hexan ein Mischstandard aus zwei Diolen (Androstendiol und 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol) und fünf Steroiden mit einer Ketogruppe (AND, ETIO, EpiA, DHEA und EpiT) injiziert und im Anschluss an die HPLC wieder aufgefangen. Der getrocknete Extrakt wird mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA) derivatisiert und nach Kap. 4.3.9 per GC/MS analysiert.

Abb. 45 zeigt den entsprechenden Ausschnitt des GC/MS-Chromatogramms.

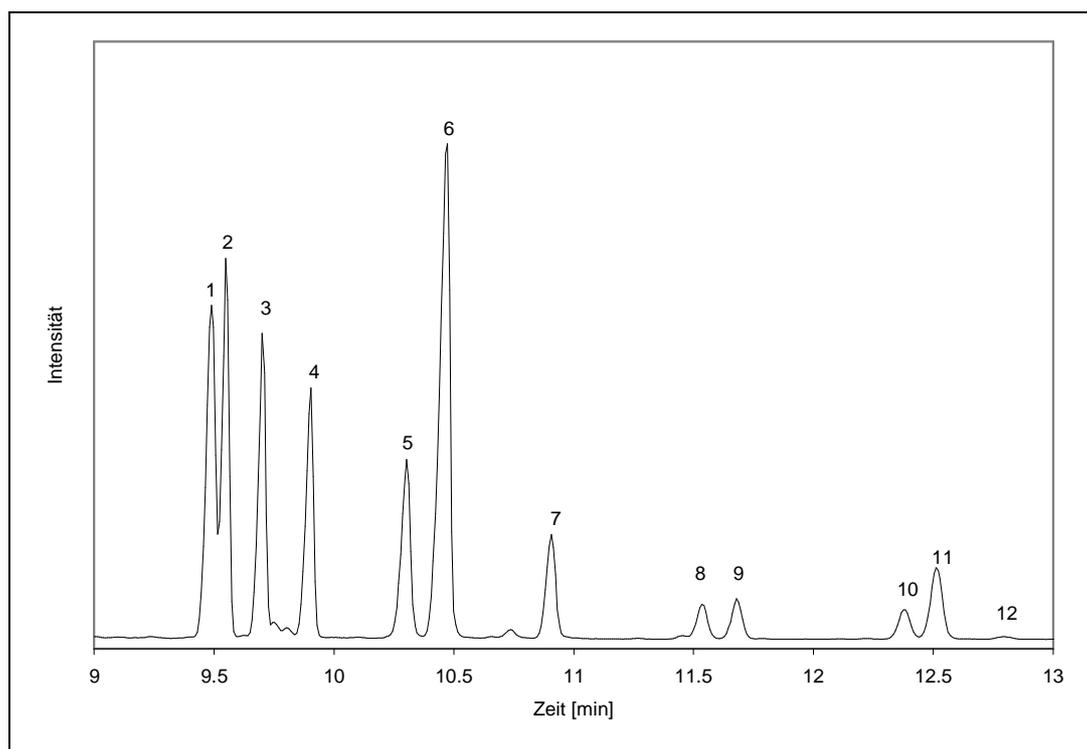


Abb. 45: GC/MS-Chromatogramm (Scan Modus, m/z 40-500) der TMS-Derivate von den im Anschluss an die HPLC mit 5% *n*-Butylamin im *n*-Hexan gesammelten Steroid-Standards Androstendiol (1), 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol (2), AND (3), ETIO (4), DHEA (5), EpiA (6) und EpiT (7) sowie fünf Kondensationsprodukten zwischen den Steroiden mit Ketofunktion und dem zugesetzten Amin mit dem Molekulargewicht 415 (10 und 12) oder 417 (8, 9 und 11)

Die Verbindungen 1 bis 7 sind Androstendiol-bis-TMS (1), 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-bis-TMS (2), AND-TMS (3), ETIO-TMS (4), DHEA-TMS (5), EpiA-TMS (6) und EpiT-TMS (7). Die Verbindungen 8 bis 12 hingegen sind zunächst unbekannt. Sie weisen ungeradzahlige Molekulargewichte (M_W) von 415 g/Mol (10 und 12) und 417 g/Mol (8, 9 und 11) auf. Im Vergleich zu den mono-TMS-Verbindungen 3 bis 7 mit $M_W = 360$ g/Mol (5 und 7) oder 362 g/Mol (3, 4 und 6) weisen die unbekanntesten Verbindungen eine Differenz von 55 g/Mol auf. Die Molmasse des zugesetzten *n*-Butylamins beträgt 73 g/Mol. Es wird geschlussfolgert, dass eine Reaktion zwischen den Steroiden mit einer Ketofunktion und dem zugesetzten primären Amin unter Wasserabspaltung stattfindet, was der Differenz von 55 g/Mol entspricht. Wahrscheinlich bilden sich zwischen primären Aminen und Ketonen über die Halbaminale nach anschließender Dehydratisierung die entsprechenden Imine (z.B. Vollhardt 1990). EpiT ist aufgrund der 3-keto-4-en-Struktur von dieser Reaktion am stärksten betroffen, was die in Abb. 43 (S. 87) gezeigte geringe Wiederfindung

erklärt, da diese Reaktion vermutlich auch auf der Oberfläche der eingesetzten stationären Phase erfolgt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Aminopropyl-Phase unter den gegebenen Bedingungen nicht geeignet ist, da sie chemisch nicht inert gegenüber den Zielanalyten ist. Zum einen wirkt sie sich auf die Wiederfindung aus, zum anderen ist eine Beeinflussung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse sowohl durch die Reaktion direkt möglich als auch indirekt durch Kontamination vorangegangener Injektionen.

5.1.7.3 *Aufreinigung auf Dimethylaminopropyl-Phase*

Aufgrund des Aufreinigungserfolgs der Urinproben mit der Aminopropyl-Phase kommt als möglichst ähnliche, gegenüber den Zielanalyten chemisch inerte Säule, eine Dimethylaminopropyl-Phase mit 0,40 cm Innendurchmesser zum Einsatz. Sie wird zunächst gemäß Tabelle 7 (S. 42) bzw. Tabelle 8 (S. 43) angewendet.

Abb. 46 zeigt das der Abb. 42 (S. 86) entsprechende HPLC/UV-Chromatogramm der Analyten mit Ketofunktion sowie das angewendete Sammelschema.

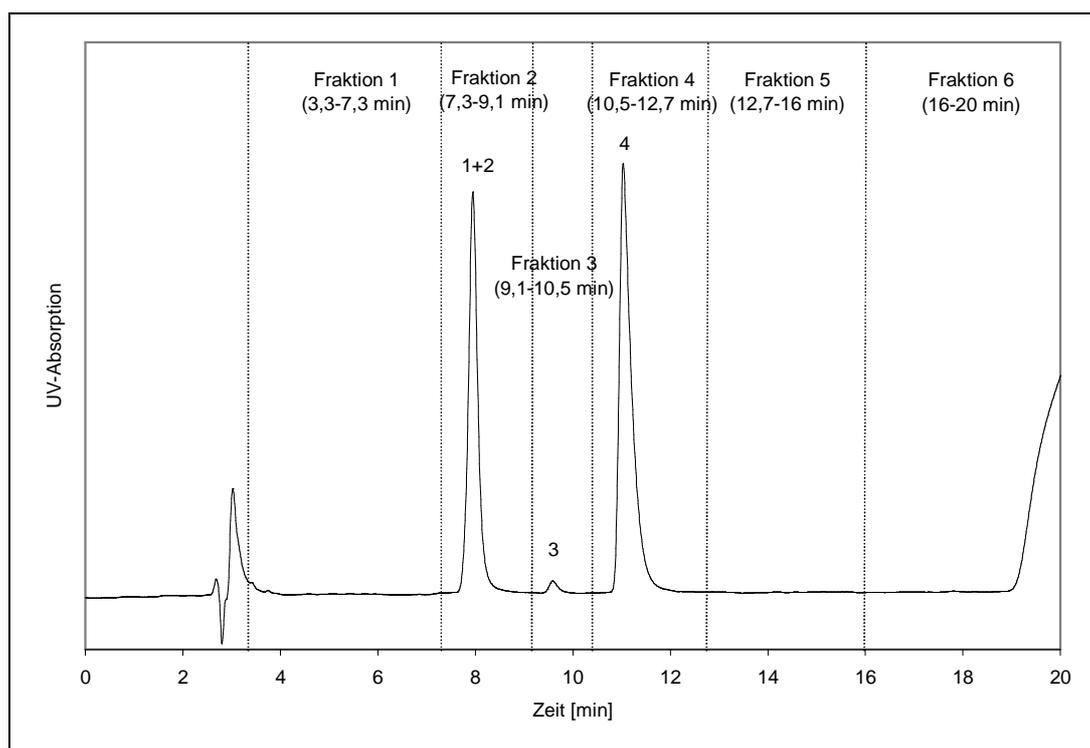


Abb. 46: HPLC/UV-Chromatogramm auf Dimethylaminopropyl-Phase bei 200 nm von EpiA (1), DHEA (2), ETIO (3) und EpiT (4) mit entsprechendem Sammelschema

Die UV-Absorption ist bei 200 nm aufgenommen. Jeweils 5 µg Substanz sind injiziert. Die Reihenfolge der verschiedenen Steroide auf den beiden getesteten Phasen aus Abb. 42 (S. 86) und Abb. 46 ist nahezu identisch; auf der Dimethylaminopropyl-Säule eluieren die gleichen Substanzen etwas später. Die

Retentionszeiten für EpiA (1) und DHEA (2) sind gleich, so dass diese Steroide gemeinsam in Fraktion 2 gesammelt werden, während ETIO (3) und EpiT (4) einzeln in den Fraktionen 3 und 4 erfasst sind. Im Gegensatz zur Aminopropyl-Phase ist die UV-Absorption von EpiT und DHEA auf der hier verwendeten HPLC-Säule erwartungsgemäß bei der angewendeten Wellenlänge von 200 nm ähnlich intensiv, was ein Hinweis zur Eliminierung der Probleme mit der Aminopropyl-Phase ist. Die verschiedenen Fraktionen werden qualitativ und quantitativ per GC/MS analysiert.

Abb. 47 zeigt für die verschiedenen gemäß Abb. 46 gesammelten Fraktionen die Wiederfindung und die Standardabweichung aus einer Doppelbestimmung.

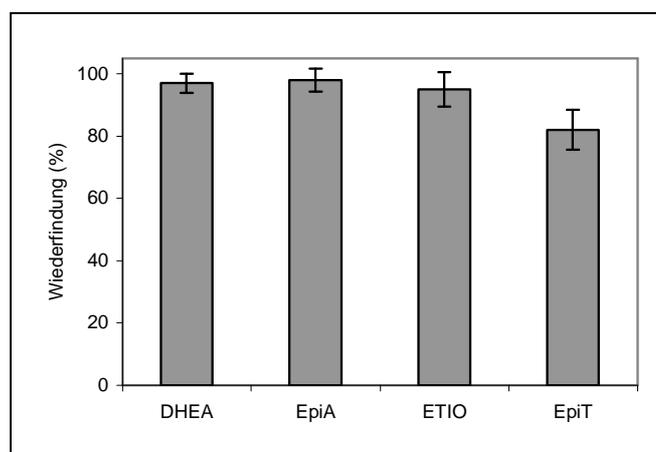


Abb. 47: Mittlere Wiederfindung der nach Abb. 46 gesammelten Steroide

Trotz der im Vergleich zur Aminopropyl-Säule deutlich kürzeren Fraktionen ist die Wiederfindung für DHEA, EpiA und ETIO nahezu vollständig. Die Wiederfindung für EpiT ist mit 82% ($\pm 6,4\%$) etwas geringer, aber zufriedenstellend. In den Fraktionen 1, 5 und 6 aus Abb. 46 sind keine Analyten nachweisbar. Sie sind ausschließlich in den vorgesehenen Fraktionen enthalten. Die analysierten $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der vier fraktionierten Analyten schwanken zufällig um den Mittelwert der nicht fraktionierten Standards und sind somit von der Aufreinigung mittels HPLC unabhängig.

Es ist festzustellen, dass die bei der Verwendung der Aminopropyl-Phase festgestellten Probleme auf der Dimethylaminopropyl-Phase nicht auftreten. Für die Aufreinigung biologischer Proben erweist sich das in Abb. 46 angegebene Sammelschema hingegen als nicht robust genug, was aufgrund der hohen UV-Absorption der biologischen Matrix nur über qualitative Analyse mittels GC/MS der gesammelten Fraktionen feststellbar ist. Speziell ETIO aus der FG-Fraktion zeigt in manchen Proben offenbar matrix-induziertes *Tailing* und ist auch in Fraktion 3 aus Abb. 46 nachweisbar. Aufgrund der in Kap. 3.4 erwähnten Isotopenfraktionierung

während eines HPLC-Peaks kann dies zu einer Beeinflussung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse führen. Zudem sind die Retentionszeiten der Standards bei dem verwendeten isokratischen Lösungsmittelgradienten von 4% Isopropanol und 96% *n*-Hexan nicht sehr konstant, so dass die Schnittgrenzen nach etwa sechs biologischen Proben überprüft und ggf. angepasst werden müssen.

Zur Verbesserung der Robustheit wird die gleiche HPLC-Säule mit einem größeren Innendurchmesser von 0,46 cm unter Einsatz des in Tabelle 8 (S. 43) gezeigten Lösungsmittelgradienten verwendet. Zudem werden die Fraktionsgrenzen aufgrund des in biologischen Proben beobachteten *Tailings* erweitert.

In Abb. 48 sind der entsprechende Ausschnitt des HPLC/UV-Chromatogramms und die Schnittgrenzen für die Androgene der FG-Fraktion gezeigt.

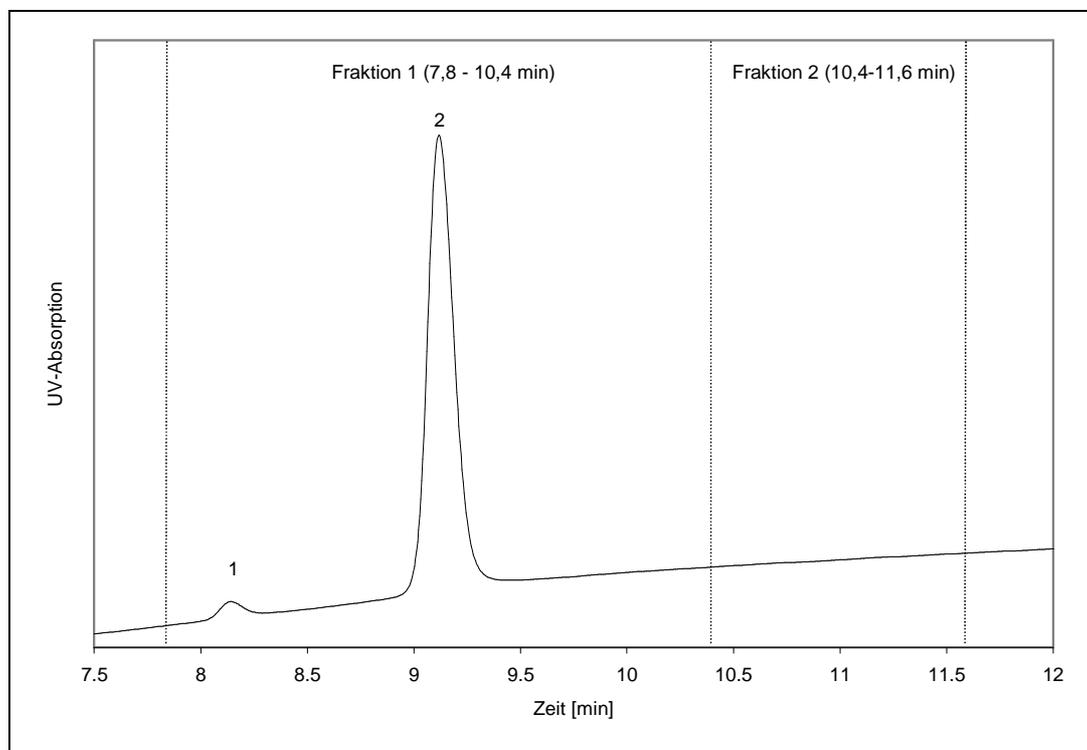


Abb. 48: Ausschnitt des HPLC/UV-Chromatogramms auf Dimethylaminopropyl-Phase bei 200 nm von ETIO (1) und Androstendiol (2) mit entsprechendem Sammelschema

Das HPLC-Chromatogramm zeigt die UV-Absorption bei 200 nm einer Injektion von jeweils 5 µg Substanz. In biologischen Proben beinhaltet Fraktion 1 neben ETIO (1) und Androstendiol (2) auch EpiT mit einer Retentionszeit von etwa 8,7 min und 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol, welches zeitgleich mit Androstendiol eluiert. In Fraktion 2 wird 5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol aufgefangen. Die beiden Androstandiole weisen nur eine minimale UV-Absorption auf, so dass die Fraktionsgrenzen für diese Steroide durch qualitative Analyse mittels GC/MS bestimmt werden. Innerhalb eines

Tages sind die Retentionszeiten der Standards vor und nach einer Sequenz nahezu konstant (± 2 s). Die Standards werden zur Überprüfung des HPLC-Systems und zum Festlegen der Fraktionsgrenzen täglich vor den biologischen Proben injiziert. Durch qualitative GC/MS-Analyse der Fraktionen biologischer Proben werden die Zielanalyten ausschließlich in den vorgesehenen Fraktionen nachgewiesen.

Es ist zu konstatieren, dass aufgrund des höheren Innendurchmessers der HPLC-Säule im Zusammenspiel mit dem Lösungsmittelgradienten und der breiteren Schnittgrenzen das verwendete HPLC-System robust ist. Des Weiteren ist darauf hinzuweisen, dass die in Abb. 35 (S. 79) gezeigte unzureichende Aufreinigung speziell von Androstendiol und 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol nicht durch engere Fraktionsgrenzen zu beeinflussen ist. Die störende Verbindung eluiert sowohl auf dem GC als auch auf der HPLC weitgehend zeitgleich mit den angesprochenen Analyten. Die ausreichende Aufreinigung von ETIO und 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol durch diesen Schritt ist bereits in Abb. 35 (S. 79) und Abb. 37 (S. 80) dargestellt.

In Abb. 49 sind der Ausschnitt des HPLC/UV-Chromatogramms und die Schnittgrenzen für DHEA und ggf. EpiA aus der S-Fraktion gezeigt.

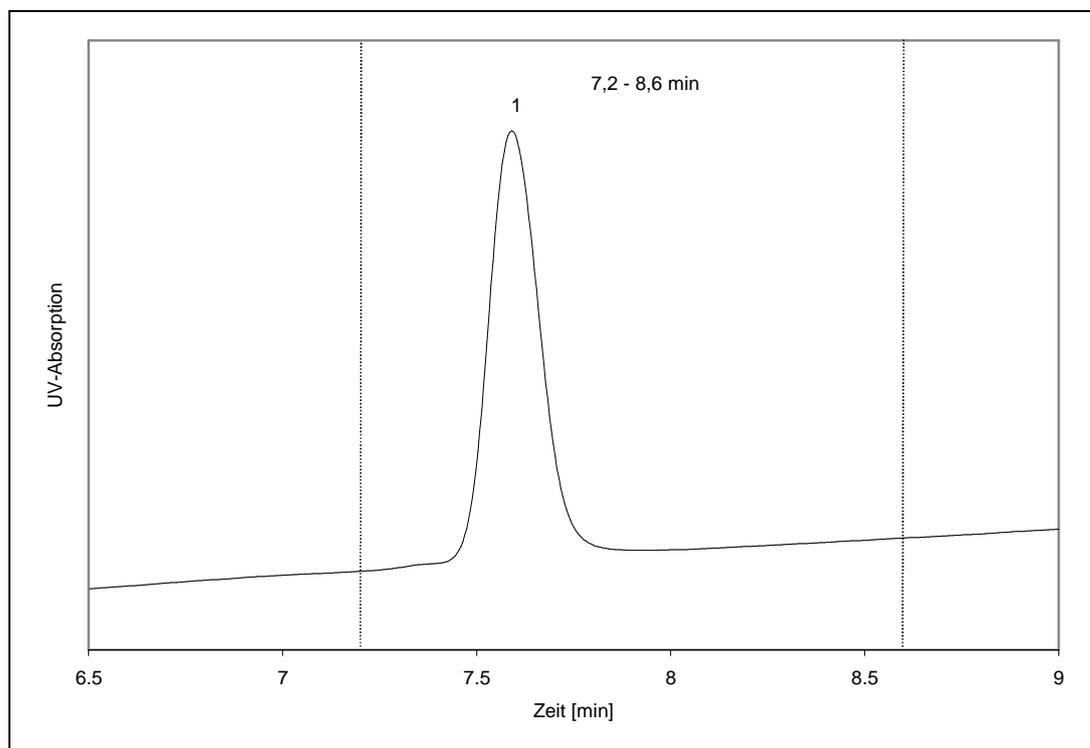


Abb. 49: HPLC/UV-Chromatogramm auf Dimethylaminopropyl-Phase bei 200 nm von DHEA (1) mit entsprechendem Sammelschema

Die gezeigte Fraktion beinhaltet in biologischen Proben ggf. neben dem Zielanalyten DHEA (1) das zeitgleich eluierende EpiA, wodurch auch von diesem

Steroid bei ausreichender Konzentration in wenigen Proben $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte bestimmt werden. Die bereits erwähnte höhere Robustheit des Systems ist hier auch durch die im Vergleich zu Abb. 46 (S. 91) verbesserte Peaksymmetrie bestätigt. Durch qualitative Analyse mittels GC/MS nach Kap. 4.3.9 der gezeigten als auch benachbarter Fraktionen können DHEA und ggf. EpiA beim Schneiden von Standards und biologischen Proben ausschließlich in der vorgesehenen Fraktion nachgewiesen werden. Die ausreichende Aufreinigung von DHEA bzw. EpiA durch diesen Schritt ist aus Abb. 39 (S. 82) ersichtlich.

Die Fraktionsgrenzen für 17α -Estradiol der Estrogene aus der FG-Fraktion sowie der Ausschnitt des HPLC/UV-Chromatogramms sind in Abb. 50 gezeigt.

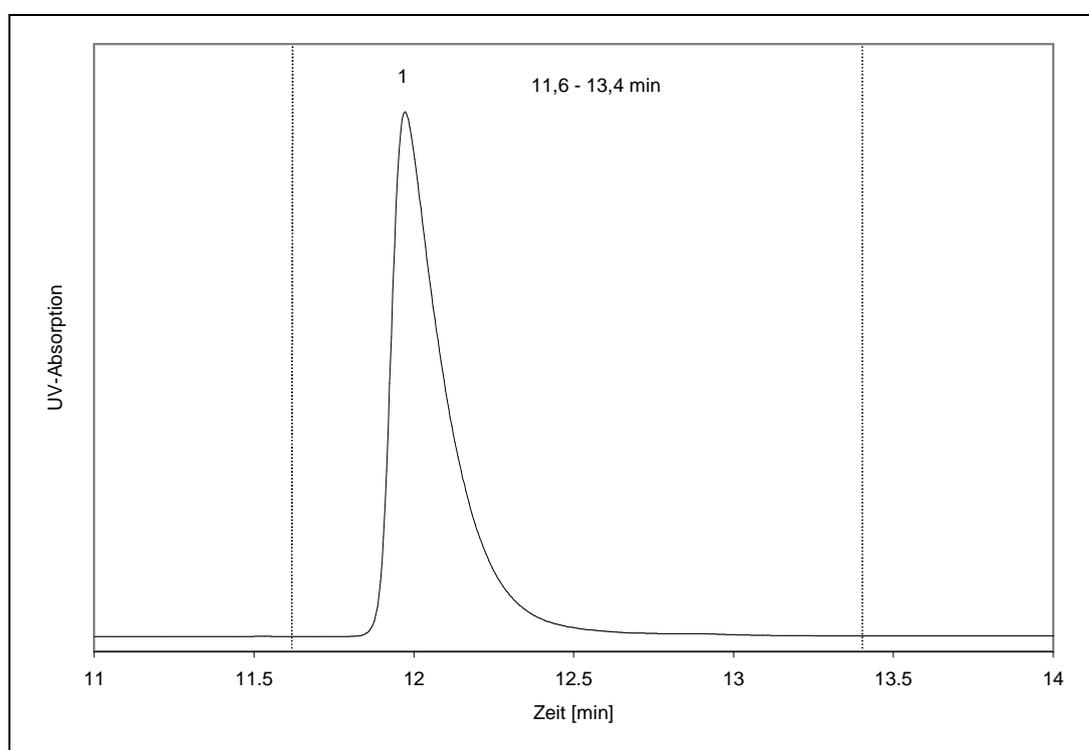


Abb. 50: HPLC/UV-Chromatogramm auf Dimethylaminopropyl-Phase bei 280 nm von 17α -Estradiol (1) mit entsprechendem Sammelschema

Das HPLC-Chromatogramm zeigt die UV-Absorption bei der für 17α -Estradiol (1) charakteristischen Wellenlänge von 280 nm einer Injektion von 5 μg . 17α -Estradiol ist von allen Zielanalyten die polarste Verbindung und eluiert unter NP-Konditionen am spätesten. Dieser Analyt ist sowohl bei Standardinjektionen als auch bei biologischen Proben ausschließlich in der vorgesehenen Fraktion mittels GC/MS nachweisbar. Die ausreichende Aufreinigung von 17α -Estradiol ist in Abb. 41 (S. 84) dargestellt.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass die Dimethylaminopropyl-Phase unter den gegebenen Bedingungen zur Aufreinigung der Zielanalyten mittels NP-HPLC

aus den urinären Extrakten geeignet ist. Es ist anzumerken, dass von den in Tabelle 12 (S. 70) genannten Zielanalyten Androstendiol und 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol zu dem aus Abb. 14 (S. 35) ersichtlichen Punkt der Aufarbeitung nach NP-HPLC noch unzureichend für die GC/C/IRMS aufgereinigt sind. DHEA, ETIO, 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol und 17α -Estradiol hingegen bedürfen keiner weiteren Aufreinigung. Für die Methode bedeutet dies, dass die Fraktion mit den Androgenen ETIO, EpiT, Androstendiol und 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol (enthalten in Fraktion 1 aus Abb. 48, S. 93) weitere Aufreinigung erfordert.

5.1.8 Acetylierung

Die theoretischen Vor- und Nachteile der Derivatisierung von Steroiden zu Acetaten oder TMS-Derivaten für die GC/C/IRMS sind in Kap. 3.5 besprochen. Fazit ist, dass nach Möglichkeit underivatisiert gemessen werden sollte. Bezüglich der Zielanalyten ist allerdings festzustellen, dass 17α -Estradiol underivatisiert auf dem GC kaum chromatographierbar ist und entsprechend derivatisiert werden muss.

Trimethylsilylierung bietet zwar exzellente chromatographische Eigenschaften für die GC, kommt aber neben den in Kap. 3.5 diskutierten theoretischen Erwägungen wegen verschiedener praktischer Gründe nicht zur Anwendung. So sind TMS-Derivate für die weitere Aufreinigung mittels RP-HPLC nicht geeignet, da diese Verbindungen unter den gegebenen wässrigen Bedingungen zumindest teilweise hydrolysieren. Des Weiteren sind viele GC/C-Kopplungen für diese Derivate nicht geeignet, da das bei der Verbrennung gebildete SiO_2 den Oxidationsreaktor irreversibel kontaminiert und dessen Eigenschaften deutlich verschlechtern kann (Meier-Augenstein 2004; Shinebarger *et al.* 2002). Laborerfahrungen haben zusätzlich gezeigt, dass sowohl das Ende der GC-Säule am Oxidationsreaktor als auch die Restriktionskapillare des *Backflush*-Systems vermutlich durch abgelagertes SiO_2 blockiert werden, was die Anfälligkeit und den Wartungsaufwand des GC/C/IRMS-Systems weiter erhöht.

Die für die GC/C/IRMS von Steroiden häufig angewendete Acetylierung (z.B. Becchi *et al.* 1994; Shackleton *et al.* 1997) hingegen führt zu akzeptablen Eigenschaften der Zielanalyten für die GC und zeigt die bezüglich der Trimethylsilylierung genannten Nachteile nicht. Zum einen werden die verschiedenen Bestandteile des GC/C/IRMS-Systems nicht durch die Derivatisierung kontaminiert und zum anderen sind die Acetate gegenüber der folgenden RP-HPLC stabil.

Entsprechend wurde innerhalb des ISOSTER-Projekts die Acetylierung gemäß Kap. 4.3.8 im Anschluss an die NP-HPLC favorisiert und angewendet.

In der praktischen Durchführung der Acetylierung erweist sich Acetanhydrid unter Umständen als kritisch. Diese Probleme wurden schon von Prévost *et al.* (2001) erkannt, weshalb Trimethylsilylierung angewendet wurde.

Das im Rahmen eines Interlaborvergleichs (ISOSTER-Projekt) verwendete Acetanhydrid zeigt im GC/MS-Chromatogramm vollständige Umsetzung der Zielanalyten zu den jeweiligen Acetaten. Die Verwendung dieses Reagenzes war allerdings aufgrund der zur Verfügung stehenden Menge auf den Interlaborvergleich beschränkt. Die Analyse der Derivatisierung mit verschiedenen kommerziellen Acetanhydridquellen (Tabelle 29, S. 180) per GC/MS nach Kap. 4.3.9 hingegen lässt zusätzlich zu den Steroid-acetaten die Steroid-acetessigester nachweisen.

Abb. 51 zeigt beispielhaft das Resultat der Acetylierung von DHEA mit Acetanhydrid von Merck (Darmstadt, Deutschland) anhand des GC/MS-Chromatogramms.

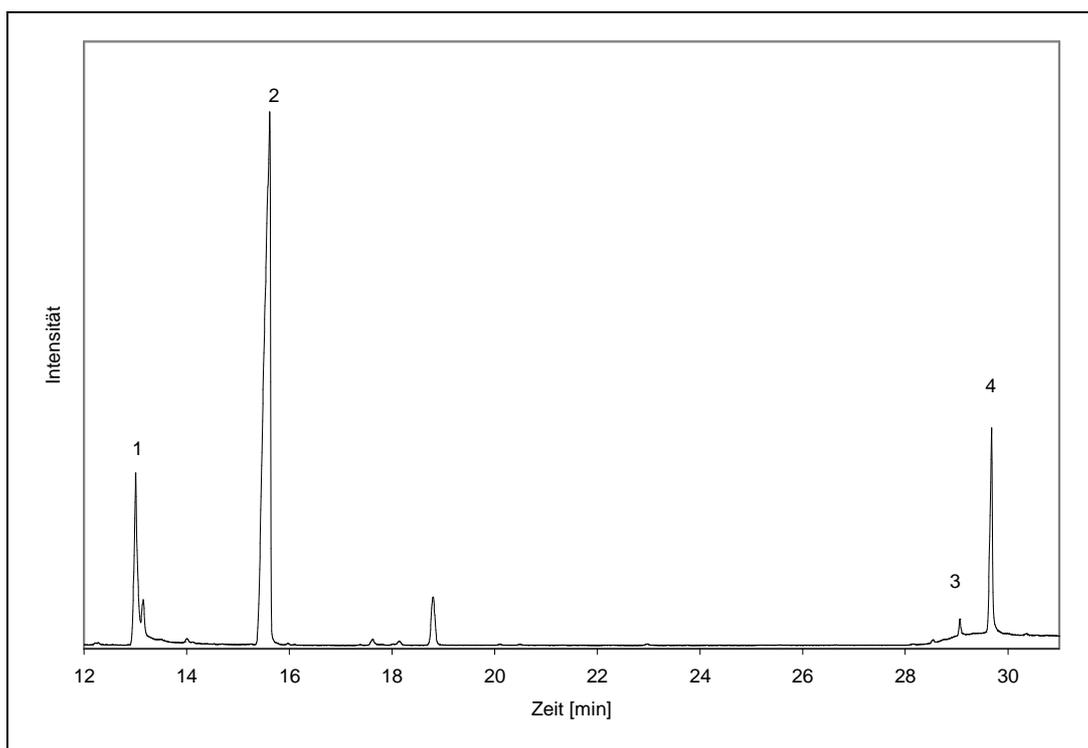


Abb. 51: GC/MS-Chromatogramm (Scan Modus, m/z 40-500) von DHEA nach Derivatisierung mit Acetanhydrid von Merck; die identifizierten Verbindungen sind DHEA (1), DHEA-acetat (2) und isomere DHEA-acetessigester (3 und 4)

Über Massenspektrum und Retentionszeit wird Verbindung 1 als freies DHEA identifiziert, Verbindung 2 ist DHEA-acetat und die Verbindungen 3 und 4 sind isomere Acetessigester des DHEA.

Für die Bildung der Nebenprodukte wird folgende Erklärung gegeben.

Acetanhydrid wird gemäß Abb. 52 aus Essigsäure und Keten hergestellt (u.a. Held *et al.* 2000; Vollhardt 1990; Weissermel und Arpe 1998).



Abb. 52: Acetanhydridherstellung

Keten ist ein äußerst reaktives Gas, welches mit OH-Gruppen zu Acetaten reagiert. Es neigt zur Dimerisierung zum Diketen (Miller *et al.* 2001), was in Abb. 53 dargestellt ist.

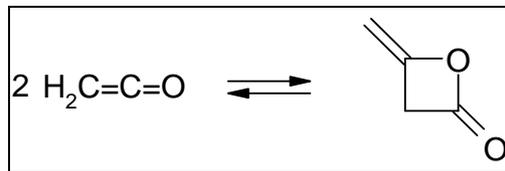


Abb. 53: Dimerisierung von Keten zum Diketen

Diketen ist ebenfalls sehr reaktiv und bildet mit primären und sekundären OH-Gruppen die entsprechenden Acetessigester (Miller *et al.* 2001), was in Abb. 54 gezeigt ist.

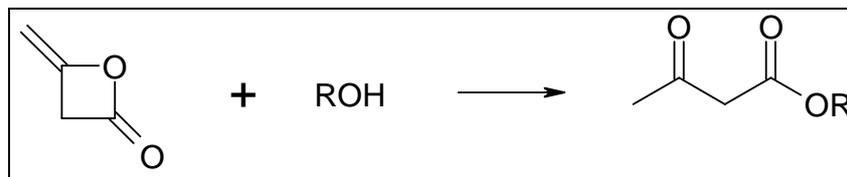


Abb. 54: Acetessigesterbildung aus Diketen und Alkoholen

Es wird angenommen, dass Reste an Diketen in den verschiedenen Acetanhydridquellen zu den Steroid-acetessigestern reagieren.

Anhand einer destillativen Aufreinigung des Acetanhydrids (Siedepunkt 140 °C) wird die Bildung der Nebenprodukte nur verringert, jedoch nicht vollständig beseitigt.

Durch den Zusatz von Wasser zum Acetanhydrid wird zunächst Essigsäure (Siedepunkt 118 °C) gebildet, welches mit Diketen zu dem in Abb. 56 gezeigten gemischten Anhydrid reagiert (Yamanaka *et al.* 1981).

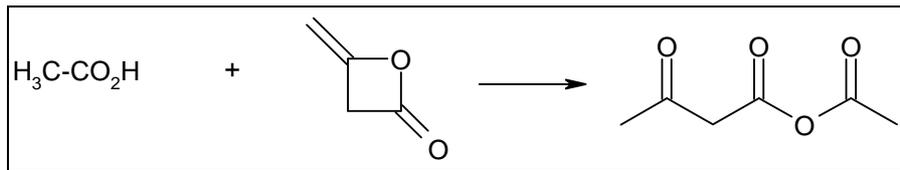


Abb. 55: Bildung eines gemischten Anhydrids aus Essigsäure und Diketen

Dieses Gemisch wird zur Entfernung des Überschusses an Essigsäure destilliert. Das so aufgereinigte Acetanhydrid führt zu vollständiger Derivatisierung, ohne dass die angesprochenen Nebenprodukte oder Edukte nachweisbar sind, so dass im Folgenden mit diesem modifizierten Reagenz derivatisiert wird.

Zur Verdeutlichung der Reaktivität des Diketens wird ein Aliquot des aufgereinigten Acetanhydrids mit 1‰ Diketen (v/v) gemäß Kap. 4.3.8.2 versetzt und zur Derivatisierung von DHEA und Testosteron verwendet.

Abb. 56 zeigt das mittels GC/MS nach Kap. 4.3.9 erhaltene Chromatogramm. Als Vergleich ist das Chromatogramm der Derivatisierung mit dem aufgereinigten Acetanhydrid ohne Zusatz von Diketen abgebildet und grau hinterlegt.

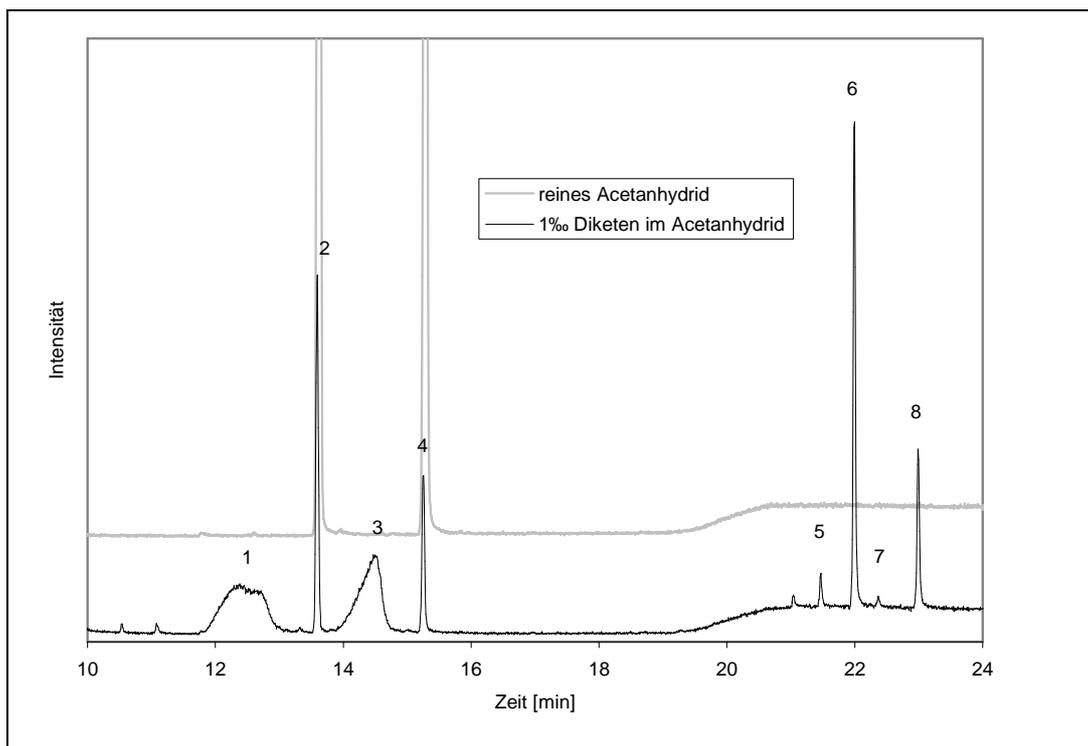


Abb. 56: GC/MS-Chromatogramme (Scan Modus, m/z 40-500) der Derivatisierung von DHEA und Testosteron mit aufgereinigtem oder mit 1‰ Diketen versetzten Acetanhydrid; die identifizierten Verbindungen sind DHEA (1), DHEA-acetat (2), Testosteron (3), Testosteron-acetat (4) und isomere Acetessigester von DHEA (5 und 6) bzw. Testosteron (7 und 8)

Im vorderen Bereich des Chromatogramms sind die Acetate von DHEA (2) und Testosteron (4) zu identifizieren sowie die freien Verbindungen (1 und 3). Die

Acetylierung mit dem aufgereinigten Acetanhydrid zeigt ausschließlich die Acetate mit etwa sechsfacher Intensität gegenüber der Derivatisierung des mit Diketen versetzten Reagenzes, so dass bezüglich der Intensität nur der relevante Ausschnitt dargestellt ist. Die für die freien Verbindungen atypische schlechte Chromatographie, die auch in Abb. 51 (S. 97) ansatzweise zu erkennen ist, lässt auf teilweise Zersetzung der Acetessigester im Einspritzblock schließen. Im hinteren Bereich sind die Reaktionsprodukte des Diketens mit DHEA (5 und 6) bzw. mit Testosteron (7 und 8) über die jeweiligen Massenspektren zu identifizieren. Der Vergleich des Verhältnisses der Intensitäten von Verbindung 6 zu Verbindung 2 aus Abb. 56 mit dem entsprechenden Verhältnis der Verbindung 4 zu Verbindung 2 aus Abb. 51 (S. 97) deutet darauf hin, dass die Verunreinigung der kommerziellen Acetanhydride mit Diketen geringer als 1‰ ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich die Verwendung kommerziell erwerbbarer Acetanhydride zur Acetylierung der Zielanalyten als kritisch erweist. Als Nebenprodukte sind stets die Acetessigester mit deutlichen Intensitäten nachweisbar, was auf Reste an Diketen aus der Herstellung schließen lässt. Die Derivatisierung des mit Wasser versetzten und anschließend destillativ aufgereinigten Acetanhydrids führt hingegen zu vollständiger Acetylierung. Entsprechend wird dieses Reagenz für die Derivatisierung der Extrakte aus dem Rinderurin im Anschluss an die Aufreinigung mittels NP-HPLC eingesetzt.

5.1.9 GC/MS-Analyse

Die Analyse per GC/MS im Anschluss an die Acetylierung ist aus verschiedenen Gründen zu diesem Zeitpunkt zweckmäßig.

Der dynamische Messbereich der *Faraday-Cups* des IRMS-Systems ist nur im Bereich von etwa einer Zehnerpotenz linear. Gelangt zu viel oder zu wenig CO₂ in die Ionenquelle ist das ermittelte ¹³C/¹²C-Verhältnis mit einem systematischen Fehler behaftet. Sofern keine anderweitigen Quantifizierungsdaten der Zielanalyten im Rinderurin vorliegen, ist hier eine Semiquantifizierung mit externen Standards durchzuführen. Dadurch lässt sich die Menge des Lösungsmittels und das Injektionsvolumen für die GC/C/IRMS hinreichend genau bestimmen. Dieser Schritt ist auch nach der abschließenden Aufreinigung mittels RP-HPLC durchführbar, erhöht allerdings den Arbeitsaufwand aufgrund der dann größeren Anzahl an Fraktionen.

Die GC/MS-Analyse dient neben der Beurteilung der Reinheit der Extrakte nach den verschiedenen Aufarbeitungsschritten (insbesondere während der Methodenentwicklung) der Überprüfung der Fraktionsgrenzen der HPLC. Ebenso sind, wie bereits erwähnt, die Retentionszeiten der beiden Androstandiole auf der NP-HPLC aufgrund mangelnder UV-Absorption erst mittels GC/MS-Analyse abschätzbar.

5.1.10 Zweite semipräparative HPLC auf RP₁₈-Phase

Wie aus Abb. 35 (S. 79) bereits ersichtlich ist, bedarf die Mischfraktion der Androgene der FG-Fraktion (vgl. Flussdiagramm der Methode in Abb. 14, S. 35) nach NP-HPLC und Derivatisierung weiterer Aufreinigung.

In Abb. 57 ist dies anhand der extrahierten Molekülionen von Androstendiol-diacetat ($M_w = 314$ g/Mol), 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat ($M_w = 316$ g/Mol) und dem intensivsten Ion der koeluierenden Matrixverbindung (m/z 207) verdeutlicht.

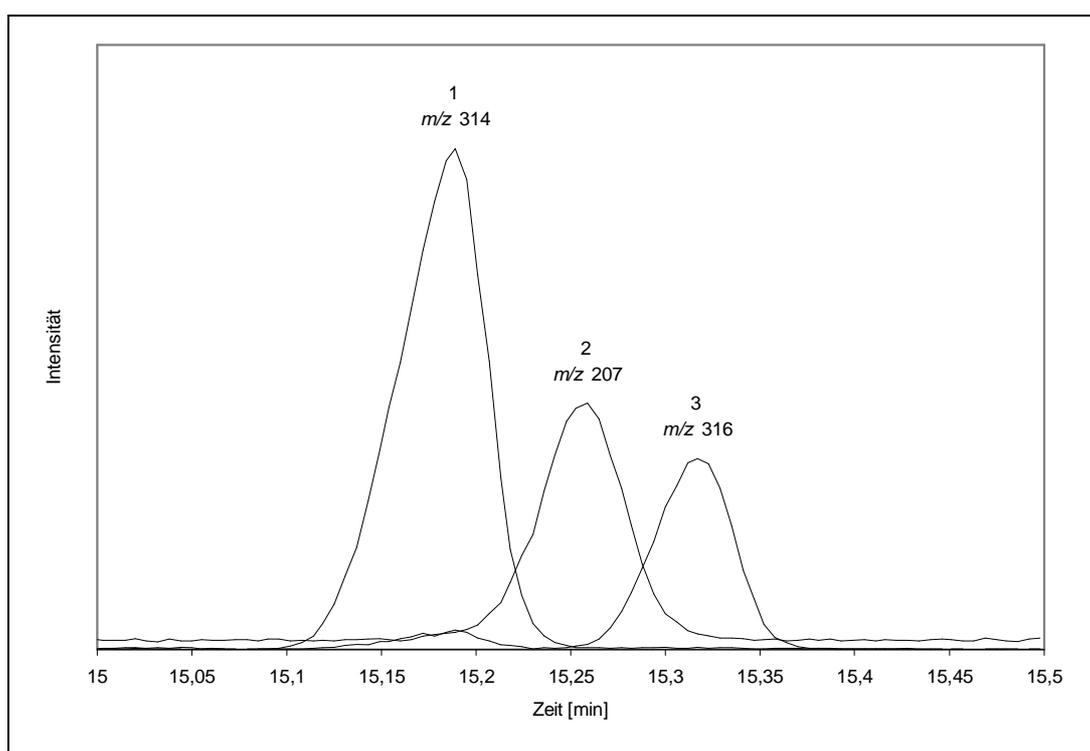


Abb. 57: Ausschnitt des GC/MS-Chromatogramms aus Abb. 35 (S. 79) der für Androstendiol-diacetat (1), 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat (3) und für die koeluierende Verbindung (2) charakteristischen Ionen

Die Acetate von Androstendiol (1) und 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol (2) weisen eine für die GC/C/IRMS störende und über Standardbibliotheken nicht identifizierbare koeluierende Matrixverbindung (2) auf, die mittels GC nicht ausreichend von den besagten Zielanalyten zu trennen ist. Da Steroid-acetate gegenüber Hydrolyse im

Wässrigen weitgehend stabil sind, wird diese Fraktion abschließend gemäß Kap. 4.3.10 mittels semipräparativer HPLC auf RP₁₈-Phase aufgereinigt.

Abb. 58 zeigt das entsprechende HPLC/UV-Chromatogramm der acetylierten Standards sowie das angewendete Sammelschema.

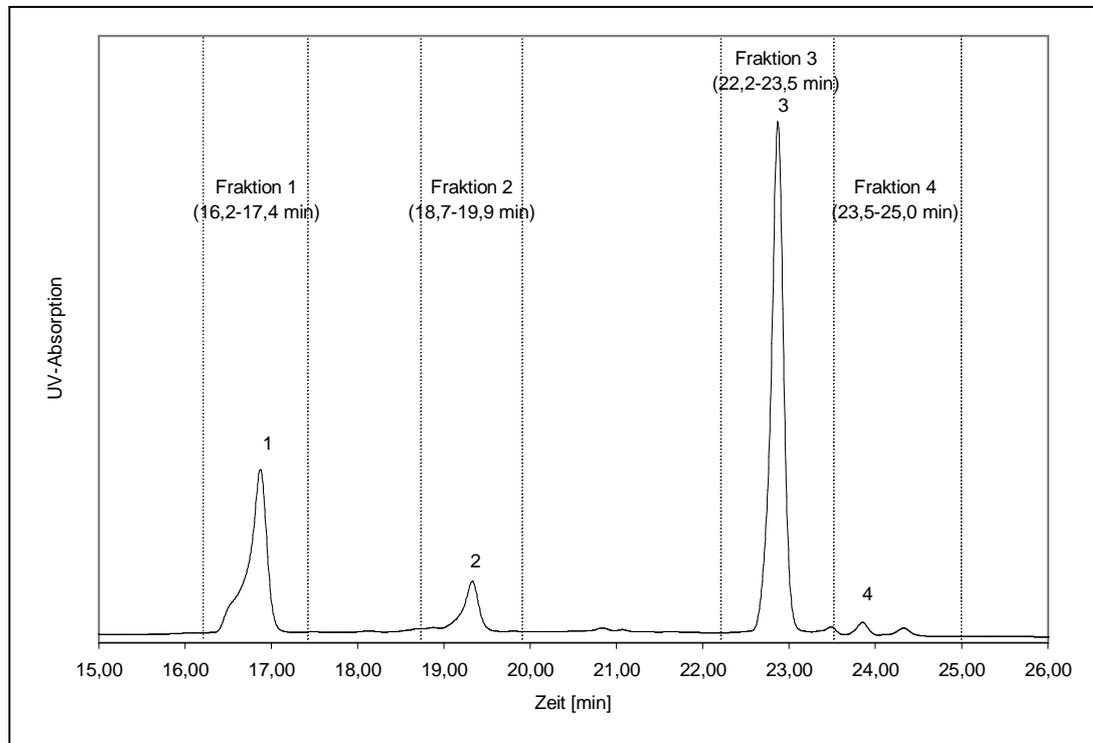


Abb. 58: HPLC/UV-Chromatogramm auf RP₁₈-Phase bei 200 nm von EpiT-acetat (1), ETIO-acetat (2), Androstendiol-diacetat (3) und 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol-diacetat (4) mit entsprechendem Sammelschema

Jeweils 5 μ g EpiT, ETIO, Androstendiol und 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol werden acetyliert, nach Überführen injiziert und bei einer unspezifischen Wellenlänge von 200 nm detektiert. Die GC/MS-Analyse von über verschiedene Sammelschemata aufgefangenen Fraktionen sowohl von Standards als auch von biologischen Proben führt zu den gezeigten robusten Schnittgrenzen für die Acetate von EpiT (1), ETIO (2), Androstendiol (3) und 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol (4). Die quantitative Analyse der fraktionierten Standards zeigt keine systematischen Verluste. Durch die eingeführten Acetatgruppen und die niedrige UV-Absorption des Lösungsmittels ist hier auch das gesättigte Androstendiol (4) detektierbar.

Der Aufreinigungserfolg dieses Aufarbeitungsschritts ist in Abb. 59 anhand der GC/MS-Chromatogramme der einzelnen Fraktionen wie in Kap. 5.1.6 am Beispiel von Probe P166 gezeigt.

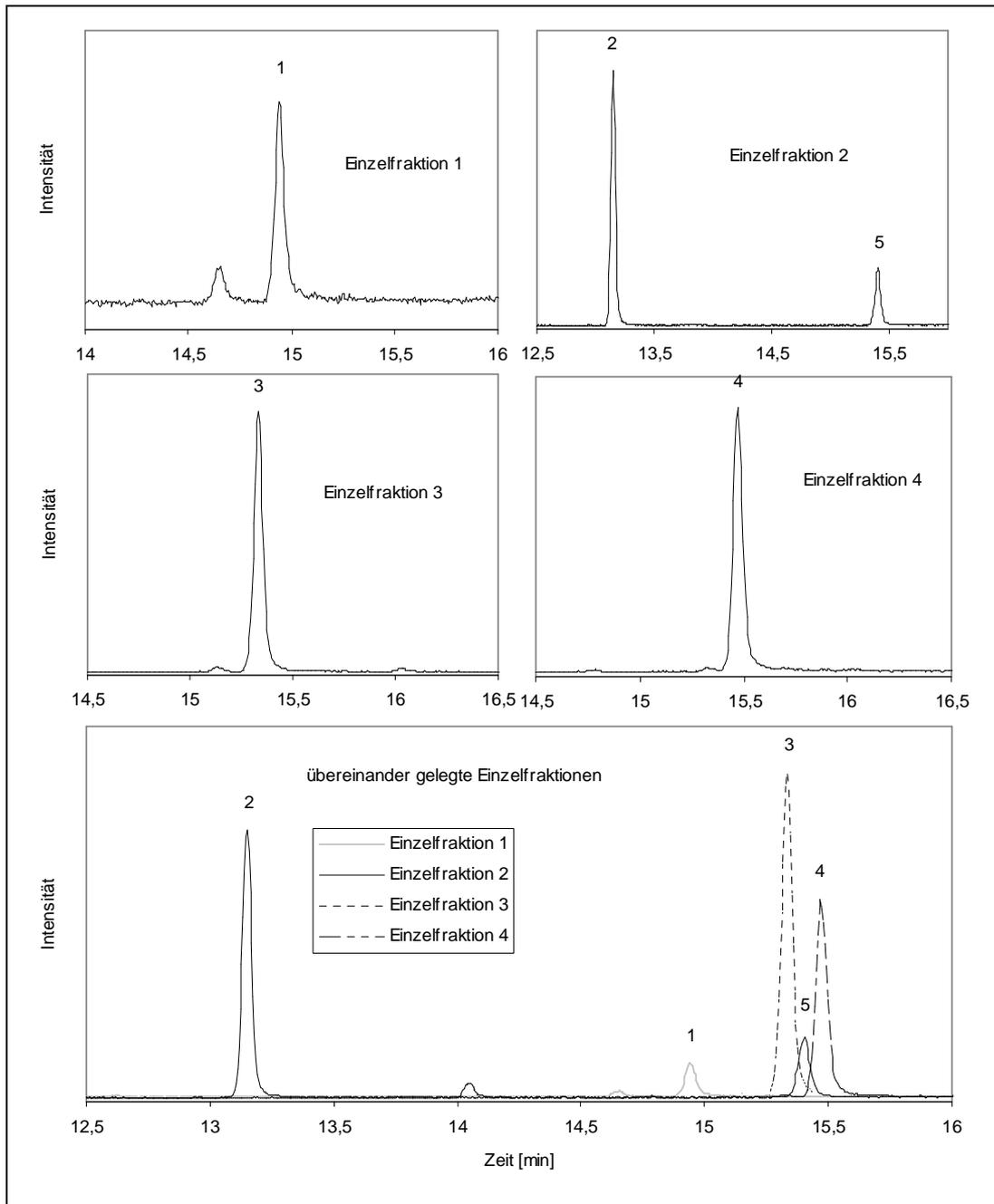


Abb. 59: GC/MS-Chromatogramme (*Scan* Modus, m/z 40-500) der gemäß Abb. 58 gesammelten Einzelfraktionen 1-4 der Probe P166 (oben) sowie die übereinander gelegten Chromatogramme der Einzelfraktionen (unten); die nummerierten Peaks sind die Acetate von EpiT (1), ETIO (2), Androstendiol (3), 5α -Androstan- 3β , 17α -diol (4) und die koeluiierende Matrixverbindung (5)

Oben und in der Mitte der Abbildung sind die relevanten Ausschnitte der GC/MS-Chromatogramme von Fraktion 1 mit EpiT-acetat (1), Fraktion 2 mit ETIO-acetat (2) sowie der störenden Matrixverbindung (5), Fraktion 3 mit Androstendiol-diacetat (3) und Fraktion (4) mit 5α -Androstan- 3β , 17α -diol-diacetat (4) einzeln dargestellt. Unten in der Abbildung sind diese Chromatogramme übereinander gelegt. Augenfällig ist die hohe Übereinstimmung dieser Darstellung mit dem GC/MS-Chromatogramm vor

der zweiten semipräparativen HPLC in Abb. 35 (S. 79). Die in Abb. 57 gezeigte Koelution (5) zwischen den Diolen befindet sich in Fraktion 2 und ist vollständig von diesen abgetrennt. Die Analyse der Massenspektren der einzelnen Peaks dieser Chromatogramme zeigt keine relevanten Koelutionen zu den Retentionszeiten der einzelnen Analyten. Entsprechend sind alle in Kap. 5.1.1 ausgewählten Zielanalyten für die GC/C/IRMS ausreichend aufgereinigt. Dies trifft für fast alle aufgearbeiteten Urinproben zu; in Einzelfällen hingegen sind störende Matrixkomponenten in den GC/C/IRMS-Chromatogrammen der verschiedenen Fraktionen zu erkennen, was für die Methode allerdings nicht weiter berücksichtigt wird. Die entsprechenden $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte sind dann nicht auszuwerten.

5.1.11 Optimierung der Anwendung des KAS für die GC/C/IRMS

Bei Verwendung der herkömmlichen GC/C-Kopplung (s. Abb. 9, S. 22) lassen sich vornehmlich das Lösungsmittel, aber auch nicht relevante Matrixkomponenten im sog. *Backflush*-Modus ausblenden, wodurch die Kapazität des Oxidationsreaktors geschont wird (vgl. Kap. 2.5). Bei Verwendung der modifizierten GC/C-Kopplung mit KAS (s. Abb. 10, S. 24) ist das *Backflush*-System hingegen nicht vorhanden. Während das Lösungsmittel (hier Aceton) im *Solvent-Vent*-Modus bei 40 °C komplett ausgeblendet wird, trifft dies auf die Matrixkomponenten nicht zu. Speziell die Fraktionen mit den niedriger konzentrierten Analyten wie EpiT weisen zum Teil beträchtliche Verhältnisse von Matrix zu Zielanalyt auf.

Abb. 60 zeigt beispielhaft das GC/C/IRMS-Chromatogramm der Injektion von 6 μL der in 10 μL Aceton aufgenommenen EpiT-acetat-Fraktion von Probe P6 unter Verwendung der modifizierten GC/C-Kopplung mit KAS. Das Lösungsmittel wird bei 40 °C im *Solvent-Vent*-Modus entfernt.

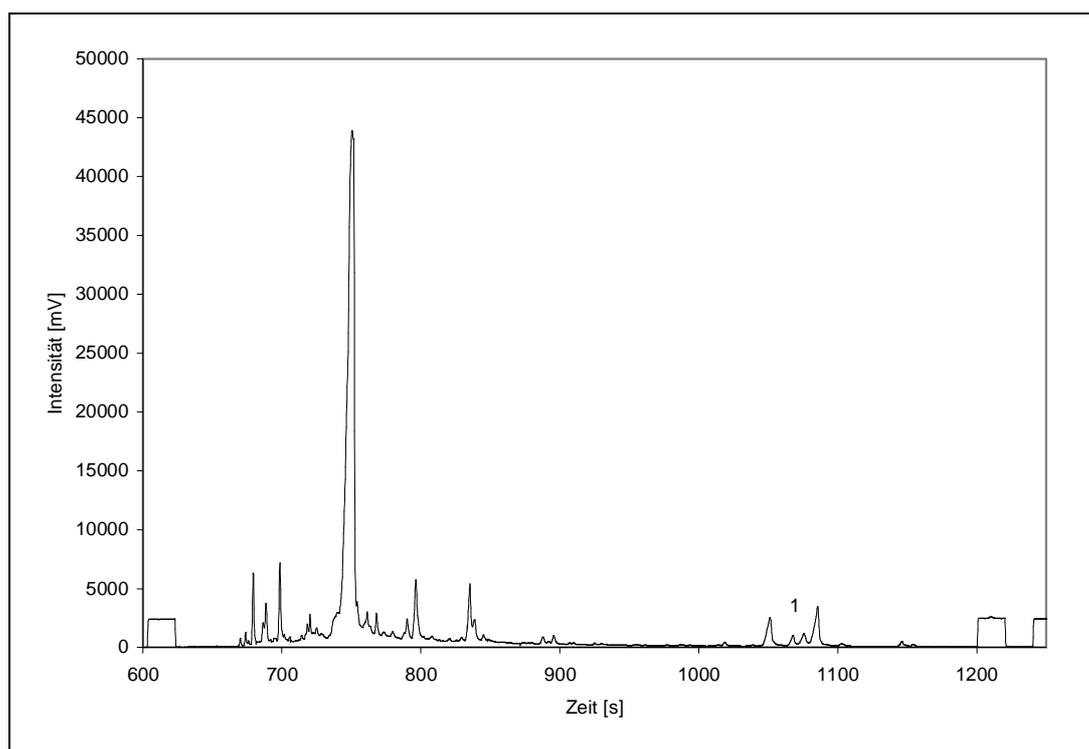


Abb. 60: GC/C/IRMS-Chromatogramm (m/z 44) der Injektion von 6 μL der in 10 μL Aceton aufgenommenen EpiT-acetat (1) enthaltenden Fraktion der Probe P6 unter Lösungsmittelausblendung mittels KAS bei 40 $^{\circ}\text{C}$

Die früh eluierenden Matrixkomponenten zwischen 660 s und 860 s weisen eine Gesamtintensität von 501 Vs auf, während EpiT-acetat (1) als eigentlicher Zielanalyt nur eine Intensität von 2,7 Vs zeigt. Das Verhältnis der Intensitäten von Matrix zu Zielanalyt beträgt entsprechend 186 zu 1. Auf diese Weise könnte nur eine geringe Anzahl an Proben analysiert werden, da der Verbrennungsreaktor frühzeitig reoxidiert werden müsste.

Die Programmierung des verwendeten KAS erlaubt neben der Ausblendung des Lösungsmittels weitere Halte-Temperaturen. Anhand der wiederholten Injektion acetylierter Standards werden für die verschiedenen Analyten keine Intensitätsverluste bis zu einer Temperatur von etwa 95 $^{\circ}\text{C}$ beobachtet. Um auch in biologischen Proben möglicherweise matrix-induzierte Verluste an Zielanalyten zu vermeiden, wird für die weiteren Analysen eine zweite Halte-Temperatur des KAS gemäß Tabelle 34 (S. 182) eingesetzt, die zur Sicherheit mit 85 $^{\circ}\text{C}$ 10 $^{\circ}\text{C}$ niedriger ist. Isotopeneffekte durch partiellen Verlust an Analyten durch zu hohe Temperaturen wurden nicht beobachtet (vgl. auch Flenker *et al.* 2007).

Zur Veranschaulichung dieser Maßnahme zur Reduzierung von früh eluierenden Matrixkomponenten wird der abermals getrocknete Rückstand aus dem Probengefäß

aus Abb. 60 erneut in 10 μL Aceton aufgenommen. Es werden 7 μL injiziert. Abb. 61 zeigt die Verbesserung anhand des entsprechenden GC/C/IRMS-Chromatogramms.

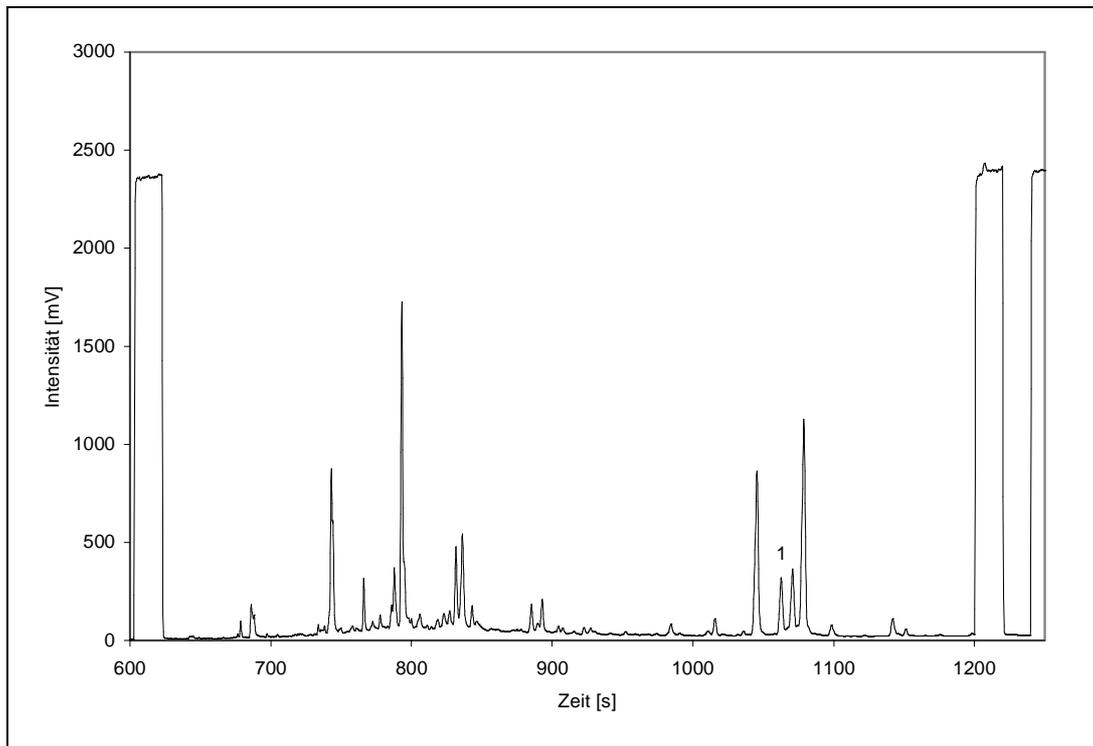


Abb. 61: GC/C/IRMS-Chromatogramm (m/z 44) der Injektion von 7 μL des in 10 μL Aceton gelösten Rückstands der in Abb. 60 beschriebenen EpiT-acetat (1) enthaltenden Fraktion unter Verwendung einer zweiten Haltetemperatur des KAS bei 85 $^{\circ}\text{C}$

Die niedrigere Intensität des Zielanalyten (1) begründet sich dadurch, dass der Großteil der Probe bereits bei der ersten Analyse injiziert wurde. Das Verhältnis der Intensitäten von Matrix zu Zielanalyt beträgt aufgrund der zweiten Haltetemperatur des KAS bei 85 $^{\circ}\text{C}$ nur noch 22 zu 1 statt vormals 186 zu 1.

Auf diese Weise lassen sich mit der modifizierten GC/C-Kopplung unter Verwendung eines KAS (s. Abb. 10, S. 24) eine ähnlich Anzahl an Proben analysieren wie mit dem herkömmlichen *Backflush*-System (s. Abb. 9, S. 22), bevor der Reaktor reoxidiert werden muss.

5.2 Validierung der Methode zur Herkunftsbestimmung der ausgewählten Steroide im Rinderurin mittels GC/C/IRMS

Gemäß den Richtlinien zur Validierung analytischer Methoden der *International Conference on Harmonisation* soll die Validierung zeigen, dass die Methode für den beabsichtigten Zweck geeignet ist (ICH 2005). Da es sich bei dieser Methode nicht um ein in dieser Richtlinie diskutiertes klassisches quantitatives oder qualitatives Nachweisverfahren handelt, werden zum Teil andere Kriterien validiert.

5.2.1 Spezifität

Zur Substanzidentifizierung steht bei GC/C/IRMS-Analysen nur die Retentionszeit der Analyten zur Verfügung. Koelutionen stellen hier das eigentliche Problem dar. Der resultierende $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert wird in Abhängigkeit der Intensität und des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses der koeluiierenden Verbindung beeinflusst und ist dann nicht mehr für den Zielanalyten spezifisch. Die Spezifität der Messungen wird im Wesentlichen, wie in Kap. 5.1 gezeigt, durch die Probenaufarbeitung gewährleistet. Im Zweifelsfall wird die Identität der Zielverbindungen mittels GC/MS-Analyse untersucht.

5.2.2 Präzision der Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von acetylierten Steroid-Standards

Die Präzision gibt den Grad der Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert an und ist durch zufällige Fehler bestimmt (Kromidas 1999). Um konstante Geräteparameter und somit valide Messungen sicherzustellen, werden in jeder Sequenz regelmäßig acetylierte Standards in einer Menge von 100 ng je Zielanalyt in das GC/C/IRMS-System injiziert. Sie werden zeitgleich mit den biologischen Proben acetyliert. Weicht das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis eines Standards deutlich von seinem Mittelwert ab, ist dies ein Hinweis auf nicht konstante Geräteparameter, worauf die Ermittlung der Ursache und die Behebung der Fehlerquelle folgt.

Tabelle 14 zeigt die ermittelte Präzision für die Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der acetylierten Standards.

Tabelle 14: Präzision der Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte acetylierter Steroid-Standards über einen Zeitraum von zwölf Monaten

acetylierter Standard	mittlerer $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert (‰) \pm Standardabweichung	N
DHEA	-34,9 \pm 0,6	73
ETIO	-35,1 \pm 0,5	87
EpiT	-32,7 \pm 0,9	86

acetylierter Standard	mittlerer $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert (‰) \pm Standardabweichung	N
EpiA	$-35,8 \pm 0,5$	66
Androstendiol	$-37,3 \pm 0,5$	75
5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol	$-35,5 \pm 0,3$	83
5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol	$-37,5 \pm 0,4$	72
17 α -Estradiol	$-33,6 \pm 1,1$	45

Die Standardabweichungen als Maß für die Präzision schwanken zwischen 0,3‰ für 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol-diacetat und 1,1‰ für 17 α -Estradiol-diacetat. Ursächlich für diese recht großen Unterschiede in der Präzision kommt eine Schwankung der Geräteparameter von Tag zu Tag nicht in Frage, da alle Messungen im selben Zeitraum von etwa zwölf Monaten stattfanden. Die Präzision der Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werts ist abhängig vom jeweiligen Analyten.

Die regelmäßige Analyse der acetylierten Standards ist ein geeigneter Indikator für die Überprüfung der Oxidationskapazität des Verbrennungsreaktors. Weichen die Messergebnisse der Standards systematisch in Richtung isotopisch leichter $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse ab, muss reoxidiert werden und die entsprechenden Werte werden nicht berücksichtigt. Es ist zu erwähnen, dass dieser Effekt kein langsamer Prozess ist, sondern innerhalb von wenigen Messungen auftritt. Der Zeitpunkt, an dem die Oxidationskapazität nicht mehr ausreicht, ist für jeden Analyten unterschiedlich. Die Erfahrung zeigt, dass 17 α -Estradiol-diacetat (schlechteste Präzision) am frühesten betroffen ist, gefolgt von EpiT-acetat (zweitschlechteste Präzision). Während die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der anderen Analyten weiterhin um den Mittelwert schwanken, sind sie für 17 α -Estradiol-diacetat bereits deutlich (ca. 3‰) zu leicht, was als Kriterium für die Reoxidation des Reaktors angewendet wird.

5.2.3 Präzision der Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse der acetylierten Zielanalyten in Rinderurinproben

Neun verschiedene Rinderurinproben werden wiederholt an unterschiedlichen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der acetylierten Zielanalyten der biologischen Proben sind in Tabelle 21 (S. 173) gezeigt. Die Identität der Proben P7, P48 und P166 war vor der Analyse bekannt. Die weiteren sechs Urine wurden im Rahmen eines Interlaborvergleichs analysiert. Probe P228 ist ein Mischurin mehrerer Tiere und dient als Qualitätskontrolle, während die anderen fünf Urine codiert waren. Deren Identität wurde nach Analyse mitgeteilt. Die Proben P46/P47, P61/P62, P213/P214, P220/P221 und P222/P223 sind jeweils identisch. Der Datensatz der

verschiedenen Analyten ist nicht für jede Probe vollständig. Speziell 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol wurde erst nach dem Interlaborvergleich in die Prozedur integriert, so dass von diesem Analyten nur von zwei wiederholten Aufarbeitungen Daten vorliegen. Andere Analyten wie 17α -Estradiol sind für eine Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses zum Teil zu gering konzentriert.

In Abb. 62 sind die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der acetylierten Zielanalyten der wiederholt aufgearbeiteten und analysierten Rinderurinproben graphisch dargestellt.

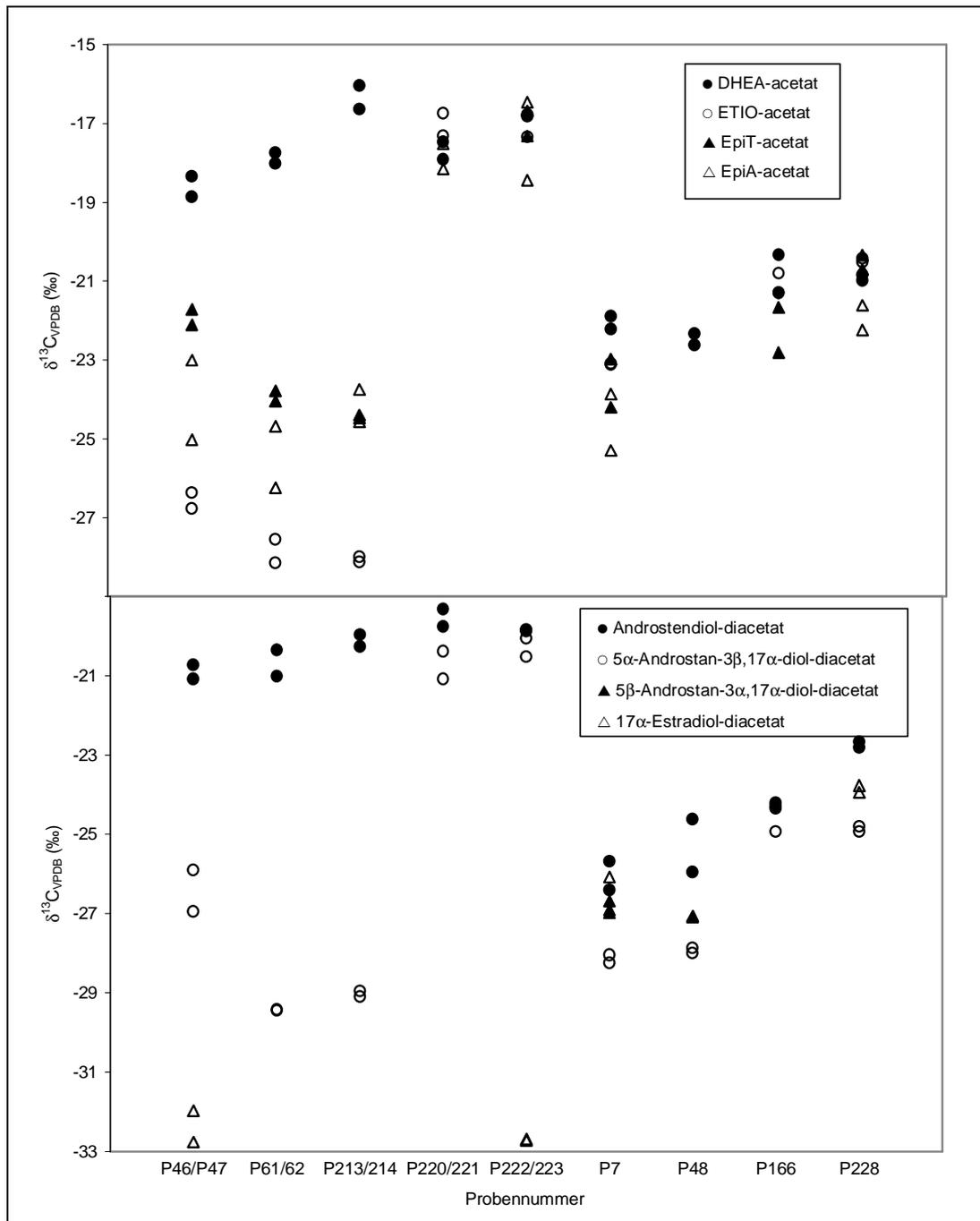


Abb. 62: Darstellung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der mono-acetylierten Zielanalyten (oben) und der bis-acetylierten Zielanalyten (unten) der wiederholt aufgearbeiteten und analysierten Rinderurinproben

Der Übersichtlichkeit halber sind die mono-acetylierten Zielanalyten (oben) von den bis-acetylierten Zielanalyten (unten) getrennt dargestellt. Die Methode zeichnet sich durch eine gute Präzision aus. Lediglich EpiA-acetat zeigt größere Abweichungen zwischen den wiederholten Bestimmungen des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses. Neben der guten Präzision ist anhand der teilweise sehr großen Unterschiede der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte zwischen den verschiedenen Metaboliten und den jeweiligen ERCs deutlich zu erkennen, dass die Probenpaare P46/47, P61/62 und P213/214 von testosteronbehandelten Tieren stammen. Entsprechend ist anhand des Vergleichs der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 17α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat zu erkennen, dass die Probenpaare P46/47 und P222/223 von estradiolbehandelten Tieren stammen.

Die Präzision anhand von Doppelbestimmungen wird nach Gleichung 9 berechnet (vgl. Analytical Methods Committee 2002).

Gleichung 9

$$\sigma_P = \frac{\sigma_D}{\sqrt{2}}$$

σ_P ist die Präzision für die Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der verschiedenen acetylierten Zielanalyten und σ_D die Standardabweichung der Differenzen der jeweiligen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse zwischen erster und zweiter Analyse. Tabelle 15 zeigt die entsprechend ermittelten Werte.

Tabelle 15: Präzision der Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der acetylierten Zielanalyten aus biologischen Proben

acetylierter Zielanalyt	Präzision (‰)	N
DHEA	0,4	9
ETIO	0,3	8
EpiT	0,5	7
EpiA	1,0	7
Androstendiol	0,4	9
5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol	0,4	9
5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol	0,2	2
17α -Estradiol	0,5	4

Die Präzision der Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse in biologischen Proben ist für alle Zielanalyten bis auf EpiA-acetat $\leq 0,5\%$. Diejenige von $0,2\%$ für 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat ist wahrscheinlich zufällig so niedrig, da aus den

oben genannten Gründen lediglich von zwei Proben wiederholte Ergebnisse für diesen Zielanalyten vorliegen. Der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert von EpiA-acetat ist hingegen nicht sehr präzise zu ermitteln ($\pm 1,0\%$). Dies ist auf die im Vergleich zum DHEA-acetat derselben Fraktion nur geringe Konzentration dieses Analyten zurückzuführen (vgl. Abb. 38, S. 81, und Abb. 39, S. 82).

Im Vergleich zur Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte acetylierter Standards ist die Präzision in biologischen Proben offenbar weitgehend unabhängig vom jeweiligen Analyten. Speziell 17α -Estradiol-diacetat zeigt mit $0,5\%$ eine vergleichbare Präzision wie die anderen Analyten, während die Präzision der Bestimmung des acetylierten Standards im Vergleich zu den anderen Analyten deutlich schlechter ist ($1,1\%$, vgl. Tabelle 14, S. 107). Offensichtlich ist die Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der acetylierten Zielanalyten in biologischen Proben aufgrund positiver Matrixeffekte robuster als die acetylierter Standards.

5.2.4 Referenzbereiche für die $\Delta\delta$ -Werte zwischen den Metaboliten und den endogenen Referenzverbindungen

Die Bestimmung der exogenen oder endogenen Herkunft der ausgewählten Zielanalyten beruht auf dem Vergleich der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse der Testosteron- bzw. Estradiol-Metaboliten mit denen der ERCs. Wichtigstes Kriterium zur Entscheidung, ob Testosteron oder Estradiol verabreicht wurde, ist das Erstellen von natürlichen Referenzbereichen z.B. nach Maßgabe der *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (Solberg und Grasbeck 1989). Auf Grundlage der Analyse der Zielanalyten aus den Blankurinen unterschiedlicher Individuen als Referenzpopulation werden Referenzbereiche für die $\Delta\delta$ -Werte zwischen den verschiedenen Metaboliten und den jeweiligen ERCs kalkuliert. Da teilweise von denselben Tieren mehrere Blankurine vorliegen, müssen die entsprechenden Daten aus Tabelle 21 (S. 173) ausgewählt werden, damit von demselben Tier nicht mehrfache Angaben in die Verteilung eingehen. Erstes Auswahlkriterium ist die Vollständigkeit des Datensatzes der jeweiligen Probe. Bei gleicher Vollständigkeit wird die niedrigere Probennummer gewählt. Bei Unvollständigkeit des Datensatzes werden einzelne Datenpaare ggf. aus anderen Blankurinen desselben Tiers ergänzt.

Liegt ein $\Delta\delta$ -Wert außerhalb des anhand der Daten der Referenzpopulation ermittelten Bereichs, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert des Metaboliten nicht endogen ist und somit eine

Beeinflussung der Isotopenverhältnisse durch Applikation von Steroiden vorliegt. Da das Konzept der Bildung von Referenzbereichen auf empirischen Daten beruht, ist sowohl die biologische als auch die analytische Varianz bereits enthalten, wodurch sich eine weitergehende Fehlerbetrachtung der Einzelwerte erübrigt.

Mit der entwickelten Methode werden $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte für mono- oder bis-acetylierte Steroide ermittelt. Eine Korrektur dieser Werte für die bei der Acetylierung neu in das Molekül eingeführten Kohlenstoffatome wird umgangen, indem zum einen die mono-acetylierten Testosteron-Metaboliten ETIO-acetat, EpiT-acetat und EpiA-acetat mit DHEA-acetat als ERC verglichen werden. Zum anderen werden die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse der bis-acetylierten Testosteron- bzw. 17β -Estradiol-Metaboliten 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat, 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat und 17α -Estradiol-diacetat mit Androstendiol-diacetat als ERC verglichen.

Bei dem Vergleich von 17α -Estradiol-diacetat mit Androstendiol-diacetat ist zu beachten, dass das Estrogen im Vergleich zum Androgen ein Kohlenstoffatom weniger aufweist. Infolgedessen sind die $\Delta\delta$ -Werte der beiden Verbindungen sowohl vom $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis des eingesetzten Acetanhydrids als auch von der Lage der Daten auf der VPDB-Skala nicht komplett unabhängig. Zum einen wird in dieser Arbeit allerdings Acetanhydrid zwei verschiedener Quellen verwendet, die sehr ähnliche $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte aufweisen (etwa -55‰ für die neu eingeführten Kohlenstoffatome). Der erstgenannte Einfluss des Acetanhydrids ist somit für alle Wertepaare konstant und wird nicht weiter berücksichtigt. Zum anderen sind im Extremfall endogene $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von minimal -30‰ bei Grasernährung und maximal -10‰ bei Maisernährung zu erwarten. Die $\Delta\delta$ -Werte zwischen 17α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat würden sich gemäß Gleichung 6 (S. 18) und Gleichung 8 (S. 28) bei gleicher Ausgangsdifferenz für die freien Verbindungen durch die unterschiedliche Lage auf der VPDB-Skala maximal um $0,16\text{‰}$ unterscheiden. Diese Einflüsse sind im Vergleich zur Präzision der Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse mittels GC/C/IRMS vernachlässigbar gering, so dass die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 17α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat wie erwähnt ohne Korrektur verglichen werden.

Bei keiner der im Folgenden vorgestellten Verteilungen bestehen nach einem Shapiro-Wilk-Test nennenswerte Einwände gegen die Normalverteilungsannahme, so dass die Referenzbereiche nach Solberg und Grasbeck (1989) parametrisch bestimmt werden. Die Referenzbereiche werden zunächst aus dem arithmetischen

Mittel der $\Delta\delta$ -Werte und der Standardabweichung der jeweiligen Analyten gebildet. Das 99%-Referenzintervall der jeweiligen Stichprobe berechnet sich beispielsweise aus dem Mittelwert \pm der 2,58-fachen Standardabweichung, was dem 99%-Quantil der Standardnormalverteilung entspricht. Zur Bildung des Referenzbereichs wird zusätzlich zu diesem Referenzintervall ein Vertrauensintervall addiert, welches der Größe der jeweiligen Stichprobe Rechnung trägt. Das 90%-Vertrauensintervall berechnet sich aus dem 1,65-fachen des Standardfehlers.

5.2.4.1 *Etiocholanolon-acetat und DHEA-acetat*

Zur Ermittlung des Referenzbereichs werden die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von ETIO-acetat und DHEA-acetat von Blankurinen 35 verschiedener Tiere analysiert. Abb. 63 stellt den Referenzbereich für die entsprechenden $\Delta\delta$ -Werte dar.

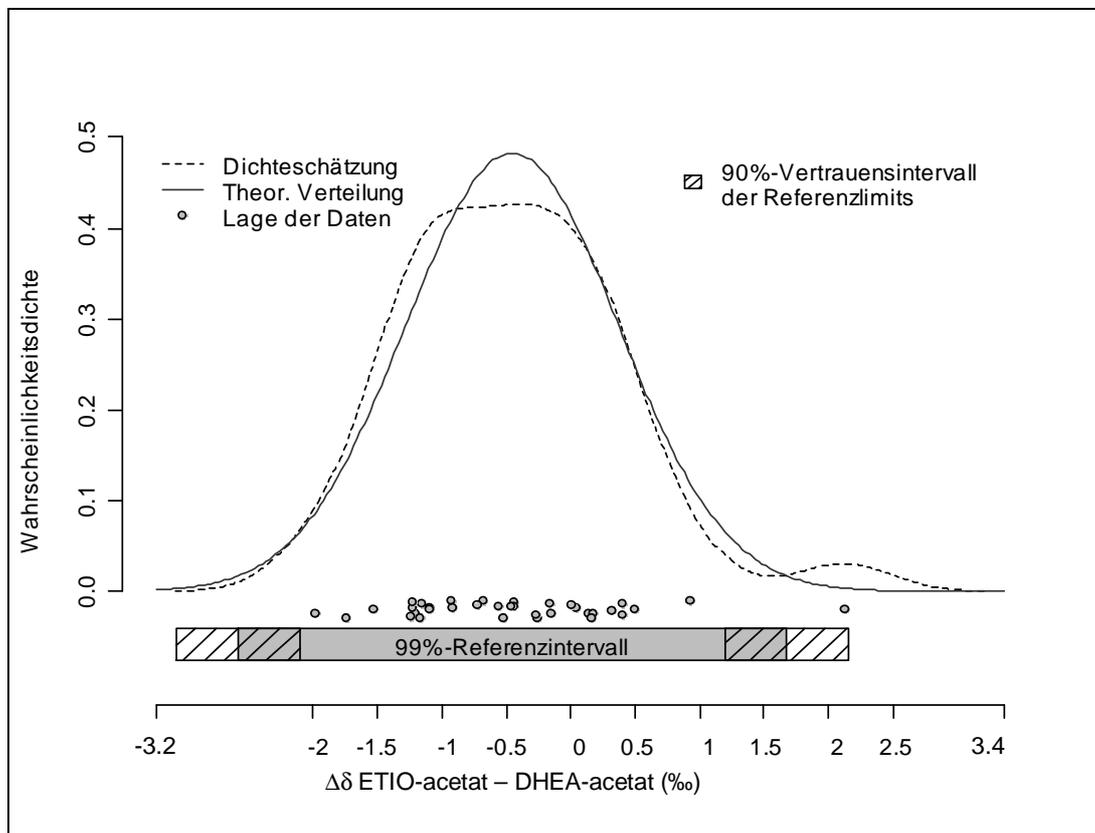


Abb. 63: Darstellung des Referenzbereichs für die Differenz der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von ETIO-acetat und DHEA-acetat ($N = 35$)

Im Mittel ist der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert von ETIO-acetat $0,5\text{‰}$ leichter als der von DHEA-acetat. Aus der Standardabweichung von $0,8\text{‰}$ ergibt sich ein 99%-Referenzintervall von $-2,6\text{‰}$ bis $1,7\text{‰}$. Zuzüglich des 90%-Vertrauensintervalls von $0,5\text{‰}$ ergibt sich der Referenzbereich für die gezeigten Analyten von $-3,1\text{‰}$ bis $2,2\text{‰}$. Die Lage der Daten entspricht weitgehend der Standardnormalverteilung. Der Wert von $2,1\text{‰}$

(Probe P160) am Rande des Referenzbereichs ist nicht als Ausreißer eingestuft und aus der Verteilung entfernt worden, da die entsprechenden Chromatogramme keinen Hinweis auf analytische Fehler geben. Für die Bewertung dieses Datenpaars ist zudem zu berücksichtigen, dass ETIO-acetat als Metabolit des Testosterons isotopisch schwerer als DHEA-acetat ist. Für den Befund, dass Testosteron appliziert wurde, wird hingegen erwartet, dass ETIO-acetat einen niedrigeren $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert als DHEA-acetat aufweist. Alle anderen Wertepaare liegen deutlich innerhalb des Referenzbereichs.

5.2.4.2 Epitestosteron-acetat und DHEA-acetat

Der Referenzbereich ist anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von EpiT-acetat und DHEA-acetat von Blankurinen 31 verschiedener Tiere ermittelt. In Abb. 64 ist er für die entsprechenden $\Delta\delta$ -Werte gezeigt.

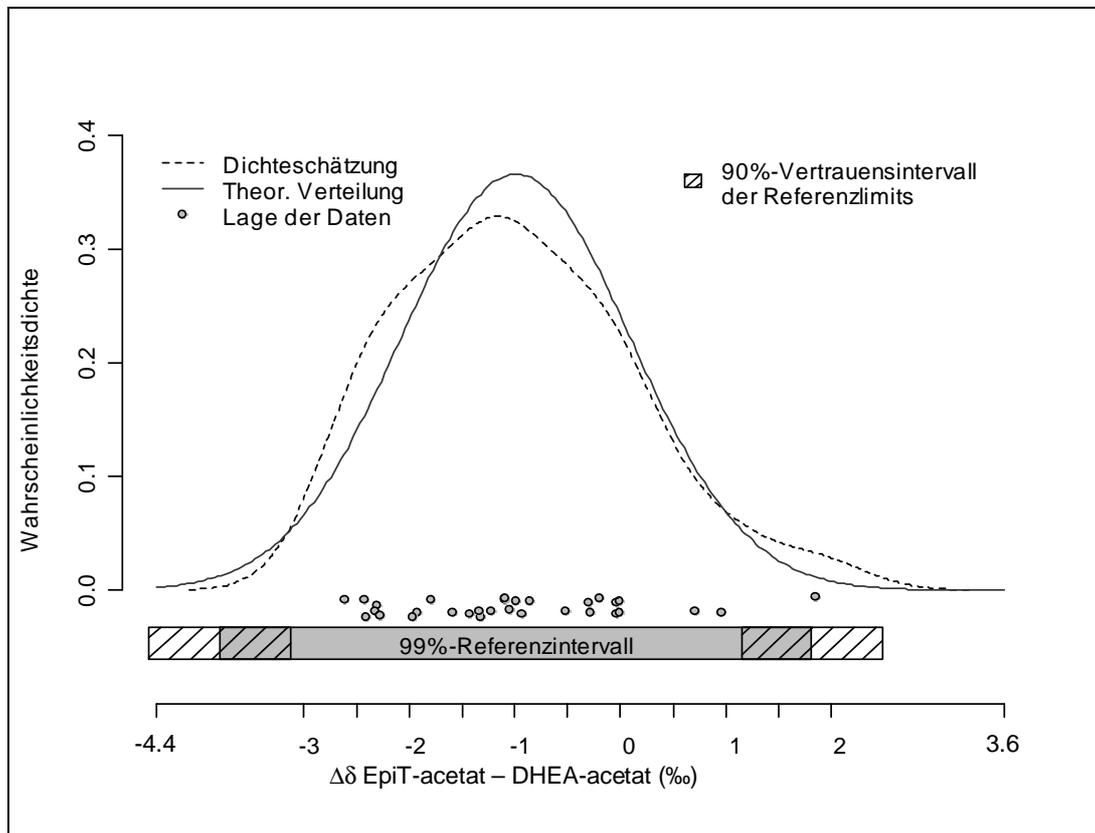


Abb. 64: Darstellung des Referenzbereichs für die Differenz der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von EpiT-acetat und DHEA-acetat ($N = 31$)

Im Durchschnitt ist EpiT-acetat 1,0‰ leichter als DHEA-acetat. Anhand der Standardabweichung von 1,1‰ ergibt sich ein 99%-Referenzintervall von -3,8‰ bis 1,8‰. Unter Hinzurechnung des 90%-Vertrauensintervalls von 0,7‰ ergibt sich der Referenzbereich von -4,5‰ bis 2,5‰. Die Datenlage entspricht weitgehend der

Standardnormalverteilung. Der Wert bei 1,9‰ (Probe 4) am Rande des 99% Referenzintervalls ist nicht als Ausreißer eingestuft und aus der Verteilung entfernt worden, da die entsprechenden Chromatogramme keinen Hinweis auf einen analytischen Fehler geben. Alle anderen Datenpunkte liegen deutlich innerhalb des Referenzbereichs.

5.2.4.3 Epiandrosteron-acetat und DHEA-acetat

Aufgrund der zumeist sehr niedrigen Konzentration von EpiA können nur aus Blankurinen von zehn verschiedenen Tieren Wertepaare zur Berechnung des in Abb. 65 dargestellten Referenzbereichs der $\Delta\delta$ -Werte zwischen EpiA-acetat und DHEA-acetat ermittelt werden.

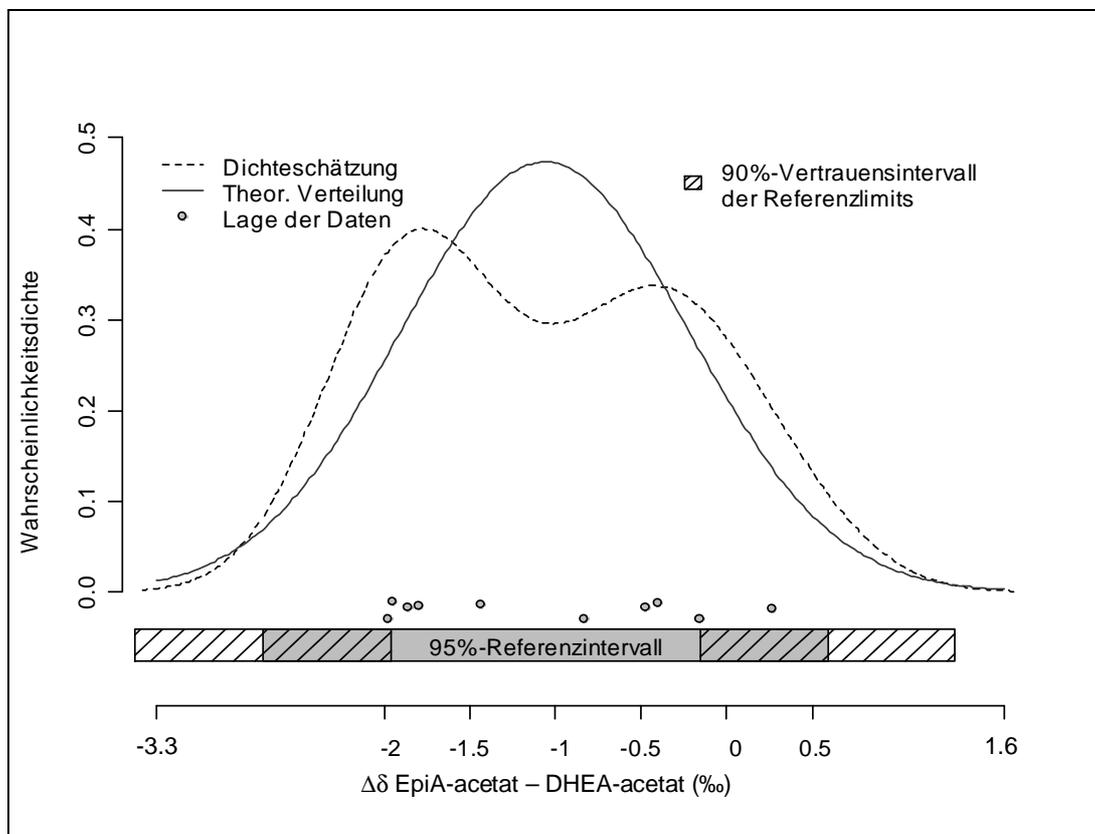


Abb. 65: Darstellung des Referenzbereichs für die Differenz der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von EpiA-acetat und DHEA-acetat ($N = 10$)

Das arithmetische Mittel des $\Delta\delta$ -Werts beträgt $-1,1\text{‰}$ bei einer Standardabweichung von $0,8\text{‰}$. Angesichts der geringen Datenlage erscheint hier die Berechnung des 95%-Referenzintervalls von $-2,7\text{‰}$ bis $0,6\text{‰}$ angemessen. Zuzüglich des aufgrund des geringen Stichprobenumfangs relativ großen 90%-Vertrauensintervalls von $0,8\text{‰}$ liegen die Limits des Referenzbereichs bei $-3,5\text{‰}$ und $1,3\text{‰}$. Die Dichteschätzung der Lage der Daten entspricht wahrscheinlich aufgrund

des geringen Stichprobenumfangs kaum der Standardnormalverteilung. Alle Datenpunkte liegen deutlich innerhalb des Referenzbereichs.

5.2.4.4 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat

Der Referenzbereich für die $\Delta\delta$ -Werte zwischen 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat ist anhand der Daten von Blankurinen 39 verschiedener Tiere ermittelt und in Abb. 66 dargestellt.

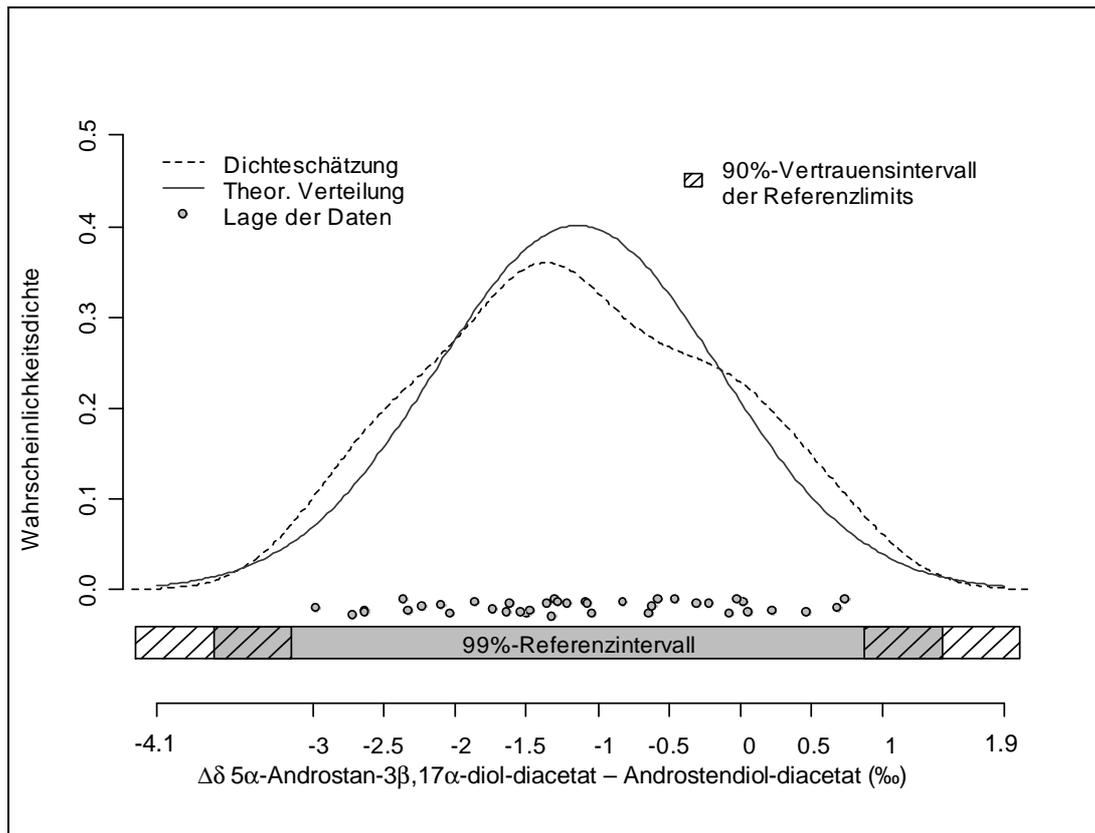


Abb. 66: Darstellung des Referenzbereichs für die Differenz der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat ($N = 39$)

Das arithmetische Mittel des $\Delta\delta$ -Werts von 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat beträgt $-1,1\text{‰}$. Unter Einbeziehung der Standardabweichung von $1,0\text{‰}$ ergibt sich ein 99%-Referenzintervall von $-3,7\text{‰}$ bis $1,4\text{‰}$. Zuzüglich des 90%-Vertrauensintervalls von $0,5\text{‰}$ betragen die Limits für den Referenzbereich $-4,3\text{‰}$ und $2,0\text{‰}$. Die Daten sind im Vergleich zur Standardnormalverteilung etwas breiter verteilt. Alle Datenpunkte liegen deutlich innerhalb des Referenzbereichs.

5.2.4.5 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat

In der Chronologie der Methodenentwicklung konnten $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat erst ermittelt werden, nachdem der Aufreinigungsschritt mittels NP-SPE aus der Aufarbeitung entfernt wurde (vgl. Kap. 5.1.6). Daher basiert der in Abb. 67 gezeigte Referenzbereich für die $\Delta\delta$ -Werte zwischen 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat lediglich auf Wertepaaren von Blankurinen 17 verschiedener Tiere.

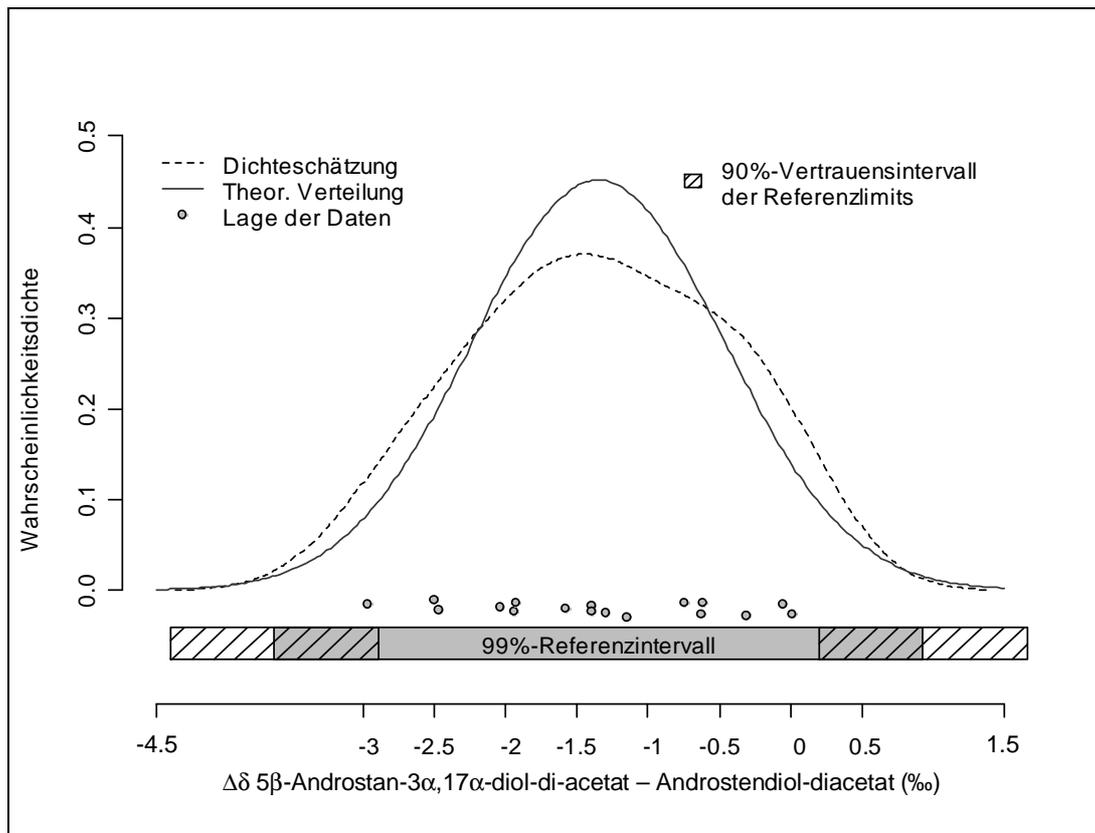


Abb. 67: Darstellung des Referenzbereichs für die Differenz der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat ($N = 17$)

Der mittlere $\Delta\delta$ -Wert für 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat beträgt $-1,4\text{‰}$. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung von $0,9\text{‰}$ ergibt sich ein 99%-Referenzintervall von $-3,6\text{‰}$ bis $0,9\text{‰}$. Einschließlich des aufgrund des geringen Stichprobenumfangs relativ großen 90%-Vertrauensintervalls von $0,7\text{‰}$ resultiert ein Referenzbereich von $-4,4\text{‰}$ bis $1,7\text{‰}$. Die Daten sind, ähnlich wie in Abb. 66, etwas breiter verteilt als die Standardnormalverteilung. Alle Datenpunkte liegen deutlich innerhalb des Referenzbereichs.

5.2.4.6 17α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat

Die Konzentration von 17α -Estradiol ist in Blankurinen im Allgemeinen sehr gering (vgl. Kap. 5.1.1.3). Zur Bildung des in Abb. 68 gezeigten Referenzbereichs der $\Delta\delta$ -Werte zwischen 17α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat stehen daher nur von Blankurinen zehn verschiedener Tiere die entsprechenden Daten zur Verfügung.

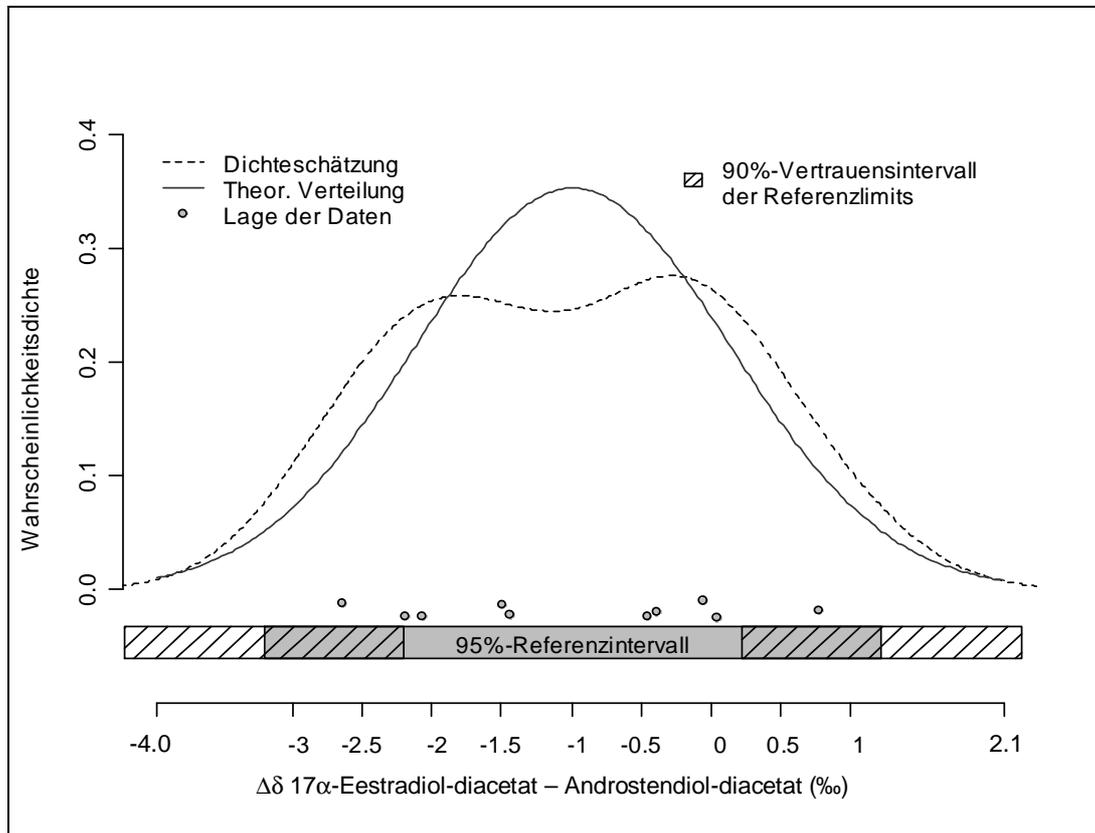


Abb. 68: Darstellung des Referenzbereichs für die Differenz der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 17α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat ($N = 10$)

Im Mittel ist das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von 17α -Estradiol-diacetat $1,0\text{‰}$ leichter als das von Androstendiol-diacetat. Aus der Standardabweichung von $1,1\text{‰}$ ergibt sich das hier angebrachte 95%-Referenzintervall von $-3,2\text{‰}$ bis $1,2\text{‰}$. Zuzüglich des aufgrund des geringen Stichprobenumfangs relativ großen 90%-Vertrauensintervalls von $1,0\text{‰}$ umfasst der Referenzbereich für die gezeigten Analyten die $\Delta\delta$ -Werte von $-4,2\text{‰}$ bis $2,2\text{‰}$. Die geringe Datenmenge lässt einen Vergleich mit der Standardnormalverteilung kaum zu. Alle Datenpunkte liegen deutlich innerhalb des ermittelten Referenzbereichs.

5.2.4.7 Zusammenfassung der Referenzbereiche

Grundsätzlich ist festzustellen, dass die Metaboliten des Testosterons bzw. des Estradiols der Referenzpopulation im Mittel etwa 1‰ isotopisch leichter sind als die

entsprechenden ERCs. Wie sich in Kap. 5.1.1.3 bereits angedeutet hat, ist das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von 17α -Estradiol in Blankurinen aufgrund zu geringer Konzentration zumeist nicht zu ermitteln. Ähnliches gilt für EpiA, während die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der weiteren Analyten in den meisten Fällen bestimmbar sind.

Für alle ermittelten Referenzbereiche gilt, dass die Referenzpopulation gemäß der *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* erweitert werden kann. Die vorgestellten Referenzbereiche sind somit nicht als endgültig zu betrachten.

In Tabelle 16 sind die Referenzbereiche für die $\Delta\delta$ -Werte zwischen den verschiedenen Analyten sowie deren Mittelwerte zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 16: Limits der Referenzbereiche für die $\Delta\delta$ -Werte der verschiedenen Metaboliten und den jeweiligen ERCs sowie deren Mittelwerte.

Analytenpaar	N	Ref.-intervall	$\Delta\delta$ -Werte (‰)		
			unteres Limit	oberes Limit	Mittelwert
(1)	35	99%	-3,1	2,2	-0,5
(2)	31	99%	-4,5	2,5	-1,0
(3)	10	95%	-3,5	1,3	-1,1
(4)	39	99%	-4,3	2,0	-1,1
(5)	17	99%	-4,4	1,7	-1,4
(6)	10	95%	-4,2	2,2	-1,0

Analytenpaare: (1) ETIO-acetat und DHEA-acetat; (2) EpiT-acetat und DHEA-acetat; (3) EpiA-acetat und DHEA-acetat; (4) 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat; (5) 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat; (6) 17α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat

Bei der Beurteilung der verschiedenen Referenzbereiche ist zu berücksichtigen, dass bei den Analytenpaaren (3) und (6) aufgrund der geringen Datenmenge nur das 95%-Referenzintervall der Stichprobe bestimmt ist, während bei den anderen Analytenpaaren das 99%-Referenzintervall die Grundlage der Berechnung des Referenzbereichs darstellt. Der Referenzbereich der jeweils mono-acetylierten Analyten ETIO und DHEA weist für das untere Limit den niedrigsten Betrag auf und für das 99%-Referenzintervall die geringste Differenz zwischen oberem und unterem Limit. Es ist daher anzunehmen, dass der Vergleich dieser Analyten am empfindlichsten einen Testosteronnachweis bei nur geringen $\Delta\delta$ -Werten zwischen Nahrung und appliziertem Testosteron ermöglicht. Zudem ist bei den jeweils bis-acetylierten Analyten zu berücksichtigen, dass der ursprüngliche $\Delta\delta$ -Wert zwischen ERC und Metabolit durch die vier bei der Acetylierung eingeführten Kohlenstoffatome stärker verringert wird als bei den jeweils mono-acetylierten

Datenpaaren (vgl. Kap. 3.5). Dies wirkt sich bei den Analytenpaaren (4) und (5) aus Tabelle 16 zusätzlich zu der im Vergleich zu Analytenpaar (1) etwas größeren Differenz zwischen oberem und unterem Limit negativ auf die Empfindlichkeit des Nachweises einer Testosteron-Applikation aus.

5.3 Anwendung der Methode zum Nachweis der Applikation von Testosteron und Estradiol aus dem Rinderurin

Die Qualität und die Anwendbarkeit der in Kap. 5.2.4 ermittelten Referenzbereiche für den Nachweis der Applikation von Testosteron oder Estradiol ist anhand der Analyse der verschiedenen Ausscheidungsversuche zu beurteilen.

5.3.1 Testosteronnachweis anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen Etiocholanolon-acetat und DHEA-acetat

In Abb. 69 sind die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von ETIO-acetat und DHEA-acetat der analysierten Proben gegeneinander aufgetragen.

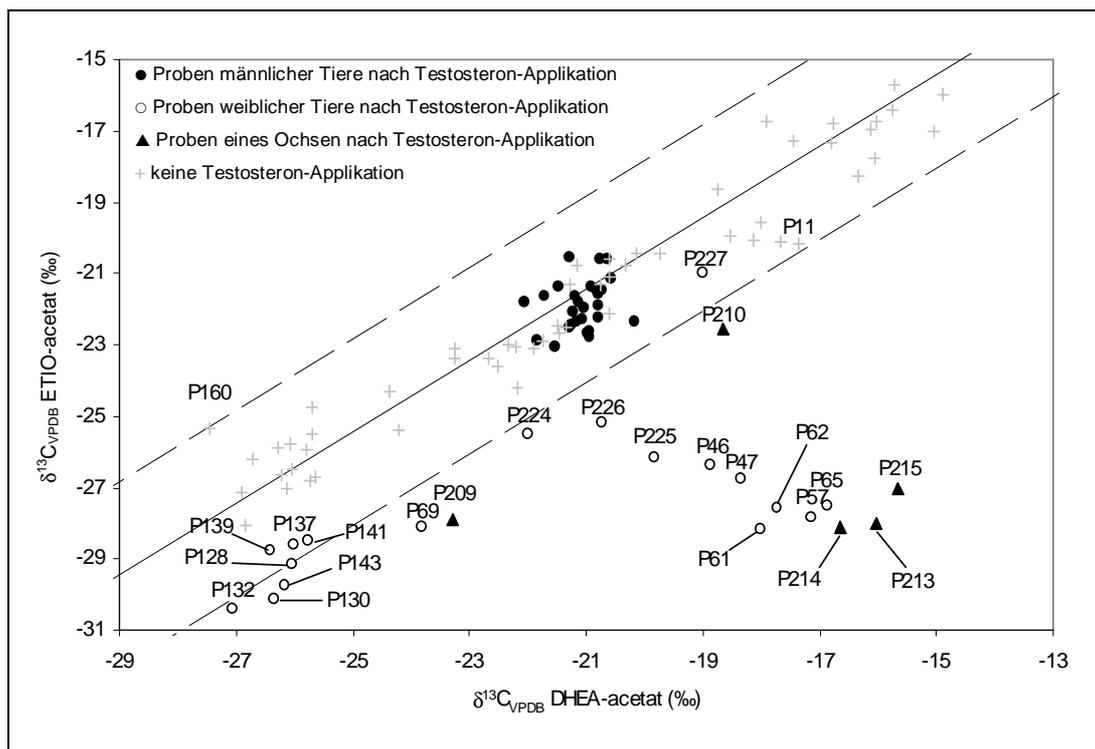


Abb. 69: Darstellung der Nachweisbarkeit der Testosteron-Applikationen anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von ETIO-acetat und DHEA-acetat im Vergleich zum Referenzbereich (gestrichelte Linien) und dem mittleren $\Delta\delta$ -Wert (durchgezogene Linie)

Auf der Abszisse sind die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von DHEA-acetat als ERC aufgetragen. Diese Werte sind ausschließlich abhängig von der Nahrung. Während die isotopisch leichteren Werte auf der linken Seite auf die C_3 -Ernährung mit Gräsern

zurückzuführen sind, führt die Nahrung mit verschiedenen Anteilen an Mais zu schwereren $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werten weiter rechts in Abb. 69. Die Ordinate zeigt die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von ETIO-acetat als Testosteron-Metabolit. Diese Werte sind zum einen abhängig von der Nahrung und zum anderen von einer möglichen Testosteron-Applikation im Vorfeld der Probenahme.

Der Vergleich mit dem in Kap. 5.2.4 entwickelten Referenzbereich von -3,1‰ bis 2,2‰ (gestrichelte Linien) zeigt, dass alle erhaltenen 55 Wertepaare von Proben nicht mit Testosteron behandelte Rinder (+) richtig zugeordnet werden. Die Proben P11 ($\Delta\delta = -2,8\text{‰}$) und P160 ($\Delta\delta = 2,1\text{‰}$) sind am weitesten vom Mittelwert (durchgezogene Linie) entfernt. Als mögliche Ursachen kann weder die Estradiol-Applikation bei Probe P11 noch die Nahrungsumstellung bei Probe P160 anhand der vorliegenden Daten ausgeschlossen werden. Wahrscheinliche Ursache ist allerdings, dass es sich bei beiden grenzwertig negativen Proben um das natürliche Resultat der Verteilung handelt. Wie zuvor bereits erwähnt, muss bei der Bewertung von Probe P160 zusätzlich berücksichtigt werden, dass die zweiseitige Betrachtung der Limits für den Referenzbereich zwar mathematisch korrekt ist, für den Nachweis einer Testosteron-Applikation aber isotopisch leichtere Metaboliten als ERCs erwartet werden. Synthetisches Testosteron weist bisher sowohl in Standards als auch in Medikamenten ausschließlich niedrige $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von etwa -28‰ auf (de la Torre *et al.* 2001 und eigene unveröffentlichte Daten).

Die Proben nach Testosteron-Applikation in Abb. 69 sind kategorisiert nach der Herkunft von männlichen (●) oder weiblichen (○) Rindern oder von Ochsen (▲).

Bei keiner der 27 Proben männlicher Rinder ist die Testosteron-Applikation nach vier, sieben, 14 oder 21 Tagen anhand des Vergleichs der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von ETIO-acetat und DHEA-acetat nachweisbar, da alle Proben innerhalb des Referenzbereichs liegen. Die Wertepaare sind zufällig um den Mittelwert der Referenzpopulation angeordnet, so dass eine Beeinflussung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte durch die Testosteron-Gabe nicht zu erkennen ist. Offensichtlich überwiegt die endogene Produktion von ETIO diejenige durch die Mobilisierung des Testosterons nach Gabe von Testosteron-enantat um ein Vielfaches. Ein positiver Nachweis wäre nur bei höherer Dosierung oder schnellerer Mobilisierung des Testosteronpräparats beispielsweise durch Gabe kürzerkettiger Ester wie dem Propionat möglich.

Bei 14 der 18 Proben weiblicher Tiere wird die Testosteron-Applikation anhand des Vergleichs der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von ETIO-acetat und DHEA-acetat

nachgewiesen, da sie außerhalb des Referenzbereichs liegen. Bei vier Proben liegt der $\Delta\delta$ -Wert innerhalb des Referenzbereichs, so dass hier die Testosteron-Gabe nicht nachgewiesen werden kann. Die Proben P128, P130, P132, P137, P139, P141 und P143 (links in Abb. 69) wurden im Sommer 2005 genommen, während Probe P69 (ebenso wie Probe P209 von einem Ochsen) aus dem Sommer 2003 stammt. Alle besagten Proben wurden während reiner Gräser-Ernährung ohne Maisanteil im Futter gesammelt. Wie in Kap. 2.4 erwähnt, war 2003 ein im Vergleich zum Jahr 2005 sehr heißer und trockener Sommer. Dies führt aus den dort besprochenen Gründen im Jahr 2003 zu isotopisch weniger angereicherten C_3 -Pflanzen als Nahrungsgrundlage als im Jahr 2005. Diese Unterschiede sind anhand der $\delta^{13}C_{VPDB}$ -Werte von DHEA-acetat der besagten Proben deutlich erkennbar. Die Nachweismöglichkeit einer Testosteron-Gabe ist also bei den auf Grasernährung basierenden Proben aus dem Jahr 2003 eher möglich als bei den Proben aus dem Jahr 2005, da hier die $\Delta\delta$ -Werte zwischen Nahrung und Testosteron größer sind. So stammen drei der insgesamt vier falsch negativen Proben aus dem Jahr 2005, während die $\Delta\delta$ -Werte der anderen vier Proben desselben Jahrs außerhalb des Referenzbereichs liegen und damit positiv sind. Probe P69 aus dem Jahr 2003 hingegen weist einen deutlich negativeren $\Delta\delta$ -Wert von $-4,3\text{‰}$ auf und ist somit positiv. Die vierte falsch negative Probe P227 stammt vom französischen Rind fünf Wochen nach Testosteron-Applikation. Während ETIO-acetat innerhalb der ersten elf Tage nach dieser Applikation (Proben P224–P226) einen weitgehend konstanten und damit kaum durch endogene Produktion beeinflussten $\delta^{13}C_{VPDB}$ -Wert aufweist, ist die Nachweisdauer bei diesem Rind nach 35 Tagen offensichtlich überschritten. Die große Spannweite der $^{13}C/^{12}C$ -Verhältnisse von DHEA-acetat der Proben dieses Tiers ist möglicherweise auf eine Umstellung der Ernährung hin zu höherem C_4 -Pflanzen-Anteil im Futter zurückzuführen. Ähnlich wie für das französische Rind gilt auch für Rind R303 (Proben P57, P61 und P65), dass sich das Kohlenstoff-Isotopenverhältnis von ETIO-acetat innerhalb von zehn Tagen nach Testosteron-Applikation kaum ändert und die endogene Produktion dieses Testosteron-Metaboliten weitgehend unterdrückt ist. Bei weiblichen Rindern kann bei entsprechender Nahrungsgrundlage von einer Nachweisdauer der angegebenen Testosteron-Applikation anhand der $\Delta\delta$ -Werte von ETIO-acetat und DHEA-acetat von mehr als zehn Tagen ausgegangen werden.

Bei allen fünf Proben des Ochsen R773 in Abb. 69 ist die Testosteron-Applikation nachweisbar. Wie erwähnt ist bei Probe P209 aus dem Jahr 2003 trotz Grasernährung die Testosteron-Gabe nachgewiesen. Die endogene Produktion von ETIO-acetat ist nach Testosteron-Gabe bei diesem Tier so gering, dass die Medikation bei Probe P210 noch nach 44 Tagen nachweisbar ist.

5.3.2 Testosteronnachweis anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen Epitestosteron-acetat und DHEA-acetat

In Abb. 70 sind die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der analysierten Proben von EpiT-acetat gegen diejenigen von DHEA-acetat dargestellt.

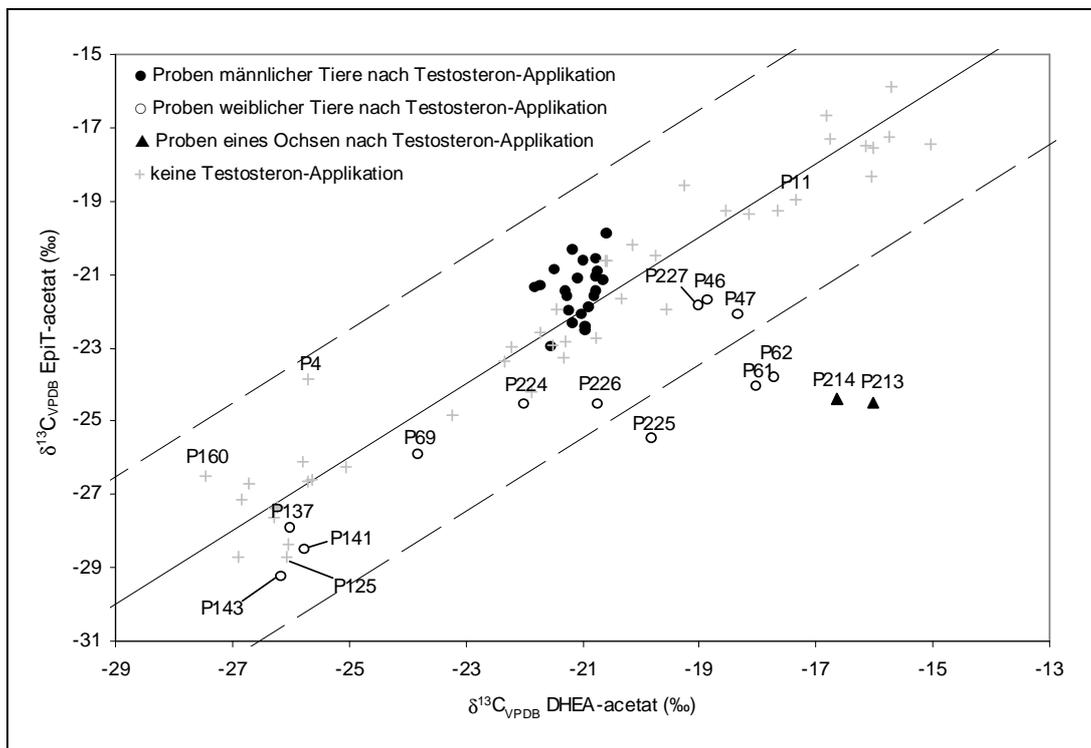


Abb. 70: Darstellung der Nachweisbarkeit der Testosteron-Applikationen anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von EpiT-acetat und DHEA-acetat im Vergleich zum Referenzbereich (gestrichelte Linien) und dem mittleren $\Delta\delta$ -Wert (durchgezogene Linie)

Vergleichbar mit Abb. 69 (S. 120) ist auf der x-Achse der Einfluss der Ernährung auf die Isotopenverhältnisse des ERCs zu erkennen, während die auf der y-Achse gezeigten $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von EpiT-acetat auch von der möglichen Gabe von Testosteron abhängig sind.

Der Vergleich der 43 Wertepaare von Proben nicht mit Testosteron behandelter Tiere (+) mit dem Referenzbereich von -4,5‰ bis 2,5‰ (gestrichelte Linien) führt zu keinem falsch positiven Befund. Die Probe P4 ist mit einem $\Delta\delta$ -Wert von 1,9‰ oberhalb des Mittelwerts (durchgezogene Linie) am weitesten von ihm entfernt, aber

deutlich innerhalb des Referenzbereichs. Unterhalb des Mittelwerts wird ein $\Delta\delta$ -Wert von $-2,6\text{‰}$ (Probe P125) nicht unterschritten. Die in Abb. 69 (S. 120) gezeigten grenzwertig negativen Proben P11 und P160 sind anhand des Vergleichs der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von EpiT-acetat und DHEA-acetat unauffällig.

Bei keiner der 22 Proben männlicher Rinder nach Testosteron-Applikation (●) kann diese anhand der $\Delta\delta$ -Werte von EpiT-acetat und DHEA-acetat nachgewiesen werden. Der mittlere $\Delta\delta$ -Wert dieser Rinder liegt mit $-0,4\text{‰}$ ($\pm 0,7\text{‰}$) höher als das arithmetische Mittel sowohl der männlichen Tiere ohne Testosteron-Applikation ($-0,7\text{‰} \pm 0,8\text{‰}$, $N = 16$) als auch der Referenzpopulation ($-1,1\text{‰} \pm 1,1\text{‰}$; $N = 31$). Über einen anderen als einen zufälligen Effekt für diesen Befund kann derzeit nur spekuliert werden.

Anhand des Vergleichs der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von EpiT-acetat und DHEA-acetat mit dem in Abb. 70 gezeigten Referenzbereich kann die Testosteron-Gabe nur bei drei von zwölf Proben weiblicher Rinder (○) nachgewiesen werden. Zudem muss beachtet werden, dass die Proben P61 und P62 verschiedene Aliquote desselben Urins sind. Es ist hingegen auch zu erkennen, dass die $\Delta\delta$ -Werte zwischen EpiT-acetat und DHEA-acetat der neun falsch negativen Proben deutlich niedriger als das arithmetische Mittel der Referenzpopulation sind und teilweise lediglich aufgrund des breiten Referenzbereichs (vgl. Tabelle 16, S. 119) falsch beurteilt werden. Insgesamt sind die Differenzen der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte zwischen EpiT-acetat und DHEA-acetat der Proben weiblicher Tiere nach Testosteron-Applikation deutlich weniger ausgeprägt als diejenigen von ETIO-acetat und DHEA-acetat.

$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von EpiT-acetat des mit Testosteron behandelten Ochsen (▲) können nur in den identischen Proben P213 und P214 bestimmt werden. Bei diesen Proben ist die Testosteron-Gabe anhand des Vergleichs mit dem Referenzbereich nachgewiesen. Erneut ist festzustellen, dass sich die Injektion des Testosteronpräparats auf das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von EpiT weniger auswirkt als auf das von ETIO.

5.3.3 Testosteronnachweis anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen Epiandrosteron-acetat und DHEA-acetat

Abb. 71 zeigt die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von EpiA-acetat und DHEA-acetat der analysierten Proben.

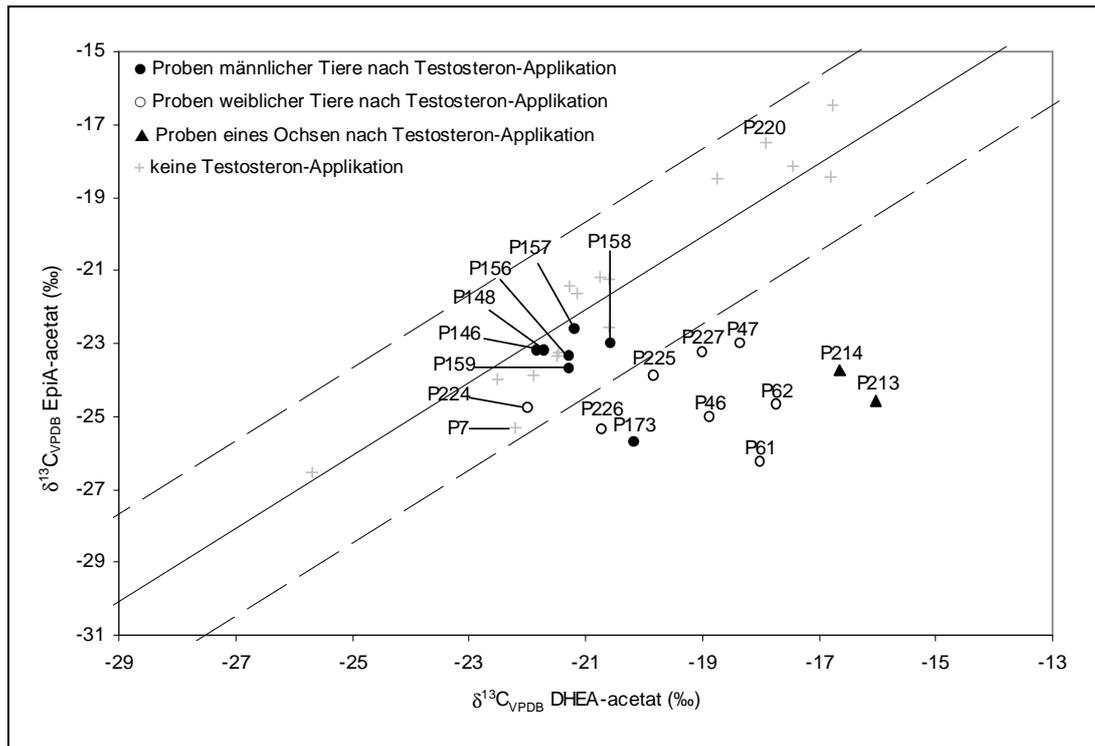


Abb. 71: Darstellung der Nachweisbarkeit der Testosteron-Applikationen anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von EpiA-acetat und DHEA-acetat im Vergleich zum Referenzbereich (gestrichelte Linien) und dem mittleren $\Delta\delta$ -Wert (durchgezogene Linie)

Im Vergleich zu den anderen Analyten liefert die GC/C/IRMS-Analyse von EpiA-acetat aufgrund zu geringer Konzentration nur in wenigen Fällen valide $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte. Entsprechend ist der Referenzbereich von $-3,5\text{‰}$ bis $1,3\text{‰}$ (gestrichelte Linien) der in Abb. 71 gezeigten Zielanalyten relativ schmal, da er auf dem 95%-Referenzintervall einer möglicherweise zufällig niedrigen Standardabweichung von nur zehn Referenzproben basiert. Insgesamt kann dies zu einer höheren Fehlerwahrscheinlichkeit in den Blankproben führen.

Dennoch sind die 16 Proben nicht mit Testosteron behandelte Tiere (+) korrekt zugeordnet, da sich die entsprechenden Wertepaare innerhalb des Referenzbereichs befinden. Die Proben P7 ($\Delta\delta = -3,1\text{‰}$) und P220 ($\Delta\delta = 0,4\text{‰}$) sind am entferntesten vom Mittelwert (durchgezogene Linie), aber deutlich innerhalb des Referenzbereichs.

Es sind $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von EpiA-acetat bei sieben Proben männlicher Rinder nach Testosteron-Injektion (●) ermittelt. Sechs Proben werden falsch negativ zugeordnet. Bei Probe P173 hingegen ist die Testosteron-Gabe 14 Tage nach Medikation nachgewiesen, da der $\Delta\delta$ -Wert von $-5,5\text{‰}$ zwischen EpiA-acetat und DHEA-acetat deutlich außerhalb des unteren Limits des Referenzbereichs von $-3,5\text{‰}$ liegt. Die Analyse der entsprechenden Daten und Chromatogramme liefert keinen

Hinweis auf einen analytischen Fehler, so dass von einer tatsächlichen Beeinflussung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses von EpiA durch die Testosteron-Gabe ausgegangen wird.

Die Analyse der Proben weiblicher Rinder nach Testosteron-Applikation (○) erbringt den Nachweis der Medikation bei sieben von acht Wertepaaren. Lediglich Probe P224 wird hier falsch negativ beurteilt, da der $\Delta\delta$ -Wert zwischen EpiA-acetat und DHEA-acetat das untere Limit des Referenzbereichs nicht unterschreitet. Im Vergleich mit den Daten aus Abb. 69 (S. 120) und Abb. 70 (S. 123) fällt auf, dass hier der Nachweis der Testosteron-Gabe bei Probe P227 auch 35 Tage nach Applikation gelingt.

Die zwei Wertepaare des mit Testosteron behandelten Ochsen R773 (▲) befinden sich außerhalb des Referenzbereichs, so dass die Medikation nachgewiesen ist.

5.3.4 Testosteronnachweis anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat

In Abb. 72 sind die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte des Testosteron-Metaboliten 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat und des ERCs Androstendiol-diacetat dargestellt.

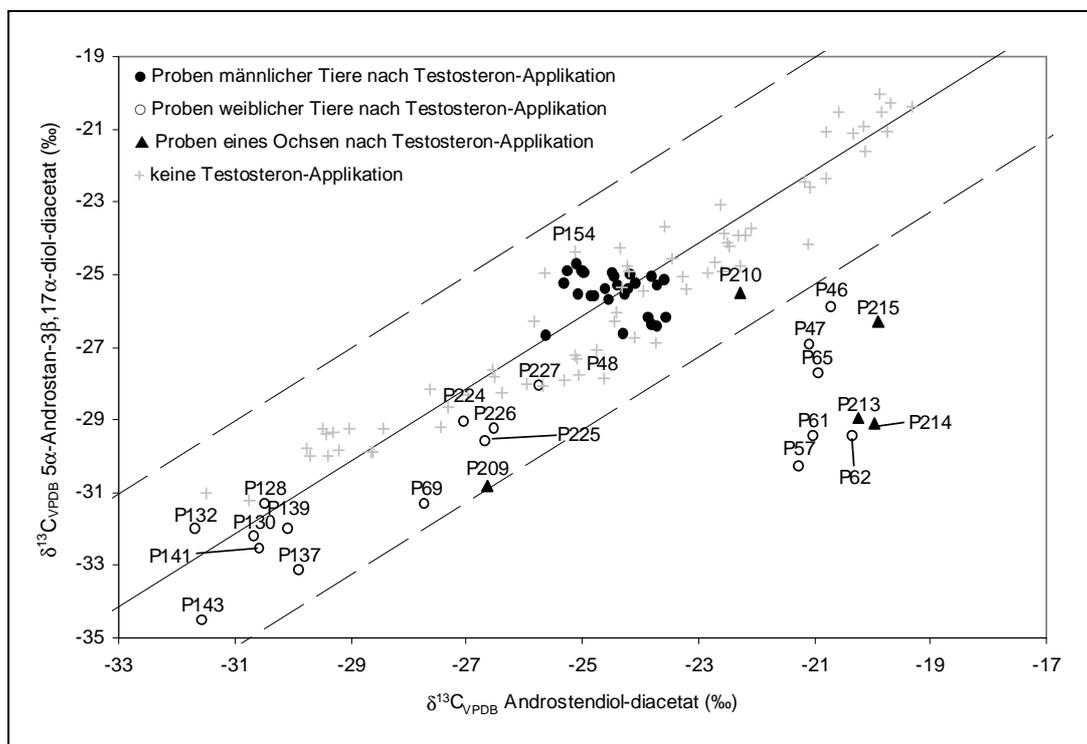


Abb. 72: Darstellung der Nachweisbarkeit der Testosteron-Applikationen anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat im Vergleich zum Referenzbereich (gestrichelte Linien) und dem mittleren $\Delta\delta$ -Wert (durchgezogene Linie)

Die Abhängigkeit der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse des ERCs von der Nahrung wird auf der Abszisse deutlich. Durch die bei der Acetylierung eingeführten vier zusätzlichen Kohlenstoffatome sind die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte insgesamt niedriger als bei den vorherigen Zielanalyten aus Abb. 69 bis Abb. 71 (S. 120 bis S. 125).

Der Vergleich mit dem Referenzbereich von $-4,3\text{‰}$ bis $2,0\text{‰}$ (gestrichelte Linie) zeigt, dass alle 69 ermittelten Wertepaare der Proben von nicht mit Testosteron behandelten Tieren (+) richtig zugeordnet werden. Am weitesten vom mittleren $\Delta\delta$ -Wert (durchgezogene Linie) entfernt sind die Proben P154 ($0,7\text{‰}$) und die wiederholte Aufarbeitung von Probe P48 ($-3,2\text{‰}$).

Der Testosteronnachweis bei den 27 Proben männlicher Tiere (●) gelingt anhand der in Abb. 72 gezeigten Zielanalyten in keinem Fall. Ähnlich wie bei dem Vergleich von ETIO-acetat mit DHEA-acetat aus Abb. 69 (S. 120) sind die Datenpunkte zufällig um den Mittelwert der Referenzpopulation verteilt, so dass eine Beeinflussung des $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werts von 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol durch die Medikation nicht zu erkennen ist und die endogene Produktion dieses Testosteron-Metaboliten offensichtlich weit größer ist als diejenige durch die exogene Applikation.

Von den 18 Proben der mit Testosteron behandelten weiblichen Tiere (○) gelingt der Nachweis anhand der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse der in Abb. 72 dargestellten Zielanalyten nur bei sechs Urinen, die während überwiegender Maisernährung gesammelt wurden. Bei Probe P69 aus dem Jahr 2003 ist zwar eine deutliche Abreicherung des Testosteron-Metaboliten zu erkennen, allerdings liegt der $\Delta\delta$ -Wert mit $-3,6\text{‰}$ innerhalb des Referenzbereichs. Bei den auf Grasernährung beruhenden falsch negativen Proben P128, P130, P132, P137, P139, P141 und P143 aus dem Jahr 2005 ist der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert des ERCs bereits so negativ, dass er sich kaum von dem des applizierten Medikaments unterscheidet, was hier den Nachweis unmöglich macht. Bei den Proben P224 bis P227 des französischen Rinds gelingt der Testosteronnachweis hingegen offensichtlich aufgrund des endogenen Anteils am 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol nicht, da die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte des Androstendiols weit weniger negativ als bei den anderen Proben sind. Der Verlauf des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses des Testosteron-Metaboliten bei den Proben P57, P61/P62 und P65 hin zu deutlich weniger abgereicherten Werten innerhalb von zehn Tagen nach Applikation deutet ebenfalls darauf hin, dass der endogene Anteil am 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol bereits kurz nach Applikation relativ schnell überwiegt. Ebenso ist der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert dieses Zielanalyten bei den positiven Proben P46/P47 (Mischproben

nach sieben bis elf Tagen nach Medikation) offensichtlich durch einen hohen endogenen Anteil beeinflusst.

Aus Abb. 72 geht hervor, dass bei drei der fünf Proben des mit Testosteron behandelten Ochsens R773 (▲) die Medikation nachgewiesen wird, während zwei Proben falsch negativ zugeordnet werden. Der falsch negative Befund zwei Tage nach Applikation bei Probe P209 ist auf die Grasernährung und den endogenen Anteil am Testosteron-Metaboliten zurückzuführen. Vierundvierzig Tage nach Testosteron-Gabe ist bei Probe P210 eine Abreicherung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses des 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetats im Vergleich zum ERC zu erkennen. Sie ist aber trotz überwiegender Maisernährung aufgrund des hohen endogenen Anteils an diesem Zielanalyten nicht ausreichend für den Nachweis anhand des Referenzbereichs. Ähnlich wie bei den weiblichen Rindern ist die Beeinflussung des Isotopenverhältnisses des Testosteron-Metaboliten durch den endogenen Anteil bei den Proben P213/P214 und P215 zu erkennen, da der $\Delta\delta$ -Wert von etwa -9‰ nach drei Tagen auf $-6,4\text{‰}$ nach sieben Tagen ansteigt.

5.3.5 Testosteronnachweis anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat

Die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der analysierten Proben von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat sind in Abb. 73 dargestellt.

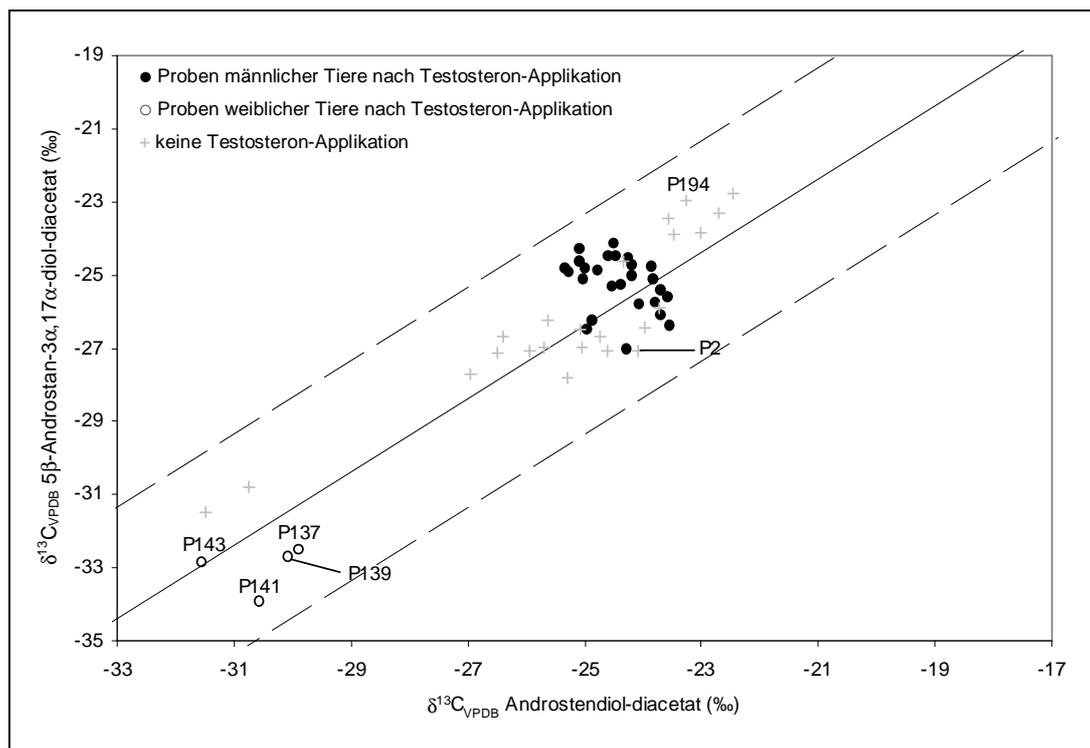


Abb. 73: Darstellung der Nachweisbarkeit der Testosteron-Applikationen anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat im Vergleich zum Referenzbereich (gestrichelte Linien) und dem mittleren $\Delta\delta$ -Wert (durchgezogene Linie)

Wie in Kap. 5.1.6 dargelegt, ist 5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol in der Chronologie der Methodenentwicklung erst spät als Zielanalyt integriert worden. Entsprechend ist der Datensatz dieses Analyten relativ unvollständig, obwohl die GC/C/IRMS-Analyse der entsprechenden Fraktion zumeist valide $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte liefert.

Durch den Vergleich mit dem Referenzbereich von -4,4‰ bis 1,7‰ (gestrichelte Linien) werden alle 23 Blankproben (+) richtig zugeordnet. Die Proben P2 ($\Delta\delta = -3,0\text{‰}$) und P194 ($\Delta\delta = 0,3\text{‰}$) sind am weitesten vom Mittelwert (durchgezogene Linie) entfernt, aber deutlich innerhalb der Limits für den Referenzbereich.

Die Testosteron-Applikation ist bei keiner der 26 Proben männlicher Tiere (●) nachweisbar. Sie sind zufällig um den mittleren $\Delta\delta$ -Wert der Referenzpopulation angeordnet, so dass eine Beeinflussung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol durch die Medikation nicht zu erkennen ist.

Auch bei den Proben weiblicher Tiere nach Testosteron-Gabe (○) ist die Medikation nicht nachzuweisen. Im Gegensatz zu den Proben der männlichen Tiere liegt die Ursache dieses falsch negativen Befunds wohl in der Tatsache begründet, dass die Proben P137, P139, P141 und P143 ausschließlich während

Grasernährung im Jahr 2005 gesammelt wurden und sehr abgereicherte endogene $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte für Androstendiol aufweisen. Ähnlich wie in Abb. 72 (S. 126) bei dem Vergleich von 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat mit Androstendiol-diacetat ist der Testosteronnachweis hier nur schwerlich möglich. Probe P141 weist mit $-3,4\text{‰}$ zumindest den niedrigsten $\Delta\delta$ -Wert aller Proben auf.

Zu Proben testosteronbehandelter Ochsen liegen keine Daten vor.

5.3.6 Estradiolnachweis anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen 17α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat

Die Nachweisbarkeit der Applikation von Estradiol ist anhand des Vergleichs der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 17α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat in Abb. 74 gezeigt.

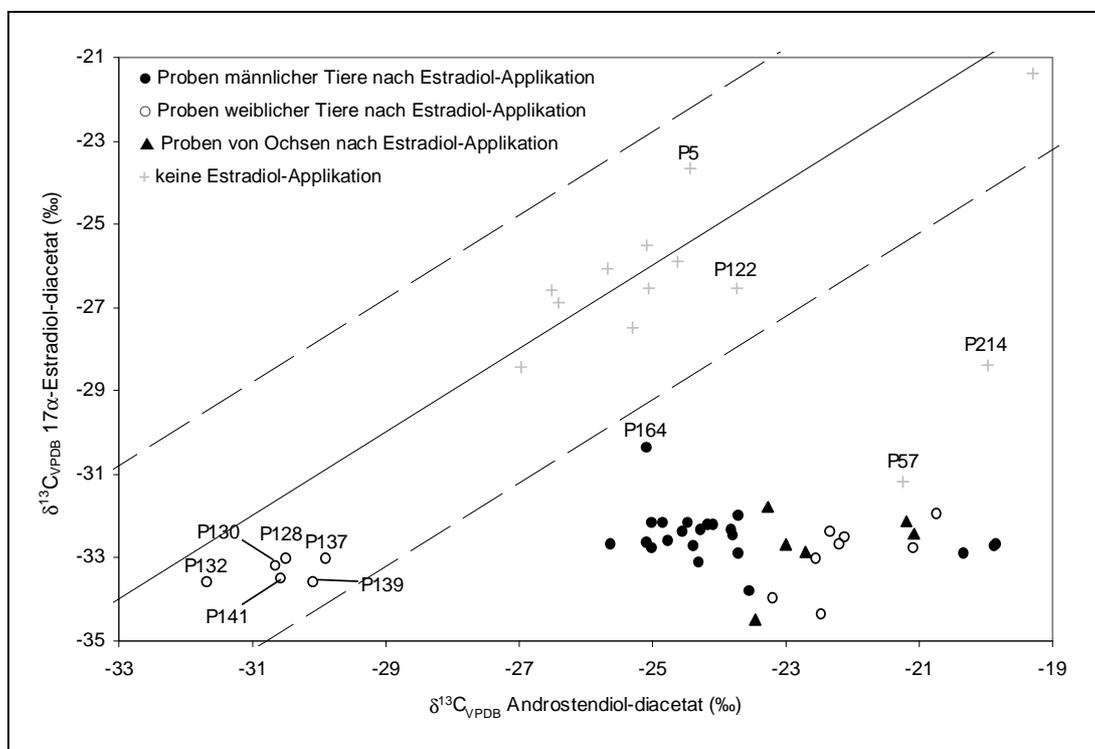


Abb. 74: Darstellung der Nachweisbarkeit der Estradiol-Applikationen anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 17α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat im Vergleich zum Referenzbereich (gestrichelte Linien) und dem mittleren $\Delta\delta$ -Wert (durchgezogene Linie)

Die Konzentration von 17α -Estradiol ist bei den zur Verfügung stehenden Blankproben äußerst gering. Im Gegensatz zum Vergleich von EpiA-acetat und DHEA-acetat aus Abb. 71 (S. 125) ist der Referenzbereich hier von $-4,2\text{‰}$ bis $1,3\text{‰}$ (gestrichelte Linien) relativ breit, obwohl er nur auf dem 95%-Referenzintervall beruht, da die Standardabweichung von nur zehn Referenzproben mit über 1‰ relativ groß ist.

Es sind $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte für 17α -Estradiol-diacetat von 13 Proben nicht mit Estradiol behandelte Rinder (+) ermittelt. Elf dieser Proben fallen in den Referenzbereich und werden richtig zugeordnet. Von diesen elf Proben zeigen die Proben P5 ($\Delta\delta = 0,8\text{‰}$) und P122 ($\Delta\delta = -2,8\text{‰}$) die größten Abweichungen vom arithmetischen Mittel der Referenzpopulation (durchgezogene Linie). Die Proben P57 eines weiblichen Tiers und P214 von einem Ochsen weisen hingegen deutlich abgereicherte $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte für 17α -Estradiol-diacetat auf. Die zugehörigen $\Delta\delta$ -Werte von $-9,9\text{‰}$ (P57) bzw. $-8,4\text{‰}$ (P214) lassen eindeutig auf die exogene Herkunft des Estradiol-Metaboliten schließen. Bei Probe P213, die ein weiteres Aliquot desselben Urins wie Probe P214 darstellt, ist die Intensität des 17α -Estradiol-diacetat-Peaks im zugehörigen GC/C/IRMS-Chromatogramm so gering, dass der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert je nach Integrationsparametern zwischen -26‰ und -29‰ schwankt und somit nicht valide bestimmbar ist. Der resultierende $\Delta\delta$ -Wert zwischen 17α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat ($\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -20,3\text{‰}$) ließe auch bei dieser Probe auf die exogene Herkunft des Metaboliten schließen. Aus Tabelle 20 (S. 167) ist ersichtlich, dass den zugehörigen Rindern im Gegensatz zu den anderen Proben der nicht mit Estradiol behandelten Tiere zwei bzw. drei Tage vor der Probenahme Testosteron appliziert wurde. Bezüglich Abb. 8 (S. 12) ist die Biosynthese der Estrogene aus den Androgenen erläutert. Es wird deutlich, dass Testosteron ein Edukt bei der Biosynthese des 17α -Estradiols ist. Entsprechend ist die Zuordnung der exogenen Herkunft des 17α -Estradiols bei den Proben P57 und P214 richtig, da es sich vom applizierten Testosteron ableitet.

Bei 22 Proben der männlichen Tiere nach Estradiol-Applikation (●) wurden $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von 17α -Estradiol-diacetat ermittelt. Anhand des Vergleichs mit dem Referenzbereich ist die Medikation bei allen Proben bis zu 16 Tage nachweisbar. Nach drei Wochen hingegen ist die Konzentration von 17α -Estradiol im Urin für die GC/C/IRMS-Analyse der aufgearbeiteten Proben zu gering. Fast alle positiven Proben weisen unabhängig von der Ernährung und dem Tag nach Applikation nahezu konstante $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von weniger als -32‰ für den Metaboliten auf. Der endogene Anteil am 17α -Estradiol ist entsprechend nur äußerst gering. Einzig bei Probe P164 ist zwei Wochen nach Estradiol-Gabe ein deutlich weniger abgereichertes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis zu verzeichnen.

Bei sechs der 14 Proben weiblicher Tiere (○) kann die Estradiol-Applikation anhand des Vergleichs der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 17α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat nicht nachgewiesen werden, da sie sich innerhalb des Referenzbereichs befinden. Bei diesen auf Gräserernährung basierenden Proben P128, P130, P132, P137, P139 und P141 aus dem Jahr 2005 sind die $\Delta\delta$ -Werte zwischen Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat zwar niedriger als das arithmetische Mittel der Referenzpopulation, der Nachweis ist hier aufgrund der isotopisch leichten endogenen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse allerdings nicht möglich. Bei acht Proben der weiblichen Rinder ist die exogene Herkunft des 17α -Estradiols nachgewiesen. Eine endogene Verdünnung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 17α -Estradiol-diacetat hin zu schwereren Werten ist bei keiner der Proben innerhalb von maximal sieben bis elf Tagen bei den Mischproben P46/47 zu erkennen.

Bei den sechs Proben der mit Estradiol behandelten Ochsen (▲) kann bis zu sieben Tage nach Medikation die Herkunft des 17α -Estradiols als exogen nachgewiesen werden. Auch bei diesen Proben ist innerhalb des beobachteten Zeitraums keine endogene Verdünnung hin zu weniger abgereicherten $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werten von 17α -Estradiol-diacetat festzustellen.

5.3.7 Zusammenfassung der Nachweisbarkeit der Applikation von Testosteron oder Estradiol mittels GC/C/IRMS

Zusammenfassend ist zunächst anzuführen, dass keine Probe anhand der $\Delta\delta$ -Werte der verschiedenen Analytenpaare falsch positiv zugeordnet wird. Die Strategie der Bildung von Referenzbereichen hat sich dahingehend als erfolgreich erwiesen.

Wie zu erwarten war, gestaltet sich der Nachweis der verschiedenen Steroid-Applikationen anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen den Metaboliten und den ERCs umso einfacher, je größer der Maisanteil im Futter ist. Für den Testosteronnachweis werden Differenzen von bis zu 12‰ zwischen ETIO-acetat und DHEA-acetat bestimmt (Probe P209) und für den Estradiolnachweis sogar bis zu knapp 13‰ zwischen 17α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat (Proben P222/223). Bei reiner Grasernährung hingegen entsprechen die endogenen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse bereits weitgehend denen der applizierten Steroide. Aufgrund sehr ähnlicher $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der endogenen und exogenen Substanzen gelingt diese Art des Nachweises dann seltener.

Insgesamt haben sich die Ergebnisse der Quantifizierungsversuche zur Bestimmung geeigneter Zielanalyten aus dem Rinderurin (vgl. Kap. 5.1.1) durch die

GC/C/IRMS-Analyse weitgehend bestätigt. Tabelle 17 zeigt für die verschiedenen Analytenpaare die Anzahl an positiven Testosteronnachweisen im Vergleich zu den falsch negativ beurteilten Proben von Ochsen und weiblichen Rindern.

Tabelle 17: Anzahl der positiven Testosteronnachweise und der falsch negativ zugeordneten Proben von weiblichen Rindern und Ochsen anhand der verschiedenen Analytenpaare

Analytenpaar	N	Anzahl positive Nachweise	Anzahl falsch negative Proben
(1)	23	19	4
(2)	14	5	9
(3)	10	9	1
(4)	23	9	14
(5)	4	0	4

Analytenpaare: (1) ETIO-acetat und DHEA-acetat; (2) EpiT-acetat und DHEA-acetat; (3) EpiA-acetat und DHEA-acetat; (4) 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat; (5) 5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat

Der Testosteronnachweis gelingt am häufigsten durch den Vergleich der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von ETIO-acetat und DHEA-acetat. Bei keinem anderen Analytenpaar wurden positive Proben basierend auf reiner Grasernährung aus dem Jahr 2005 richtig zugeordnet. Anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte dieser Analyten gelingt der Testosteronnachweis also in der Regel am empfindlichsten.

Wie in den Quantifizierungsversuchen bereits vermutet, führt der Vergleich von EpiT-acetat und DHEA-acetat nur in wenigen Fällen zu einem positiven Nachweis und häufiger zu falsch negativen Proben. Nach Testosteron-Applikation sind die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von EpiT-acetat deutlich weniger angereichert als die von ETIO-acetat. Zudem ist EpiT im Rinderurin häufiger für die GC/C/IRMS nicht ausreichend konzentriert.

In fast allen Proben können die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der acetylierten Androstandiole und von Androstendiol bestimmt werden. Allerdings führt der Vergleich der acetylierten Diole häufiger zu falsch negativen Proben als der Vergleich von ETIO-acetat mit DHEA-acetat. Ursächlich für die geringere Empfindlichkeit sind zum einen die wahrscheinlich größere endogene Verdünnung von zumindest 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol im Gegensatz zu ETIO. Zum anderen hat die Bis-Acetylierung im Gegensatz zur Mono-Acetylierung generell geringere Differenzen zwischen den $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werten der Metaboliten und denen der ERCs zur Folge (vgl. Kap. 3.5). Entsprechend führt dies bei gleich großen Referenzbereichen grundsätzlich zu einer geringeren Empfindlichkeit. Die Eignung des 5 β -Androstan-3 α ,17 α -diols als

Testosteron-Metabolit wird ähnlich wie die des 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diols erwartet. Dies kann allerdings nur aufgrund der Quantifizierungsdaten vermutet werden. Von keiner Probe, die anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat positiv getestet wurde, ist aufgrund der zu diesem Zeitpunkt noch angewendeten NP-SPE der entsprechende $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert des 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetats bestimmt worden.

Anhand keines der bisher erwähnten Analytenpaare kann die Applikation von Testosteron bei Proben nicht kastrierter männlicher Rinder nachgewiesen werden. Höchstwahrscheinlich begründet sich dies mit der vergleichsweise hohen Eigenproduktion von Testosteron bei diesen Tieren im Gegensatz zu Ochsen und weiblichen Rindern bzw. einer für diese Tiere zu geringen Mobilisierung des applizierten Testosteron-enantiomers, so dass die Testosteron-Metaboliten weitgehend unveränderte $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte aufweisen.

Der Vergleich der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von EpiA-acetat und DHEA-acetat bildet bei den nicht kastrierten männlichen Rindern mit einem positiven Nachweis die Ausnahme. Die Bewertung dieses Analytenpaars ist allerdings schwierig. Einerseits ist die urinaire Konzentration von EpiA auch nach Testosteron-Applikation häufig zu gering für die GC/C/IRMS (vgl. Kap. 5.1.1.2.3) und die Analyse des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses von EpiA-acetat aus biologischen Proben weist die schlechteste Präzision aller Analyten auf (vgl. Tabelle 15, S. 110). Andererseits gelingt der Testosteronnachweis bei den Proben P173 und P227 anhand keines der anderen Analytenpaare. In wenigen Fällen kann der Vergleich der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von EpiA-acetat und DHEA-acetat am empfindlichsten sein.

Die anhand der Quantifizierungsversuche abgeschätzte Nachweismöglichkeit der Gabe von Estradiol anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 17α -Estradiol ist weitgehend bestätigt. Die urinaire Konzentration dieses Analyten ist zwar in den analysierten Blankproben in der Regel zu gering für die GC/C/IRMS-Analyse, es zeigen jedoch alle Urinproben nach Estradiol-Gabe für 17α -Estradiol-diacetat negativere $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte im Vergleich zu Androstendiol-diacetat als ERC als die Blankproben. Lediglich bei den auf reiner Gräserernährung basierenden Urinproben aus dem Jahr 2005 sind die entsprechenden $\Delta\delta$ -Werte für einen positiven Estradiolnachweis nicht ausreichend. Insgesamt ist die Estradiol-Applikation bei 36 Proben nachgewiesen, während sechs Proben aufgrund der abgereicherten endogenen $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte falsch negativ zugeordnet werden. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass die Herkunft

von urinärem 17α -Estradiol auch nach Testosteron-Applikation exogenen Ursprungs sein kann.

Bezüglich der schlechten Nachweismöglichkeit von Testosteron in nicht kastrierten männlichen Rindern ist abschließend zu erwähnen, dass bei diesen Tieren im Gegensatz zu weiblichen Rindern und Ochsen die zusätzliche Gewichtszunahme durch Steroidhormone am geringsten ist (u.a. Smith *et al.* 1999; Wilson *et al.* 1999). Arts *et al.* (1991), Scippo *et al.* (1994) und Simontacchi *et al.* (2004) berichten zudem, dass eine Testosteron-Gabe bei männlichen Rindern, wahrscheinlich durch einen negativen Rückkopplungseffekt auf Hypothalamus und Hypophyse, zu weniger Testosteron und insgesamt weniger Androgenen im Blut führt. Auch ZoBell *et al.* (2000) beschreiben eine Anwendungsstrategie der in den USA zugelassenen Wachstumshormone explizit nicht für männliche Kälber, sondern ausschließlich für Ochsen und weibliche Rinder. Entsprechend ist die Missbrauchswahrscheinlichkeit von Testosteron bei nicht kastrierten männlichen Rindern aufgrund mangelnder Rentabilität als gering anzusehen.

5.4 Validierung der Methode zur Herkunftsbestimmung von Norandrosteron im Humanurin

Zur Eignung der in Kap. 4.4 beschriebenen Methode für die Herkunftsbestimmung von NA im Humanurin wird die Spezifität für NA, AND und ETIO validiert.

Die Wiederholbarkeit der Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte eines in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzten Standards wird nur für NA validiert, da es ausschließlich für NA Blankurine gibt, aber kein Urin frei von den endogenen Steroiden AND oder ETIO ist.

Die Reproduzierbarkeit der Analyse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse wird für alle drei Zielanalyten anhand der wiederholten Analyse von 13 Urinproben untersucht.

Zur Überprüfung der Methode auf Richtigkeit der exogenen oder endogenen Herkunftsbestimmung werden elf Kontrollproben mit bekannter NA-Quelle analysiert. Die $\Delta\delta$ -Werte zwischen NA als Metabolit und AND als ERC sollen Aufschluss über die Herkunft von NA geben.

Da das Phänomen der Demethylierungsaktivität nur äußerst selten auftaucht und dessen Ursache weitgehend unbekannt ist, ist das Erstellen eines Referenzbereichs für die $\Delta\delta$ -Werte zwischen NA und AND anhand einer Referenzpopulation basierend auf durch diese Aktivität hervorgerufenem endogenem NA praktisch unmöglich. Die

Eignung der Methode zur Herkunftsbestimmung dieses Analyten wird anhand der Analyse der in Tabelle 23 (S. 177) gezeigten Dopingkontrollproben mit geringem NA-Gehalt zwischen 2 ng/mL und 18,5 ng/mL geprüft.

5.4.1 Spezifität

Wie in Kap. 5.2.1 bereits erwähnt, stehen bei GC/C/IRMS-Messungen lediglich die Retentionszeiten zur Identifizierung der Analyten zur Verfügung. Wichtig für die valide Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der Zielanalyten ist die weitgehende Abwesenheit koeluiender Matrixkomponenten. Dies wird durch die Probenaufarbeitung für alle Analyten in der Regel gewährleistet. Ggf. wird die Identität und die Reinheit der Zielverbindungen mittels GC/MS-Analyse überprüft.

Die beiden verwendeten GC-Säulen weisen unter den gegebenen Bedingungen ähnliche chromatographische Eigenschaften auf. Die nachfolgend gezeigten Chromatogramme zur Verdeutlichung des Aufreinigungserfolgs und der Spezifität sind beispielhaft auf der Optima $\delta 3$ GC-Säule unter *Splitless*-Bedingungen gemessen.

Für die NA enthaltende Fraktion kann die Spezifität der Methode anhand des Vergleichs der Chromatogramme eines Blankurins und eines mit NA versetzten Urins gezeigt werden, was bei den endogenen Steroiden AND und ETIO nicht möglich ist.

Abb. 75 zeigt den für NA relevanten Ausschnitt des GC/C/IRMS-Chromatogramms der NA-Fraktion eines Blankurins.

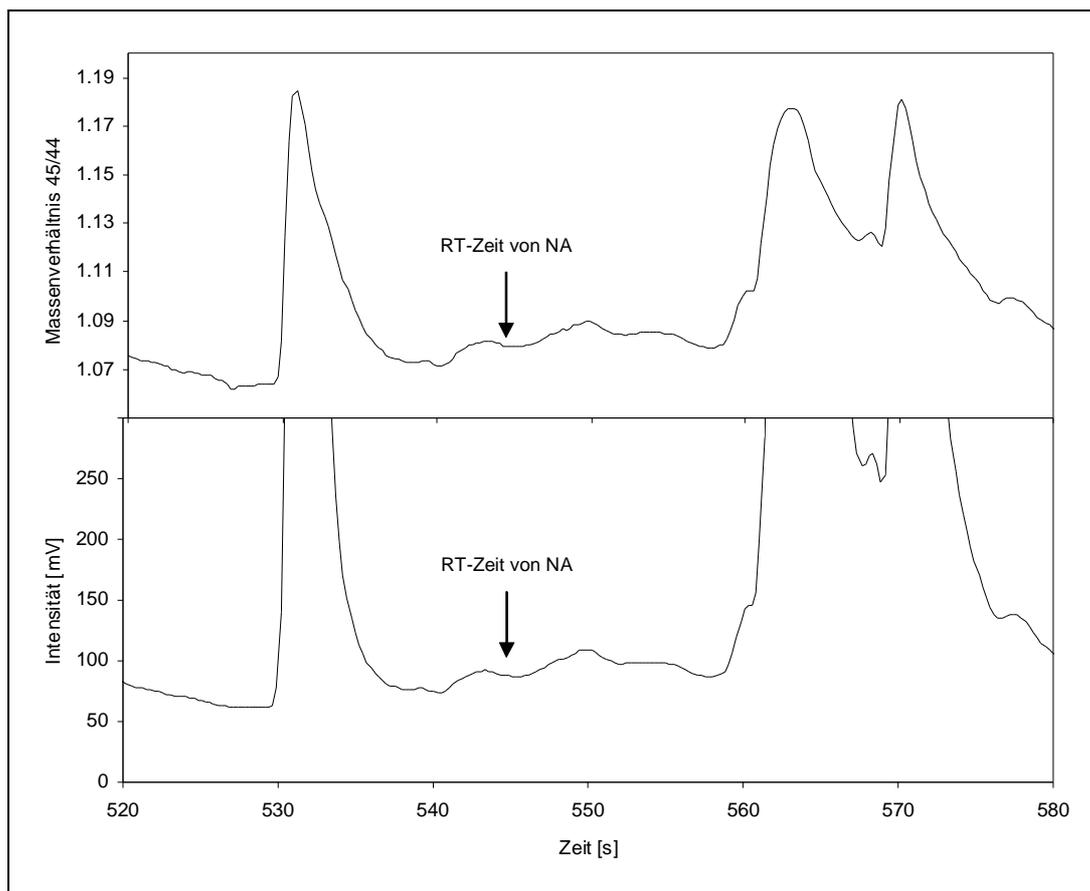


Abb. 75: Relevanter Ausschnitt des GC/C/IRMS-Chromatogramms der NA-Fraktion eines Blankurins; Verhältnis der Massen 45/44 (oben) und die Intensität von m/z 44 (unten)

Es wurden 3 μL der in 5 μL Methanol angelösten NA-Fraktion injiziert. Oben in der Abbildung ist das Verhältnis von m/z 45 zu m/z 44 (mit einem jeweiligen Offset von 100 mV zur Glättung der Basislinie) gezeigt, während unten die Intensität von m/z 44 zu sehen ist.

Im für NA relevanten Zeitfenster zwischen etwa 540 s und 560 s sind anhand der Intensität von m/z 44 kaum Matrixkomponenten zu erkennen. Ebenso ist das Verhältnis der Intensitäten der Massen 45/44 in diesem Zeitfenster relativ konstant, was für die Korrektur des Hintergrunds und damit für eine valide Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses eines möglichen NA-Signals vielversprechend ist.

In Abb. 76 ist der relevante Ausschnitt des GC/C/IRMS-Chromatogramms der NA-Fraktion eines Blankurins gezeigt, der mit NA-glucuronid in einer Menge von 4 ng/mL bezüglich des freien Steroids versetzt wurde.

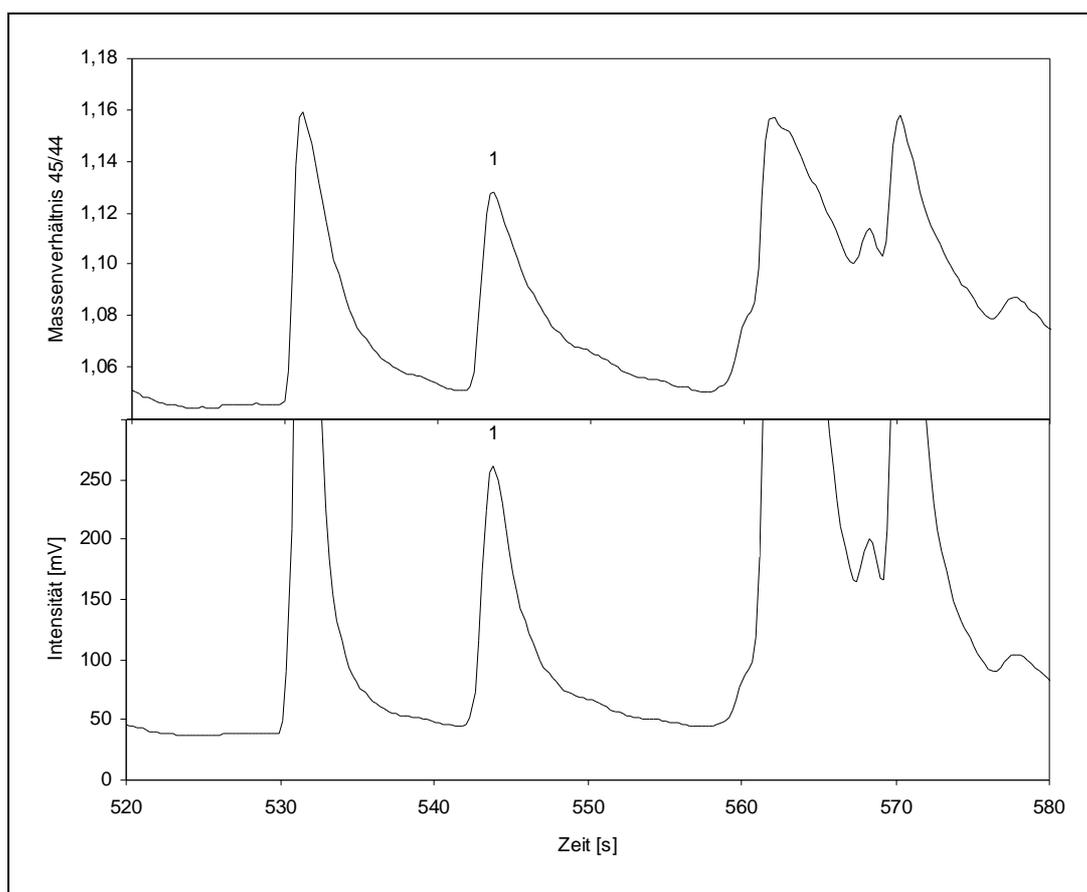


Abb. 76: Relevanter Ausschnitt des GC/C/IRMS-Chromatogramms der NA (1) enthaltenden Fraktion eines mit NA-glucuronid versetzten Blankurins der Konzentration 4 ng/mL bezüglich des freien Steroids; Verhältnis der Massen 45/44 (oben) und die Intensität von m/z 44 (unten)

Die Intensität des Signals für NA (1) ist für die GC/C/IRMS ausreichend. Das Verhältnis der Massen 45/44 lässt vermuten, dass keine mit NA koeluerenden Matrixkomponenten vorhanden sind. Die GC/MS-Analyse der NA enthaltenden Proben bestätigt, dass die Methode für NA spezifisch ist. Es ist allerdings anzumerken, dass in seltenen Fällen und nicht optimalen chromatographischen Bedingungen die Intensität des Peaks zwischen etwa 530 s und 535 s, der als DHEA-Metabolit 6β -Hydroxy- $3\alpha,5$ -cyclo- 5α -androst-17-on identifiziert wurde (vgl. Bradlow 1970), so groß ist, dass er sich teilweise mit dem von NA überlagert. In diesen Fällen ist der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert von NA nicht valide bestimmbar.

In Abb. 77 ist jeweils die Intensität von m/z 44 der GC/C/IRMS-Chromatogramme der AND-Fraktion und der ETIO-Fraktion eines Blankurins gezeigt.

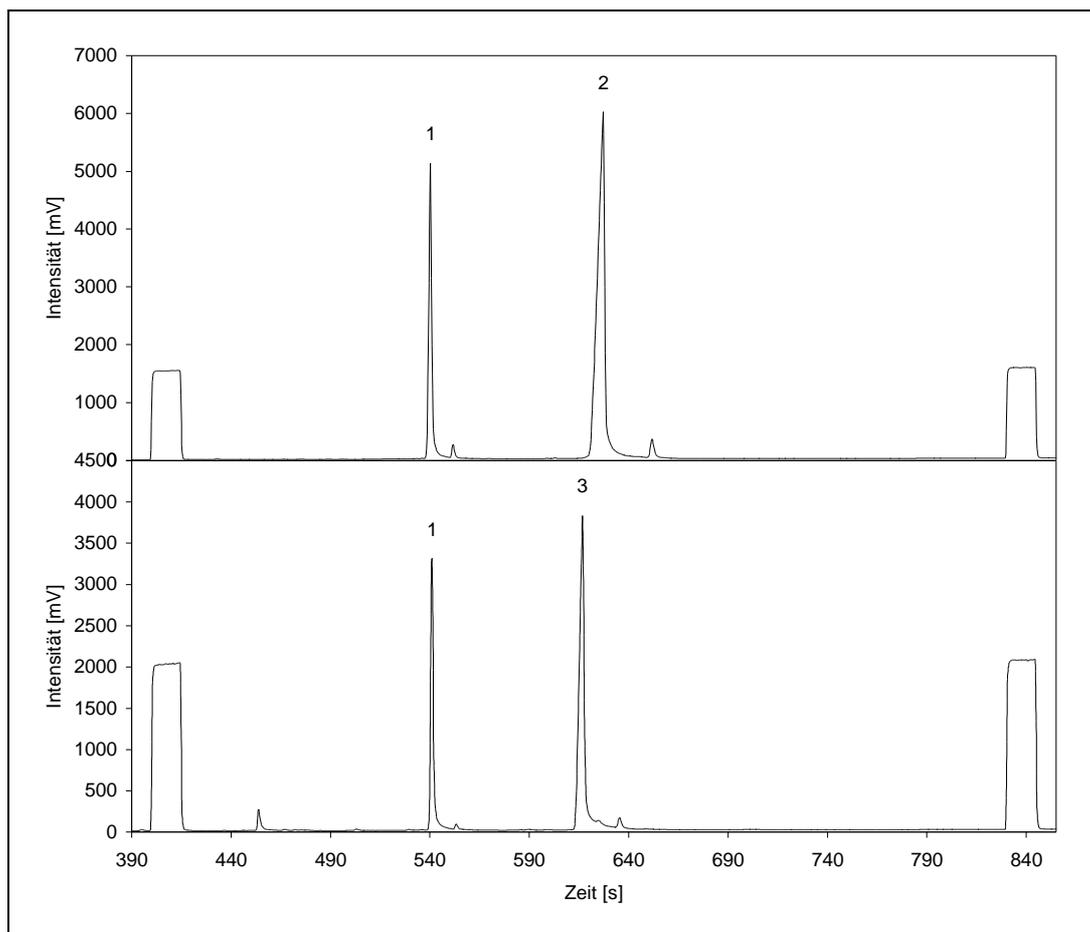


Abb. 77: GC/C/IRMS-Chromatogramme (m/z 44) der AND (2) enthaltenden Fraktion (oben) und der ETIO (3) enthaltenden Fraktion (unten) eines Blankurins; als Referenzstandard ist jeweils 5α -Androstan- 3β -ol (1) koinjiziert

Es ist jeweils $1 \mu\text{L}$ der in $150 \mu\text{L}$ Methanol angelösten Fraktionen sowie 5α -Androstan- 3β -ol (1) als Referenzstandard mit bekanntem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis injiziert. Zu Beginn und am Ende der Chromatogramme ist jeweils ein Referenzgaspuls zu erkennen. Sowohl AND (2) als auch ETIO (3) aus den entsprechenden Fraktionen sind weitgehend basisliniengetrennt von Matrixkomponenten. Die Identifizierung der gezeigten Signale mittels GC/MS-Analyse lässt keine Koelutionen erkennen. Die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte dieser Analyten sind aus biologischen Proben valide bestimmbar.

5.4.2 Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit der Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses von NA in den mit verschiedenen Konzentrationen an NA-glucuronid versetzten Blankurinen ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Wiederholbarkeit der Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werts von NA in mit NA-glucuronid versetzten Blankurinen über einen Zeitraum von zwölf Monaten

Konzentration NA [ng/mL]	mittlerer $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert NA \pm Standardabweichung (‰)
2	-26,5 \pm 0,4 (N = 5)
4	-26,8 \pm 0,8 (N = 6)
6	-26,6 \pm 0,7 (N = 9)
8	-26,8 \pm 0,4 (N = 8)
Gesamt	-26,7 \pm 0,6 (N = 28)

Das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von NA aus dem zugesetzten NA-glucuronid ist in jeder Sequenz innerhalb von zwölf Monaten bestimmt worden. Der mittlere $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert dieses Standards schwankt für die verschiedenen Konzentrationen von 2 ng/mL bis 8 ng/mL zwischen -26,5‰ und -26,8‰ während der Mittelwert aller Werte -26,7‰ beträgt. Die Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von NA ist unabhängig von den vorgegebenen Konzentrationen weitgehend konstant. Die zugehörigen Standardabweichungen zwischen 0,4‰ und 0,8‰ zeigen eine befriedigende Präzision der Methode für die verschiedenen Konzentrationen, wenngleich die Intensitäten des am niedrigsten konzentrierten Urins nahe dem unteren Limit des linearen Messbereichs des IRMS-Systems sind.

5.4.3 Reproduzierbarkeit

Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit werden dreizehn Dopingkontrollproben mit NA-Konzentrationen zwischen 2 ng/mL und 20 ng/mL wiederholt an verschiedenen Tagen aufgearbeitet und bei unterschiedlichen Bedingungen analysiert. Die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von NA, AND und ETIO dieser Proben sind in Abb. 78 bis Abb. 80 dargestellt. Bei der ersten Analyse wird im *Splitless*-Modus injiziert und eine Optima $\delta 3$ GC-Säule verwendet (●). Für die zweite Aufarbeitung wird der CoC-Injektor verwendet. Fünf der 13 wiederholten Proben werden auf der Optima $\delta 3$ GC-Säule analysiert (○), während die anderen acht Proben unter Einsatz der HP-5MS GC-Säule bestimmt werden (Δ).

In Abb. 78 sind die Ergebnisse der wiederholten Analyse der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von NA dargestellt.

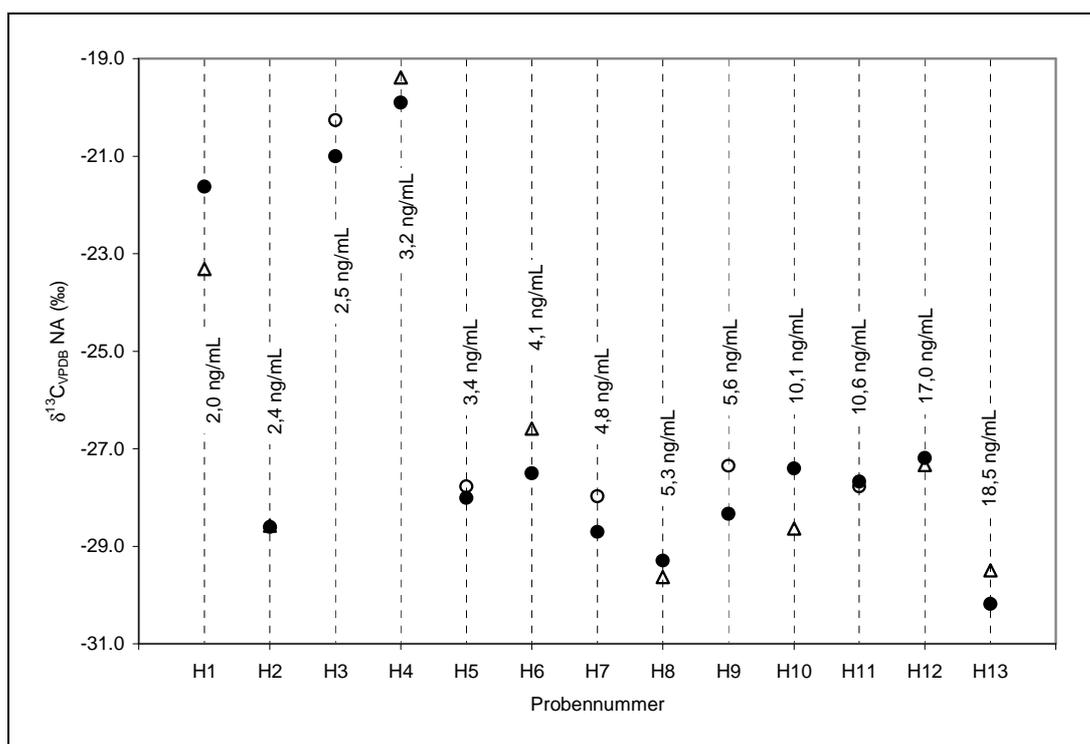


Abb. 78: Wiederholte Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von NA in Dopingkontrollproben und dessen Konzentration; erste Analyse mit *Splitless*-Injektion und Optima $\delta 3$ GC-Säule (●), zweite Analyse mit CoC-Injektion und Optima $\delta 3$ GC-Säule (○) oder HP-5MS GC-Säule (Δ)

Die Proben sind von links nach rechts in aufsteigender NA-Konzentration sortiert. Die Ordinate zeigt die entsprechenden $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse.

Es ist kein Trend in der Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von NA zwischen der ersten Analyse mit *Splitless*-Injektion auf der Optima $\delta 3$ GC-Säule (●) und der zweiten Analyse mit CoC-Injektion und identischer (○) oder HP-5MS GC-Säule (Δ) feststellbar. Im Mittel unterscheiden sich die Ergebnisse lediglich um $0,1\text{‰}$ ($\pm 0,8\text{‰}$; $N = 13$). Beide Injektoren liefern vergleichbare Ergebnisse.

Bei Verwendung der Optima $\delta 3$ GC-Säule und CoC-Injektion sind die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von NA bei der zweiten Analyse im Mittel $0,5\text{‰}$ ($\pm 0,4\text{‰}$; $N = 5$) schwerer als bei der ersten Analyse, während sie bei Verwendung der HP-5MS GC-Säule $0,2\text{‰}$ ($\pm 0,9\text{‰}$; $N = 8$) leichter sind. Diese Abweichungen bewegen sich innerhalb der Messunsicherheit, so dass beide GC-Säulen für den verwendeten Zweck geeignet sind.

Die größte Differenz zwischen den beiden Analysen beträgt bei der am niedrigsten konzentrierten Probe $1,7\text{‰}$ und in der Regel weniger als 1‰ . Insgesamt liefert die Methode unter den verschiedenen GC/C/IRMS-Bedingungen auch bei niedrigen NA-Konzentration reproduzierbare $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte für NA.

Abb. 79 zeigt die entsprechenden Ergebnisse der wiederholten Analyse der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von AND.

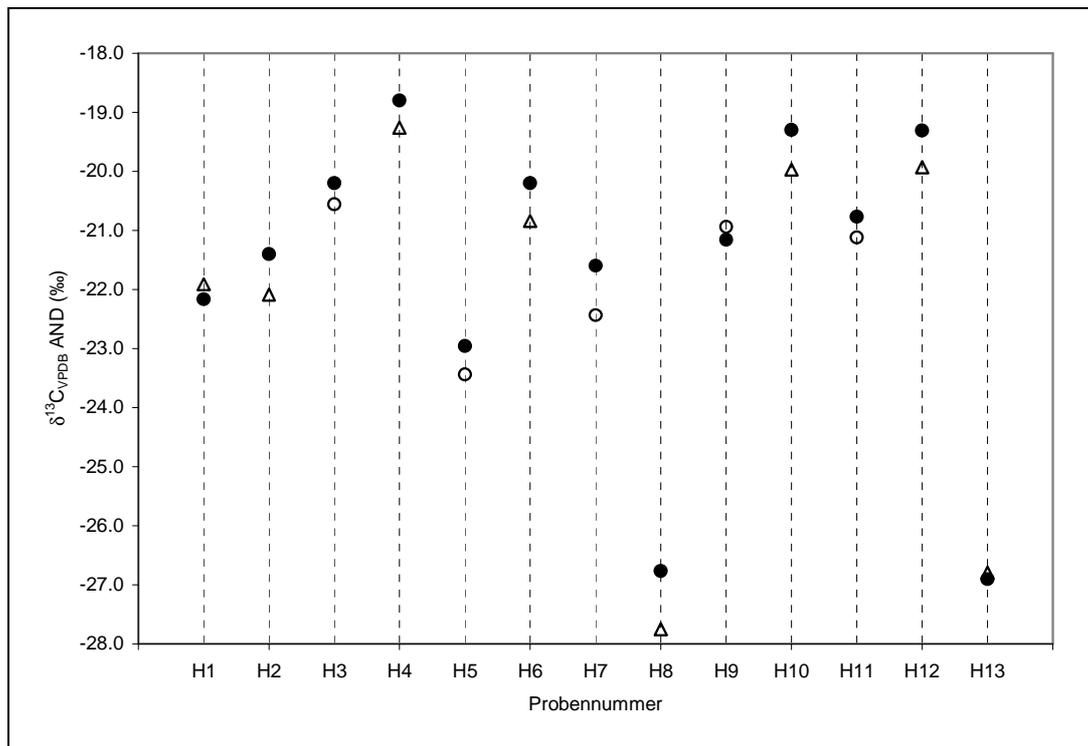


Abb. 79: Wiederholte Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von AND in Dopingkontrollproben mit *Splitless*-Injektion und Optima $\delta 3$ GC-Säule (●) oder mit CoC-Injektion und Optima $\delta 3$ GC-Säule (○) oder HP-5MS GC-Säule (Δ)

Die Konzentration von AND ist im Humanurin gewöhnlich so hoch, dass sie keinen für die GC/C/IRMS limitierenden Parameter darstellt und hier nicht angegeben ist.

Im Durchschnitt sind die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von AND bei der Verwendung des CoC-Injektors und Optima $\delta 3$ (○) oder HP-5MS GC-Säule (Δ) um $0,4\text{‰}$ ($\pm 0,4\text{‰}$; $N = 13$) leichter als bei der ersten Analyse mittels *Splitless*-Injektion auf der Optima $\delta 3$ GC-Säule (●). Ein möglicher Trend zu schwereren $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnissen durch den CoC-Injektor ist nicht auszuschließen, würde sich aber im Rahmen der Messunsicherheit bewegen, so dass für die Methode beide Injektoren geeignet sind.

Der Einsatz der Optima $\delta 3$ GC-Säule bei der wiederholten Analyse mittels CoC-Injektor liefert im Mittel $0,4\text{‰}$ ($\pm 0,4\text{‰}$; $N = 5$) leichtere $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte für AND als zuvor. Die Anwendung der HP-5MS GC-Säule ergibt eine vergleichbare Abweichung von $0,5\text{‰}$ ($\pm 0,4\text{‰}$; $N = 8$) im Gegensatz zur ersten Analyse. Entsprechend ist der Einsatz beider GC-Säulen für die Analyse der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von AND angebracht.

Alle Abweichungen zwischen erster und zweiter Analyse betragen weniger als 1‰. Insgesamt ist die Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von AND unter den verschiedenen Bedingungen reproduzierbar.

Die Ergebnisse der wiederholten Analyse der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von ETIO unter den verschiedenen Bedingungen sind in Abb. 80 dargestellt.

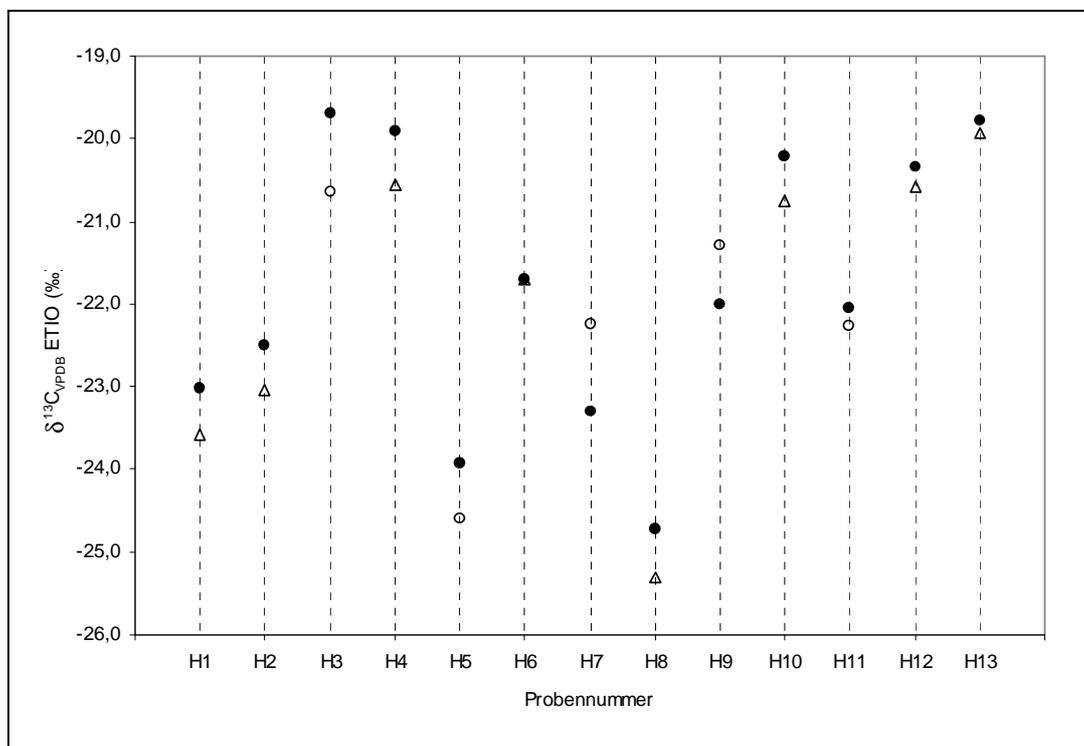


Abb. 80: Wiederholte Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von ETIO in Dopingkontrollproben mit *Splitless*-Injektion und Optima $\delta 3$ GC-Säule (●) oder mit CoC-Injektion und Optima $\delta 3$ GC-Säule (○) oder HP-5MS GC-Säule (Δ)

Die Konzentration von ETIO beläuft sich in einer ähnlichen Größenordnung wie die von AND und ist entsprechend nicht angegeben.

Die Verwendung des CoC-Injektors ergibt für die wiederholte Analyse im Durchschnitt $0,3\text{‰}$ ($\pm 0,6\text{‰}$; $N = 13$) leichtere $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse für ETIO als die erste Analyse unter *Splitless*-Bedingungen (●). Diese Abweichungen gehen in dieselbe Richtung wie bei der Analyse von AND, bewegen sich aber wie zuvor im Rahmen der Messunsicherheit, so dass auch für die Analyse der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von ETIO beide Injektortypen zweckmäßig sind.

Die wiederholte Analyse mittels CoC-Injektion und Optima $\delta 3$ GC-Säule (○) ergibt im Mittel die gleichen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse ($\pm 0,9\text{‰}$; $N = 5$) wie die erste Analyse unter *Splitless*-Bedingungen, während der Einsatz der HP-5MS GC-Säule (Δ) zu

0,4‰ ($\pm 0,2\%$; $N = 8$) leichteren Werten führt. Wie zuvor ist der Einsatz beider GC-Säulen für die Analyse der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von ETIO geeignet.

Die Differenz der Ergebnisse zwischen erster und zweiter Analyse beträgt maximal 1,1‰. Somit liefert die Analyse von ETIO mit der angegebenen Methode unter den verschiedenen Bedingungen reproduzierbare Ergebnisse.

5.4.4 Richtigkeit

Zur Überprüfung, ob die endogene oder exogene Herkunft von NA im Humanurin durch den Vergleich der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von AND und NA richtig bestimmbar ist, werden die in Tabelle 22 (S. 176) beschriebenen Kontrollroben K1 bis K11 mit geringer NA-Konzentration bekannter Herkunft analysiert.

Abb. 81 zeigt die ermittelten $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von NA und AND dieser Proben.

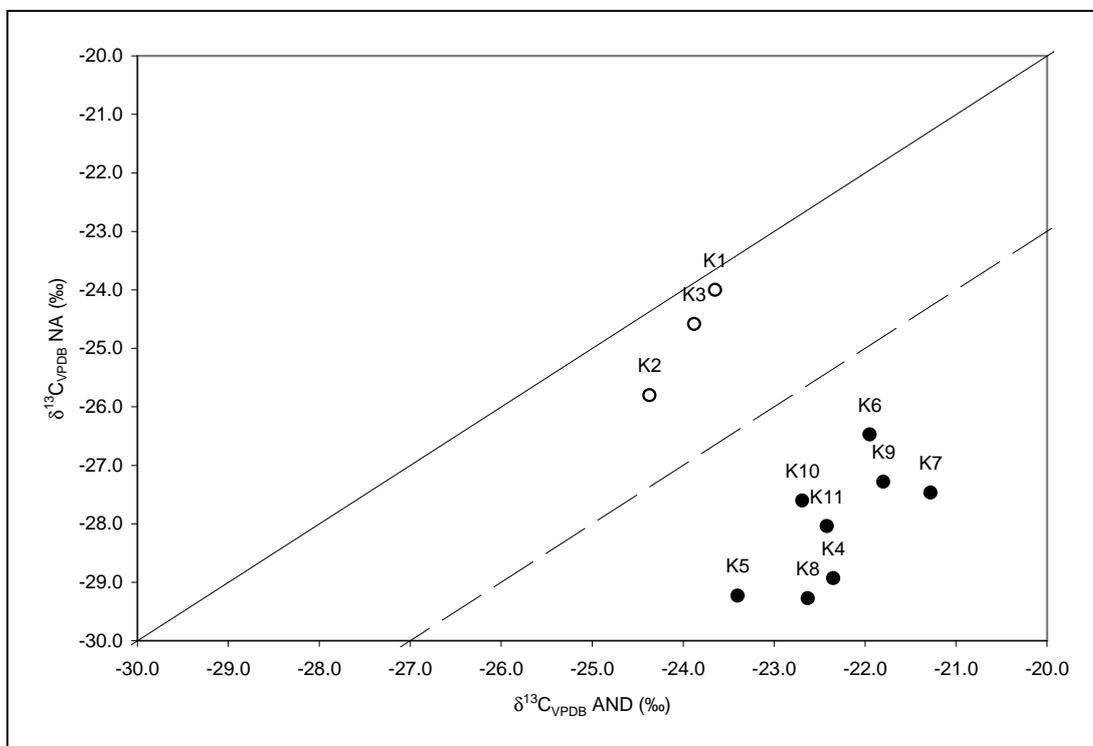


Abb. 81: $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von NA gegen die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von AND aus den Urinproben K1 bis K11 mit NA endogener Herkunft (○) oder exogener Herkunft (●)

Wenn NA ein ähnliches $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis wie AND aufweist (gekennzeichnet durch die durchgezogene Linie), wird der Ursprung des NA als endogen bewertet. Ist der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert von NA hingegen mehr als 3‰ leichter als der von AND (vgl. WADA 2004a, gekennzeichnet durch die gestrichelte Linie), wird von einer exogenen NA-Quelle ausgegangen.

Die Proben K1 bis K3 mit durch Schwangerschaft hervorgerufenem NA (○) befinden sich nahe der durchgezogenen Linie. Die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von AND

und NA unterscheiden sich dementsprechend kaum, so dass die endogene Herkunft des NA erkennbar ist.

Die Proben K4 bis K11 (●) weisen aufgrund der Gabe von 19-Norandrost-4-en-3 β ,17 β -diol bzw. 19-Norandrost-4-en-3,17-dion exogenes NA auf (Schrader und Schänzer 2004; Schrader *et al.* 2006). Die entsprechenden $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte dieser Proben liegen außerhalb der gestrichelten Linie, so dass die exogene Herkunft des NA festzustellen ist.

In Abb. 82 sind die $\Delta\delta$ -Werte zwischen NA und AND gegen die NA-Konzentration der Kontrollproben dargestellt.

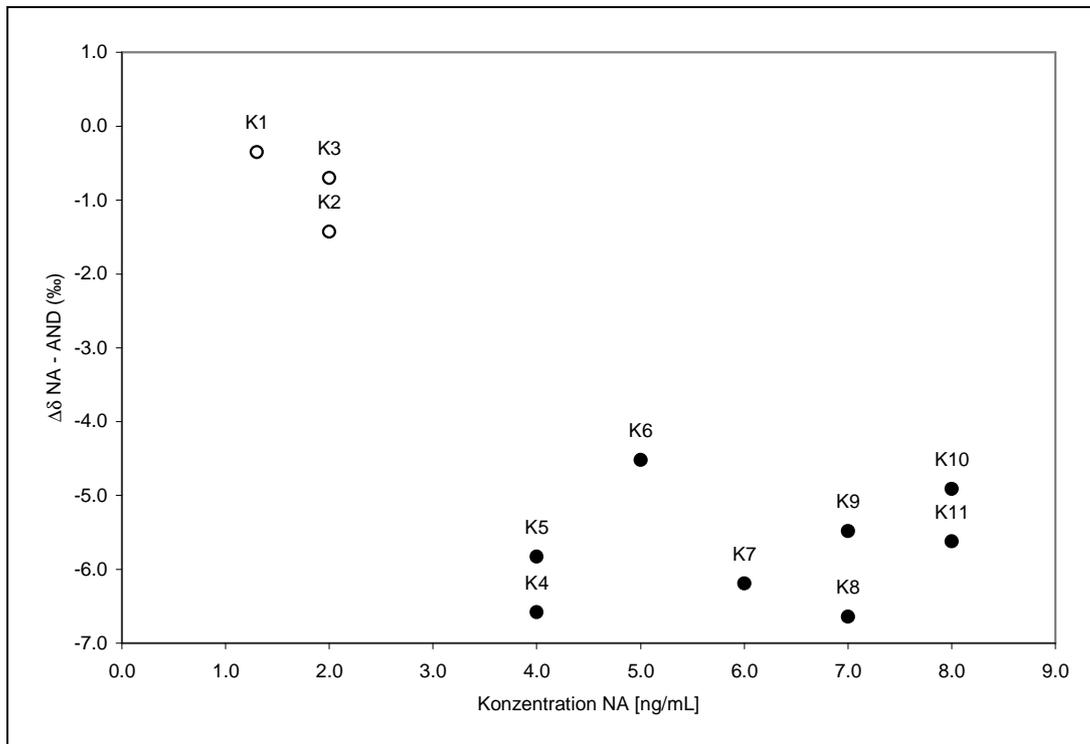


Abb. 82: $\Delta\delta$ -Werte zwischen NA und AND der Kontrollproben K1 bis K11 mit bekannter endogener (○) oder exogener (●) NA-Herkunft gegen die NA-Konzentration

Bei den Proben K1 bis K3 mit durch Schwangerschaft hervorgerufener endogener NA-Herkunft (○) wird eine Konzentration von 2 ng/mL nicht überschritten. Die Differenz der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte beträgt maximal 1,4‰ (Probe K2).

Die Proben K4 bis K11 mit exogener NA-Herkunft (●) weisen Konzentrationen zwischen 4 ng/mL und 8 ng/mL auf. Die entsprechende Differenz zwischen NA und AND beträgt in keinem Falle weniger als 4,5‰ (Probe K6).

Anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen NA und AND sind beide Gruppen voneinander zu unterscheiden, so dass alle elf Proben mit bekannter NA-Quelle richtig zugeordnet werden.

5.4.5 Analyse von Dopingkontrollproben

Wie in Kap. 5.4 bereits erwähnt, ist das Phänomen der Demethylierungsaktivität im Urin äußerst selten und infolgedessen bezüglich Ursache und Mechanismus weitgehend unerforscht. Entsprechend ist die Erstellung eines Referenzbereichs für die $\Delta\delta$ -Werte zwischen NA und AND anhand einer Referenzgruppe schwerlich zu realisieren. Der Urin schwangerer Frauen kann zwar geeignete Mengen an endogenem NA aufweisen, jedoch ist die Zweckmäßigkeit einer solchen Referenzgruppe nicht gegeben, da keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die eine oder die andere Ursache für endogenes NA im Urin möglicherweise mit einem Isotopeneffekt behaftet ist. Die 25 in Tabelle 23 (S. 177) gezeigten Dopingkontrollproben sind auf die Demethylierungsaktivität getestet worden. Bei fünf Proben sowohl männlicher als auch weiblicher Athleten wurde sie nachgewiesen.

Tabelle 19 zeigt die entsprechenden $\Delta\delta$ -Werte zwischen NA und AND dieser fünf Proben.

Tabelle 19: $\Delta\delta$ -Werte zwischen NA und AND der Dopingkontrollproben, die Demethylierungsaktivität zeigen

Probe	$\Delta\delta$ NA – AND (‰)
H1 (1)	0,5
H1 (2)	-1,4
H14	0,5
H17	0,1
H21	-0,7
H22	-0,4
Gesamt	-0,2 (\pm 0,7)

Alle Proben sind *Splitless* auf der Optima δ^3 GC-Säule gemessen. Zusätzlich ist die Probe H1 wiederholt mittels CoC-Injektor auf der HP-5MS GC-Säule analysiert.

Bei keiner der Proben ist eine deutliche Differenz zwischen den $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werten von NA und AND zu verzeichnen. Der niedrigste $\Delta\delta$ -Wert beträgt -1,4‰ bei der wiederholten Analyse der Probe H1. Im Durchschnitt ist NA 0,2‰ (\pm 0,7‰; $N = 6$) leichter als AND. Die Demethylierungsreaktion vom AND zum NA ist hier mit keinem deutlichen Isotopeneffekt behaftet und die Herkunft von NA ist in diesen Proben offensichtlich endogen.

Abb. 83 zeigt die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von NA und AND aller 25 Dopingkontrollproben.

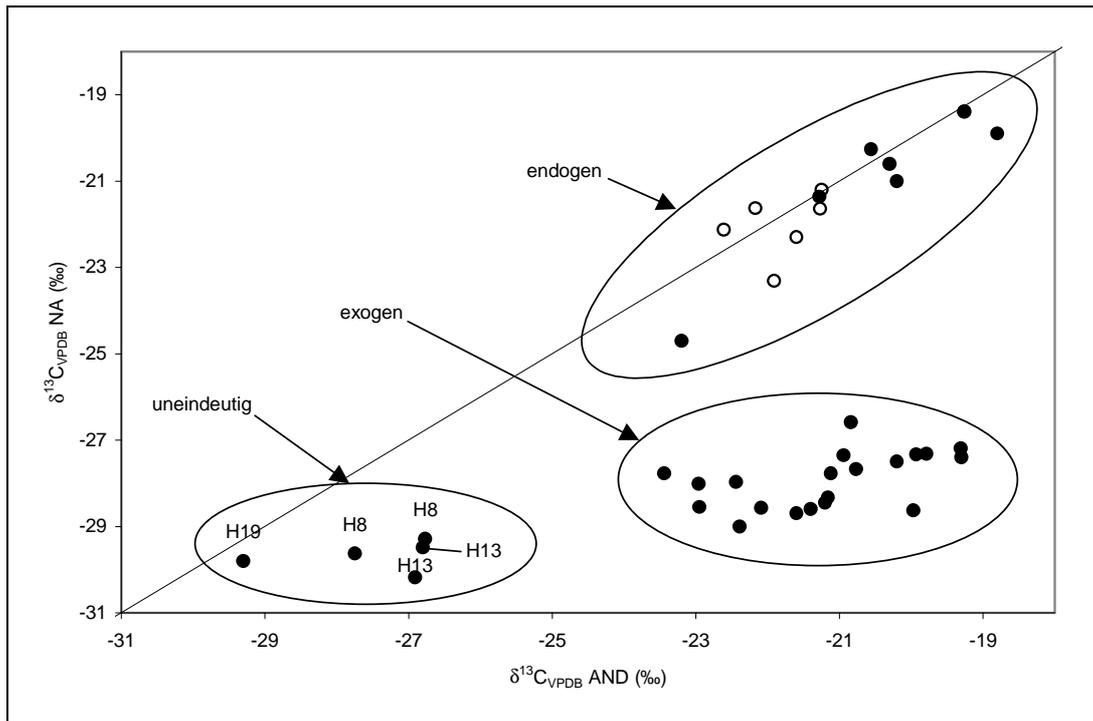


Abb. 83: $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von NA gegen die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von AND von 25 Dopingkontrollproben ohne (●) oder mit (○) Demethylierungsaktivität; 13 Proben wurden wiederholt unter veränderten GC/C/IRMS-Bedingungen analysiert; die Ellipsen zeigen die vermutliche Einteilung in endogene, exogene oder uneindeutige NA-Herkunft

Es wird zwischen Proben ohne (●) und Proben mit (○) Demethylierungsaktivität unterschieden. Die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von NA endogener Herkunft werden wieder ähnlich wie die von AND erwartet (gekennzeichnet durch die durchgezogene Linie). Dreizehn der 25 Dopingkontrollproben sind wiederholt aufgearbeitet und unter veränderten GC/C/IRMS-Bedingungen analysiert worden (vgl. Kap. 5.4.3).

Die Proben können offensichtlich in drei verschiedene Gruppen unterteilt werden. Sie sind durch Ellipsen gekennzeichnet, die hier keine Referenzbereiche darstellen, sondern die Zugehörigkeit der Proben zur jeweiligen Gruppe verdeutlichen.

Die erste Gruppe umfasst insgesamt zehn verschiedene Proben (H1, H3, H4, H14, H16-H18, H20, H21 und H22) sowohl von männlichen als auch von weiblichen Athleten. Drei der Proben sind wiederholt aufgearbeitet und analysiert. AND zeigt hier erkennbar endogene $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte in Abhängigkeit der Ernährung jedes einzelnen Athleten zwischen etwa -23‰ und -19‰. Die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von NA weisen im Vergleich nur geringe Unterschiede zum ERC auf. Die fünf Proben, bei denen eine Demethylierungsaktivität nachgewiesen ist, befinden sich in dieser Gruppe, während die Aktivität bei den anderen fünf Proben dieser Gruppe (ebenfalls von männlichen und weiblichen Athleten) nicht nachgewiesen werden kann. NA hat

in diesen zehn Proben offensichtlich einen endogenen Ursprung, so dass ein Dopingvergehen als Ursache für den NA-Nachweis ausgeschlossen wird.

Die zweite Gruppe umfasst insgesamt zwölf Dopingkontrollproben (H2, H5–H7, H9–H12, H15, H23–H25), von denen acht wiederholt aufgearbeitet und analysiert sind. Sie stammen von elf Athleten männlichen Geschlechts, während bei einem Athleten das Geschlecht nicht bekannt ist. Bei keiner dieser Proben ergab der Test auf Demethylierungsaktivität ein positives Resultat. Diese Proben weisen ähnliche $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse für AND auf wie die erste Gruppe. Die entsprechenden $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte für NA zwischen $-26,6\text{‰}$ und $-29,0\text{‰}$ hingegen sind hier deutlich negativer als für den ERC. Sie sind offensichtlich durch die Applikation von Steroiden beeinflusst, so dass die exogene Herkunft von NA und damit ein Dopingvergehen in diesen Proben nachgewiesen ist.

Die dritte Gruppe umfasst die Proben H8 und H13 (jeweils doppelt) sowie H19 sowohl von männlichen als auch von weiblichen Athleten. Bei keiner dieser Proben ist eine Demethylierungsaktivität nachgewiesen. AND und NA weisen jeweils $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte zwischen etwa -27‰ und -30‰ auf und unterscheiden sich entsprechend nicht deutlich voneinander. Der Grund für die abgereicherten Isotopenverhältnisse des AND besteht darin, dass sie in diesen Proben bereits durch Doping mit anderen Steroiden beeinflusst sind (unveröffentlichte Daten) und somit keine endogenen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse mehr aufweisen. Obwohl die Proben in dieser Gruppe die niedrigsten $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte für NA aufweisen, ist dessen Herkunft anhand des Vergleichs mit AND als ERC nicht eindeutig feststellbar. Anhand des Vergleichs mit nicht beeinflussten Steroiden als ERC hingegen ist ein Dopingvergehen sowohl über die exogene Herkunft des AND als auch über die ursprünglich exogene Herkunft des NA durchaus zu erkennen. Lediglich die Unterscheidung zwischen einer physiologischen Ursache für urinäres NA und der Applikation von 19-Norsteroiden ist auf diese Weise nicht möglich.

Bei den Proben H8 und H13 wird die missbräuchliche Anwendung von zu AND verstoffwechselter Steroiden auch anhand des Vergleichs mit ETIO deutlich. Während dieser Analyt normalerweise einen um etwa $0,9\text{‰}$ ($\pm 0,6\text{‰}$; $N = 33$) leichteren Wert als AND aufweist, ist dies bei den Proben H8 und H13 umgekehrt. Bei Probe H8 ist AND $2,2\text{‰}$ ($\pm 0,3\text{‰}$; $N = 2$) leichter als ETIO und bei Probe H13 sogar $7,0\text{‰}$ ($\pm 0,2\text{‰}$; $N = 2$) leichter. Es ist bekannt, dass die Applikation vor allem von 5α -Dihydrotestosteron aber auch von anderen natürlichen Steroiden wie

Testosteron zunächst zu den 5α -Metaboliten wie AND führt, während die 5β -Metaboliten noch weitgehend unbeeinflusst sein können (u.a. Geyer *et al.* 1996a; Geyer *et al.* 1996b). Entsprechendes spiegelt sich hier in den unterschiedlich stark beeinflussten Isotopenverhältnissen von AND und ETIO wieder. Für den Nachweis der Applikation von an Position 19 demethylierten Androgenen wäre folglich bei den Proben H8 und H13 der Vergleich der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von NE mit ETIO als ERC vielversprechend. Der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert von NE wird nach besagter Applikation ähnlich erwartet wie der des NA, während ETIO hingegen weiterhin überwiegend endogene Werte zeigt. Umgekehrt wäre ein entsprechend schweres $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von NE ein Hinweis auf die physiologische Bildung der 19-Norsteroide.

Bei Probe H19 würde aus diesem Vergleich keine Möglichkeit eines entsprechenden Nachweises resultieren, da AND und ETIO bereits ähnlich abgereicherte $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte aufweisen und somit in keinem Falle eine signifikante Differenz zwischen NE und ETIO zu erwarten ist.

Abb. 84 zeigt die $\Delta\delta$ -Werte zwischen NA und AND der Dopingkontrollproben gegen die ggf. dichtekorrigierte NA-Konzentration (vgl. WADA 2004b).

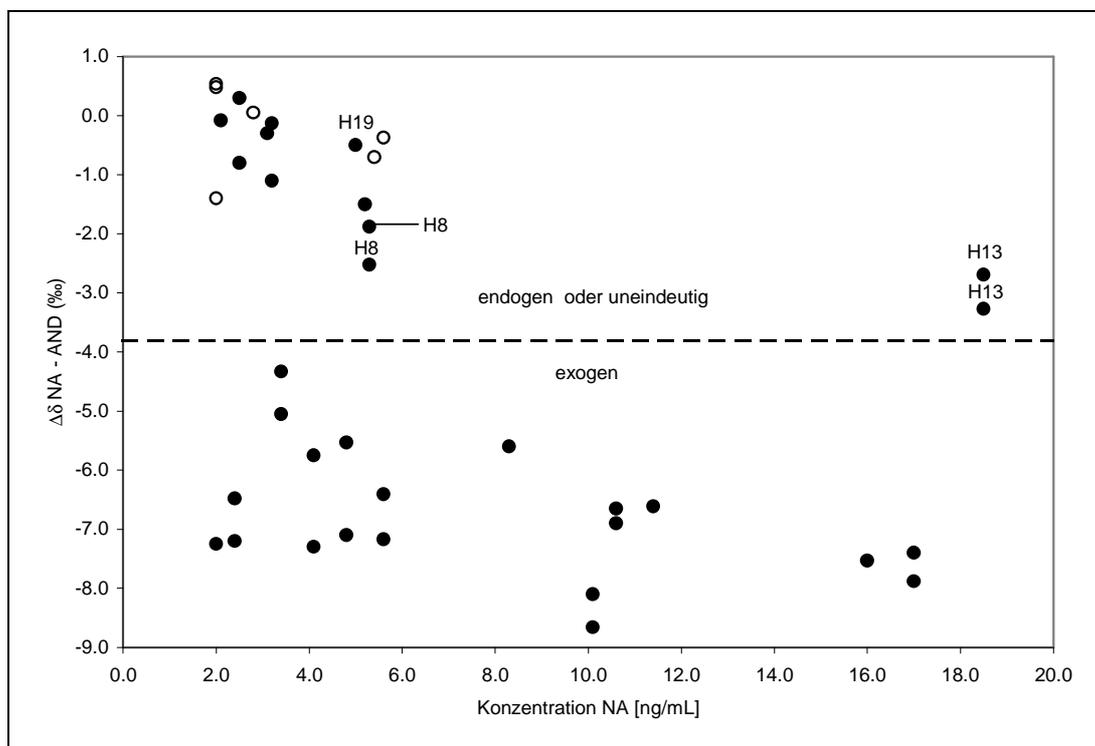


Abb. 84: $\Delta\delta$ -Werte zwischen NA und AND gegen die NA-Konzentration der 25 Dopingkontrollproben (13 wiederholt) ohne (●) oder mit (○) Demethylierungsaktivität; $\Delta\delta$ -Werte unterhalb eines möglichen Entscheidungskriteriums von $-3,8\text{‰}$ (gestrichelte Linie) indizieren exogene, diejenigen oberhalb endogene oder uneindeutige Herkunft von NA

Es wird wieder zwischen Proben ohne (●) und Proben mit (○) Demethylierungsaktivität unterschieden. $\Delta\delta$ -Werte unterhalb eines möglichen Entscheidungskriteriums von -3,8‰ (gestrichelte Linie) indizieren exogene Herkunft von NA, während die Werte oberhalb als endogen oder uneindeutig erachtet werden. Dieses Kriterium ist aufgrund der niedrigen NA-Konzentration und der damit verbundenen schlechteren Präzision etwas größer ausgewählt als das der WADA (3‰, s. WADA 2004a).

Die Proben H8, H13 und H19 mit uneindeutiger NA-Herkunft befinden sich oberhalb dieses Limits.

Die zehn Proben mit offensichtlich endogener NA-Herkunft befinden sich ebenfalls oberhalb dieses möglichen Kriteriums. Sie weisen maximale Konzentrationen von 5,2 ng/mL (keine Demethylierungsaktivität) bzw. 5,6 ng/mL (nachgewiesene Demethylierungsaktivität) auf. Die $\Delta\delta$ -Werte dieser Proben liegen zwischen 0,5‰ und -1,5‰. Entsprechend ist auch das von der WADA gegebene Kriterium einer Differenz von mehr als 3‰ nicht überschritten.

Die zwölf Proben mit offensichtlich exogener NA-Herkunft werden weitgehend über den gesamten Konzentrationsbereich zwischen 2 ng/mL und 16,5 ng/mL identifiziert. Die $\Delta\delta$ -Werte dieser Proben weisen Beträge zwischen 4,3‰ und 8,7‰ auf und befinden sich somit unterhalb des möglichen Entscheidungskriteriums.

6 Zusammenfassung

Natürliche Steroide können proteinanabole Wirkung aufweisen, weshalb sie in der Viehwirtschaft oder im Leistungssport missbräuchlich angewendet werden. Dies ist zum einen innerhalb der Europäischen Union als Masthilfsmittel bei Tieren verboten und gilt zum anderen im Sport als Doping.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die komponentenspezifische Isotopenverhältnismassenspektrometrie des Kohlenstoffs eingesetzt, um einerseits aus dem Urin den Nachweis der missbräuchlichen Anwendung von Testosteron und Estradiol in der Rindermast zu erbringen und andererseits die endogene oder exogene Herkunft urinären Norandrosterons in Dopingkontrollproben festzustellen, um somit Doping von physiologischen Ursachen zu unterscheiden.

Die Bestimmung der endogenen oder exogenen Herkunft der Zielanalyten gelingt anhand der Analyse der $\Delta\delta$ -Werte zwischen den Metaboliten missbräuchlich anwendbarer anaboler Steroide und geeigneten endogenen Referenzverbindungen.

6.1 Nachweis des Missbrauchs von Testosteron und Estradiol in der Rindermast

Um geeignete Zielanalyten auszuwählen, wurden Ausscheidungsversuche mit 17β -Estradiol und Testosteron quantitativ analysiert.

Dehydroepiandrosteron und Androst-5-en- $3\beta,17\alpha$ -diol zeigten bei Applikation von Testosteron und 17β -Estradiol unbeeinflusste Konzentrationen. Diese beiden Steroide wurden demzufolge als endogene Referenzverbindungen bestimmt.

Etiocholanolon, 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol und 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol zeigten nach Testosteron-Gabe im Vergleich zu den endogenen Referenzverbindungen deutlich erhöhte Konzentrationen. Entsprechend wurden diese Steroide als Zielverbindungen bestimmt, die nach Testosteron-Applikation ggf. exogene $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte aufweisen. Die literaturbekannten Testosteron-Metaboliten Epitestosteron und Epiandrosteron zeigten nach Testosteron-Applikation wenig ausgeprägte Konzentrationsänderungen, wurden aber in der Methodenentwicklung berücksichtigt.

17α -Estradiol zeigte nach Applikation von 17β -Estradiol im Vergleich zu den endogenen Referenzverbindungen deutlich erhöhte Konzentrationen. Folglich wurde es als Zielanalyt bestimmt, der nach Gabe von 17β -Estradiol ggf. exogene $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte aufweist.

Basierend auf den Konzentrationen der Zielanalyten wurde sich für ein Aufarbeitungsvolumen von 20 mL Urin entschieden.

Zur Hydrolyse der Steroidkonjugate wurden zwei Strategien miteinander verglichen. Die enzymatische Hydrolyse der Steroid-glucuronide mit β -Glucuronidase von *Escherichia Coli* und anschließender chemischer Hydrolyse der Sulfatkonjugate erwies sich gegenüber der kombinierten Hydrolyse mit einer Enzymlösung von *Helix Pomatia* mit Glucuronidase- und Sulfataseaktivität als vorteilhaft.

Nach einer Umkehr-Phasen Festphasenextraktion wurden die Proben mittels flüssig/flüssig Extraktion bei verschiedenen pH-Werten in Androgene, Estrogene und Sulfatkonjugate aufgeteilt. Die letztgenannten wurden darauf folgend chemisch hydrolysiert.

Ein zunächst durchgeführter Aufreinigungsschritt mittels Normal-Phasen Festphasenextraktion wurde im Verlauf der Methodenentwicklung überprüft. Er wurde schließlich aus der Methode entfernt, da dies zum einen zu kaum saubereren Extrakten und zum anderen zum Verlust des 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diols führte.

Die semipräparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie stellt in der Aufarbeitung einen Schlüsselschritt dar. Aufgrund eines hohen Anteils unpolarer Matrixkomponenten und unzureichender Aufreinigung war dieser Schritt auf Umkehrphasen-Material zunächst ungeeignet. Die Aufreinigung unter Normal-Phasen Bedingungen auf Aminopropyl-Material führte hingegen zu saubereren Extrakten. Diese Phase konnte allerdings nicht eingesetzt werden, da sich unter den gegebenen Bedingungen Kondensationsprodukte zwischen den Zielverbindungen und den primären Amino-Gruppen der stationären Phase bilden und diese somit chemisch nicht inert gegenüber den Zielanalyten ist. Schließlich wurde eine Dimethylaminopropyl-Phase unter Normal-Phasen Bedingungen eingesetzt. Zum einen ist eine chemische Reaktion mit den Zielverbindungen nicht möglich und zum anderen wurde eine mit der Aminopropyl-Phase vergleichbare Aufreinigung erzielt.

Im Anschluss wurden die verschiedenen Extrakte zur Verbesserung der gaschromatographischen Eigenschaften der Zielanalyten acetyliert. Die Verwendung von Acetanhydrid als Derivatisierungsreagenz erwies sich als kritisch. Neben der erwünschten Acetylierung der Zielanalyten führte Acetanhydrid unterschiedlicher kommerzieller Quellen zu Nebenprodukten, die als Steroid-acetessigester identifiziert wurden. Reste an Diketen im Derivatisierungsreagenz aus dessen Produktion würden die Bildung der Nebenprodukte erklären. Durch Zugabe von Wasser zum

Acetanhydrid und darauf folgende Destillation wurde die Bildung der Nebenprodukte bei der Acetylierung beseitigt.

Während die Fraktionen der Acetate von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol aus den Androgenen, von 17α -Estradiol aus den Estrogenen und von Dehydroepiandrosteron sowie Epiandrosteron aus den Sulfatkonjugaten für die abschließende Analyse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse ausreichend aufgereinigt waren, zeigte die gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse der verbliebenen Androgen-Fraktion eine störende Koelution zwischen den Acetaten von 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol und Androst-5-en- $3\beta,17\alpha$ -diol.

Die semipräparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie dieser Fraktion auf Umkehrphasen-Material führte zu ausreichender Aufreinigung der verbliebenen acetylierten Zielanalyten von Etiocholanolon, Epiandrosteron, 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol und Androst-5-en- $3\beta,17\alpha$ -diol.

Somit ermöglicht die Probenaufarbeitung die komponentenspezifische Analyse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse der acetylierten Zielanalyten aus dem Rinderurin mittels Gaschromatographie/Verbrennung/Isotopenverhältnismassenspektrometrie.

Es zeigte sich, dass die Präzision der wiederholten Analyse der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte acetylierter Standards abhängig von der jeweiligen Verbindung ist. Die Schwankungsbreite der Standardabweichungen betrug zwischen 0,3‰ für 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat und 1,1‰ für 17α -Estradiol-diacetat.

Die Präzision der Analyse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse der Zielanalyten in biologischen Proben hingegen ist weitgehend unabhängig von den einzelnen Verbindungen und war kleiner oder gleich 0,5‰. Lediglich die wiederholte Analyse des Epiandrosteron-acetats zeigte aufgrund der im Vergleich zum in derselben Fraktion vorhandenen Dehydroepiandrosteron niedrigeren Konzentration eine schlechtere Präzision von 1,0‰.

Eine Korrektur der einzelnen $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte aufgrund der bei der Acetylierung neu eingeführten Kohlenstoffatome wurde dadurch umgangen, dass einerseits die mono-acetylierten Metaboliten von Etiocholanolon, Epiandrosteron sowie Epiandrosteron mit dem mono-acetylierten Dehydroepiandrosteron als endogener Referenzverbindung und andererseits die bis-acetylierten Metaboliten von 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol, 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol sowie 17α -Estradiol-diacetat mit dem bis-acetylierten Androst-5-en- $3\beta,17\alpha$ -diol als endogener Referenzverbindung verglichen wurden.

Um anhand der auf diese Weise gebildeten $\Delta\delta$ -Werte auf endogene oder exogene Herkunft der Metaboliten von Testosteron bzw. 17β -Estradiol schließen zu können, wurden Referenzbereiche für Urinproben unbehandelter Tiere nach Maßgabe der *International Federation of Clinical Chemistry* erstellt.

Der Vergleich der ermittelten $\Delta\delta$ -Werte mit den Referenzbereichen führte in keiner Probe eines unbehandelten Tiers zu einem falsch positiven Befund.

Grundsätzlich ist der Nachweis der Applikation von 17β -Estradiol oder Testosteron anhand dieser Methode durch die Nahrungsgrundlage der Tiere limitiert. Hoher Grasanteil führte teilweise zu endogenen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnissen, die im Bereich der applizierten Steroide lagen. Entsprechend konnten endogene und exogene Herkunft dann nicht mehr voneinander unterschieden werden.

Die Analyse der Urine von mit Testosteron behandelten weiblichen und kastrierten männlichen Tieren zeigte, dass der Nachweis dieser Applikation anhand des Vergleichs der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von Etiocholanolon-acetat mit Dehydroepiandrosteron-acetat am empfindlichsten gelingt. Bei der Probe eines Ochsen wurde die Testosteron-Gabe noch 44 Tage nach Applikation nachgewiesen.

Bei Proben von mit Testosteron behandelten nicht kastrierten männlichen Tieren konnte diese Applikation in der Regel nicht nachgewiesen werden. Einzig der Vergleich von Epiandrosteron-acetat mit Dehydroepiandrosteron-acetat führte in einem Fall zu einem positiven Nachweis, obwohl die Konzentration dieses Testosteron-Metaboliten für eine valide Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses häufig zu gering war. Ursächlich für diese falsch negativen Ergebnisse war der hier im Vergleich zu den weiblichen Tieren und Ochsen höhere endogene Anteil an Testosteron-Metaboliten. Die Wahrscheinlichkeit eines Missbrauchs von Testosteron bei nicht kastrierten männlichen Tieren ist allerdings aufgrund mangelnder Rentabilität im Vergleich zu den anderen Tieren am geringsten.

Die Gabe von 17β -Estradiol wurde bei Proben von nicht kastrierten männlichen und weiblichen Rindern sowie von Ochsen anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen 17α -Estradiol-diacetat und Androst-5-en- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat nachgewiesen. Der Nachweis dieser Applikation gelang bei männlichen Tieren bis zu drei Wochen nach Medikation und war dann durch die Konzentration des 17α -Estradiols limitiert. Zudem wurde anhand der exogenen Herkunft von 17α -Estradiol nach Testosteron-Applikation festgestellt, dass 17α -Estradiol ein Metabolit des Testosterons sein kann.

Abschließend ist festzustellen, dass die entwickelte Methode geeignet ist, die endogene oder exogene Herkunft der identifizierten Metaboliten von Testosteron und 17 β -Estradiol zu bestimmen und somit deren missbräuchliche Anwendung in der Rindermast aus dem Urin nachzuweisen.

6.2 Herkunftsbestimmung von urinärem Norandrosteron in der Dopinganalytik

Die wichtigsten Zielanalyten zur Bestimmung der endogenen oder exogenen Herkunft des 19-Norandrosterons sind das 19-Norandrosteron selbst als ggf. exogener Metabolit künstlicher 19-Norsteroiden und das Androsteron als endogene Referenzverbindung.

Bei der angewendeten Methode findet zu Anfang eine Festphasen-Extraktion von 10 mL der Urinproben auf Umkehrphasen-Material statt, gefolgt von einer enzymatischen Hydrolyse der Steroid-glucuronide und anschließender flüssig/flüssig-Extraktion. Die eigentliche Aufreinigung der Zielanalyten basiert auf den beiden für die Rindermethode entwickelten Fraktionierungen mittels semipräparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zunächst auf Dimethylaminopropyl-Material und dann auf Umkehrphasen-Material. Neben 19-Norandrosteron und Androsteron wird ebenfalls das Etiocholanolon als weiterer Analyt aufgereinigt.

Die Aufarbeitung ermöglicht spezifisch die Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von 19-Norandrosteron, Androsteron und Etiocholanolon mittels Gaschromatographie/Verbrennung/Isotopenverhältnismassenspektrometrie.

Der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert des als Glucuronid zu Blankurinen zugesetzten 19-Norandrosteron-Standards wurde unabhängig von seiner Konzentration zwischen 2 ng/mL und 8 ng/mL wiederholbar bestimmt ($-26,7\text{‰} \pm 0,6\text{‰}$; $N = 28$).

Anhand der wiederholten Analyse von Dopingkontrollproben wurde eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der Zielanalyten unter Verwendung verschiedener Injektionstechniken und Gaschromatographie-Säulen erreicht.

In Kontrollproben wurde die bekannt endogene oder exogene Herkunft des 19-Norandrosterons anhand der $\Delta\delta$ -Werte zwischen 19-Norandrosteron und Androsteron richtig bestimmt.

Dopingkontrollproben, bei denen eine Demethylierungsaktivität festgestellt wurde, zeigten für 19-Norandrosteron und Androsteron weitgehend identische $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte und damit endogene Herkunft für den Nandrolon-Metaboliten. Daraus wurde

geschlossen, dass die zu Grunde liegende Demethylierungsreaktion mit keinem deutlichen Isotopeneffekt behaftet ist.

Dopingkontrollproben, die keine Demethylierungsaktivität zeigten, wurden anhand der Analyse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse in drei Gruppen unterteilt.

Bei der ersten Gruppe zeigten sowohl Androsteron als auch 19-Norandrosteron ähnliche $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte, was auf die endogene Herkunft des Metaboliten schließen ließ. In diesen Proben konnte somit ein Dopingvergehen als Ursache für den Nachweis urinären 19-Norandrosterons ausgeschlossen werden.

Die höchste Konzentration an 19-Norandrosteron endogenen Ursprungs betrug 5,2 ng/mL, ohne dass eine Demethylierungsaktivität nachgewiesen wurde bzw. 5,6 ng/mL bei entsprechender Aktivität.

Es ist zu erwähnen, dass 19-Norandrosteron endogenen Ursprungs in Proben mit und ohne Demethylierungsaktivität sowohl weiblicher als auch männlicher Athleten analysiert wurde. Somit kann kein Zusammenhang zwischen dem Geschlecht des jeweiligen Athleten und der Herkunft des 19-Norandrosterons festgestellt werden.

Die zweite Gruppe zeigte für 19-Norandrosteron im Vergleich zum Androsteron deutlich abgereicherte $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse. Die Herkunft des Metaboliten wurde anhand der entsprechenden $\Delta\delta$ -Werte als eindeutig exogen bestimmt, wodurch ein Dopingvergehen nachgewiesen wurde.

Bei der dritten Gruppe handelte es sich um Proben, bei denen die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von Androsteron bereits durch die Einnahme von Steroiden exogene Werte zeigten. Die Bildung der $\Delta\delta$ -Werte zwischen 19-Norandrosteron und Androsteron ließ entsprechend nicht eindeutig auf exogene oder endogene Herkunft schließen. So ist der Ursprung des 19-Norandrosterons zwar anhand des Vergleichs mit anderen endogenen Referenzverbindungen als exogen bestimmbar; physiologische Ursachen wie die Demethylierungsaktivität können jedoch nicht mehr eindeutig von einem Dopingvergehen mit 19-Norsteroiden unterschieden werden.

Zusammenfassend ist die angewendete Methode geeignet, die Herkunft urinären 19-Norandrosterons in Dopingkontrollproben als endogen oder exogen zu bestimmen, um somit ein Dopingvergehen von physiologischen Ursachen zu unterscheiden.

7 Literaturverzeichnis

- Abe, I.; Rohmer, M.; Prestwich, G.D. (1993).** Enzymatic Cyclization of Squalene and Oxidosqualene to Sterols and Triterpenes. *Chem Rev*, **93**(6): 2189-2206.
- Allison, C.E.; Francey, R.J.; Krummel, P.B. (24.04.2003).** $\delta^{13}\text{C}$ in CO_2 from Sites in the CSIRO Atmospheric Research GASLAB Air Sampling Network. *In Trends: A Compendium of Data on Global Change*. 18.10.2006, http://cdiac.esd.ornl.gov/trends/co2/allison-csiro/allcsiro_gaslab.html
- Analytical Methods Committee (2002).** Technical Brief No. 9: A Simple Fitness-for-Purpose Control Chart Based on Duplicate Results Obtained from Routine Test Materials. *amc technical brief*, **9**.
- Angeletti, R.; Contiero, L.; Gallina, G.; Montesissa, C. (2006).** The Urinary Ratio of Testosterone to Epitosterone: A Good Marker of Illegal Treatment also in Cattle? *Vet Res Commun*, **30**: 127-131.
- Arts, C.J.; van Baak, M.J.; Vandenberg, H.; Schilt, R.; Berende, P.L.M.; den Hartog, J.M. (1990).** Concentrations of the Endogenous Steroid-Hormones Estradiol-17-Beta, Testosterone and Progesterone in Veal Calves in Connection with the Control for Illegal Administration. *Arch. Lebensmittelhyg.*, **41**(3): 58-62.
- Arts, C.J.; van Baak, M.J.; den Hartog, J.M. (1991).** Control System for Detection of the Illegal Use of Naturally Occurring Steroids in Calves. *J Chromatogr*, **564**(2): 429-444.
- Ayotte, C.; Guay, C.; Cl  roux, M.; Goudreault, D.; Fakirian, A. (2002).** Origin of Elevated Levels of Norandrosterone in Human Urine: Half-Truths vs. Facts. *In Recent Advances in Doping Analysis. Proceedings of the Manfred Donike Workshop. 20th Cologne Workshop on Dope Analysis, 10th to 15th March 2002.* Sport und Buch Strau  , K  ln. pp. 13-21.
- Balizs, G.; Jainz, A.; Horvatovich, P. (2005).** Investigation of the Feeding Effect on the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotope Ratio of the Hormones in Bovine Urine Using Gas Chromatography/Combustion Isotope Ratio Mass Spectrometry. *J Chromatogr A*, **1067**(1-2): 323-330.
- Barrie, A.; Bricout, J.; Kozi  t, J. (1984).** Gas-Chromatography - Stable Isotope Ratio Analysis at Natural Abundance Levels. *Biomed Mass Spectrom*, **11**(11): 583-588.
- Baumann, P.Q.; Ebenstein, D.B.; O'Rourke, B.D.; Nair, K.S. (1992).** High-Performance Liquid-Chromatographic Technique for Non-Derivatized Leucine Purification - Evidence for Carbon Isotope Fractionation. *J Chromatogr-Biomed*, **573**(1): 11-16.
- Baume, N.; Avois, L.; Schweizer, C.; Cardis, C.; Dvorak, J.; Cauderay, M.; Mangin, P.; Saugy, M. (2004).** ^{13}C Nandrolone Excretion in Trained Athletes: Interindividual Variability in Metabolism. *Clin Chem*, **50**(2): 355-364.
- Becchi, M.; Aguilera, R.; Farizon, Y.; Flament, M.-M.; Casabianca, H.; James, P. (1994).** Gas Chromatography/Combustion/Isotope-Ratio Mass Spectrometry Analysis of Urinary Steroids to Detect Misuse of Testosterone in Sport. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **8**: 304-308.
- Beerling, D.J.; Royer, D.L. (2002).** Fossil Plants as Indicators of the Phanerozoic Global Carbon Cycle. *Annu Rev Earth Pl Sc*, **30**: 527-556.
- Bender, M.M. (1968).** Mass Spectrometric Studies of Carbon 13 Variations in Corn and Other Grasses. *Radiocarbon*, **10**(2): 468-472.

- Bender, M.M. (1971).** Variations in C-13/C-12 Ratios of Plants in Relation to Pathway of Photosynthetic Carbon Dioxide Fixation. *Phytochemistry*, **10**(6): 1239-1244.
- Bradlow, H.L. (1970).** The Hydrolysis of Steroid Conjugates. *In* Chemical and biological aspects of steroid conjugation. Springer Verlag, New York. pp. 132-181.
- Brand, W.A.; Tegtmeier, A.R.; Hilkert, A. (1994).** Compound-Specific Isotope Analysis - Extending Toward N-15 N-14 and O-18 O-16. *Org Geochem*, **21**(6-7): 585-594.
- Brand, W.A. (1996).** High Precision Isotope Ratio Monitoring Techniques in Mass Spectrometry. *J Mass Spectrom*, **31**(3): 225-235.
- Bricout, V.; Wright, F. (2004).** Update on Nandrolone and Norsteroids: How Endogenous or Xenobiotic are these Substances? *Eur J Appl Physiol*, **92**(1-2): 1-12.
- Butenandt, A.; Tscherning, K. (1934).** Beiträge zur Konstitutionsermittlung des Follikelhormones. *Z Physiol Chem*, **229**: 167-182.
- Caimi, R.J.; Brenna, J.T. (1997).** Quantitative Evaluation of Carbon Isotopic Fractionation during Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J Chromatogr A*, **757**(1-2): 307-310.
- Craig, H. (1953).** The Geochemistry of the Stable Carbon Isotopes. *Geochim Cosmochim Acta*, **3**(2-3): 53-92.
- Craig, H. (1954).** Carbon-13 in Plants and the Relationships between Carbon-13 and Carbon-14 Variations in Nature. *J Geol*, **62**(2): 115-149.
- Craig, H. (1957).** Isotopic Standards for Carbon and Oxygen and Correction Factors for Mass-Spectrometric Analysis of Carbon Dioxide. *Geochim Cosmochim Acta*, **12**(1-2): 133-149.
- de Boer, D.; de Jong, E.; Maes, R.A.; van Rossum, J.M. (1988).** The Problems of Oral Contraceptives in Dope Control of Anabolic Steroids. *Biomed Environ Mass Spectrom*, **17**(2): 127-128.
- de Geus, B.; Delbeke, F.; Meeusen, R.; Van Eenoo, P.; De Meirleir, K.; Busschaert, B. (2004).** Norandrosterone and Noretiocholanolone Concentration Before and After Submaximal Standardized Exercise. *Int J Sports Med*, **25**(7): 528-532.
- de la Torre, X.; Gonzalez, J.C.; Pichini, S.; Pascual, J.A.; Segura, J. (2001).** C-13/C-12 Isotope Ratio MS Analysis of Testosterone, in Chemicals and Pharmaceutical Preparations. *J Pharmaceut Biomed*, **24**(4): 645-650.
- De Laeter, J.R.; Bohlke, J.K.; De Bièvre, P.; Hidaka, H.; Peiser, H.S.; Rosman, K.J.R.; Taylor, P.D.P. (2003).** Atomic Weights of the Elements: Review 2000 - (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*, **75**(6): 683-800.
- Deutscher Wetterdienst. (2003a).** Der Rekordsommer 2003. 12.06.2007, http://www.dwd.de/de/FundE/Klima/KLIS/prod/spezial/temp/Rekordsommer_2003.pdf
- Deutscher Wetterdienst. (2003b).** Jahresübersicht 2003. 12.06.2007, http://www.dwd.de/de/wir/Geschaeftsfelder/Medien/Leistungen/GWL/2002/2003/index_jahresbericht2003.html
- Deutscher Wetterdienst. (2005).** Jahresübersicht 2005. 12.06.2007, http://www.dwd.de/de/wir/Geschaeftsfelder/Medien/Leistungen/GWL/2002/2005/index_jahresbericht2005.html
- Docherty, G.; Jones, V.; Evershed, R.P. (2001).** Practical and Theoretical Considerations in the Gas Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass

- Spectrometry Delta C-13 Analysis of Small Polyfunctional Compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **15**(9): 730-738.
- Draisci, R.; Palleschi, L.; Ferretti, E.; Lucentini, L.; Cammarata, P. (2000).** Quantitation of Anabolic Hormones and their Metabolites in Bovine Serum and Urine by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr A*, **870**(1-2): 511-522.
- Emrich, K.; Vogel, J.C. (1970).** Carbon Isotope Fractionation During Precipitation of Calcium Carbonate. *Earth Planet Sc Lett*, **8**(5): 363-&.
- Europäische Kommission.** Hormone im Rindfleisch, Hintergrund und Chronologischer Abriss des WTO-Disput. 30.03.2006, http://europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/library/press/press57_de.pdf
- Farquhar, G.D.; O'Leary, M.H.; Berry, J.A. (1982).** On the Relationship between Carbon Isotope Discrimination and the Inter-Cellular Carbon-Dioxide Concentration in Leaves. *Aust J Plant Physiol*, **9**(2): 121-137.
- Farquhar, G.D. (1983).** On the Nature of Carbon Isotope Discrimination in C-4 Species. *Aust J Plant Physiol*, **10**(2): 205-226.
- Farquhar, G.D.; Richards, R.A. (1984).** Isotopic Composition of Plant Carbon Correlates with Water-Use Efficiency of Wheat Genotypes. *Aust J Plant Physiol*, **11**(6): 539-552.
- Farquhar, G.D.; Ehleringer, J.R.; Hubick, K.T. (1989).** Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. *Annu Rev Plant Phys*, **40**: 503-537.
- Ferchaud, V.; Le Bizec, B.; Monteau, F.; Andre, F. (1998).** Determination of the Exogenous Character of Testosterone in Bovine Urine by Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Analyst*, **123**(12): 2617-2620.
- Ferchaud, V.; Courcoux, P.; Le Bizec, B.; Monteau, F.; Andre, F. (2000a).** Enzymatic Hydrolysis of Conjugated Steroid Metabolites: Search for Optimum Conditions using Response Surface Methodology. *Analyst*, **125**(12): 2255-2259.
- Ferchaud, V.; Le Bizec, B.; Monteau, F.; Andre, F. (2000b).** Characterization of Exogenous Testosterone in Livestock by Gas Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry: Influence of Feeding and Age. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **14**(8): 652-656.
- Flenker, U.; Horning, S.; Nolteernsting, E.; Geyer, H.; Schänzer, W. (1999).** Measurement of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Ratios to Confirm Misuse of Endogenous Steroids. *In* Recent Advances in Doping Analysis. Proceedings of the Manfred Donike Workshop. 16th Cologne Workshop on Dope Analysis, 15th to 20th March 1998. Sport und Buch Strauß, Köln. pp. 243-256.
- Flenker, U.; Schänzer, W. (2003).** Expression of Differences in Isotopic Composition. *In* Recent Advances in Doping Analysis. Proceedings of the Manfred Donike Workshop. 21st Cologne Workshop on Dope Analysis, 16th to 21st March 2003. Sport und Buch Strauß, Köln. pp. 179-182.
- Flenker, U. 2006.** Vorrichtung und Verfahren zur Gaschromatographischen Trennung von Substanzen. Deutsche Patentanmeldung Nr. 10 2006 015 258.1.
- Flenker, U.; Hebestreit, M.; Piper, T.; Schänzer, W. (2006).** A New, Effective and Robust Method to Couple Gas Chromatography and Isotope Ratio Mass Spectrometry. *In* Recent Advances in Doping Analysis. Proceedings of the Manfred Donike Workshop. 24th Cologne Workshop on Dope Analysis, 4th to 9th June 2006. Sport und Buch Strauß, Köln. pp. 299-306.

- Flenker, U.; Hebestreit, M.; Piper, T.; Hülsemann, F.; Schänzer, W. (2007).** Improved Performance and Maintenance in Gas Chromatography/Isotope Ratio Mass Spectrometry by Precolumn Solvent Removal. *Anal Chem.*
- Forest, M. (1989).** Steroidhormone. *In Innere Medizin der Gegenwart in 14 Bänden. Band 4, Endokrinologie, Teil A: Grundlagen.* Urban&Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore. pp. 74-95.
- Gensler, M.; Rossmann, A.; Schmidt, H.L. (1995).** Detection of Added L-Ascorbic-Acid in Fruit Juices by Isotope Ratio Mass-Spectrometry. *J Agric Food Chem*, **43**(10): 2662-2666.
- Geyer, H.; Schänzer, W.; Mareck-Engelke, U.; Donike, M. (1996a).** Factors Influencing the Steroid Profile. *In Recent Advances in Doping Analysis. Proceedings of the 13th Cologne Workshop on Dope Analysis, 12th to 17th March 1995.* Sport und Buch Strauß, Köln. pp. 95-113.
- Geyer, H.; Schänzer, W.; Schindler, U.; Donike, M. (1996b).** Changes of the Urinary Steroidprofile after Sublingual Application of Dihydrotestosterone (DHT). *In Recent Advances in Doping Analysis. Proceedings of the 13th Cologne Workshop on Dope Analysis, 12th to 17th March 1995.* Sport und Buch Strauß, Köln. pp. 215-229.
- Gonfiantini, R.; Stichler, W.; Rozanski, K. (1995).** Standards and Intercomparison Materials Distributed by the International Atomic Energy Agency for Stable Isotope Measurements. *In Reference and intercomparison materials for stable isotopes of light elements.* International Atomic Energy Agency, Wien. pp. 13-29.
- Grosse, J.; Anielski, P.; Hemmersbach, P.; Lund, H.; Mueller, R.K.; Rautenberg, C.; Thieme, D. (2005).** Formation of 19-Norsteroids by In Situ Demethylation of Endogenous Steroids in Stored Urine Samples. *Steroids*, **70**(8): 499-506.
- Guy, R.D.; Fogel, M.F.; Berry, J.A.; Hoering, T.C. (1987).** Isotope Fractionation during Oxygen Production and Consumption by Plants. *In Progress in photosynthetic research III.* Martinus Nijhoff, Dordrecht. pp. 597-600.
- Haupt, H.A.; Rovere, G.D. (1984).** Anabolic Steroids: A Review of the Literature. *Am J Sports Med*, **12**(6): 469-484.
- Held, H.; Rengstl, A.; Mayer, D. (2000).** Acetic Anhydride and Mixed Fatty Acid Anhydrides. *In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.* 7. Auflage. 15.01.2007, <http://www.interscience.wiley.com/ullmanns>
- Hemmersbach, P.; Hagensen Jetne, A.H.; Lund, H.S. (2006).** Determination of Urinary Norandrosterone Excretion in Females during one Menstrual Cycle by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Biomed Chromatogr*, **20**(8): 710-717.
- Hoefs, J. (1997).** Stable Isotope Geochemistry. Springer, Berlin.
- Hoffmann, B.; Heinritzi, K.H.; Kyrein, H.J.; Oehrle, K.L.; Oettel, G.; Rattenberger, E.; Vogt, K.; Karg, H. (1976).** Studies on Hormonal Concentrations in Tissues, Plasma and Urine of Fattening Calves after Treatment with Hormone-Effective Anabolic Steroids. *Fortschr Tierphysiol Tierernahr*(6): 80-90.
- Horning, S.; Geyer, H.; Machnik, M.; Schänzer, W. (1997).** Detection of Exogenous Testosterone by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Analysis. *In Recent Advances in Doping Analysis. Proceedings of the Manfred Donike Workshop. 14th Cologne Workshop on Dope Analysis, 17th to 22nd March 1996.* Sport und Buch Strauß, Köln. pp. 275-283.

- ICH 2005.** Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 05.02.2006,
<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>
- Keeling, C.D. (1961).** A Mechanism for Cyclic Enrichment of Carbon-12 by Terrestrial Plants. *Geochim Cosmochim Acta*, **24**(3-4): 299-313.
- Kleemann, A.; Roth, H.J. (1983).** Arzneistoffgewinnung: Naturstoffe und Derivate. Thieme, Stuttgart.
- Kromidas, S. (1999).** Validierung in der Analytik. Wiley-VCH, Weinheim.
- Lange, I.G.; Daxenberger, A.; Schiffer, B.; Witters, H.; Ibarreta, D.; Meyer, H.H.D. (2002).** Sex Hormones Originating from Different Livestock Production Systems: Fate and Potential Disrupting Activity in the Environment. *Anal Chim Acta*, **473**(1-2): 27-37.
- Lewis, K.M.; Archer, R.D. (1979).** pKa Values of Estrone, 17 Beta-Estradiol and 2-Methoxyestrone. *Steroids*, **34**(5): 485-499.
- Lone, K.P. (1997).** Natural Sex Steroids and their Xenobiotic Analogs in Animal Production: Growth, Carcass Quality, Pharmacokinetics, Metabolism, Mode of Action, Residues, Methods, and Epidemiology. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **37**(2): 93-209.
- Lüttge, U.; Kluge, M.; Bauer, G. (1994).** Botanik. VCH, Weinheim.
- Mareck-Engelke, U.; Schultze, G.; Geyer, H.; Schänzer, W. (2000).** 19-Norandrosterone in Pregnant Women. *In* Recent Advances in Doping Analysis. Proceedings of the 18th Cologne Workshop on Dope Analysis, 20th to 25th February 2000. Sport und Buch Strauß, Köln. pp. 145-150.
- Mason, P.M.; Hall, S.E.; Gilmour, I.; Houghton, E.; Pillinger, C.; Seymour, M.A. (1998).** The Use of Stable Carbon Isotope Analysis to Detect the Abuse of Testosterone in Cattle. *Analyst*, **123**(12): 2405-2408.
- Matthews, D.E.; Hayes, J.M. (1978).** Isotope-Ratio-Monitoring Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal Chem*, **50**(11): 1465-1473.
- McKinney, C.R.; McCrea, J.M.; Epstein, S.; Allen, H.A.; Urey, H.C. (1950).** Improvements in Mass Spectrometers for the Measurement of Small Differences in Isotope Abundance Ratios. *Rev Sci Instrum*, **21**(8): 724-730.
- Meier-Augenstein, W. (2004).** GC and IRMS Technology for ¹³C and ¹⁵N Analysis on Organic Compounds and Related Gases. *In* Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques. Elsevier, Amsterdam. pp. 153-176.
- Melander, L.; Saunders, W.H. (1980).** Reaction Rates of Isotopic Molecules. Wiley, New York.
- Mellin, T.N.; Erb, R.E. (1965).** Estrogens in Bovine - a Review. *J Dairy Sci*, **48**(6): 687-&.
- Mellin, T.N.; Erb, R.E.; Estergreen, V.L. (1965).** Quantitative Estimation and Identification of Estrogens in Bovine Urine. *J Dairy Sci*, **48**(7): 895-&.
- Meyer, H.; Karg, H. (1999).** Aktualisierte Wertung der Masthilfsmittel Trenbolonacetat, Zeranol und Melengestrolacetat (Überlegungen zum "Hormonstreit" zwischen der EU und den USA bei der WTO). *Arch. Lebensmittelhyg.*, **50**: 28-37.
- Meyer, H.H.D. (2001).** Biochemistry and Physiology of Anabolic Hormones used for Improvement of Meat Production. *APMIS*, **109**: 336-343.
- Meyer, V.R. (1988).** Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. Diesterweg Salle Verlag, Frankfurt am Main.
- Michal, G. (1999).** Biochemical Pathways. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

- Miller, R.; Abaecherli, C.; Said, A.; Jackson, B. (2001).** Ketenes. *In* Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 7. Auflage. 15.01.2007, <http://www.interscience.wiley.com/ullmanns>
- Mutschler, E. (1996).** Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Nalborczyk, E.; Lacroix, L.J.; Hill, R.D. (1975).** Environmental Influences on Light and Dark CO₂ Fixation by Kalanchoe-Daigremontiana. *Can J Bot*, **53**(11): 1132-1138.
- Nalborczyk, E. (1978).** Dark Carboxylation and its Possible Effect on the Value of $\delta^{13}\text{C}$ in C₃ Plants. *Acta Physiol. Planta*, **1**: 53-58.
- Newman, A. (1996).** The Precise World of Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Anal Chem*, **68**: 373A-377A.
- Nier, A.O. (1947).** A Mass Spectrometer for Isotope and Gas Analysis. *Rev Sci Instrum*, **18**(6): 398-411.
- O'Leary, M.H. (1981).** Carbon Isotope Fractionation in Plants. *Phytochemistry*, **20**(4): 553-567.
- O'Leary, M.H.; Rife, J.E.; Slater, J.D. (1981).** Kinetic and Isotope Effect Studies of Maize Phosphoenolpyruvate Carboxylase. *Biochemistry*, **20**(25): 7308-7314.
- O'Leary, M.H. (1984).** Measurement of the Isotope Fractionation Associated with Diffusion of Carbon-Dioxide in Aqueous-Solution. *J Phys Chem*, **88**(4): 823-825.
- O'Leary, M.H. (1988).** Carbon Isotopes in Photosynthesis. *Bioscience*, **38**(5): 328-336.
- Ozer, D.; Temizer, A. (1997).** The Determination of Nandrolone and its Metabolites in Urine by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, **22**(4): 421-425.
- Peisker, M. (1982).** The Effect of CO₂ Leakage from Bundle Sheath-Cells on Carbon Isotope Discrimination in C-4 Plants. *Photosynthetica*, **16**(4): 533-541.
- Prévost, S.; Nicol, T.; Monteau, F.; Andre, F.; Le Bizec, B. (2001).** Gas Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry to Control the Misuse of Androgens in Breeding Animals: New Derivatization Method Applied to Testosterone Metabolites and Precursors in Urine Samples. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **15**(24): 2509-2514.
- Richtlinie 81/602/EWG des Rates** vom 31. Juli 1981 über ein Verbot von Bestimmten Stoffen mit Hormonaler Wirkung und von Stoffen mit Thyreostatischer Wirkung, *Abl. L 222*, 07.08.1981.
- Richtlinie 88/146/EWG des Rates** vom 7. März 1988 zum Verbot des Gebrauchs von Bestimmten Stoffen mit Hormonaler Wirkung im Tierbereich, *Abl. L 070*, 16.03.1988.
- Richtlinie 96/22/EG des Rates** vom 29. April 1996 über das Verbot der Verwendung Bestimmter Stoffe mit Hormonaler bzw. Thyreostatischer Wirkung und von β -Agonisten in der Tierischen Erzeugung und zur Aufhebung der Richtlinien 81/602/EWG, 88/146/EWG und 88/299/EWG, *Abl. L 125/3*, 23.05.1996.
- Richtlinie 2003/74/EG des Europäischen Parlaments und des Rates** vom 22. September 2003 zur Änderung der Richtlinie 96/22/EG des Rates über das Verbot der Verwendung Bestimmter Stoffe mit Hormonaler bzw. Thyreostatischer Wirkung und von β -Agonisten in der Tierischen Erzeugung, *Abl. L 262/17*, 14.10.2003.
- Rico, A.G. (1983).** Metabolism of Endogenous and Exogenous Anabolic Agents in Cattle. *J Anim Sci*, **57**(1): 226-232.

- Roeske, C.A.; O'Leary, M.H. (1984).** Carbon Isotope Effects on the Enzyme-Catalyzed Carboxylation of Ribulose Bisphosphate. *Biochemistry*, **23**(25): 6275-6284.
- Rumsey, T.S.; Hammond, A.C. (1990).** Effects of Intake level on Metabolic Response to Estrogenic Growth Promoters in Beef Steers. *J Anim Sci*, **68**(12): 4310-4318.
- Rumsey, T.S.; Hammond, A.C.; Elsasser, T.H. (1999).** Responses to an Estrogenic Growth Promoter in Beef Steers Fed Varying Nutritional Regimens. *J Anim Sci*, **77**(11): 2865-2872.
- Samuels, T.P.; Nedderman, A.; Seymour, M.A.; Houghton, E. (1998).** Study of the Metabolism of Testosterone, Nandrolone and Estradiol in Cattle. *Analyst*, **123**(12): 2401-2404.
- Santrock, J.; Studley, S.A.; Hayes, J.M. (1985).** Isotopic Analyses Based on the Mass-Spectrum of Carbon-Dioxide. *Anal Chem*, **57**(7): 1444-1448.
- Schänzer, W.; Donike, M. (1993).** Metabolism of Anabolic Steroids in Man: Synthesis and Use of Reference Substances for Identification of Anabolic Steroid Metabolites. *Anal Chim Acta*, **275**(1-2): 23-48.
- Schänzer, W.; Donike, M. (1995).** Synthesis of Deuterated Steroids for GC/MS Quantification of Endogenous Steroids. *In* Recent Advances in Doping Analysis. Proceedings of the 12th Cologne Workshop on Dope Analysis, 10th to 15th April 1994. Sport und Buch Strauß, Köln. pp. 93-112.
- Schänzer, W. (1996).** Metabolism of Anabolic Androgenic Steroids. *Clin Chem*, **42**(7): 1001-1020.
- Schänzer, W.; Breidbach, A.; Geyer, H.; von Kuk, C.; Nolteernsting, E.; Thevis, M. (2000).** Metabolism of Nortestosterone, Norandrostenedione and Norandrostenediol. Identification of 3 α -hydroxyestr-4-en-17-one glucuronide and 3 α ,16 α -dihydroxy-5 α -estran-17-one Glucuronide and Sulphate. *In* Recent Advances in Doping Analysis. Proceedings of the 18th Cologne Workshop on Dope Analysis, 20th to 25th February 2000. Sport und Buch Strauß, Köln. pp. 155-174.
- Schilt, R.; Groot, M.J.; Berende, P.L.; Ramazza, V.; Ossenkoppele, J.S.; Haasnoot, W.; Van Bennekom, E.O.; Brouwer, L.; Hooijerink, H. (1998).** Pour on Application of Growth Promoters in Veal Calves: Analytical and Histological Results. *Analyst*, **123**(12): 2665-2670.
- Schimmelmann, A. (2004).** Hydrogen and Carbon Stable Isotope Standards for Organic Compound-Specific Investigations. 12.11.2004, <http://php.indiana.edu/~aschimme/hc.html>
- Schmidt, H.L.; Butzenlechner, M.; Rossmann, A.; Schwarz, S.; Kexel, H.; Kempe, K. (1993).** Inter- and Intramolecular Isotope Correlations in Organic Compounds as a Criterion for Authenticity Identification and Origin Assignment. *Z Lebensm Unters For*, **196**(2): 105-110.
- Schrader, Y.; Schänzer, W. (2004).** Plasma Levels of 19-Norsteroids after Oral and Sublingual Administration of Norandrostenedione. *In* Recent Advances in Doping Analysis. Proceedings of the 22nd Cologne Workshop on Dope Analysis, 7th to 12th March 2004. Sport und Buch Strauß, Köln. pp. 109-119.
- Schrader, Y.; Thevis, M.; Schänzer, W. (2006).** Quantitative Determination of Metabolic Products of 19-Norandrostenediol in Human Plasma Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Drug Metab Dispos*, **34**(8): 1328-1335.
- Schröter, M.W. (2002).** Lebensmittelrechtliche Vorsorge als Rechtsprinzip - Nationale, Europäische und Welthandelsrechtliche Aspekte. 30.03.2006, http://www.zerp.uni-bremen.de/english/pdf/dp4_2002.pdf

- Scippo, M.L.; Degand, G.; Duyckaerts, A.; Maghuinrogister, G.; Delahaut, P. (1994).** Control of the Illegal Administration of Natural Steroid-Hormones in the Plasma of Bulls and Heifers. *Analyst*, **119**(12): 2639-2644.
- Sessions, A.L. (2006).** Isotope-Ratio Detection for Gas Chromatography. *J Sep Sci*, **29**(12): 1946-1961.
- Shackleton, C.H.; Phillips, A.; Chang, T.; Li, Y. (1997).** Confirming Testosterone Administration by Isotope Ratio Mass Spectrometric Analysis of Urinary Androstenediols. *Steroids*, **62**(4): 379-387.
- Shinebarger, S.R.; Haisch, M.; Matthews, D.E. (2002).** Retention of Carbon and Alteration of Expected ¹³C-Tracer Enrichments by Silylated Derivatives Using Continuous-Flow Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Anal Chem*, **74**(24): 6244-6251.
- Simontacchi, C.; de Altamirano, T.P.; Marinelli, L.; Angeletti, R.; Gabai, G. (2004).** Plasma Steroid Variations in Bull Calves Repeatedly Treated with Testosterone, Nortestosterone and Oestradiol Administered alone or in Combination. *Vet Res Commun*, **28**(6): 467-477.
- Smith, J.L.; Wilson, L.L.; Swanson, D.L. (1999).** Implant Sequence Effects in Intact Male Holstein Veal Calves: Live and Slaughter Traits. *J Anim Sci*, **77**(12): 3125-3132.
- Solberg, H.E.; Grasbeck, R. (1989).** Reference Values. *Adv Clin Chem*, **27**: 1-79.
- Starka, L. (2003).** Epitestosterone. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **87**(1): 27-34.
- Thevis, M.; Opfermann, G.; Schmickler, H.; Schänzer, W. (2001).** Mass Spectrometry of Steroid Glucuronide Conjugates. I. Electron Impact Fragmentation of 5alpha-/5beta-Androstan-3alpha-ol-17-one Glucuronides, 5alpha-Estran-3alpha-ol-17-one Glucuronide and Deuterium-Labelled Analogues. *J Mass Spectrom*, **36**(2): 159-168.
- Thieme, D.; Anielski, P.; Grosse, J.; Hemmersbach, P.; Lund, H.; Rautenberg, C. (2004).** Kinetics of In-Situ Demethylation of Endogenous Steroids in Urine Samples. *In Recent Advances in Doping Analysis. Proceedings of the Manfred Donike Workshop. 22nd Cologne Workshop on Dope Analysis, 7th to 12th March 2004.* Sport und Buch Strauß, Köln. pp. 177-188.
- Tseng, Y.L.; Sun, C.Y.; Kuo, F.H. (2006).** Detection and Quantification of Glucuro- and Sulfoconjugated Metabolites in Human Urine Following Oral Administration of Xenobiotic 19-Norsteroids. *Steroids*, **71**(9): 817-827.
- van der Wal, P.; Berende, P.L.M. (1983).** Effect of Anabolic Agents on Food Producing Animals. *In Anabolics in Animal Production.* Office International des Epizooties, Paris. pp. 73-115.
- Van Eenoo, P.; Delbeke, F.T.; de Jong, F.H.; De Backer, P. (2001).** Endogenous Origin of Norandrosterone in Female Urine: Indirect Evidence for the Production of 19-Norsteroids as By-Products in the Conversion from Androgen to Estrogen. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **78**(4): 351-357.
- Vollhardt, K.P.C. (1990).** Organische Chemie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- von Kuk, C. 2003.** Gaschromatographisch-Massenspektrometrische Untersuchungen zum Nachweis renal ausgeschiedener Sulfatkonjugate von Steroidhormonen beim Menschen und Pferd, Deutsche Sporthochschule Köln, Köln.
- von Kuk, C.; Flenker, U.; Schänzer, W. (2003).** Urinary Steroid Sulphates: Sample Preparation, Reference Values and Investigations in Biosynthesis and Metabolism. *In Recent Advances in Doping Analysis. Proceedings of the*

- Manfred Donike Workshop. 21st Cologne Workshop on Dope Analysis, 16th to 21st March 2003. Sport und Buch Strauß, Köln. pp. 169-178.
- WADA 2003.** World Anti-Doping Code. 05.04.2006, http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/code_v3.pdf
- WADA 2004a.** Reporting and Evaluation Guidance for Testosterone, Epitestosterone, T/E Ratio and other Endogenous Steroids. Technical Document TD2004EAAS, World Anti-Doping Agency. 31.03.2006, http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/end_steroids_aug_04.pdf
- WADA 2004b.** Reporting Norandrosterone Findings. Technical Document TD2004NA, World Anti-Doping Agency. 31.03.2006, http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/nandrolone_aug_04.pdf
- WADA 2007.** The 2007 Prohibited List. 03.05.2007, http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/2007_List_En.pdf
- Weissermel, K.; Arpe, H.-J. (1998).** Industrielle Organische Chemie. Wiley-VCH, Weinheim.
- Weltring, A. 2004.** Erarbeitung einer Methode zur Probenaufarbeitung von Rinderfaeces für die GC-C-IRMS Analytik, TU Berlin, Berlin.
- Wendt, K.U.; Schulz, G.E.; Corey, E.J.; Liu, D.R. (2000).** Enzyme Mechanisms for Polycyclic Triterpene Formation. *Angew Chem Int Ed Engl*, **39**(16): 2812-2833.
- Wickman, F.E. (1952).** Variations in the Relative Abundance of the Carbon Isotopes in Plants. *Geochim Cosmochim Acta*, **2**(4): 243-254.
- Wikipedia. (2007, 05.06.2007).** Hitzewelle 2003. 12.06.2007, http://de.wikipedia.org/wiki/Hitzewelle_2003
- Wilson, L.L.; Smith, J.L.; Swanson, D.L.; Mills, E.W. (1999).** Implant Sequence Effects in Intact Male Holstein Veal Calves: Carcass Characteristics. *J Anim Sci*, **77**(12): 3133-3139.
- Winter, K.; Holtum, J.A.M. (2002).** How Closely do the Delta C-13 Values of Crassulacean Acid Metabolism Plants Reflect the Proportion of CO₂ Fixed during Day and Night? *Plant Physiol*, **129**(4): 1843-1851.
- Yamanaka, H.; Shiraishi, T.; Sakamoto, T.; Matsuda, H. (1981).** Studies on Quinoline and Isoquinoline Derivatives .6. Addition-Reaction of Diketene with Isoquinolines in the Presence of Carboxylic-Acids. *Chem Pharm Bull*, **29**(4): 1049-1055.
- ZoBell, D.; Chapman, C.K.; Heaton, K.; Birkelo, C. (2000).** Beef Cattle Implants. 30.03.2006, <http://extension.usu.edu/files/agpubs/ag509.pdf>

8 Vorveröffentlichungen

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

8.1 Publikationen

Buisson, C.; Hebestreit, M.; Preiss Weigert, A.; Heinrich, K.; Fry, H.; Flenker, U.; Banneke, S.; Prévost, S.; André, F.; Schänzer, W.; Houghton, E.; Le Bizec, B. (2005). Application of Stable Carbon Isotope Analysis to the Detection of 17 β -Estradiol Administration to Cattle. *J Chromatogr A*, **1093**(1-2): 69-80.

Hebestreit, M.; Flenker, U.; Fußhöller, G.; Geyer, H.; Güntner, U.; Mareck, U.; Piper, T.; Thevis, M.; Ayotte, C.; Schänzer, W. (2006). Determination of the Origin of Urinary Norandrosterone Traces by Gas Chromatography Combustion Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Analyst*, **131**(9): 1021-1026.

Hebestreit, M.; Flenker, U.; Buisson, C.; André, F.; Le Bizec, B.; Fry, H.; Lang, M.; Preiss Weigert, A.; Heinrich, K.; Hird, S.; Schänzer, W. (2006). Application of Stable Carbon Isotope Analysis to the Detection of Testosterone Administration to Cattle. *J Agric Food Chem*, **54**(8): 2850-2858.

8.2 Tagungsbeiträge

Hebestreit, M.; Flenker, U.; Schänzer, W. (2004). Hardware-Considerations for Purification of Steroids by Normal-Phase HPLC for GC-C-IRMS. *In* Recent Advances in Doping Analysis. Proceedings of the Manfred Donike Workshop. 22nd Cologne Workshop on Dope Analysis, 7th to 12th March 2004. Sport und Buch Strauß, Köln. pp. 323-327.

9 Anhang

9.1 Urinproben und Ausscheidungsversuche von Rindern

Die für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Rinderurinproben sind Tabelle 20 zu entnehmen.

Tabelle 20: Rinderurinproben

Probe	Tier-Nr.	Kategorie	Alter [Monate]	Applikation	Tage bez. Applikation	Nahrung	Tage nach Nahrungs-umstellung
P1	R196	weiblich	139,3	-	-	Gräser	> 2 Monate
P2	R252	trächtig	91,3	-	-	37% Mais	> 2 Monate
P3	R265	weiblich	26,7	-	-	37% Mais	> 2 Monate
P4	R274	trächtig	70,1	-	-	37% Mais	> 2 Monate
P5	R280	trächtig	26,8	-	-	37% Mais	> 2 Monate
P6	R283	trächtig	57,3	-	-	37% Mais	> 2 Monate
P7	R294	trächtig	50,8	-	-	27% Mais	> 2 Monate
P8	R297	weiblich	10,1	-	0	37% Mais	> 2 Monate
P9	R297	weiblich	10,2	Estradiol	2	37% Mais	> 2 Monate
P10	R297	weiblich	10,3	Estradiol	4	37% Mais	> 2 Monate
P11	R297	weiblich	10,3	Estradiol	6	37% Mais	> 2 Monate
P12	R297	weiblich	10,4	Estradiol	1	37% Mais	> 2 Monate
P13	R297	weiblich	10,4	Estradiol	3	37% Mais	> 2 Monate
P14	R297	weiblich	10,5	Estradiol	5	37% Mais	> 2 Monate
P15	R297	weiblich	10,6	Estradiol	7	37% Mais	> 2 Monate
P16	R297	weiblich	10,6	Estradiol	9	37% Mais	> 2 Monate
P17	R297	weiblich	10,7	Estradiol	11	37% Mais	> 2 Monate
P18	R297	weiblich	11,5	-	-	37% Mais	> 2 Monate
P19	R297	weiblich	11,7	-	0	37% Mais	> 2 Monate
P20	R297	weiblich	11,8	Testoviron	1	37% Mais	> 2 Monate
P21	R297	weiblich	11,8	Testoviron	3	37% Mais	> 2 Monate
P22	R297	weiblich	11,9	Testoviron	5	37% Mais	> 2 Monate
P23	R297	weiblich	12,0	Testoviron	7	37% Mais	> 2 Monate
P24	R297	weiblich	12,0	Testoviron	9	37% Mais	> 2 Monate
P25	R297	weiblich	12,1	Testoviron	11	37% Mais	> 2 Monate
P26	R297	weiblich	19,1	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P27	R297	weiblich	19,2	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P28	R297	weiblich	19,3	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P29	R297	weiblich	19,4	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P30	R297	weiblich	19,4	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P31	R297	weiblich	19,4	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P32	R297	weiblich	19,5	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P33	R297	weiblich	19,6	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P34	R297	weiblich	19,7	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P35	R297	weiblich	19,8	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P36	R298	weiblich	18,7	-	-6	60% Mais	> 2 Monate
P37	R298	weiblich	18,7	-	-4	60% Mais	> 2 Monate
P38	R298	weiblich	18,9	-	0	60% Mais	> 2 Monate
P39	R298	weiblich	18,9	Estradiol + Testosteron-Depot	1	60% Mais	> 2 Monate

Probe	Tier-Nr.	Kategorie	Alter [Monate]	Applikation	Tage bez. Applikation	Nahrung	Tage nach Nahrungs-umstellung
P40	R298	weiblich	18,9	Estradiol + Testosteron-Depot	2	60% Mais	> 2 Monate
P41	R298	weiblich	19,0	Estradiol + Testosteron-Depot	4	60% Mais	> 2 Monate
P42	R298	weiblich	19,1	Estradiol + Testosteron-Depot	7	60% Mais	> 2 Monate
P43	R298	weiblich	19,2	Estradiol + Testosteron-Depot	9	60% Mais	> 2 Monate
P44	R298	weiblich	19,2	Estradiol + Testosteron-Depot	11	60% Mais	> 2 Monate
P45	R298	weiblich	19,3	Estradiol + Testosteron-Depot	14	60% Mais	> 2 Monate
P46	R298	weiblich	19,2	Estradiol + Testosteron-Depot	7, 9, 11	60% Mais	> 2 Monate
P47	R298	weiblich	19,2	Estradiol + Testosteron-Depot	7, 9, 11	60% Mais	> 2 Monate
P48	R299	trächtig (?)	42,4	-	-	37% Mais	> 2 Monate
P49	R303	weiblich	7,2	-	-7	60% Mais	> 2 Monate
P50	R303	weiblich	7,2	-	-6	60% Mais	> 2 Monate
P51	R303	weiblich	7,2	-	-5	60% Mais	> 2 Monate
P52	R303	weiblich	7,3	-	-4	60% Mais	> 2 Monate
P53	R303	weiblich	7,4	-	0	60% Mais	> 2 Monate
P54	R303	weiblich	7,4	-	0	60% Mais	> 2 Monate
P55	R303	weiblich	7,4	Testosteron-Depot	1	60% Mais	> 2 Monate
P56	R303	weiblich	7,5	Testosteron-Depot	2	60% Mais	> 2 Monate
P57	R303	weiblich	7,5	Testosteron-Depot	2	60% Mais	> 2 Monate
P58	R303	weiblich	7,5	Testosteron-Depot	3	60% Mais	> 2 Monate
P59	R303	weiblich	7,6	Testosteron-Depot	7	60% Mais	> 2 Monate
P60	R303	weiblich	7,7	Testosteron-Depot	8	60% Mais	> 2 Monate
P61	R303	weiblich	7,7	Testosteron-Depot	8	60% Mais	> 2 Monate
P62	R303	weiblich	7,7	Testosteron-Depot	8	60% Mais	> 2 Monate
P63	R303	weiblich	7,7	Testosteron-Depot	9	60% Mais	> 2 Monate
P64	R303	weiblich	7,7	Testosteron-Depot	10	60% Mais	> 2 Monate
P65	R303	weiblich	7,7	Testosteron-Depot	10	60% Mais	> 2 Monate
P66	R303	weiblich	7,9	Testosteron-Depot	14	60% Mais	> 2 Monate
P67	R303	weiblich	7,9	Testosteron-Depot	15	60% Mais	> 2 Monate
P68	R303	weiblich	10,2	-	0	Gräser	66
P69	R303	weiblich	10,2	Testosteron-Depot	2	Gräser	68
P70	R304	weiblich	5,2	-	-7	60% Mais	> 2 Monate
P71	R304	weiblich	5,2	-	-6	60% Mais	> 2 Monate
P72	R304	weiblich	5,3	-	-5	60% Mais	> 2 Monate
P73	R304	weiblich	5,3	-	-4	60% Mais	> 2 Monate
P74	R304	weiblich	5,4	-	0	60% Mais	> 2 Monate
P75	R304	weiblich	5,5	Estradiol + Progesteron	1	60% Mais	> 2 Monate
P76	R304	weiblich	5,5	Estradiol + Progesteron	1	60% Mais	> 2 Monate
P77	R304	weiblich	5,5	Estradiol + Progesteron	2	60% Mais	> 2 Monate
P78	R304	weiblich	5,5	Estradiol + Progesteron	3	60% Mais	> 2 Monate
P79	R304	weiblich	5,7	Estradiol + Progesteron	7	60% Mais	> 2 Monate
P80	R304	weiblich	5,7	Estradiol + Progesteron	8	60% Mais	> 2 Monate

Probe	Tier-Nr.	Kategorie	Alter [Monate]	Applikation	Tage bez. Applikation	Nahrung	Tage nach Nahrungs-umstellung
P81	R304	weiblich	5,7	Estradiol + Progesteron	9	60% Mais	> 2 Monate
P82	R304	weiblich	5,7	Estradiol + Progesteron	10	60% Mais	> 2 Monate
P83	R304	weiblich	5,9	Estradiol + Progesteron	14	60% Mais	> 2 Monate
P84	R304	weiblich	5,9	Estradiol + Progesteron	15	60% Mais	> 2 Monate
P85	R304	weiblich	6,2	Estradiol + Progesteron	23	Gräser	5
P86	R305	weiblich	5,1	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P87	R305	weiblich	5,1	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P88	R305	weiblich	5,1	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P89	R305	weiblich	5,2	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P90	R305	weiblich	5,3	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P91	R305	weiblich	5,3	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P92	R305	weiblich	5,4	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P93	R305	weiblich	5,4	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P94	R305	weiblich	5,5	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P95	R305	weiblich	5,6	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P96	R305	weiblich	5,6	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P97	R305	weiblich	5,6	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P98	R305	weiblich	5,7	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P99	R305	weiblich	5,8	-	-	60% Mais	> 2 Monate
P100	R305	weiblich	6,0	-	-	Gräser	5
P101	R305	weiblich	7,0	-	-	Gräser	33
P102	R305	weiblich	7,9	-	-	Gräser	60
P103	R305	weiblich	29,7	-	-	37% Mais	> 2 Monate
P104	R306	weiblich	4,1	-	-7	60% Mais	> 2 Monate
P105	R306	weiblich	4,1	-	-6	60% Mais	> 2 Monate
P106	R306	weiblich	4,2	-	-5	60% Mais	> 2 Monate
P107	R306	weiblich	4,2	-	-4	60% Mais	> 2 Monate
P108	R306	weiblich	4,3	-	0	60% Mais	> 2 Monate
P109	R306	weiblich	4,4	Estradiol	1	60% Mais	> 2 Monate
P110	R306	weiblich	4,4	Estradiol	2	60% Mais	> 2 Monate
P111	R306	weiblich	4,4	Estradiol	3	60% Mais	> 2 Monate
P112	R306	weiblich	4,6	Estradiol	7	60% Mais	> 2 Monate
P113	R306	weiblich	4,6	Estradiol	8	60% Mais	> 2 Monate
P114	R306	weiblich	4,6	Estradiol	9	60% Mais	> 2 Monate
P115	R306	weiblich	4,7	Estradiol	10	60% Mais	> 2 Monate
P116	R306	weiblich	4,8	Estradiol	14	60% Mais	> 2 Monate
P117	R306	weiblich	4,8	Estradiol	15	60% Mais	> 2 Monate
P118	R309	trächtig	25,9	-	-	27% Mais	> 2 Monate
P119	R312	trächtig	23,5	-	-	27% Mais	> 2 Monate
P120	R314	trächtig	23,0	-	-	27% Mais	> 2 Monate
P121	R316	trächtig	22,1	-	-	27% Mais	> 2 Monate
P122	R318	trächtig	19,0	-	-	27% Mais	> 2 Monate
P123	R321	weiblich	14,6	-	-	Gräser	> 2 Monate
P124	R323	weiblich	10,1	-	-	Gräser	> 2 Monate
P125	R325	weiblich	9,4	-	-	Gräser	> 2 Monate
P126	R328	weiblich	8,7	-	-	Gräser	78
P127	R329	weiblich	7,9	-	-11	Gräser	78

9 Anhang

Probe	Tier-Nr.	Kategorie	Alter [Monate]	Applikation	Tage bez. Applikation	Nahrung	Tage nach Nahrungs-umstellung
P128	R329	weiblich	8,3	Estradiol + Testosteron-Depot	4	Gräser	89
P129	R330	weiblich	7,5	-	-11	Gräser	78
P130	R330	weiblich	7,9	Estradiol + Testosteron-Depot	4	Gräser	89
P131	R331	weiblich	7,5	-	-11	Gräser	78
P132	R331	weiblich	7,9	Estradiol + Testosteron-Depot	4	Gräser	89
P133	R332	weiblich	7,5	-	-11	Gräser	78
P134	R332	weiblich	7,9	Estradiol + Testosteron-Depot	4	Gräser	89
P135	R333	weiblich	10,1	-	-	Gräser	78
P136	R334	weiblich	9,8	-	-11	Gräser	78
P137	R334	weiblich	10,2	Estradiol + Testosteron-Depot	4	Gräser	89
P138	R335	weiblich	9,1	-	-11	Gräser	78
P139	R335	weiblich	9,5	Estradiol + Testosteron-Depot	4	Gräser	89
P140	R336	weiblich	8,4	-	-11	Gräser	78
P141	R336	weiblich	8,8	Estradiol + Testosteron-Depot	4	Gräser	89
P142	R337	weiblich	8,0	-	-11	Gräser	78
P143	R337	weiblich	8,4	Estradiol + Testosteron-Depot	4	Gräser	89
P144	R670	männlich	9,4	-	-11	27% Mais	78
P145	R670	männlich	9,7	Estradiol + Testosteron-Depot	4	27% Mais	89
P146	R670	männlich	9,8	Estradiol + Testosteron-Depot	7	27% Mais	92
P147	R670	männlich	10,1	Estradiol + Testosteron-Depot	14	27% Mais	99
P148	R670	männlich	10,3	Estradiol + Testosteron-Depot	21	27% Mais	106
P149	R671	männlich	9,4	-	-13	27% Mais	76
P150	R671	männlich	9,4	-	-11	27% Mais	78
P151	R671	männlich	9,8	Estradiol + Testosteron-Depot	4	27% Mais	89
P152	R671	männlich	10,1	Estradiol + Testosteron-Depot	14	27% Mais	99
P153	R671	männlich	10,3	Estradiol + Testosteron-Depot	21	27% Mais	106
P154	R672	männlich	9,5	-	-13	27% Mais	76
P155	R672	männlich	9,5	-	-11	27% Mais	78
P156	R672	männlich	9,9	Estradiol + Testosteron-Depot	4	27% Mais	89
P157	R672	männlich	10,0	Estradiol + Testosteron-Depot	7	27% Mais	92
P158	R672	männlich	10,2	Estradiol + Testosteron-Depot	14	27% Mais	99
P159	R672	männlich	10,4	Estradiol + Testosteron-Depot	21	27% Mais	106
P160	R673	männlich	3,7	-	-	27% Mais	4
P161	R675	männlich	5,6	-	-	27% Mais	4
P162	R676	männlich	10,9	Estradiol + Testosteron-Depot	4	27% Mais	110
P163	R676	männlich	11,0	Estradiol + Testosteron-Depot	7	27% Mais	113

Probe	Tier-Nr.	Kategorie	Alter [Monate]	Applikation	Tage bez. Applikation	Nahrung	Tage nach Nahrungs-umstellung
P164	R676	männlich	11,2	Estradiol + Testosteron-Depot	14	27% Mais	120
P165	R676	männlich	11,5	Estradiol + Testosteron-Depot	21	27% Mais	127
P166	R677	männlich	14,0	-	-47	27% Mais	63
P167	R677	männlich	15,6	Estradiol + Testosteron-Depot	4	27% Mais	110
P168	R677	männlich	15,7	Estradiol + Testosteron-Depot	7	27% Mais	113
P169	R677	männlich	15,9	Estradiol + Testosteron-Depot	14	27% Mais	120
P170	R677	männlich	16,1	Estradiol + Testosteron-Depot	21	27% Mais	127
P171	R678	männlich	18,7	Estradiol + Testosteron-Depot	4	27% Mais	110
P172	R678	männlich	18,8	Estradiol + Testosteron-Depot	7	27% Mais	113
P173	R678	männlich	19,0	Estradiol + Testosteron-Depot	14	27% Mais	120
P174	R678	männlich	19,2	Estradiol + Testosteron-Depot	21	27% Mais	127
P175	R679	männlich	17,2	-	-49	27% Mais	61
P176	R679	männlich	18,9	Estradiol + Testosteron-Depot	4	27% Mais	110
P177	R679	männlich	19,0	Estradiol + Testosteron-Depot	7	27% Mais	113
P178	R679	männlich	19,2	Estradiol + Testosteron-Depot	14	27% Mais	120
P179	R679	männlich	19,4	Estradiol + Testosteron-Depot	21	27% Mais	127
P180	R685	männlich	7,3	-	-	60% Mais	25
P181	R685	männlich	8,0	-	-	60% Mais	46
P182	R696	Ochse	20,2	-	-	Gräser	> 2 Monate
P183	R696	Ochse	22,9	-	-	60% Mais	66
P184	R696	Ochse	23,1	-	-	60% Mais	72
P185	R697	Ochse	23,1	Estradiol + Progesteron	1	60% Mais	66
P186	R697	Ochse	23,3	Estradiol + Progesteron	7	60% Mais	72
P187	R699	männlich	22,7	-	-84	Gräser	> 2 Monate
P188	R699	männlich	25,4	-	-3	60% Mais	62
P189	R699	männlich	25,5	-	0	60% Mais	65
P190	R699	männlich	26,0	Estradiol	16	60% Mais	81
P191	R773	Ochse	13,7	-	0	37% Mais	> 2 Monate
P192	R773	Ochse	13,8	Estradiol	2	37% Mais	> 2 Monate
P193	R773	Ochse	13,9	Estradiol	4	37% Mais	> 2 Monate
P194	R773	Ochse	13,9	Estradiol	6	37% Mais	> 2 Monate
P195	R773	Ochse	14,0	Estradiol	1	37% Mais	> 2 Monate
P196	R773	Ochse	14,1	Estradiol	3	37% Mais	> 2 Monate
P197	R773	Ochse	14,1	Estradiol	5	37% Mais	> 2 Monate
P198	R773	Ochse	14,2	Estradiol	7	37% Mais	> 2 Monate
P199	R773	Ochse	14,3	Estradiol	9	37% Mais	> 2 Monate
P200	R773	Ochse	14,3	Estradiol	11	37% Mais	> 2 Monate
P201	R773	Ochse	15,1	-	-8	37% Mais	> 2 Monate
P202	R773	Ochse	15,3	-	0	37% Mais	> 2 Monate

Probe	Tier-Nr.	Kategorie	Alter [Monate]	Applikation	Tage bez. Applikation	Nahrung	Tage nach Nahrungs-umstellung
P203	R773	Ochse	15,4	Progesteron	1	37% Mais	> 2 Monate
P204	R773	Ochse	15,4	Progesteron	3	37% Mais	> 2 Monate
P205	R773	Ochse	15,5	Progesteron	5	37% Mais	> 2 Monate
P206	R773	Ochse	15,6	Progesteron	7	37% Mais	> 2 Monate
P207	R773	Ochse	15,6	Progesteron	9	37% Mais	> 2 Monate
P208	R773	Ochse	15,7	Progesteron	11	37% Mais	> 2 Monate
P209	R773	Ochse	25,1	Testosteron-Depot	2	Gräser	> 2 Monate
P210	R773	Ochse	26,4	Testosteron-Depot	44	60% Mais	25
P211	R773	Ochse	27,5	-	-10	60% Mais	58
P212	R773	Ochse	27,7	-	-6	60% Mais	62
P213	R773	Ochse	27,9	Testosteron-Depot	3	60% Mais	68
P214	R773	Ochse	27,9	Testosteron-Depot	3	60% Mais	68
P215	R773	Ochse	28,0	Testosteron-Depot	7	60% Mais	72
P216	278/280	trächtig	33,6	-	-	37% Mais	> 2 Monate
P217	297/298	weiblich	8,3	-	-	37% Mais	> 2 Monate
P218	771/772	männlich	11,5	-	-	37% Mais	> 2 Monate
P219	773/774	Ochse	12,4	-	-	37% Mais	> 2 Monate
P220	R798	männlich	n.b.	-	-	n.b.	n.b.
P221	R798	männlich	n.b.	-	-	n.b.	n.b.
P222	R799	männlich	n.b.	Estradiol	3	n.b.	n.b.
P223	R799	männlich	n.b.	Estradiol	3	n.b.	n.b.
P224	Mamie	weiblich	n.b.	Testosteron-Depot	1	n.b.	n.b.
P225	Mamie	weiblich	n.b.	Testosteron-Depot	4	n.b.	n.b.
P226	Mamie	weiblich	n.b.	Testosteron-Depot	11	n.b.	n.b.
P227	Mamie	weiblich	n.b.	Testosteron-Depot	35	n.b.	n.b.
P228	n.b.	Mischprobe	n.b.	-	-	n.b.	n.b.

n.b.: nicht bekannt

Die Proben wurden zunächst nach der vom BfR vergebenen Tiernummer und dann nach dem Alter zum Zeitpunkt der Probenahme sortiert. Zur Identifizierung der Proben wurde ihnen nachfolgend eine fortlaufende Nummer zugewiesen. In der dritten Spalte ist die Kategorie des jeweiligen Tiers aufgeführt. Bei den weiblichen Tieren ist eine vorhandene Schwangerschaft ggf. gekennzeichnet (trächtig) ebenso wie eine mögliche Kastration bei den männlichen Tieren (Ochse). Die im Verlauf des ISOSTER-Projekts applizierten Steroide sind, ebenso wie die Anzahl der Tage nach Applikation, in den nächsten Spalten angegeben. Urinproben von Tag 0 wurden am Tag der Applikation vor Injektion des jeweiligen Medikaments gesammelt. Die letzten beiden Spalten von Tabelle 20 geben die Nahrungsgrundlage zum Zeitpunkt der Urinabgabe an und die Anzahl der Tage nach Ernährungsumstellung.

9.2 $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der acetylierten Zielanalyten in Rinderurinproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse der Zielanalyten von 118 verschiedenen Urinproben analysiert. Bei neun Proben fand zusätzlich eine Doppelbestimmung statt. Die ermittelten $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der acetylierten Zielanalyten sind Tabelle 21 zu entnehmen. Aufgrund mangelnder Konzentration oder analytischer bzw. gerätetechnischer Fehler ist der Datensatz nicht für jede Probe vollständig.

Tabelle 21: $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der acetylierten Zielanalyten der analysierten Rinderurinproben

Probe	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der acetylierten Zielanalyten 1-8 (‰)							
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
P1	-24,21	-25,41			-27,44	-29,17		
P2	-21,73	-22,88	-22,58		-24,09	-26,72	-27,05	
P3	-19,56		-21,97		-24,41	-26,02		
P4	-25,69	-24,76	-23,84	-26,52	-26,97	-28,32	-27,71	-28,41
P5		-20,69	-21,49	-21,33	-24,44	-26,30		-23,67
P6	-22,52	-23,61		-23,96	-25,30	-27,93	-27,80	-27,49
P7	-22,21	-23,08	-22,98	-25,29	-26,40	-28,24	-26,69	-26,90
P7	-21,89	-23,11	-24,20	-23,87	-25,68	-28,04	-26,98	-26,07
P8		-19,72			-22,50	-24,14		
P9	-17,65	-20,13	-19,28		-22,32	-23,90		-32,40
P10	-18,54	-19,93	-19,28		-22,18	-23,91		-32,70
P11	-17,35	-20,19	-18,97		-22,10	-23,75		-32,53
P12	-18,14	-20,06	-19,35		-23,20	-25,39		-33,95
P13					-22,47	-24,22	-22,77	-34,37
P46	-18,86	-26,36	-21,72	-25,02	-20,72	-25,90		-31,97
P47	-18,34	-26,76	-22,11	-23,00	-21,08	-26,95		-32,76
P48	-22,33	-23,01	-23,37		-25,95	-27,99	-27,09	
P48	-22,62				-24,62	-27,86	-27,06	-25,91
P54	-17,44				-21,12	-24,18		
P57	-17,13	-27,85			-21,25	-30,27		-31,19
P61	-18,01	-28,15	-24,04	-26,24	-21,01	-29,42		
P62	-17,73	-27,55	-23,79	-24,69	-20,35	-29,44		
P65	-16,85	-27,51			-20,92	-27,71		
P68	-24,37	-24,33			-27,33	-28,63		
P69	-23,82	-28,10	-25,93		-27,72	-31,32		
P76	-18,01	-19,59			-22,55	-23,86		-33,01
P85	-18,51				-22,29	-24,78		
P100	-19,27		-18,56		-22,59	-24,92		
P101	-22,17	-24,19			-25,82	-26,29		
P102	-25,73	-26,82			-27,63	-28,14		
P103	-22,67	-23,39			-25,12	-27,22		
P118	-23,25	-23,11			-24,74	-27,07	-26,67	
P119	-21,45	-22,69	-21,97	-23,25	-26,51	-27,83	-27,12	-26,57
P120	-21,33	-22,49	-23,25		-25,05	-27,77	-26,97	-26,54
P121	-21,5	-22,43	-22,92	-23,36	-25,08	-27,31	-26,47	-25,53

Probe	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der acetylierten Zielanalyten 1-8 (‰)							
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
P122	-20,60	-22,12		-22,55	-23,73	-26,87	-25,92	-26,53
P123	-25,04		-26,26		-29,03	-29,24		
P124	-25,71	-25,53	-26,64		-28,62	-29,90		
P125	-26,08	-25,76	-28,69		-28,66	-29,87		
P126	-25,80	-25,96	-26,10		-29,41	-29,38		
P127	-25,63	-26,72	-26,62		-29,47	-29,24		
P128	-26,05	-29,14			-30,48	-31,29		-33,03
P129	-26,13	-27,04			-29,77	-29,79		
P130	-26,34	-30,11			-30,66	-32,20		-33,20
P132	-27,06	-30,41			-31,68	-31,98		-33,57
P133	-26,05	-26,49	-28,37		-29,19	-29,83		
P134	-26,09						-32,89	-32,64
P135	-26,28	-25,88	-27,37		-29,28	-29,35		
P136	-26,85	-28,08	-27,13		-30,76	-31,21	-30,81	
P137	-26,01	-28,63	-27,91		-29,89	-33,14	-32,51	-33,04
P138	-26,28		-27,6		-31,50	-31,03	-31,49	
P139	-26,41	-28,75			-30,08	-32,01	-32,68	-33,57
P140	-26,23	-26,67	-27,32		-29,69	-29,99		
P141	-25,75	-28,49	-28,52		-30,56	-32,53	-33,93	-33,51
P142	-26,90	-27,15	-28,69		-30,14			
P143	-26,17	-29,75	-29,22		-31,54	-34,52	-32,83	
P144	-20,59	-21,11	-20,62		-23,96	-25,45	-26,43	
P145	-21,54	-23,07	-22,96		-24,29	-26,64	-27,03	-33,13
P146	-21,82	-22,90	-21,35	-23,20	-25,62	-26,70		-32,69
P147	-20,81	-21,49	-21,62		-24,26	-25,53	-24,53	-32,34
P148	-21,71	-21,64	-21,32	-23,21	-25,32	-25,26	-24,80	
P149	-20,15	-20,42	-20,18		-25,64	-24,95	-26,26	
P150	-19,74	-20,43	-20,50		-24,22	-24,74		
P151	-22,04	-21,78			-23,58	-25,15	-25,61	
P152	-21,47	-21,38	-20,89		-25,00	-24,92	-24,81	-32,76
P153	-21,12	-21,79			-23,85	-26,21	-24,78	
P154	-21,16	-20,75		-21,63	-25,12	-24,38		
P155	-20,60	-20,60	-20,61	-21,22	-24,19			
P156	-21,27	-22,49		-23,36	-23,54	-26,17	-26,39	-33,79
P157	-21,17	-21,64	-20,31	-22,60	-25,07	-25,57	-24,64	-32,62
P158	-20,58	-21,14	-19,87	-22,98	-24,45	-25,06	-24,49	-32,17
P159	-21,28	-20,54	-21,44	-23,67	-24,59	-25,41	-24,46	
P160	-27,45	-25,32	-26,49		-28,44	-29,26		
P161	-26,71	-26,21	-26,71		-29,40	-29,97		
P162	-20,97	-22,70	-20,61		-23,70	-26,42	-26,08	-32,89
P163	-21,07	-22,31	-21,14		-24,53	-25,72	-25,29	-32,38
P164	-20,75	-20,62	-20,90		-25,09	-24,72	-24,29	-30,38
P165	-20,64	-20,61	-21,15		-24,49	-24,95	-24,16	
P166	-20,33	-20,79	-21,67		-24,34	-24,28	-24,65	
P166	-21,29	-21,29	-22,81	-21,45	-24,20	-24,92		
P167	-20,90	-21,35	-21,89		-23,81	-25,05	-25,14	-32,34
P168	-20,94	-22,79	-22,53		-24,77	-25,59	-24,89	-32,58
P169	-21,23	-22,06	-22,00		-25,01	-24,93	-25,12	-32,15
P170	-20,77	-21,57	-21,47		-25,26	-24,91	-24,94	
P171	-20,95	-22,63	-22,46		-24,07	-25,25	-25,81	-32,23

Probe	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der acetylierten Zielanalyten 1-8 (‰)							
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
P172	-21,03	-21,98	-22,10		-23,70	-25,30	-25,41	-31,99
P173	-20,17	-22,34		-25,69	-24,37	-25,28	-25,26	-32,74
P174	-20,77	-22,23	-21,08		-24,96	-24,98	-26,49	
P175	-20,76	-21,31	-22,73	-21,16	-24,33	-25,37		
P176	-21,16	-22,32	-22,32		-23,78	-26,39	-25,73	-32,48
P177	-21,25	-22,45	-21,61		-24,85	-25,62	-26,25	-32,16
P178	-20,77	-21,93	-20,60		-24,17	-25,02	-24,72	-32,20
P179	-20,72	-21,49			-24,19	-25,39	-25,01	
P180	-18,76	-18,63		-18,49	-22,62	-23,11		
P181	-15,71	-15,70	-15,90		-19,68	-20,30		
P183	-15,04	-17,02	-17,46		-20,13	-21,60		
P184	-14,88	-15,96			-20,16	-20,91		
P185	-16,33	-18,29			-21,18	-22,47		-32,11
P186	-16,63				-21,07	-22,60		-32,43
P187	-23,25	-23,40	-24,84		-26,53	-27,61		
P188	-16,13	-16,95	-17,49		-20,79	-21,08		
P189	-16,02	-16,74	-17,55		-20,57	-20,53		
P190	-15,75	-16,44	-17,23		-20,33	-21,12		-32,91
P191		-19,68			-22,83	-24,98		
P192					-23,00		-23,84	-32,67
P193					-22,71	-24,65	-23,31	-32,85
P194					-23,26	-25,06	-22,97	-31,79
P195					-23,46	-24,57	-23,90	-34,48
P196					-23,58	-23,68	-23,46	
P209	-23,30	-27,92			-26,64	-30,83		
P210	-18,65	-22,59			-22,29	-25,50		
P212	-16,06	-17,80	-18,33		-20,79	-22,33		
P213	-16,03	-27,99	-24,47	-24,57	-20,25	-28,95		
P214	-16,63	-28,12	-24,40	-23,75	-19,96	-29,09		-28,39
P215	-15,67	-27,04			-19,91	-26,27		
P220	-17,91	-16,74		-17,51	-19,75	-21,08		
P221	-17,46	-17,30		-18,15	-19,31	-20,38		-21,38
P222	-16,77	-16,77	-17,32	-16,46	-19,87	-20,05		-32,73
P223	-16,81	-17,33	-16,68	-18,44	-19,84	-20,51		-32,68
P224	-21,99	-25,48	-24,53	-24,78	-27,05	-29,05		
P225	-19,82	-26,15	-25,46	-23,89	-26,67	-29,58		
P226	-20,73	-25,20	-24,55	-25,34	-26,51	-29,23		
P227	-19,00	-20,96	-21,87	-23,24	-25,74	-28,08		
P228	-20,83	-20,41	-20,34	-22,24	-22,67	-24,93		-23,77
P228	-20,98	-20,51	-20,70	-21,61	-22,80	-24,80		-23,94

acetylierte Zielanalyten: (1) DHEA; (2) ETIO; (3) EpiT; (4) EpiA; (5) Androstendiol, (6) 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol; (7) 5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol; (8) 17 α -Estradiol

9.3 Humanurinproben

9.3.1 Kontrollproben mit Norandrosteron bekannter Herkunft

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Überprüfung der Richtigkeit der Methode elf Urinproben mit geringer NA-Konzentration bekannter Herkunft analysiert. In Tabelle 22 sind diese Kontrollproben und die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt

Tabelle 22: Identität und Ergebnisse der Kontrollproben mit bekannter Herkunft von NA

Probe	Konzentration (NA) [ng/mL]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte (%)		
		NA	AND	ETIO
K1 ^(a)	1,3	-24,00	-23,65	-24,24
K2 ^(a)	2	-25,80	-24,37	-24,70
K3 ^(a)	2	-24,58	-23,88	-25,04
K4 ^(b)	4	-28,93	-22,35	-23,38
K5 ^(d)	4	-29,23	-23,40	-24,13
K6 ^(e)	5	-26,47	-21,95	-23,20
K7 ^(b)	6	-27,47	-21,28	-22,96
K8 ^(c)	7	-29,27	-22,63	-24,24
K9 ^(e)	7	-27,28	-21,80	-23,13
K10 ^(c)	8	-27,60	-22,69	-24,80
K11 ^(d)	8	-28,04	-22,42	-24,98

^(a) aufgrund einer Schwangerschaft endogene Herkunft von NA

^(b) durch Anwendung einer Kapsel mit 100 mg 19-Norandrost-4-en-3,17-dion exogene NA-Herkunft

^(c) durch Anwendung einer Sublingualtablette mit 25 mg 19-Norandrost-4-en-3,17-dion exogene NA-Herkunft

^(d) durch Anwendung einer Kapsel mit 100 mg 19-Norandrost-4-en-3 β ,17 β -diol exogene NA-Herkunft

^(e) durch Anwendung einer Sublingualtablette mit 25 mg 19-Norandrost-4-en-3 β ,17 β -diol exogene NA-Herkunft

Die Proben wurden zunächst nach endogener oder exogener Herkunft von NA sortiert und dann nach dessen in der Routineanalytik mittels GC/MS-Analyse nach Mareck-Engelke *et al.* (2000) ermittelten Konzentration. Die Proben K1 bis K3 stammen von 2 Frauen aus dem vierten, siebten und achten Schwangerschaftsmonat mit demzufolge endogener Herkunft von NA. Die Proben K4 bis K11 mit geringer NA-Konzentration exogener Herkunft stammen von den gekennzeichneten Ausscheidungsversuchen nach Gabe von 19-Norandrost-4-en-3,17-dion (Schrader und Schänzer 2004) oder 19-Norandrost-4-en-3 β ,17 β -diol (Schrader *et al.* 2006) an gesunde männliche Probanden.

9.3.2 Dopingkontrollproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von NA, AND und ETIO aus 25 Dopingkontrollproben mit geringer NA-Konzentration zwischen 2 ng/mL und 20 ng/mL bestimmt. In Tabelle 23 sind die Proben und die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 23: Identität und Ergebnisse der Analyse der Dopingkontrollproben

Probe	Geschlecht	Demethylierungsaktivität	GC/C/IRMS-Methode	Konzentration NA [ng/mL]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte (‰)		
					NA	AND	ETIO
H1	weiblich	ja	(1)	2,0	-21,63	-22,17	-23,01
			(3)		-23,31	-21,91	-23,57
H2	männlich	nein	(1)	2,4	-28,60	-21,40	-22,50
			(3)		-28,57	-22,09	-23,05
H3	männlich	nein	(1)	2,5	-21,00	-20,20	-19,70
			(2)		-20,26	-20,56	-20,64
H4	männlich	nein	(1)	3,2	-19,90	-18,80	-19,90
			(3)		-19,39	-19,26	-20,55
H5	männlich	nein	(1)	3,4	-28,01	-22,96	-23,92
			(2)		-27,77	-23,44	-24,59
H6	männlich	nein	(1)	4,1	-27,50	-20,20	-21,70
			(3)		-26,59	-20,84	-21,71
H7	männlich	nein	(1)	4,8	-28,70	-21,60	-23,30
			(2)		-27,97	-22,44	-22,23
H8	männlich	nein	(1)	5,3	-29,29	-26,77	-24,73
			(3)		-29,63	-27,75	-25,30
H9	männlich	nein	(1)	5,6	-28,33	-21,16	-22,01
			(2)		-27,35	-20,94	-21,30
H10	männlich	nein	(1)	10,1	-27,40	-19,30	-20,20
			(3)		-28,63	-19,97	-20,76
H11	männlich	nein	(1)	10,6	-27,67	-20,77	-22,04
			(2)		-27,77	-21,12	-22,26
H12	männlich	nein	(1)	17,0	-27,19	-19,31	-20,33
			(3)		-27,33	-19,93	-20,58
H13	männlich	nein	(1)	18,5	-30,18	-26,91	-19,78
			(3)		-29,49	-26,80	-19,92
H14	weiblich	ja	(1)	2,0	-22,13	-22,61	-23,72
H15	unbekannt	nein	(1)	2,0	-28,45	-21,20	-20,54
H16	männlich	nein	(1)	2,1	-21,36	-21,28	-22,38
H17	männlich	ja	(1)	2,8	-21,20	-21,25	-21,97
H18	männlich	nein	(1)	3,1	-20,60	-20,30	-22,00
H19	weiblich	nein	(1)	5,0	-29,80	-29,30	-29,90
H20	weiblich	nein	(1)	5,2	-24,70	-23,20	-23,70
H21	männlich	ja	(1)	5,4	-22,30	-21,60	-22,90
H22	männlich	ja	(1)	5,6	-21,64	-21,27	-22,64
H23	männlich	nein	(1)	8,3	-28,55	-22,95	-24,59
H24	männlich	nein	(1)	11,4	-29,00	-22,39	-22,42
H25	männlich	nein	(1)	16,0	-27,32	-19,79	-20,11

GC/C/IRMS-Methoden: (1) Optima $\delta 3$ GC-Säule und *Splitless*-Injektion; (2) Optima $\delta 3$ GC-Säule und CoC-Injektion; (3) HP5-MS GC-Säule und CoC-Injektion

Die Proben wurden zunächst nach wiederholter Analyse unter anderen GC/C/IRMS-Bedingungen sortiert und dann nach aufsteigender Konzentration von NA. Die $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von NA, AND und ETIO sowie die in der Routine mittels GC/MS-Analyse nach Mareck-Engelke *et al.* (2000) bestimmten und ggf. nach WADA (2004b) dichtekorrigierten Konzentrationen von NA im Urin sind ebenfalls

Tabelle 23 zu entnehmen. Das Ergebnis eines Tests auf Demethylierungsaktivität nach Grosse *et al.* (2005) ist gekennzeichnet und, sofern bekannt, das Geschlecht des der Probe zugehörigen Athleten.

9.4 Reagenzien, Lösungsmittel und Geräte

Die verwendeten Referenzverbindungen und deren Bezugsquellen sind Tabelle 24 zu entnehmen.

Tabelle 24: Referenzverbindungen

Verbindung	Bezugsquelle
17 α -Estradiol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
17 β -Estradiol	Paesel + Lorei (Duisburg, Deutschland)
² H ₄ -AND-sulfat	Laborsynthese (nach von Kuk 2003)
² H ₄ -ETIO	Laborsynthese (nach Schänzer und Donike 1995)
² H ₅ -AND-glucuronid	Laborsynthese (nach Thevis <i>et al.</i> 2001)
5 α -Androstan-3 α ,11 β -diol-17-on	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol	Steraloids (Newport, USA)
5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol	Steraloids (Newport, USA)
5 α -Androstan-3 β ,17 β -diol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol-diacetat	Steraloids (Newport, USA)
5 α -Androstan-3 β -ol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
5 β -Pregnan-3 α ,20 α -diol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
AND	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Androst-5-en-3 β ,17 α -diol	Paesel + Lorei (Duisburg, Deutschland)
Androst-5-en-3 β ,17 β -diol	Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Deutschland)
DHEA	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
EpiA	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
EpiT	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Estron	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
ETIO	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
NA und NA-glucuronid	Laborsynthese (nach Schänzer und Donike 1993; Schänzer und Donike 1995; Thevis <i>et al.</i> 2001)
Testosteron	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Die verwendeten Lösungsmittel und deren Bezugsquellen sind Tabelle 25 zu entnehmen.

Tabelle 25: Lösungsmittel

Lösungsmittel	Bezugsquelle
Aceton (für die GC)	KMF Laborchemie (St. Augustin, Deutschland)
Acetonitril (für die LC)	JT Baker (Deventer, Niederlande)
Cyclohexan (p.a.)	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Lösungsmittel	Bezugsquelle
Ethylacetat (p.a.)	KMF Laborchemie (St. Augustin, Deutschland)
Isopropanol (für die LC)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol (reinst, destilliert)	KMF Laborchemie (St. Augustin, Deutschland)
<i>n</i> -Hexan (für die LC)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
<i>n</i> -Pentan (p.a.)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Reinstwasser	Milli Q/Elix 3, Millipore (Schwalbach, Deutschland)
<i>tert</i> -Butylmethylether (reinst, destilliert)	KMF Laborchemie (St. Augustin, Deutschland)
THF (für die LC)	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Die verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen sind Tabelle 26 zu entnehmen.

Tabelle 26: Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
<i>di</i> -Phosphorpentoxid (reinst)	Fluka (Bucks, Schweiz)
Eisessig (p.a.)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumcarbonat (p.a.)	KMF Laborchemie (St. Augustin, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (p.a.)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumhydrogencarbonat (p.a.)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumhydroxid (p.a.)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumacetat (p.a.)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid (p.a.)	KMF Laborchemie (St. Augustin, Deutschland)
<i>n</i> -Butylamin (99%)	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Schwefelsäure (98%; p.a.)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Trockeneis	Institut für Organische Chemie der Universität Köln

Die verwendeten Enzymlösungen und deren Bezugsquellen sind Tabelle 27 zu entnehmen.

Tabelle 27: Enzymlösungen

Enzym	Bezugsquelle
β -Glucuronidase von <i>Escherichia coli</i>	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
gereinigte β -Glucuronidase/Arylsulfatase von <i>Helix Pomatia</i> (Typ H5), gelöst in 20 mL Wasser	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Die verwendeten Pufferlösungen und deren Herstellung sind Tabelle 28 zu entnehmen.

Tabelle 28: Pufferlösungen

Pufferlösung	Herstellung
0,2 M Acetatpuffer (pH 5,2)	16,4 g Natriumacetat werden in 900 mL Wasser gelöst, mit Eisessig auf pH 5,2 eingestellt und auf 1 L aufgefüllt

Pufferlösung	Herstellung
0,8 M Phosphatpuffer (pH 6,8)	27,2 g Kaliumdihydrogenphosphat werden in 150 mL Wasser gelöst, mit 1 M KOH-Lösung auf pH 6,8 eingestellt und auf 250 mL Endvolumen aufgefüllt
0,2 M Phosphatpuffer (pH 6,8)	der 0,8 M Phosphatpuffer wird $\frac{1}{4}$ (v/v) mit Wasser verdünnt
Carbonatpuffer	je 100 g Kaliumcarbonat und Kaliumhydrogencarbonat werden in 1L Wasser gelöst

Die zur Derivatisierung verwendeten Reagenzien und deren Bezugsquellen sind Tabelle 29 zu entnehmen.

Tabelle 29: Derivatisierungsreagenzien

Reagenz	Bezugsquelle
Acetanhydrid (p.a.)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Acetanhydrid (p.a.)	Merck (Darmstadt, Deutschland), destilliert
Acetanhydrid (p.a.)	Merck (Darmstadt, Deutschland), destilliert eine Woche nach Zugabe von 10 mL Wasser pro 1000 mL Reagenz
Acetanhydrid (p.a.)	verschickt durch das BfR (Berlin, Deutschland) im Rahmen eines Interlaborvergleichs zum ISOSTER-Projekt
Acetanhydrid (p.a.)	Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Acetanhydrid (p.a.)	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Acetanhydrid (p.a.)	Fluka (Bucks, Schweiz)
Acetanhydrid (p.a.)	Riedel de Haën (Seelze, Deutschland)
Ammoniumiodid	Fluka (Bucks, Schweiz)
Diketen (stabilisiert mit Kupfersulfat)	Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethanthiol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
MSTFA	Chemische Fabrik Karl Bucher (Waldstetten, Deutschland)
Pyridin (p.a.)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
MSTFA/Trimethyliodsilan	MSTFA/NH ₄ I/Ethanthiol, 1000/2/6 (v/w/v)

Das verwendete HPLC-System ist Tabelle 30 zu entnehmen. Die variierten Parameter wie Säule, Ofentemperatur oder Lösungsmittel sind an der entsprechenden Stelle im Experimentellen Teil angegeben.

Tabelle 30: HPLC-System

Bauteil	Bezugsquelle
Entgaser, 1100er Serie, G1322A	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
quaternäre Pumpe, 1100er Serie, G1311A	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
Autosampler, 1100er Serie, G1313A	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
temperierbarer Säulenofen, 1100er Serie, G1316A	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
UV-Detektor, 1100er Serie, G1314A	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
Fraktionssammler Foxy 200	ISCO (Lincoln, Nebraska, USA)

Die verwendeten HPLC-Säulen sowie deren Bezugsquellen sind Tabelle 31 zu entnehmen.

Tabelle 31: HPLC-Säulen

HPLC-Säule	Bezugsquelle
CC 8/4 Nucleosil 100-5 N(CH ₃) ₂	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
EC 250/4,0 Nucleosil 100-5 N(CH ₃) ₂	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
EC 250/4,6 Nucleosil 100-5 N(CH ₃) ₂	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
EC 250/4,6 Nucleosil 100-5 NH ₂	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
LiChroCart 250-4 LiChrospher 100 RP ₁₈ EC (5 µm)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
LiChroCart 25-4 LiChrospher 100 RP ₁₈ (5 µm)	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Die GC/MS-Messungen wurden auf dem in Tabelle 32 gezeigten System der Firma Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) durchgeführt. Die variierten Parameter wie Temperaturprogramm, Säule oder Injektionsmodus sind an der entsprechenden Stelle im Experimentellen Teil angegeben.

Tabelle 32: GC/MS-System

Autosampler	7683
GC-Ofen	6890
Helium-Fluss	1 mL/min (konstant)
Injektor	<i>Split/Splitless</i> (300 °C)
Ionisierung	EI (70 eV)
MS	5973N
Quadrupoltemperatur	150 °C
Quellentemperatur	230 °C
Trärgas	Helium
Transfer-Line	300 °C

Die Analysen der ¹³C/¹²C-Verhältnisse der urinären Steroide aus dem Rinderurin wurden zunächst auf dem in Tabelle 33 angegebenen herkömmlichen GC/C/IRMS-System durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben stammen die verschiedenen Bauteile von der Firma Thermo Scientific (Bremen, Deutschland).

Tabelle 33: GC/C/IRMS-System 1a

Injektor	<i>Split/Splitless</i> (300 °C)
Injektionsmodus	<i>Splitless</i> (für 90 s)
Injektionslösungsmittel	Cyclohexan
Injektionsvolumen	maximal 3 µL
Autosampler	A200SE von CTC Analytics (Zwingen, Schweiz); Injektionsgeschwindigkeit 5,5 µL/s
Trärgas	Helium
Helium-Fluss	2 mL/min (konstant)

GC-Ofen	6890
GC-Säule mit vorgeschaltetem RT-Gap	J&W HP-5MS von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland); Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm und Filmdicke 0,25 µm; über <i>Pressfits</i> verbunden mit 2 m deaktivierter Fused Silica Säule mit 0,32 mm Innendurchmesser
Temperaturprogramm	60 °C (90 s); 40 °C/min bis 240 °C; 3 °C/min bis zur Elution der Analyten; 40 °C/min bis 300 °C; 90 s isotherm
Kopplung zwischen GC und IRMS	GC/C III, 940 °C, angepasst durch das Entfernen des Reduktionsreaktors, dem Ersetzen der Nafion-Membran durch eine Aceton-Trockeneisfalle und dem Höhersetzen des Verbrennungsofens um ca. 1,5 cm
IRMS	Delta Plus XP

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die GC/C-Kopplung unter Verwendung eines KAS als Injektor weitreichend modifiziert (s. Abb. 10, S. 24) und als Patent angemeldet (Flenker 2006). Die Analyse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse der urinären Steroide aus dem Rinderurin wurde dann auf dem modifizierten System aus Tabelle 33 durchgeführt. Tabelle 34 sind die gegenüber Tabelle 33 veränderten Parameter zu entnehmen.

Tabelle 34: GC/C/IRMS-System 1b, ausgerüstet mit KAS und modifizierter GC/C-Kopplung

Injektor	KAS 4 von Gerstel (Mülheim, Deutschland) mit an der Splitleitung angeschlossener Vakuumpumpe (vgl. Flenker 2006)
Injektionslösungsmittel	Aceton
Injektionsmodus	4 min <i>Solvent Vent</i> (100 mL/min Helium-Fluss) bei vollständig geöffnetem Splitventil mit eingeschalteter Pumpe (-0,3 Bar gegenüber Atmosphäre), anschließend bei ausgeschalteter Pumpe 2 min Überführungszeit bei geschlossenem Splitventil
Injektionsvolumen	bis zu 10 µL als sog. Sandwich-Injektion mit nacheinander 1 µL Luft, 1 µL Lösungsmittel, 1 µL Luft und bis zu 7 µL Probe
Injektortemperatur-Programm	40 °C für 2 min (Ausblendung des Lösungsmittels), 1 °C/s bis 85 °C, 1:45 min halten (Entfernen von leichtflüchtigen Matrixkomponenten), 10 °C/s bis 300 °C, 10 min halten (Überführung der Analyten sowie Säubern des Injektors)
Kopplung zwischen GC und IRMS	GC/C III; zusätzlich angepasst zu den in Tabelle 33 genannten Parametern nach Flenker <i>et al.</i> (2007); vgl. auch Abb. 10 (S. 24)
RT-Gap	ohne
GC-Temperaturprogramm	40 °C für 5 min; 40 °C/min bis 240 °C; 3 °C/min bis zur Elution der Analyten; 40 °C/min bis 300 °C; 90 s isotherm

Die Analyse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse der urinären Steroide der Humanproben wurde auf dem in Tabelle 35 angegebenen GC/C/IRMS-System der Firma Thermo Scientific (Bremen, Deutschland) durchgeführt. Im Verlauf der Arbeit wurden zwei verschiedene GC-Säulen und zwei verschiedene Injektoren verwendet.

Tabelle 35: GC/C/IRMS-System 2

<i>Front</i> -Injektor	<i>Split/Splitless</i> (300°C)
<i>Back</i> -Injektor	CoC

Injektionsmodus bez. des <i>Front</i> -Injektors	<i>Splitless</i> (90 s)
Injektionslösungsmittel	Methanol bei <i>Splitless</i> -Injektion Aceton bei CoC-Injektion
Injektionsvolumen	maximal 3 μL aus Methanol bei <i>Splitless</i> -Injektion maximal 2 μL aus Aceton bei CoC-Injektion
Injektion	manuell oder mit Autosampler A200S von CTC Analytics (Zwingen, Schweiz) (5,5 $\mu\text{L/s}$)
Trägergas	Helium
Helium-Fluss	2,1 Bar (konstanter Druck)
RT-Gap bei <i>Splitless</i> -Injektion	2 m deaktivierte Fused Silica Säule mit 0,32 mm Innendurchmesser
RT-Gap bei CoC Injektion	1 m deaktivierte Fused Silica Säule mit 0,53 mm Innendurchmesser
GC-Säule A	Optima $\delta 3$ von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland); Länge 17 m, Innendurchmesser 0,25 mm und Filmdicke 0,25 μm
GC-Säule B	J&W HP-5MS von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland); Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm und Filmdicke 0,25 μm
GC-Ofen	5890 von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
Anfangstemperatur	bei <i>Splitless</i> -Injektion 60 $^{\circ}\text{C}$ (90 s), bei CoC-Injektion 50 $^{\circ}\text{C}$ (30 s)
Temperaturprogramm bei GC-Säule A	30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis 265 $^{\circ}\text{C}$; 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis zur Elution der Analyten; 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis 295 $^{\circ}\text{C}$; 2 min isotherm
Temperaturprogramm bei GC-Säule B	30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis 240 $^{\circ}\text{C}$; 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis zur Elution der Analyten; 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis 295 $^{\circ}\text{C}$; 2 min isotherm
Kopplung zwischen GC und IRMS	GC/C II, 940 $^{\circ}\text{C}$, angepasst durch das Entfernen des Reduktionsreaktors, dem Ersetzen der Nafion-Membran durch eine Aceton-Trockeneisfalle und dem Höhersetzen des Verbrennungsofens um ca. 1,5 cm
IRMS	Delta C

Die benötigten Gase und deren Bezugsquellen sind Tabelle 36 zu entnehmen.

Tabelle 36: Gase

Gas	Bezugsquelle
Helium, Reinheit 5.0	Linde (Wiesbaden, Deutschland)
Kohlendioxid, Reinheit 5.3	Linde (Wiesbaden, Deutschland); $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Wert = -3.0‰ (kalibriert über ein Alkan-Gemisch bekannter Isotopensignaturen (Schimmelmann 2004))
Sauerstoff, Reinheit 5.0	Linde (Wiesbaden, Deutschland)

Sonstige Geräte und Materialien sowie deren Bezugsquellen sind Tabelle 37 zu entnehmen.

Tabelle 37: Sonstige Geräte und Materialien

Material/Gerät	Bezugsquelle
Chromabond RP ₁₈ -SPE-Säulen (0,5 g, 6 mL)	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
GC-Autosampler Gewindeflaschen (2 mL)	WICOM (Heppenheim, Deutschland)

Material/Gerät	Bezugsquelle
Heizblock für 48 Reagenzgläser	HLC (Bovenden, Deutschland)
HPLC-Autosampler Gewindeflaschen (2 mL) mit Kurzgewinde	WICOM (Heppenheim, Deutschland)
konische Mikroeinsätze für Autosampler-Gefäße (300 µL)	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Konische Röhrchen (50 mL, Polypropylen)	Becton Dickinson (LePont de Claix, Frankreich)
Kurzgewinde-Schraubkappen mit Butylgummi und Teflon-Septen	WICOM (Heppenheim, Deutschland)
NP-SPE-Säulen (1 g, 6 mL)	UCT (Bristol, Großbritannien)
Polypropylen-Schraubkappen für GC-Autosampler Gewindeflaschen	WICOM (Heppenheim, Deutschland)
RP ₁₈ -SPE-Säulen (2 g, 12 mL)	UCT (Bristol, Großbritannien)
Teflon-Septen für GC-Autosampler Gewindeflaschen	WICOM (Heppenheim, Deutschland)
Vakuumbstation für 12 SPE-Säulen	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Vortex G-560 E	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Zentrifuge (Z 513)	Hermle (Wehlingen, Deutschland)

9.5 *Abbildungsverzeichnis*

Abb. 1: Steroidgrundgerüst des Gonans _____	5
Abb. 2: Konformationsbezeichnung des α - bzw. β -Halbraums am Beispiel des Gonans _____	5
Abb. 3: Strukturformel des Cholesterins _____	6
Abb. 4: Biosynthese des Farnesyldiphosphats über Geranyldiphosphat _____	6
Abb. 5: Biosynthese des Squalens _____	7
Abb. 6: Biosynthese des Lanosterins _____	7
Abb. 7: Biosynthese des Testosterons; die abgekürzten Enzyme sind die 17α -Hydroxylase der Zytochrom P450-Enzymreihe (P450c17), die 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Isomerase (3β -HSD) und die 17β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase (17β -HSO) _____	10
Abb. 8: Übersicht der Aromatasereaktion zur Biosynthese des Estrons und des 17β -Estradiols; das abgekürzte Enzym ist die 17β -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase (17β -HSO) _____	12
Abb. 9: Prinzipieller Aufbau des verwendeten GC/C/IRMS-Systems _____	22
Abb. 10: Prinzipieller Aufbau der mitentwickelten GC/C-Kopplung mit Kaltaufgabesystem _____	24
Abb. 11: Potenzielle Zielanalyten zum Testosteronnachweis mittels GC/C/IRMS; ERCs oberhalb und Metaboliten unterhalb des Testosterons _____	30

Abb. 12: Potenzielle Metaboliten zum Estradiolnachweis mittels GC/C/IRMS _____	31
Abb. 13: Vereinfachte Fragestellung und potenzielle Zielanalyten zur Herkunftsbestimmung urinären Norandrosterons _____	33
Abb. 14: Flussdiagramm der entwickelten Methode für den Rinderurin; die durchnummerierten Analyten sind EpiT (1), ETIO (2), Androstendiol (3), 5 α - Androstan-3 β ,17 α -diol (4), 5 β -Androstan-3 α ,17 α -diol (5), 17 α -Estradiol (6), DHEA (7) und EpiA (8) _____	35
Abb. 15: Ausschnitt des HPLC/UV-Chromatogramms auf Dimethylaminopropyl- Phase bei 200 nm der Standards NA (1), AND (2) und ETIO (3) mit entsprechendem Sammelschema _____	47
Abb. 16: Ausschnitt des HPLC/UV-Chromatogramms auf RP ₁₈ -Phase bei 200 nm von NA (1) und AND (2) sowie das entsprechende Sammelschema _____	48
Abb. 17: Urinäre Konzentration von Androstendiol in Blankproben der Tiere R297 und R305 _____	52
Abb. 18: Urinäre Konzentration von Androstendiol in Proben der Tiere R297, R303 und Mamie vor bzw. nach Testosteron-Applikation _____	53
Abb. 19: Urinäre Konzentration von Androstendiol in Proben der Tiere R297, R306 und R773 vor bzw. nach Estradiol-Applikation _____	54
Abb. 20: Urinäre Konzentration von Androstendiol in Proben des Tiers R773 vor bzw. nach Progesteron-Applikation _____	55
Abb. 21: Urinäre Konzentration von Androstendiol in Proben des Tiers R298 (Estradiol und Testosteron) und des Tiers R304 (Estradiol und Progesteron) vor bzw. nach Applikation _____	56
Abb. 22: Urinäre Konzentration von DHEA in Blankproben der Tiere R297 und R305 _____	57
Abb. 23: Urinäre Konzentration von DHEA in Proben der Tiere R297, R303 und Mamie vor bzw. nach Testosteron-Applikation _____	57
Abb. 24: Urinäre Konzentration von DHEA in Proben der Tiere R297, R306 und R773 vor bzw. nach Estradiol-Applikation _____	58
Abb. 25: Urinäre Konzentration von DHEA in Proben des Tiers R773 vor bzw. nach Progesteron-Applikation _____	58
Abb. 26: Urinäre Konzentration von DHEA in Proben des Tiers R298 (Estradiol und Testosteron) und des Tiers R304 (Estradiol und Progesteron) vor bzw. nach Applikation _____	59

Abb. 27: Verlauf des Konzentrationsverhältnisses von ETIO zu Androstendiol vor und nach Testosteron-Applikation ($N = 4$) _____	61
Abb. 28: Verlauf des Konzentrationsverhältnisses von EpiT zu Androstendiol vor und nach Testosteron-Applikation ($N = 4$) _____	63
Abb. 29: Verlauf des Konzentrationsverhältnisses von EpiA zu Androstendiol vor und nach Testosteron-Applikation ($N = 2$) _____	64
Abb. 30: Verlauf des Konzentrationsverhältnisses von 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol zu Androstendiol vor und nach Testosteron-Applikation ($N = 2$) _____	65
Abb. 31: Verlauf des Konzentrationsverhältnisses von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol zu Androstendiol vor und nach Testosteron-Applikation ($N = 4$) _____	67
Abb. 32: Verlauf des logarithmisch dargestellten Konzentrationsverhältnisses von 17α -Estradiol zu Androstendiol vor und nach Estradiol-Applikation ($N = 5$) _____	69
Abb. 33: Boxplots der Vollständigkeit der Hydrolyse mit dem Enzym von <i>Helix Pomatia</i> gegenüber β -Glucuronidase von <i>Escherichia coli</i> und anschließender chemischer Hydrolyse; die nummerierten Verbindungen sind der zugesetzte Standard $^2\text{H}_5$ -Androsteron-glucuronid (1) und die endogenen Steroide Androstendiol (2), ETIO (3), 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol (4), 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol (5), DHEA (6) und 17α -Estradiol (7) _____	74
Abb. 34: GC/MS-Chromatogramme (Scan Modus, m/z 40-500) der Mischfraktion der acetylierten Androgene ohne bzw. mit NP-SPE-Aufreinigung; ETIO (1), EpiT (2), Androstendiol (3) und 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol (4) _____	78
Abb. 35: Ausschnittsvergrößerung der Zielanalyten aus Abb. 34 _____	79
Abb. 36: GC/MS-Chromatogramme (Scan Modus, m/z 40-500) der 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat (5) enthaltenden Fraktion ohne bzw. mit NP-SPE-Aufreinigung _____	80
Abb. 37: Ausschnittsvergrößerung des Peaks von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat aus Abb. 36 _____	80
Abb. 38: GC/MS-Chromatogramme (Scan Modus, m/z 40-500) der DHEA-acetat (6) enthaltenden Fraktion ohne bzw. mit NP-SPE-Aufreinigung _____	81
Abb. 39: Ausschnittsvergrößerung des Peaks von DHEA-acetat aus Abb. 38 _____	82
Abb. 40: GC/MS-Chromatogramme (Scan Modus, m/z 40-500) der acetylierten Estrogen-Fraktion ohne bzw. mit NP-SPE-Aufreinigung _____	83

- Abb. 41: Ausschnittsvergrößerung im Bereich des Peaks von 17α -Estradiol-diacetat (1) des GC/MS-Chromatogramms (Scan Modus, m/z 40-500) der acetylierten Estrogen-Fraktion von Probe P192 ohne Aufreinigung mittels NP-SPE _____ 84
- Abb. 42: HPLC/UV-Chromatogramm auf Aminopropyl-Phase bei 200 nm von EpiA (1), DHEA (2), ETIO (3) und EpiT (4) sowie das entsprechende Sammelschema _____ 86
- Abb. 43: Mittlere Wiederfindung der angegebenen Steroide der Fraktion 2 aus Abb. 42 _____ 87
- Abb. 44: HPLC/UV-Chromatogramme auf Aminopropyl-Phase bei 245 nm von jeweils 5 μ g EpiT ohne (1), mit 1‰ (2), mit 5‰ (3), mit 1% (4) oder mit 5% (5) *n*-Butylamin im *n*-Hexan _____ 89
- Abb. 45: GC/MS-Chromatogramm (Scan Modus, m/z 40-500) der TMS-Derivate von den im Anschluss an die HPLC mit 5% *n*-Butylamin im *n*-Hexan gesammelten Steroid-Standards Androstendiol (1), 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol (2), AND (3), ETIO (4), DHEA (5), EpiA (6) und EpiT (7) sowie fünf Kondensationsprodukten zwischen den Steroiden mit Ketofunktion und dem zugesetzten Amin mit dem Molekulargewicht 415 (10 und 12) oder 417 (8, 9 und 11) _____ 90
- Abb. 46: HPLC/UV-Chromatogramm auf Dimethylaminopropyl-Phase bei 200 nm von EpiA (1), DHEA (2), ETIO (3) und EpiT (4) mit entsprechendem Sammelschema _____ 91
- Abb. 47: Mittlere Wiederfindung der nach Abb. 46 gesammelten Steroide _____ 92
- Abb. 48: Ausschnitt des HPLC/UV-Chromatogramms auf Dimethylaminopropyl-Phase bei 200 nm von ETIO (1) und Androstendiol (2) mit entsprechendem Sammelschema _____ 93
- Abb. 49: HPLC/UV-Chromatogramm auf Dimethylaminopropyl-Phase bei 200 nm von DHEA (1) mit entsprechendem Sammelschema _____ 94
- Abb. 50: HPLC/UV-Chromatogramm auf Dimethylaminopropyl-Phase bei 280 nm von 17α -Estradiol (1) mit entsprechendem Sammelschema _____ 95
- Abb. 51: GC/MS-Chromatogramm (Scan Modus, m/z 40-500) von DHEA nach Derivatisierung mit Acetanhydrid von Merck; die identifizierten Verbindungen sind DHEA (1), DHEA-acetat (2) und isomere DHEA-acetessigester (3 und 4) 97
- Abb. 52: Acetanhydridherstellung _____ 98
- Abb. 53: Dimerisierung von Keten zum Diketen _____ 98
- Abb. 54: Acetessigesterbildung aus Diketen und Alkoholen _____ 98

- Abb. 55: Bildung eines gemischten Anhydrids aus Essigsäure und Diketen _____ 99
- Abb. 56: GC/MS-Chromatogramme (*Scan* Modus, m/z 40-500) der Derivatisierung von DHEA und Testosteron mit aufgereinigtem oder mit 1‰ Diketen versetzten Acetanhydrid; die identifizierten Verbindungen sind DHEA (1), DHEA-acetat (2), Testosteron (3), Testosteron-acetat (4) und isomere Acetessigester von DHEA (5 und 6) bzw. Testosteron (7 und 8) _____ 99
- Abb. 57: Ausschnitt des GC/MS-Chromatogramms aus Abb. 35 (S. 79) der für Androstendiol-diacetat (1), 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat (3) und für die koeluiierende Verbindung (2) charakteristischen Ionen _____ 101
- Abb. 58: HPLC/UV-Chromatogramm auf RP₁₈-Phase bei 200 nm von EpiT-acetat (1), ETIO-acetat (2), Androstendiol-diacetat (3) und 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat (4) mit entsprechendem Sammelschema _____ 102
- Abb. 59: GC/MS-Chromatogramme (*Scan* Modus, m/z 40-500) der gemäß Abb. 58 gesammelten Einzelfractionen 1-4 der Probe P166 (oben) sowie die übereinander gelegten Chromatogramme der Einzelfractionen (unten); die nummerierten Peaks sind die Acetate von EpiT (1), ETIO (2), Androstendiol (3), 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol (4) und die koeluiierende Matrixverbindung (5) __ 103
- Abb. 60: GC/C/IRMS-Chromatogramm (m/z 44) der Injektion von 6 μ L der in 10 μ L Aceton aufgenommenen EpiT-acetat (1) enthaltenden Fraktion der Probe P6 unter Lösungsmittelausblendung mittels KAS bei 40 °C _____ 105
- Abb. 61: GC/C/IRMS-Chromatogramm (m/z 44) der Injektion von 7 μ L des in 10 μ L Aceton gelösten Rückstands der in Abb. 60 beschriebenen EpiT-acetat (1) enthaltenden Fraktion unter Verwendung einer zweiten Haltetemperatur des KAS bei 85 °C _____ 106
- Abb. 62: Darstellung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der mono-acetylierten Zielanalyten (oben) und der bis-acetylierten Zielanalyten (unten) der wiederholt aufgearbeiteten und analysierten Rinderurinproben _____ 109
- Abb. 63: Darstellung des Referenzbereichs für die Differenz der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von ETIO-acetat und DHEA-acetat ($N = 35$) _____ 113
- Abb. 64: Darstellung des Referenzbereichs für die Differenz der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von EpiT-acetat und DHEA-acetat ($N = 31$) _____ 114
- Abb. 65: Darstellung des Referenzbereichs für die Differenz der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von EpiA-acetat und DHEA-acetat ($N = 10$) _____ 115

- Abb. 66: Darstellung des Referenzbereichs für die Differenz der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat ($N = 39$) _____ 116
- Abb. 67: Darstellung des Referenzbereichs für die Differenz der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat ($N = 17$) _____ 117
- Abb. 68: Darstellung des Referenzbereichs für die Differenz der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 17α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat ($N = 10$) _____ 118
- Abb. 69: Darstellung der Nachweisbarkeit der Testosteron-Applikationen anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von ETIO-acetat und DHEA-acetat im Vergleich zum Referenzbereich (gestrichelte Linien) und dem mittleren $\Delta\delta$ -Wert (durchgezogene Linie) _____ 120
- Abb. 70: Darstellung der Nachweisbarkeit der Testosteron-Applikationen anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von EpiT-acetat und DHEA-acetat im Vergleich zum Referenzbereich (gestrichelte Linien) und dem mittleren $\Delta\delta$ -Wert (durchgezogene Linie) _____ 123
- Abb. 71: Darstellung der Nachweisbarkeit der Testosteron-Applikationen anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von EpiA-acetat und DHEA-acetat im Vergleich zum Referenzbereich (gestrichelte Linien) und dem mittleren $\Delta\delta$ -Wert (durchgezogene Linie) _____ 125
- Abb. 72: Darstellung der Nachweisbarkeit der Testosteron-Applikationen anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat im Vergleich zum Referenzbereich (gestrichelte Linien) und dem mittleren $\Delta\delta$ -Wert (durchgezogene Linie) _____ 126
- Abb. 73: Darstellung der Nachweisbarkeit der Testosteron-Applikationen anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol-diacetat und Androstendiol-diacetat im Vergleich zum Referenzbereich (gestrichelte Linien) und dem mittleren $\Delta\delta$ -Wert (durchgezogene Linie) _____ 129
- Abb. 74: Darstellung der Nachweisbarkeit der Estradiol-Applikationen anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von 17α -Estradiol-diacetat und Androstendiol-diacetat im Vergleich zum Referenzbereich (gestrichelte Linien) und dem mittleren $\Delta\delta$ -Wert (durchgezogene Linie) _____ 130
- Abb. 75: Relevanter Ausschnitt des GC/C/IRMS-Chromatogramms der NA-Fraktion eines Blankurins; Verhältnis der Massen 45/44 (oben) und die Intensität von m/z 44 (unten) _____ 137

- Abb. 76: Relevanter Ausschnitt des GC/C/IRMS-Chromatogramms der NA (1) enthaltenden Fraktion eines mit NA-glucuronid versetzten Blankurins der Konzentration 4 ng/mL bezüglich des freien Steroids; Verhältnis der Massen 45/44 (oben) und die Intensität von m/z 44 (unten) _____ 138
- Abb. 77: GC/C/IRMS-Chromatogramme (m/z 44) der AND (2) enthaltenden Fraktion (oben) und der ETIO (3) enthaltenden Fraktion (unten) eines Blankurins; als Referenzstandard ist jeweils 5α -Androstan- 3β -ol (1) koinjiziert _____ 139
- Abb. 78: Wiederholte Bestimmung der $\delta^{13}C_{VPDB}$ -Werte von NA in Dopingkontrollproben und dessen Konzentration; erste Analyse mit *Splitless*-Injektion und Optima $\delta 3$ GC-Säule (●), zweite Analyse mit CoC-Injektion und Optima $\delta 3$ GC-Säule (○) oder HP-5MS GC-Säule (Δ) _____ 141
- Abb. 79: Wiederholte Bestimmung der $\delta^{13}C_{VPDB}$ -Werte von AND in Dopingkontrollproben mit *Splitless*-Injektion und Optima $\delta 3$ GC-Säule (●) oder mit CoC-Injektion und Optima $\delta 3$ GC-Säule (○) oder HP-5MS GC-Säule (Δ) 142
- Abb. 80: Wiederholte Bestimmung der $\delta^{13}C_{VPDB}$ -Werte von ETIO in Dopingkontrollproben mit *Splitless*-Injektion und Optima $\delta 3$ GC-Säule (●) oder mit CoC-Injektion und Optima $\delta 3$ GC-Säule (○) oder HP-5MS GC-Säule (Δ) 143
- Abb. 81: $\delta^{13}C_{VPDB}$ -Werte von NA gegen die $\delta^{13}C_{VPDB}$ -Werte von AND aus den Urinproben K1 bis K11 mit NA endogener Herkunft (○) oder exogener Herkunft (●) _____ 144
- Abb. 82: $\Delta\delta$ -Werte zwischen NA und AND der Kontrollproben K1 bis K11 mit bekannter endogener (○) oder exogener (●) NA-Herkunft gegen die NA-Konzentration _____ 145
- Abb. 83: $\delta^{13}C_{VPDB}$ -Werte von NA gegen die $\delta^{13}C_{VPDB}$ -Werte von AND von 25 Dopingkontrollproben ohne (●) oder mit (○) Demethylierungsaktivität; 13 Proben wurden wiederholt unter veränderten GC/C/IRMS-Bedingungen analysiert; die Ellipsen zeigen die vermutliche Einteilung in endogene, exogene oder uneindeutige NA-Herkunft _____ 147
- Abb. 84: $\Delta\delta$ -Werte zwischen NA und AND gegen die NA-Konzentration der 25 Dopingkontrollproben (13 wiederholt) ohne (●) oder mit (○) Demethylierungsaktivität; $\Delta\delta$ -Werte unterhalb eines möglichen Entscheidungskriteriums von -3,8‰ (gestrichelte Linie) indizieren exogene, diejenigen oberhalb endogene oder uneindeutige Herkunft von NA _____ 149

9.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Isotopeneffekte verschiedener Schritte der photosynthetischen CO ₂ -Fixierung (nach Farquhar <i>et al.</i> 1989) _____	19
Tabelle 2: Ionen und Zielanalyten der quantitativen GC/MS-Analysen _____	37
Tabelle 3: Parameter der quantitativen GC/MS-Analysen _____	37
Tabelle 4: HPLC-Parameter zum Einsatz der RP ₁₈ -Phase _____	41
Tabelle 5: HPLC-Parameter zum Einsatz der Aminopropyl-Phase _____	41
Tabelle 6: Modifizierte Lösungsmittel zum Einsatz der Aminopropyl-Phase _____	42
Tabelle 7: HPLC-Parameter zum Einsatz der Dimethylaminopropyl-Phase zur Aufreinigung der Androgene _____	42
Tabelle 8: HPLC-Parameter zum Einsatz der Dimethylaminopropyl-Phase zur Aufreinigung der Estrogene _____	43
Tabelle 9: GC/MS-Parameter zur Überprüfung der HPLC-Aufreinigung _____	44
Tabelle 10: DHEA-Konzentrationen der verschiedenen Tierversuche aus Abb. 22 bis Abb. 26 _____	59
Tabelle 11: Mediane und maximale Konzentrationen nicht geeigneter Zielanalyten	60
Tabelle 12: Durch Quantifizierung ermittelte urinaire Zielanalyten und deren Eigenschaften für den Nachweis der Applikation von Estradiol und Testosteron mittels GC/C/IRMS _____	70
Tabelle 13: $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte von Standards mit bzw. ohne HPLC-Fraktionierung gemäß Abb. 42 _____	88
Tabelle 14: Präzision der Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte acetylierter Steroid-Standards über einen Zeitraum von zwölf Monaten _____	107
Tabelle 15: Präzision der Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der acetylierten Zielanalyten aus biologischen Proben _____	110
Tabelle 16: Limits der Referenzbereiche für die $\Delta\delta$ -Werte der verschiedenen Metaboliten und den jeweiligen ERCs sowie deren Mittelwerte. _____	119
Tabelle 17: Anzahl der positiven Testosteronnachweise und der falsch negativ zugeordneten Proben von weiblichen Rindern und Ochsen anhand der verschiedenen Analytenpaare _____	133
Tabelle 18: Wiederholbarkeit der Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werts von NA in mit NA-glucuronid versetzten Blankurinen über einen Zeitraum von zwölf Monaten _____	140
Tabelle 19: $\Delta\delta$ -Werte zwischen NA und AND der Dopingkontrollproben, die Demethylierungsaktivität zeigen _____	146
	191

Tabelle 20: Rinderurinproben	167
Tabelle 21: $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ -Werte der acetylierten Zielanalyten der analysierten Rinderurinproben	173
Tabelle 22: Identität und Ergebnisse der Kontrollproben mit bekannter Herkunft von NA	176
Tabelle 23: Identität und Ergebnisse der Analyse der Dopingkontrollproben	177
Tabelle 24: Referenzverbindungen	178
Tabelle 25: Lösungsmittel	178
Tabelle 26: Chemikalien	179
Tabelle 27: Enzymlösungen	179
Tabelle 28: Pufferlösungen	179
Tabelle 29: Derivatisierungsreagenzien	180
Tabelle 30: HPLC-System	180
Tabelle 31: HPLC-Säulen	181
Tabelle 32: GC/MS-System	181
Tabelle 33: GC/C/IRMS-System 1a	181
Tabelle 34: GC/C/IRMS-System 1b, ausgerüstet mit KAS und modifizierter GC/C-Kopplung	182
Tabelle 35: GC/C/IRMS-System 2	182
Tabelle 36: Gase	183
Tabelle 37: Sonstige Geräte und Materialien	183