

GC/C-IRMS in komplexer biologischer Matrix: Untersuchungen zu den Einflussfaktoren auf die Genauigkeit der gemessenen Isotopenver- hältnisse am Beispiel der Steroid-Analytik

Dissertation

vorgelegt von Diplom-Lebensmittelchemikerin Melanie Gimpel

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:
Vorsitzender: Prof. Dr. H. Schubert
Berichter: Prof. Dr. L. W. Kroh
Berichter: Prof. Dr. R. Wittkowski

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 08.12.2010

Berlin 2011
D 83

Impressum

Dissertationen

Vorgelegt von Melanie Gimpel

GC/C-IRMS in komplexer biologischer Matrix:
Untersuchungen zu den Einflussfaktoren auf die Genauigkeit der
gemessenen Isotopenverhältnisse am Beispiel der Steroid-Analytik

Bundesinstitut für Risikobewertung
Pressestelle
Thielallee 88-92
14195 Berlin

Berlin 2011 (Dissertationen 01/2011)
129 Seiten, 77 Abbildungen, 17 Tabellen
€ 10,-

Druck: Umschlag, Inhalt und buchbinderische Verarbeitung
BfR-Hausdruckerei Dahlem

ISSN 1863-852X (Print), 2191-3137 (Internet)
ISBN 3-938163-74-7

Inhalt

1	Zusammenfassung	5
2	Problemstellung	7
3	Einleitung	9
3.1	Variationen der natürlichen Isotopengehalte	9
3.2	Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie	11
3.3	GC/C-IRMS	12
3.3.1	Kalibrieren von GC/C-IRMS-Systemen	14
3.4	Anwendungsgebiete der GC/C-IRMS	15
3.5	Einflüsse auf die Messungen von Stabilisotopenverhältnissen mittels GC/C-IRMS	18
3.6	Beurteilungs- bzw. Validierungsparameter in der GC/C-IRMS	19
4	Ergebnisse	21
4.1	Probenaufarbeitung	21
4.1.1	Einfluss der Gesamtaufarbeitung auf die Richtigkeit der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte	23
4.1.2	Einfluss der Solvolyse und Hydrolyse	24
4.1.3	Fraktionierung während der HPLC-Aufreinigung	25
4.1.4	Einfluss der 2. HPLC-Aufreinigung	28
4.1.5	Einfluss der Derivatisierung	29
4.1.6	Einfluss der Gesamtaufarbeitung auf die Präzision der $\delta^{13}\text{C}$ -Messwerte	33
4.2	Probeninjektion	38
4.2.1	Einfluss der Injektionsgeschwindigkeit	39
4.2.2	Einfluss der Injektionstemperatur	42
4.2.3	Einfluss der Injektionstechnik (<i>split</i> und <i>splitless</i>)	48
4.2.4	Einfluss des Injektionsvolumens	50
4.3	Gaschromatographische Einflüsse	50
4.3.1	Einfluss des Temperaturprogrammes und des Trägergasflusses	50
4.3.2	Peakintegration	57
4.3.3	<i>Background</i> -Korrektur	58
4.3.4	^{17}O -Korrektur	59
4.4	Einflüsse der Combustion	60
4.4.1	Einfluss der Oxidationstemperatur	64
4.5	Einflüsse am Interface	66
4.5.1	Einfluss des Helium- und des Kohlendioxidflusses	67
4.5.2	Einfluss des GC-Trägergasflusses	70
4.6	Linearität – mengenabhängige Isotopenfraktionierung	73
4.7	Kalibrierung	78
4.8	Validierung	82
4.8.1	GC/C-IRMS	83
4.8.2	Interner Standard	84
4.8.3	Aufarbeitung	85

5	Diskussion	87
5.1	Probenaufarbeitung gesamt	87
5.1.1	Solvolyse und Flüssig/flüssig-Extraktion	87
5.1.2	Fraktionierung während der HPLC	88
5.1.3	Einfluss der zweiten HPLC-Aufreinigung	89
5.1.4	Einfluss der Derivatisierung	89
5.1.5	Betrachtung der Präzision bei der Gesamtaufarbeitung	91
5.2	Probeninjektion	92
5.3	Gaschromatographische Einflüsse	94
5.4	Combustion	95
5.5	Interface	96
5.6	Linearität – mengenabhängige Isotopenfraktionierung	97
5.7	Kalibrierung	99
5.8	Validierung	100
5.9	Zusammenfassung	101
5.10	Fazit	102
6	Experimenteller Teil	105
6.1	Chemikalien und Messgase	105
6.2	Geräteparameter Basiseinstellungen	106
6.2.1	GC/C-IRMS	106
6.2.2	EA-IRMS	107
6.3	Probenvorbereitung für die EA-IRMS	107
6.4	Referenzgaskalibrierung	108
6.5	Aufarbeitung	108
6.6	Einfluss von GC/C-IRMS-Geräteparametern	109
7	Literaturverzeichnis	113
8	Abbildungsverzeichnis	121
9	Tabellenverzeichnis	127
10	Danksagung	129

1 Zusammenfassung

Die Isotopenverhältnisbestimmung mittels GC/C-IRMS findet zunehmend auch in der Untersuchung von Lebensmitteln Anwendung. Aufgrund zahlreicher potenzieller Fehlerquellen durch Isotopenfraktionierungen während der Aufarbeitung und der GC/C-IRMS-Messung ist die Anwendung dieser Technik besonders in komplexer biologischer Matrix wie zum Beispiel Lebensmitteln schwierig. Auf die Isotopenfraktionierungen verursachenden Faktoren wird in der Literatur häufig hingewiesen, sie wurden bisher jedoch kaum systematisch untersucht.

Die Einflüsse auf die Genauigkeit von GC/C-IRMS-Messwerten wurden anhand von Steroidhormonen aus Rinderurin, Steroid-Standardlösungen und Alkanen identifiziert und quantifiziert. Die Steroidhormone aus Rinderurin sind für die Beschreibung von potenziellen Fehlerquellen in der Probenaufarbeitung für die GC/C-IRMS-Analytik besonders geeignet, weil aufgrund der Komplexität der Matrix eine Vielzahl unterschiedlicher Aufarbeitungsschritte durchgeführt werden muss.

Bei der Gesamtbewertung aller Einflüsse auf die Genauigkeit der Messwerte muss berücksichtigt werden, dass diese sich sowohl addieren als auch gegenseitig aufheben können. Bei der Aufarbeitung von Steroiden aus Rinderurin und deren Vermessung mittels GC/C-IRMS sowie der Untersuchung von Alkanen wurden zahlreiche kritische Parameter identifiziert und quantifiziert. Die GC/C-IRMS ist wenig robust gegen Veränderungen von Injektions- und GC-Parametern sowie gegen Variationen von Einstellungen am Interface. Deshalb müssen die relevanten Parameter stets konstant gehalten werden. Wird sowohl eine potenzielle Isotopenfraktionierung während der Probenaufarbeitung als auch die GC/C-IRMS-Messung durch für die jeweilige Anwendung geeignete Kontrollmessungen kontinuierlich überprüft, erweist sich die GC/C-IRMS als genaue Methode für die Bestimmung von Isotopenverhältnissen auch aus komplexer biologischer Matrix wie Rinderurin.

Abstract

The determination of the isotope ratio by means of GC/C-IRMS is increasingly applied to the analysis of foodstuffs. Due to numerous potential sources of error caused by isotope fractionation during processing and GC/C-IRMS measurement use of this technique is especially difficult in complicated biological matrices, such as foodstuffs. Scientific literature often alludes to factors causing isotope fractionation; however, to date, there has been little systematic research of potential sources of error.

Influences on GC/C-IRMS measurement accuracy were identified and quantified utilizing cattle urine, standard steroid solutions, and alkanes. Because of the complex nature of the matrices requiring various sample preparation and preconcentration steps steroidal hormones in cattle urine are particularly suited for characterizing potential sources of error for GC/C-IRMS analysis sample preparation.

In the overall evaluation of the influences on measurement accuracy, it must be taken into account, that said influences may compound one another and/or may negate one another. Processing of cattle urine steroids, measurement of the same using GC/C-IRMS, and alkanes analysis, identified and quantified numerous critical parameters. GC/C-IRMS is not robust, where subjected to changing injection and GC parameters and interface setting variations. Therefore, relevant parameters should be permanently maintained. As long as, both potential isotope fractionation during the specimen processing and GC/C-IRMS measurement are continuously controlled by means of check measurements suitable for particular applications, GC/C-IRMS proves to be an accurate method for the determination of isotope ratios which is also applicable to complicated biological matrices such as cattle urine.

2 Problemstellung

Seitdem an Gaschromatographen gekoppelte Isotopenverhältnis-Massenspektrometer kommerziell verfügbar sind, wird die GC/C-IRMS auch für Fragestellungen im Bereich der Lebensmittelanalytik eingesetzt. Seit Beginn dieser Entwicklung wurden zahlreiche Methoden zur Untersuchung der Authentizität von Lebensmitteln mittels GC/C-IRMS veröffentlicht. Die meisten Anwendungen konzentrieren sich allerdings auf weniger komplexe Matrices. Die Verwendung der GC/C-IRMS für die Messung von Analyten aus komplexer biologischer Matrix ist aufgrund zahlreicher Fehlerquellen durch Isotopenfraktionierung bei der oft aufwendigen Aufarbeitung und bei der eigentlichen Messung nicht trivial. Auf die Isotopenfraktionierung wird häufig in der Literatur hingewiesen, ihre Einflussfaktoren wurden jedoch bisher nur ansatzweise systematisch untersucht.

Deshalb ist das Ziel dieser Arbeit, die Faktoren, welche die Genauigkeit, das heißt die Richtigkeit und die Präzision von Messungen der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse mittels GC/C-IRMS in komplexer Matrix beeinflussen, zu bestimmen und zu beurteilen. Dabei sind sowohl die Einflüsse der Probenaufarbeitung als auch im Besonderen die der Messtechnik auf die Bestimmung der Stabilisotopen zu betrachten. Die Ergebnisse der Probenaufarbeitung wurden im Rahmen der Messungen des am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) bearbeiteten ISOSTER-Projektes (ISOSTER – Determination of the Origin of Hormones in Cattle, funded by European Commission, DG RTD “Growth” Programme, Project No. GRD1-2001-40085) gewonnen. In diesem Projekt wurde eine GC/C-IRMS-Methode entwickelt, die einen Nachweis von in der Tiermast angewendeten natürlichen Steroidhormonen über das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis ermöglichen soll. Da die hierzu entwickelte Methode eine umfangreiche Probenaufarbeitung zur Isolierung der Analyten aus komplexer biologischer Matrix beinhaltet und umfangreiche Messungen mit den Ziel-Analyten durchgeführt wurden, sollen diese als Grundlage für die Bestimmung und Beurteilung der Einflussfaktoren einer Probenaufarbeitung auf die Genauigkeit der gemessenen Isotopenverhältnisse dienen. Die Einflüsse der Messtechnik wurden an den im ISOSTER-Projekt vermessenen Substanzen untersucht. Ergänzend hierzu wurden Untersuchungen an Alkanen verschiedener Kettenlänge durchgeführt, um den Einfluss molekülgrößenbedingter Phänomene besser beschreiben zu können.

3 Einleitung

3.1 Variationen der natürlichen Isotopengehalte

Die meisten chemischen Elemente kommen in der Natur in mehreren stabilen Isotopen vor. Die unterschiedliche Neutronenzahl der Isotope eines Elementes wirkt sich auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Molekülen aus, die mit diesen Isotopen gebildet werden. Unterschiedlich hohe Bindungsenergien bewirken, dass isotopomere Moleküle mit schwereren Isotopen im Allgemeinen langsamer reagieren als die mit leichteren Isotopen und sich deshalb im nicht umgesetzten Teil des Ausgangsstoffes anreichern („kinetischer Isotopeneffekt“). Weitere Einflüsse wie das molare Volumen, der Dampfdruck, der Siedepunkt oder der Schmelzpunkt werden als thermodynamische Isotopeneffekte zusammengefasst.

Diese kinetischen und thermodynamischen Isotopeneffekte sind die Ursache für die Isotopendiskriminierung bei der Entstehung und Umsetzung organischer Substanzen in pflanzlichen und tierischen Organismen. Dies hat eine Verschiebung des Isotopengehalts der Bioelemente H, C, N, O und S relativ zur mittleren natürlichen Häufigkeit zur Folge. Tabelle 3.1 zeigt die mittleren Isotopenverhältnisse der relevanten Bioelemente.

Tabelle 3.1: Die wichtigsten Bioelemente und die Häufigkeit ihrer stabilen Isotope

Element	Stabile Isotope	Mittlere rel. Häufigkeit in Atom% ¹⁾	Verhältnis seltenes/häufiges Isotop
Wasserstoff	¹ H	99,9885	0,000115
	² D	0,0115	
Kohlenstoff	¹² C	98,93	0,0110816
	¹³ C	1,07	
Stickstoff	¹⁴ N	99,632	0,00369
	¹⁵ N	0,368	
Sauerstoff	¹⁶ O	99,757	0,000381
	¹⁷ O	0,038	
	¹⁸ O	0,205	
Schwefel	³² S	94,93	0,000211
	³³ S	0,76	
	³⁴ S	4,29	
	³⁶ S	0,02	

¹⁾ Rosman und Taylor 1998

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Analytik der Kohlenstoffisotope. In den folgenden Teilen dieser Arbeit sind deshalb, wenn nicht anders beschrieben, stets die Kohlenstoffisotope gemeint.

In der IRMS-Analytik ist der δ -Wert eine gebräuchliche Größe für die Angabe von Isotopenverhältnissen. Der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert ist die in Promille angegebene Abweichung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses einer Probe relativ zu einem Standard (s. Formel 3.1).

$$\delta^{13}\text{C vs PDB [‰]} = \left[\frac{([\text{C}^{13}] / [\text{C}^{12}])_{\text{Probe}}}{([\text{C}^{13}] / [\text{C}^{12}])_{\text{PDB}}} - 1 \right] \times 1000 \text{ ‰}$$

Formel 3.1

Der PDB-Standard (Pee Dee Belemnite aus South Carolina) ist ein fossiles Calciumcarbonat mit dem festen Isotopenverhältnis $[^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}] = 0,0112372 \pm 0,000009$, was einem ^{13}C -Gehalt von 1,1112328 Atom% entspricht [Craig 1957]. Dieser Wert ist der Bezugspunkt der international üblichen PDB-Skala für $\delta^{13}\text{C}$ -Werte und wurde auf einen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von 0 ‰ festgelegt. Die Änderung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes um 1 ‰ entspricht also einer Änderung von 0,0010989 Atom-%.

In der Natur kommt es aufgrund der oben beschriebenen Isotopeneffekte zu Abweichungen der in Tabelle 3.1 gezeigten mittleren Häufigkeiten der stabilen Isotope. Beim Kohlenstoff zeigt sich diese Abweichung ab der dritten Nachkommastelle des Verhältnisses des ^{13}C -Isotopes zum ^{12}C -Isotop. Bei der Photosynthese führt der kinetische Isotopeneffekt bei der primären CO_2 -Fixierung der Pflanzen zu unterschiedlichen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnissen. $^{13}\text{CO}_2$ reagiert langsamer als $^{12}\text{CO}_2$, weshalb es zu einer Abreicherung von ^{13}C im organisch gebundenen Kohlenstoff im Verhältnis zu CO_2 in der Luft kommt. Der Grad der Abreicherung hängt vom jeweiligen Photosyntheseweg der Pflanze ab. In ländlichen Gebieten beträgt der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des CO_2 in der Luft -7,8 ‰, in städtischen Gebieten oder in der Nähe von Fabriken beträgt der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert zwischen -12 und -7,8 ‰.

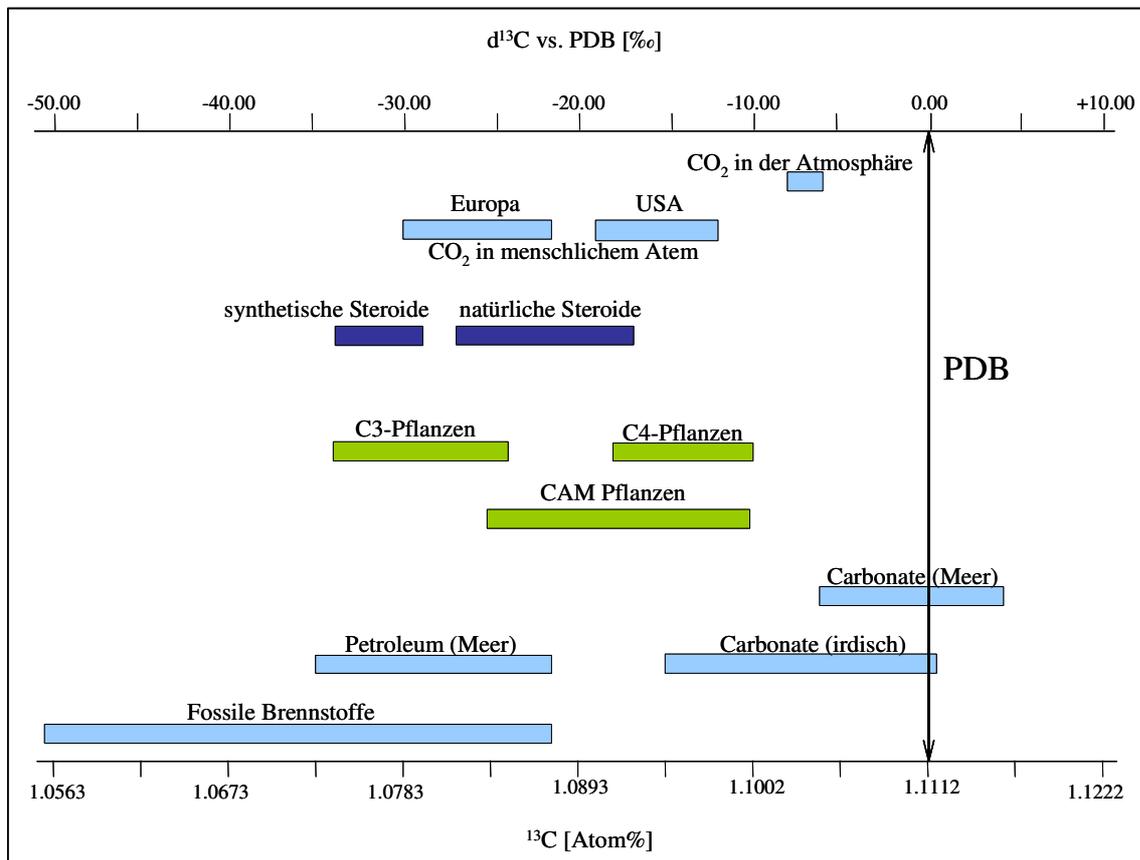


Abbildung 3.1: Natürliche Isotopenfraktionierung des Kohlenstoffs

C3-Pflanzen fixieren das CO_2 aus der Luft im Calvin-Zyklus über das Primärprodukt 3-Phosphoglycerinsäure (C3). Hierbei kommt es zu einer relativ starken ^{13}C -Abreicherung mit $\delta^{13}\text{C}$ -Werten zwischen -24 und -32 ‰ (Abb. 3.1). Zu den C3-Pflanzen gehören beispielsweise Weizen, Gerste, Hafer, Reis, Zuckerrüben, Kartoffeln, Zitrusfrüchte, Sojabohnen und Weintrauben. Die C3-Pflanzen werden wegen ihres niedrigen $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes auch „leichte Pflanzen“ genannt.

Mais, Hirse und Zuckerrohr zählen zu den C4-Pflanzen, die das CO₂ im Hatch-Slack-Zyklus über das Primärprodukt Oxalacetat (C4) fixieren, was zu einer geringeren ¹³C-Abreicherung führt. Deshalb werden diese Pflanzen auch „schwere Pflanzen“ genannt und besitzen δ¹³C-Werte zwischen –10 und –16 ‰ (Abb. 3.1).

CAM-Pflanzen (Crassulacean Acid Metabolismus) speichern CO₂ während der Nacht über eine Variante des C4-Weges in Form von Malat und setzen es tagsüber zum Einbau in Zucker wieder frei. CAM-Pflanzen, z.B. Ananas und Vanille, haben δ¹³C-Werte zwischen –12 und –30 ‰.

3.2 Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie

Die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) ist das älteste massenspektrometrische Verfahren in der analytischen Chemie. In der Geochemie, den Umweltwissenschaften und den erdgeschichtlichen Wissenschaften ist die IRMS seit Langem Standardanalytik. Mit der Entwicklung des Elemental Analyzers (EA) und des Thermal Conversion Elemental Analyzers (TC/EA) kann die Probe online in das für die IRMS benötigte Messgas überführt werden. Dies führte dazu, dass die IRMS neben ihrem Einsatz in der Geochemie nun auch in anderen Gebieten der analytischen Chemie wie der Lebensmittelchemie an Bedeutung gewann. Allerdings bietet die EA-IRMS nur die Möglichkeit der Vermessung einer Gesamtprobe (*bulk analysis*) und nicht einzelner Probenbestandteile. Barrie et al. [1984] koppelten als Erste einen Gaschromatographen über ein Online-System an ein Massenspektrometer mit zwei Massensammlern. Mit dem kommerziellen Vertrieb von an die IRMS gekoppelten Gaschromatographen ab dem Jahr 1988 können nun auch die Einzelsubstanzen einer Probe nach ihrer gaschromatographischen Auftrennung direkt an der IRMS vermessen werden [Brand 1996]. Je nach Beschaffenheit des Interfaces können die Isotopenzusammensetzungen der Elemente Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Wasserstoff einzelner Komponenten auf diese Art bestimmt werden, wobei die Messungen von ¹³C und ¹⁵N verbreiteter sind als die der anderen Elemente.

Mit herkömmlichen Massenspektrometern können durch das Scannen von Massen mehrerer hundert Dalton strukturelle Informationen über die untersuchte Probe gewonnen werden. Diese Massenspektrometer haben nur einen Detektor und können deshalb nicht zeitgleich zwei oder mehr Massen detektieren. Selbst im *SIM-Modus* (*selected ion monitoring*) können deshalb mit organischen Massenspektrometern nur Anreicherungen von mindestens 0,5 Atom% ¹³C mit ausreichender Genauigkeit gemessen werden [Meier-Augenstein 2004]. Die natürlichen Unterschiede, die in der Stabilisotopenanalytik von Interesse sind, liegen für Kohlenstoff jedoch im Bereich von 0,001 Atom% [Craig 1957; Meier-Augenstein 2004].

Isotopenverhältnis-Massenspektrometer besitzen deshalb mindestens einen Doppel-, meist jedoch einen Dreifach-Kollektor, mit denen die Ionenströme von zwei bis drei Massen simultan erfasst werden können. Zur Bestimmung der Isotopenverhältnisse der Kohlenstoffisotope ¹³C/¹²C werden die zu untersuchenden Substanzen zunächst vollständig zu CO₂ umgesetzt. Dabei eventuell entstehende Stickoxide werden anschließend zu elementarem Stickstoff reduziert. Mittels IRMS wird nun das Mengenverhältnis der entstandenen Kohlendioxid-Isotope mit den Massen 44 (¹²C¹⁶O¹⁶O) und 45 (¹³C¹⁶O¹⁶O, ¹²C¹⁶O¹⁷O) bestimmt. Die Isotopenverhältnis-Massenspektrometer, die einen Dreifach-Kollektor (drei Faraday Cups) besitzen, können zudem die Masse 46 (¹³C¹⁶O¹⁷O, ¹²C¹⁶O¹⁸O, ¹²C¹⁷O¹⁷O) simultan zu den Massen 44 und 45 erfassen. Die Signale werden anschließend digitalisiert und die Peakflächen jeder Masse integriert, aus denen dann die Isotopenverhältnisse berechnet werden. Um alle Massen in ungefähr der gleichen Intensität darstellen zu können (vgl. Abb. 3.2), werden die Ionenströme entsprechend ihrer Intensität unterschiedlich verstärkt. Die Masse 45 wird im Verhältnis zur Masse 44 100-fach verstärkt, die Masse 46 333-fach. Neben dem ¹³CO₂ wird auch das ¹²C¹⁶O¹⁷O mit der Masse 45 aufgenommen. Der Fehler, der bei der Erfassung des

^{17}O entsteht, wird von der Software moderner IRMS-Geräte, wie sie für diese Arbeit verwendet werden, automatisch korrigiert.

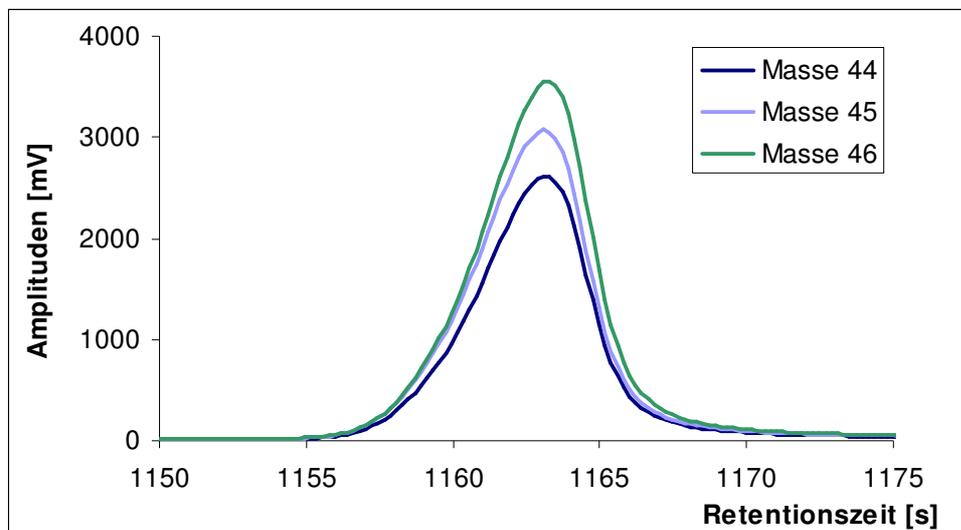


Abbildung 3.2: Auszug aus einem GC/C-IRMS-Chromatogramm: Massen 44, 45 und 46 eines Standard-Peaks

3.3 GC/C-IRMS

In der GC/C-IRMS erfolgt vor der Umsetzung der Probe zu CO_2 eine gaschromatographische Auftrennung der Einzelsubstanzen, die sich von der klassischen Gaschromatographie nicht unterscheidet. Das GC-Eluat wird direkt in den Oxidationsreaktor geleitet und dort bei ca. $950\text{ }^\circ\text{C}$ mit Platin, Nickel- und Kupferoxid als Katalysator vollständig zu Kohlendioxid und Wasser verbrannt. Im Reduktionsofen werden die in Gegenwart von Stickstoff bei der Verbrennung entstehenden Stickoxide zu elementarem Stickstoff reduziert.

Mit Hilfe eines Backflush-Ventiles ist es möglich, Lösemittel-Peaks und andere unerwünschte Komponenten nach der GC-Trennung nicht in den Oxidationsreaktor, sondern aus dem System heraus zu spülen. Dadurch wird die Lebensdauer des Verbrennungsofens erheblich erhöht. Mit der GC/C-IRMS kann im Gegensatz zur EA-IRMS nur jeweils entweder das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis oder das $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Verhältnis der Substanzen einer Probe bestimmt werden. Bei der EA-IRMS ist die simultane Bestimmung beider Elemente möglich, da das Messgas vor der IRMS chromatographisch in CO_2 und N_2 getrennt werden kann. Bevor das Messgas-Helium-Gemisch nun über einen *Open-split*-Mechanismus in die Ionenquelle geleitet wird, wird das bei der Verbrennung entstandene Wasser mittels einer semipermeablen Membran – meistens aus Nafion® – vom Messgas abgetrennt (Abb. 3.3). Dies ist erforderlich, weil sich in der Ionenquelle in Anwesenheit von Wasser HCO_2^- -Ionen bilden können, die, da sie die Masse 45 besitzen, das Messergebnis verfälschen würden [Leckrone und Hayes 1998, Meier-Augenstein 1999a].

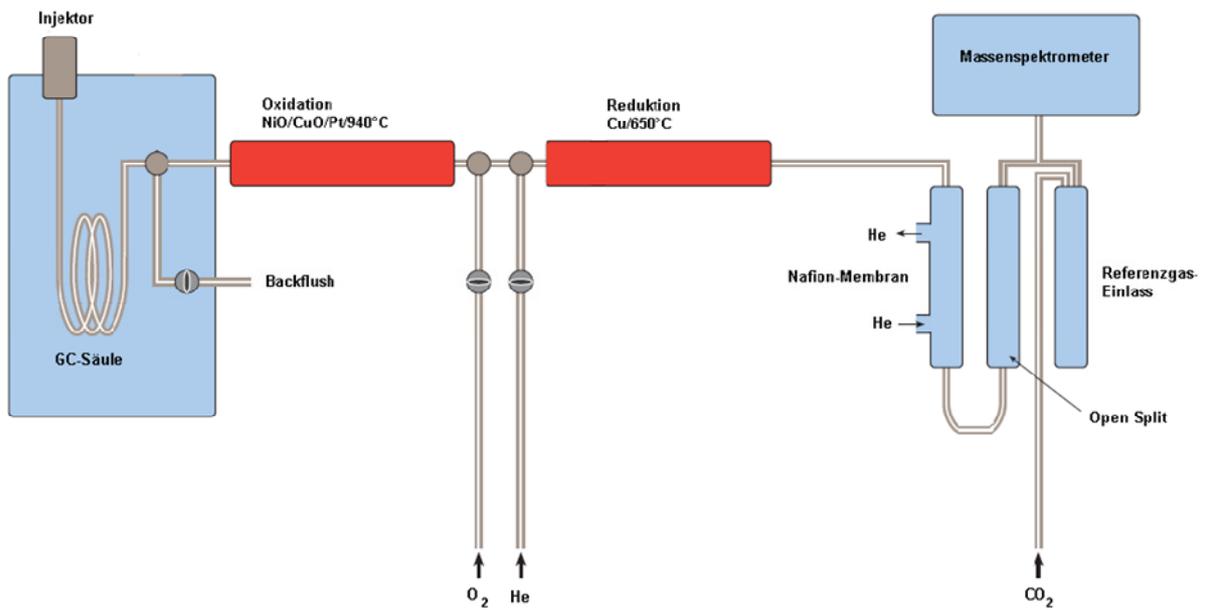
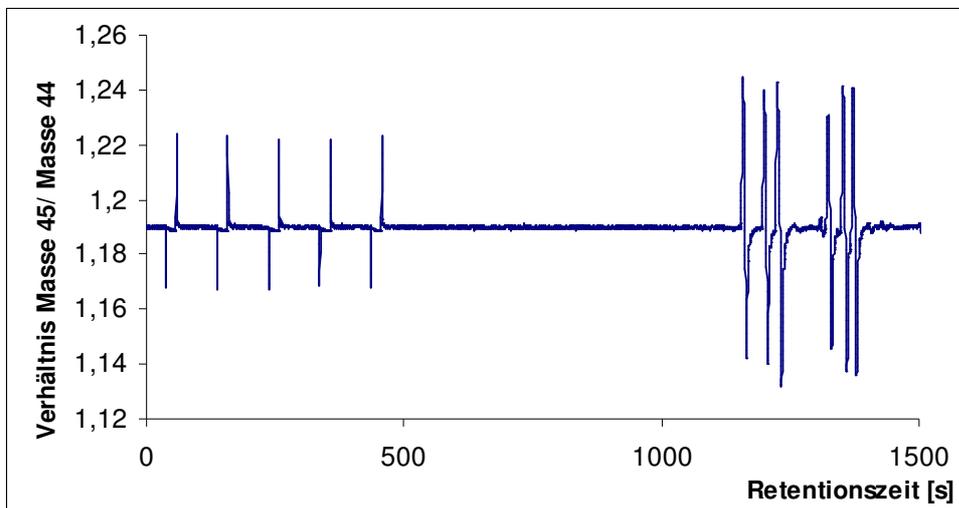


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der verwendeten GC/C-IRMS, modifiziert nach Thermo Finnigan

Während jeder Messung werden mehrere Stöße des Referenzgases CO_2 , das gegen den internationalen Bezugsstandard PDB kalibriert wurde (vgl. Kap. 3.3.1), in die Quelle eingeleitet. Die folgende Abbildung (Abb. 3.4) zeigt ein typisches GC/C-IRMS-Chromatogramm, in dem vorne die Referenzgas-Peaks und hinten die Peaks von Steroid-Acetat-Standard-Substanzen zu sehen sind.



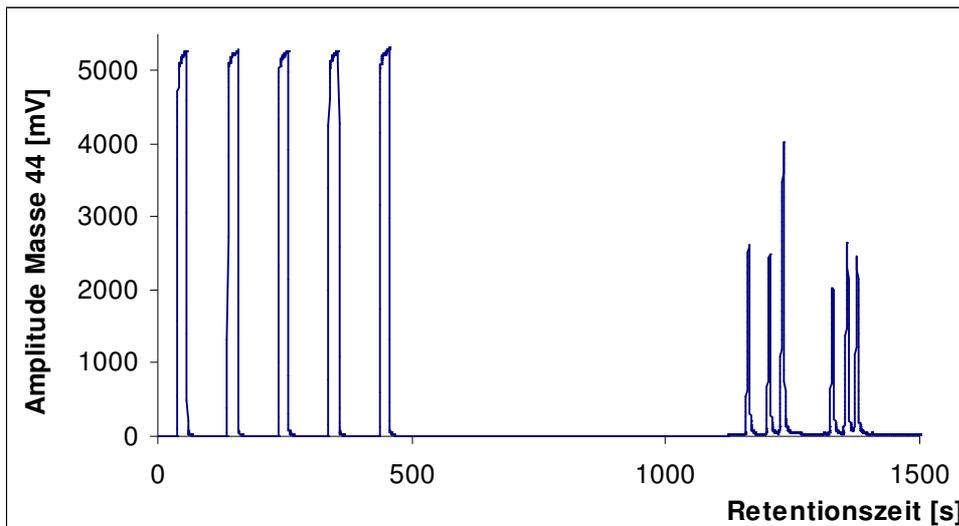


Abbildung 3.4 : Beispiel für ein GC/C-IRMS-Chromatogramm: oben Verhältnis der Massen 45 und 44 zueinander, unten Amplitude der Masse 44, vorne im Chromatogramm fünf CO₂-Referenzgas-Peaks, hinten Steroid-Acetat-Standards

Für die erfolgreiche Vermessung einer Probe mittels GC/C-IRMS müssen von jedem Analyten in der Regel mindestens 10 ng, besser jedoch ca. 50 ng injiziert werden. Somit ist die Empfindlichkeit der Isotopenverhältnis-Massenspektrometer als Detektor für die Gaschromatographie um ein Vielfaches geringer als die eines herkömmlichen Massenspektrometers.

3.3.1 Kalibrieren von GC/C-IRMS-Systemen

Die Messung von Stabilisotopenverhältnissen erfolgt nicht als Absolutwert, sondern gegen einen Standard bzw. ein standardisiertes Referenzgas, um Massendiskriminierungseffekte zu kompensieren, die im Laufe der Zeit oder von Gerät zu Gerät unterschiedlich stark ausfallen können. Zu diesem Zweck wird vor und/oder nach den Probenpeaks mehrfach ein Referenzgas (CO₂) mit bekannter Isotopenzusammensetzung in die Quelle eingelassen. Gegen einen oder mehrere dieser Referenzgas-Peaks wird das Isotopenverhältnis der Probenpeaks von der Software berechnet.

Abbildung 3.5 zeigt das für die GC/C-IRMS relevante Kalibrierschema. Für die ¹³C/¹²C-Verhältnismessung gilt der Standard PDB (PeeDee Belemnite) als Bezugspunkt und somit als *Primärstandard*. Wegen der begrenzten Verfügbarkeit der Primärstandards wurden *Sekundärstandards* gegen diesen Primärstandard vermessen und werden zum Kalibrieren der Standardgase verwendet. Diese Standards werden in der Regel vom National Institute of Standards & Technology (NIST) hergestellt und von der Internationalen Atomenergiebehörde (IAEA) zertifiziert und vertrieben. Für die ¹³C/¹²C-Verhältnismessung mit der EA-IRMS sind dies z.B. eine Polyethylenfolie (IAEA PE-foil) mit dem δ¹³C-Wert gegen PDB von -31,8 ‰ und ein Öl (IAEA NBS-22) mit dem δ¹³C-Wert gegen PDB von -29,7 ‰.

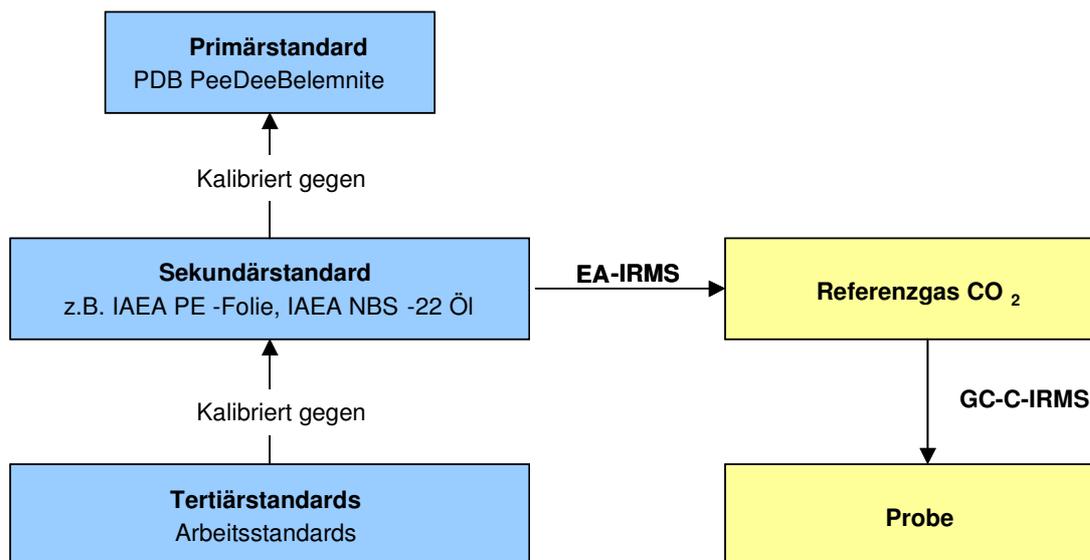


Abbildung 3.5: Standards und verwendetes Kalibrierschema für die GC/C-IRMS

Für die Überprüfung der Kalibrierung und den täglichen Laborgebrauch werden üblicherweise *Tertiärstandards* hergestellt, die über den Sekundärstandard in Bezug zum Primärstandard gesetzt werden. Letztlich wird über den Vergleich der Stabilisotopenverhältnisse des CO₂-Gases der zu vermessenen Probe mit den Isotopenverhältnissen des Referenzgases der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der Probe gegen den Primärstandard PDB bestimmt und ist so mit allen anderen gegen PDB aufgenommenen Messwerten vergleichbar (Abb. 3.5). Zertifizierte Sekundärstandards existieren bisher nur für die EA-IRMS, nicht jedoch für die GC/C-IRMS. Deshalb wurde das für die vorliegende Arbeit verwendete Referenzgas für die GC/C-IRMS-Messungen mit Hilfe der EA-IRMS mit den IAEA-Standards PE-foil und NBS 22 kalibriert. Dies ist allerdings nicht ideal, da sich die Ergebnisse von EA-IRMS-Messungen von GC/C-IRMS-Ergebnissen aufgrund chromatographischer Phänomene, Einflüsse während der Injektion und Unterschiede im Interface unterscheiden können. Diese Einflüsse sind auch abhängig von der Art der zu untersuchenden Substanzen, weshalb es wünschenswert wäre, für die GC/C-IRMS möglichst problemspezifische Standards zur Verfügung zu haben (vgl. Kapitel 4.6 Kalibrierung).

3.4 Anwendungsgebiete der GC/C-IRMS

Die Anwendungsgebiete der Stabilisotopenanalytik sind vielfältig. In der Geochemie, den erdgeschichtlichen Wissenschaften, der Archäologie und den Umweltwissenschaften gilt die IRMS seit Langem als Standardanalytik [Meier-Augenstein 2004]. Aber auch in der Lebensmittelanalytik gibt es inzwischen etablierte IRMS-Standardmethoden zur Herkunftsbestimmung und Untersuchung der Authentizität wie zum Beispiel die Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Stabilisotopenverhältnisse in Weinethanol, Fruchtsäften oder in Honig zum Nachweis einer Verfälschung durch unerlaubte Zuckering [Breas et al. 1994; Martin et al. 1996; Weber et al. 1997; Gonzales et al. 1999; Guillou et al. 2001]. Zur Herkunftsbestimmung von Wein und zum Erkennen von Verfälschungen von Fruchtsäften und Weinen durch Wässerung hat sich zudem die Bestimmung des $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnisses in der Lebensmittelanalytik etabliert [1999; Begley und Scrimgeour 1997; Rossmann et al. 1999].

Seit an Gaschromatographen gekoppelte IRMS-Geräte kommerziell erhältlich sind [Brand 1996], wird die Stabilisotopenanalytik zunehmend für diejenigen Anwendungsgebiete der analytischen Chemie interessant, in denen Einzelsubstanzen aus komplexer Matrix untersucht werden. Dies sind neben der Lebensmittelanalytik (Herkunft und Authentizität) die

Geochemie, die Archäologie, die Umweltchemie, die Dopingkontrolle im Sport und Bereiche der Stoffwechseluntersuchungen [Meier-Augenstein 1999]. Eine Recherche nach allen Veröffentlichungen mit dem Inhalt GC/C-IRMS unter den Suchbegriffen „GC/C-IRMS“, „GC-IRMS“ und „Compound Specific Carbon Isotope Analysis“ ergab 566 Ergebnisse aus den Jahren 1990 bis 2008. Abbildung 3.6 zeigt anhand der Anzahl der Artikel pro Jahr die wachsende Bedeutung der GC/C-IRMS.

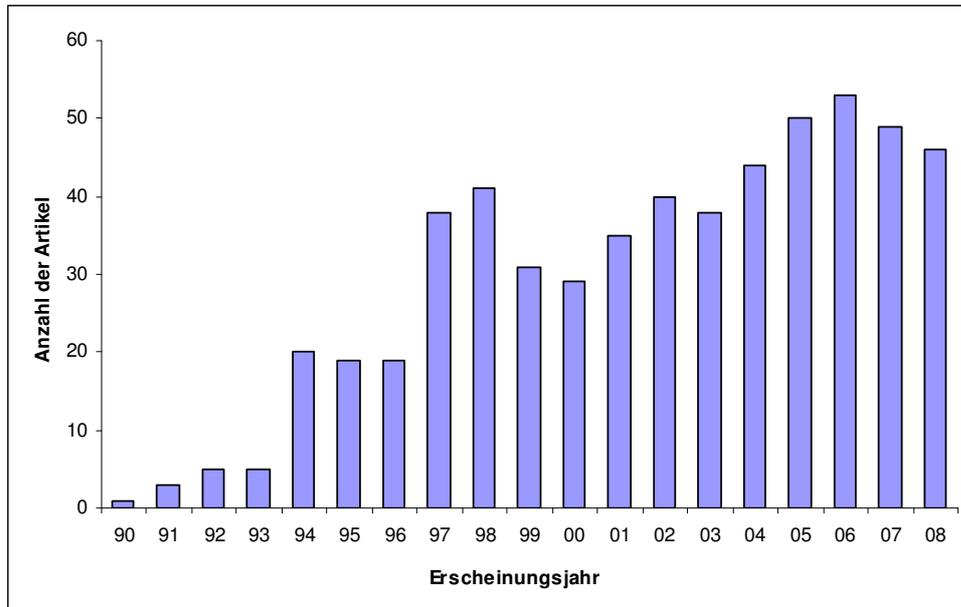


Abbildung 3.6: Anzahl der unter den Suchbegriffen „GC/C-IRMS“, „GC-IRMS“ und „Compound Specific Carbon Isotope Analysis“ gefundenen Artikel der Jahre 1990 bis 2008

Dem Fachgebiet der Chemie sind 29 % der Arbeiten zuzuordnen und den Geowissenschaften 17 %. Aus den Anwendungsgebieten der Umweltwissenschaften, der Agrarwissenschaften und der Biologie sowie der Biochemie, Genetik und Molekularbiologie stammen jeweils 12 % der Veröffentlichungen und aus der Medizin 5 % (s. Abb. 3.7).

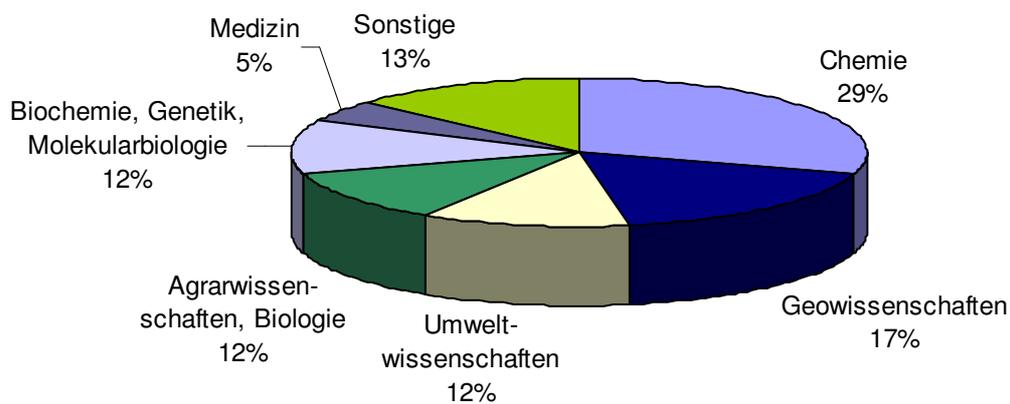


Abbildung 3.7: Aufteilung der Literatur nach Fachgebieten

In der Lebensmittelchemie wird die GC/C-IRMS bisher hauptsächlich in der Aromenforschung eingesetzt. Es wurden ^{13}C -Isotopenanalysen an Transanethol [Bilke und Mosandl 2002], 2- und 3-Methylbutanol [Schumacher et al. 1999], Korianderöl [Frank et al. 1995], Zitronenöl und Orangenöl [Braunsdorf et al. 1993a; Braunsdorf et al. 1993b], Estragol und Methyl Eugenol [Ruff et al. 2002], Mandarinenöl [Faulhaber et al. 1997a, Faulhaber et al. 1997b], Aromakomponenten verschiedener Schwarzteesorten [Weinert et al. 1999], flüchtige Komponenten der Birne und Ananas [Preston et al. 2003; Kahle et al. 2005], α - und β -Ionone aus Himbeeren [Sewenig et al. 2005], γ - und δ -Decalactone aus Steinobst der Gattung *prunus* [Tamura et al. 2005] und Zimtaldehyd [Sewenig et al. 2003] zur Bestimmung der Authentizität von Aromen durchgeführt. Weitere Arbeiten beschäftigen sich mit der Authentizität von Vanillearoma [Fayet et al. 1999; Bensaid et al. 2002; Scharrer und Mosandl 2002]. Neben den $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnissen werden zunehmend auch die $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Verhältnisse und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Isotopenverhältnisse untersucht.

Über das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis einzelner Fettsäuren verschiedener pflanzlicher Öle lassen sich Verfälschungen hochwertiger Fette mit minderwertigeren und preiswerteren Fetten erkennen [Woodbury et al. 1995; Kelly et al. 1997; Angerosa et al. 1997; Woodbury et al. 1998a; Woodbury et al. 1998b; Spangenberg et al. 1998; Angerosa et al. 1999; Royer et al. 1999; Spangenberg und Ogrinc 2001]. Auf die gleiche Weise konnten Spangenberg und Dionisi [2001] auch die Zugabe von pflanzlichen Fetten zu Kakaobutter nachweisen.

Ein weiterer Themenkomplex der Lebensmittelchemie, in dem die GC/C-IRMS zum Einsatz kommt, ist die Authentizitätskontrolle von (alkoholischen) Getränken. Hener et al. bestimmten mittels Headspace-GC/C-IRMS die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Ethanol aus diversen alkoholhaltigen Getränken [Hener et al. 1995; Hener et al. 1998]. Die Authentizität von Tequila lässt sich mit Hilfe der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse und der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnisse des Ethanols überprüfen [Aguilera-Cisneros et al. 2002], ebenso wie die von Scotch Whisky anhand der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse [Parker et al. 1998]. Eine relativ neue Methode ist die Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes (und des $\delta^{18}\text{O}$ -Wertes) von Weinglycerin mit dem Ziel, einen unerlaubten Zusatz von Glycerin nachzuweisen [Calderone et al. 2004; Jung et al. 2006]. Mit Hilfe der GC/C-IRMS kann die Herkunft von CO_2 in Mineralwasser (natürlich oder industriell) nachgewiesen werden [Redondo und Yelamos 2005], ebenso wie der Zusatz von CO_2 zu Schaumweinen [Calderone et al. 2007]. Kelly et al. [2003] gelang über die Bestimmung der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse von Hexamethyltetramin aus Fruktose der Nachweis von Zuckersirupzusatz zu Apfelsaft.

Ein relativ neues Einsatzgebiet ist die Entwicklung von Methoden zur Bestimmung des unerlaubten Einsatzes von endogenen Hormonen in der Fleischproduktion mit Hilfe der GC/C-IRMS. Das Prinzip gleicht dem in der Kontrolle des Humandopings, wo die GC/C-IRMS schon seit einiger Zeit Anwendung findet. Der Beweis von Doping kann bei der Verwendung von endogenen Hormonen nicht alleine über deren Quantifizierung erfolgen, da bei einer Quantifizierung keine Unterscheidung natürlich gebildeter und unerlaubt verabreichter Mengen gemacht werden kann. Aufgrund der großen natürlichen Schwankungsbreiten bei Hormonen zwischen einzelnen Individuen lassen sich schwer quantitative Grenzwerte festlegen. Nach der Einnahme von endogenen Hormonen ändert sich allerdings die Isotopenzusammensetzung der entsprechenden Hormone und ihrer Metaboliten im Organismus, während die Isotopenzusammensetzung der Vorläufersubstanzen unverändert bleibt. Zur Kontrolle unerlaubten Dopings beim Sport werden deshalb die Isotopenverhältnisse geeigneter Vorläufersubstanzen und die der verdächtigen Hormone oder ihrer Metaboliten aus dem Urin bestimmt. Wenn sich die Isotopenverhältnisse der unerlaubt eingenommenen Hormone von den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten der körpereigenen Hormone unterscheiden, ist über diese Differenz die Einnahme von endogenen Hormonen nachweisbar [Aguilera et al. 1996a; Aguilera et al. 1996b; Schänzer et al. 1997; Shackleton et al. 1997a; Shackleton et al. 1997b; Aguilera et al. 1999; Ueki et al. 1999; Aguilera et al. 2000; Bourgoigne et al. 2000; Aguilera et al. 2001; Mathurn et al. 2001; Desroches et al. 2002; Saudan et al. 2004; Baume et al. 2006].

Neben den im Rahmen des ISOSTER-Projektes veröffentlichten Arbeiten zur Detektion einer Behandlung von Rindern mit Testosteron und 17β -Estradiol [Buisson et al. 2005; Hebestreit et al. 2006] wurden auf diesem Gebiet bisher nur wenige Ergebnisse publiziert. Ferchaud et al. bestimmten die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von DHEA als Vorläufersubstanz und den Metaboliten Epitestosteron und Etiocholanolon aus dem Urin einer Kuh in einem Zeitraum von 23 Tagen nach der intramuskulären Gabe von Testosteronenanthat und ermittelten dabei Unterschiede von bis zu 4,2 ‰ zwischen dem Testosteron-Vorläufer und den Metaboliten [Ferchaud et al. 1998]. In einer weiteren Studie untersuchten Ferchaud et al. den Einfluss der Fütterung und des Alters der Tiere auf die Isotopenverhältnisse der oben genannten Substanzen [Ferchaud et al. 2000]. Mason et al. untersuchten die Isotopenverhältnisse von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol und Cholesterol aus der Galle von 48 h vor der Schlachtung mit Testosteronpräparaten behandelten Rindern mittels GC/C-IRMS. Allein anhand der absoluten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol konnte kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren gemessen werden. Die Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von 5β -Androstan- $3\alpha,17\alpha$ -diol zu dessen Vorläufer Cholesterol war jedoch bei den behandelten Tieren signifikant größer als bei den unbehandelten [Mason et al. 1998]. Balisz et al. zeigten die Unterschiede der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von DHEA, Etiocholanolon und Epitestosteron aus Rinderurin in Abhängigkeit von der Fütterung der Tiere (Mais- oder Grasfütterung) anhand von vier jungen Bullen [Balisz et al. 2005].

Vor der Vermessung der Zielanalyten mittels GC/C-IRMS ist eine aufwendige Aufarbeitung der komplexen Matrix notwendig. Die Einflüsse der unterschiedlichen Aufarbeitungsschritte und der Messbedingungen auf die Ergebnisse wurden bisher nur wenig untersucht (s. Kap. 3.5).

3.5 Einflüsse auf die Messungen von Stabilisotopenverhältnissen mittels GC/C-IRMS

Sowohl während der Probenaufarbeitung für die GC/C-IRMS als auch während der Messung kann es zu Isotopenfraktionierungen kommen, die das Messergebnis verfälschen. Die besonderen Anforderungen, wie eine ausreichende Analytenmenge, die richtige Derivatisierung der Analyten, die Qualität der gaschromatographischen Trennung, das Interface-Design und die geeignete Kalibrierung für die Messungen mittels GC/C-IRMS, wurden in einigen Übersichtsartikeln [Meier-Augenstein 1999; Meier-Augenstein 2002; Meier-Augenstein 2004] angeführt. Das Ausmaß der entstehenden Fehler und Ungenauigkeiten bei Abweichungen von den idealen Messbedingungen wurde bisher wenig diskutiert.

Nach Meier-Augenstein [1999; 2004] sind folgende Punkte als Ursachen für eine Massendiskriminierung und somit eine mögliche Isotopenfraktionierung während der GC/C-IRMS-Messung zu berücksichtigen:

1. Isotopenfraktionierung während der Injektion
2. chromatographischer Isotopeneffekt
3. chromatographische Peakverformung (Fronting und Tailing)
4. Verbrennungsprozess (Combustion)
5. Peakverformung des CO_2 -Gas-Peaks während der Passage durch das Combustion-Interface
6. Änderung der Gasflüsse im *open-split*
7. das Isotopenmassenspektrometer

Außerdem ist bei Probenaufarbeitungsschritten mit Flüssigchromatographie und Festphasenextraktion sowie bei der Derivatisierung eine Isotopenfraktionierung möglich [Meier-Augenstein 2002].

In dieser Arbeit werden anhand der Steroide und teilweise anhand von Alkanen verschiedener Kettenlänge die Einflüsse von Aufarbeitungsschritten und der Messtechnik auf die Isotopenfraktionierung und somit die Genauigkeit untersucht. Die Schwerpunkte liegen bei der Messtechnik auf der Probeninjektion und der Gaschromatographie sowie dem Verbrennungsprozess und den Gasflüssen im Interface. Zudem wird der Einfluss der Gesamt-Probenaufarbeitung und einiger Einzelschritte auf die Genauigkeit der ermittelten Isotopenverhältnisse untersucht. Bei den einzelnen Aufarbeitungsschritten liegt der Schwerpunkt auf der HPLC-Aufreinigung sowie der Derivatisierung der Zielsubstanzen.

3.6 Beurteilungs- bzw. Validierungsparameter in der GC/C-IRMS

Es gibt für die Validierung einer Methode verschiedene Möglichkeiten wie die In-house-Validierung oder Ringversuche. Parameter für eine Methodvalidierung sind a) die Richtigkeit, b) die Präzision, c) die Linearität, d) die Wiederfindung, e) die Bestimmungs- und die Nachweisgrenze, f) die Selektivität und Spezifität und g) die Robustheit [Kromidas 1999]. In der GC/C-IRMS-Analytik können nicht alle üblichen Validierungsparameter bestimmt werden oder besitzen hier eine andere Relevanz als bei klassischen Analysenmethoden wie der Quantifizierung.

a) Richtigkeit

Die Richtigkeit ist das Maß der Abweichung eines Messwertes vom richtigen Wert aufgrund eines systematischen Fehlers [ISO 5725-1]. Dabei bezieht man sich auf einen Wert, der als fehlerfrei gilt, wie zum Beispiel der Wert eines zertifizierten Referenzmaterials. Als quantitatives Maß für die Richtigkeit gilt die systematische Ergebnisabweichung. Für die EA-IRMS existieren zertifizierte Standards mit bekannten Isotopenverhältnissen. Für Anwendungen mit der GC/C-IRMS gibt es solche zertifizierten Standards bislang noch nicht. Für die vorliegende Arbeit wurden Versuche mit diversen Steroiden und Alkanstandards durchgeführt, um die Richtigkeit von GC/C-IRMS-Methoden zu bestimmen (s. Kap. 4.7).

b) Präzision

Die Präzision einer Methode beschreibt, wie groß die Streuung der Messwerte aufgrund zufälliger Fehler ist [ISO 5725-1]. Sie wird entweder als Standardabweichung aus verschiedenen Einzelmesswerten oder als deren Varianz angegeben. In dieser Arbeit wird zwischen der *Messpräzision*, welche die Wiederholpräzision für die GC/C-IRMS-Messung bedeutet, und der *Methodenpräzision*, welche die gesamte Aufarbeitung mit einschließt, unterschieden.

Die Genauigkeit ist das Maß für den Gesamtfehler einer Analyse und ist damit ein Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision [ISO 5725-1].

c) Linearität

Die Linearität stellt ein Maß für den mathematischen Zusammenhang zwischen dem Messwert beziehungsweise dem Messsignal und der Konzentration eines Analyten dar [Kromidas 1999]. Bei der IRMS sollte der Messwert unabhängig von der Menge des eingesetzten Analyten beziehungsweise der Signalhöhe sein. Die dennoch in Abhängigkeit von der Probenkonzentration bzw. der Höhe des Signals bestehende Abweichung des Messwertes kann über die Bestimmung der Linearität erfasst und berücksichtigt werden. Die Linearität der IRMS-Methode wird im Kapitel 4.6 eingehend betrachtet.

d) Wiederfindung

Die Wiederfindung ist in der quantitativen Analytik das Verhältnis des gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in der Probe und stellt die Ausbeute dar [Kromidas 1999]. Da die IRMS keine quantifizierende Methode ist, kann keine Wiederfindung bestimmt werden.

e) Bestimmungsgrenze, Nachweisgrenze

Auch die Bestimmungs- und die Nachweisgrenzen sind für die IRMS-Analytik nicht anwendbar. Sie beschreiben die kleinste quantifizierbare beziehungsweise die kleinste nachweisbare Menge eines Analyten [Kromidas 1999]. Es gibt aber eine bestimmte Probenmenge bzw. eine Signalhöhe, die für eine Messung der Stabilisotopenverhältnisse nötig ist und die mit der Bestimmungsgrenze einer Methode gleichgesetzt werden kann.

f) Selektivität und Spezifität

Eine Methode ist selektiv, wenn sie verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung erfasst. Sie ist spezifisch, wenn sie den zu bestimmenden Analyten erfasst, ohne dass das Ergebnis durch andere Bestandteile wie zum Beispiel Matrix beeinflusst wird [Kromidas 1999]. Spezifität ist bei der GC/C-IRMS nicht gegeben.

g) Robustheit

Die Robustheit beschreibt das Ausmaß der Unabhängigkeit eines Ergebnisses von Änderungen relevanter Einflussparameter [ISO/WD 13530]. Als Maß für die Robustheit einer Methode gilt der Bereich, in dem das Ergebnis von einer Änderung des Parameters unabhängig ist. Dieser Validierungsparameter ist für die GC/C-IRMS anwendbar und wird mit der Untersuchung der Einflussfaktoren auf die Genauigkeit der Stabilisotopenmessungen bestimmt.

4 Ergebnisse

Alle in dieser Arbeit dargestellten und diskutierten GC/C-IRMS-Ergebnisse stammen, wenn nicht anders angegeben, aus Dreifachmessungen. Zum Identifizieren und Eliminieren von Ausreißern wurde der Grubbs-Ausreißertest mit einem Signifikanzniveau von 95 % angewendet. Zum Vergleich zweier (Mittel-)werte wurde – wenn nicht anders angegeben – der t-Test (Student-Test) durchgeführt, mit dem die Signifikanzen der Unterschiede der Mittelwerte mit einem Signifikanzniveau von 95 % berechnet wurden. Zum Überprüfen der Homogenität der Varianzen wurde der Varianzen-F-Test ebenfalls mit einem Signifikanzniveau von 95 % durchgeführt. In allen Grafiken werden die Ergebnisse von gleichzeitig – also in derselben Mischung – gemessenen Analyten in ihrer Elutionsreihenfolge dargestellt. Die Fehlerbalken stellen stets die einfache Standardabweichung der abgebildeten Mittelwerte dar.

Im Allgemeinen sind im Folgenden nur die direkt gegenübergestellten Werte miteinander vergleichbar, da sie auch unter identischen Bedingungen ermittelt wurden. Ein Vergleich absoluter $\delta^{13}\text{C}$ -Werte aus verschiedenen Kapiteln dieser Arbeit ist nur bedingt möglich.

Folgende Punkte der Aufarbeitung, der GC/C-IRMS-Messung und der Auswertung wurden in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Genauigkeit der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte untersucht:

- **Aufarbeitung:** Gesamtaufarbeitung und die Einzelschritte Solvolyse, HPLC, Derivatisierung, Probenmatrix und Analytkonzentration
- **GC/C-IRMS, Injektion:** Lösemiteleinflüsse, Injektionsgeschwindigkeit, Injektionstemperatur, Liner, Purgetime, Injektionstechnik
- **GC/C-IRMS, Gaschromatographie:** GC-Temperaturprogramm, Trägergasfluss
- **GC/C-IRMS, Auswertung:** Peakintegration, *Background*-Korrektur, ^{17}O -Korrektur
- **Combustion:** Sauerstoffgehalt des *Combustion*-Ofens, Oxidationstemperatur
- **GC/C-Interface:** Helium- und Kohlendioxidfluss, GC-Trägergasfluss
- mengenabhängige Isotopendiskriminierung, Kalibrierung

4.1 Probenaufarbeitung

Für Messungen von biologischen Matrices mit der GC/C-IRMS ist eine Probenaufarbeitung nötig, um die gewünschten Analyten aufzureinigen und gegebenenfalls aufzukonzentrieren. Die zu untersuchenden Analyten müssen basisliniengetrennt und frei von unerwünschten Begleitstoffen sein. Oft ist eine Derivatisierung schwer flüchtiger Substanzen nötig. Die Aufarbeitung muss möglichst diskriminierungsfrei geschehen, um eine Isotopenfraktionierung zu vermeiden.

Die folgenden Steroidhormone wurden im ISOSTER-Projekt nach ihrer Isolierung aus Rinderurin und einer mehrstufigen Aufarbeitung zur Aufreinigung und Konzentrierung mit der GC/C-IRMS vermessen: DHEA, Epitestosteron, Etiocholanolon, Epiandrosteron, 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol, 5-Androsten-3 β ,17 α -diol, Estron, 17 α -Estradiol und 17 β -Estradiol.

Die Isolierung dieser Analyten erfolgte aus jeweils 20 ml Rinderurin. Der erste Schritt ist die enzymatische Hydrolyse zur Freisetzung der glucuronidisch gebundenen Steroide, gefolgt von einer Festphasenextraktion an C18-Material. Bei der sich anschließenden Flüssig/flüssig-Extraktion werden die Steroide durch Extraktion bei unterschiedlichen pH-Werten in drei verschiedene Fraktionen, die Androgen-, die Estrogen- und die Sulfatfraktion, aufgetrennt. Für die Androgen- und die Estrogenfraktion folgen jeweils eine weitere Festphasenextraktion an einer SiOH-Phase und eine Aufreinigung mittels HPLC (N[CH₃]₂-Phase). Nach

der HPLC liegen die Steroide in Unterfraktionen vor und werden entweder in diesen Unterfraktionen weiterbehandelt und vermessen oder gegebenenfalls vor der Analyse mit der IRMS wieder vereinigt. Sowohl die Androgene als auch die Estrogene werden nach der HPLC acetyliert. Die Estrogene sind nach dieser Derivatisierung direkt an der GC-MS und GC/C-IRMS messbar. Die Steroide der Androgenfraktion werden nach der Derivatisierung ein weiteres Mal mittels HPLC (RP-18-Säule) aufgereinigt und in verschiedenen Fraktionen gesammelt. Nach diesem letzten Schritt können nun auch die Androgene mittels GC-MS und GC/C-IRMS vermessen werden. Die nach der Flüssig/flüssig-Extraktion erhaltene Sulfatfraktion wird zunächst an einer C18-Festphase aufgereinigt und anschließend werden die als Sulfat gebundenen Steroidhormone mittels saurer Hydrolyse freigesetzt. Die Androgene der Sulfatfraktion werden analog zur Aufarbeitung der Estrogenfraktion weiterbehandelt: Nach einer Aufreinigung an einer SiOH-Festphase folgen die HPLC (N[CH₃]₂-Phase) und die Acetylierung vor der Vermessung mit der GC-MS und GC/C-IRMS.

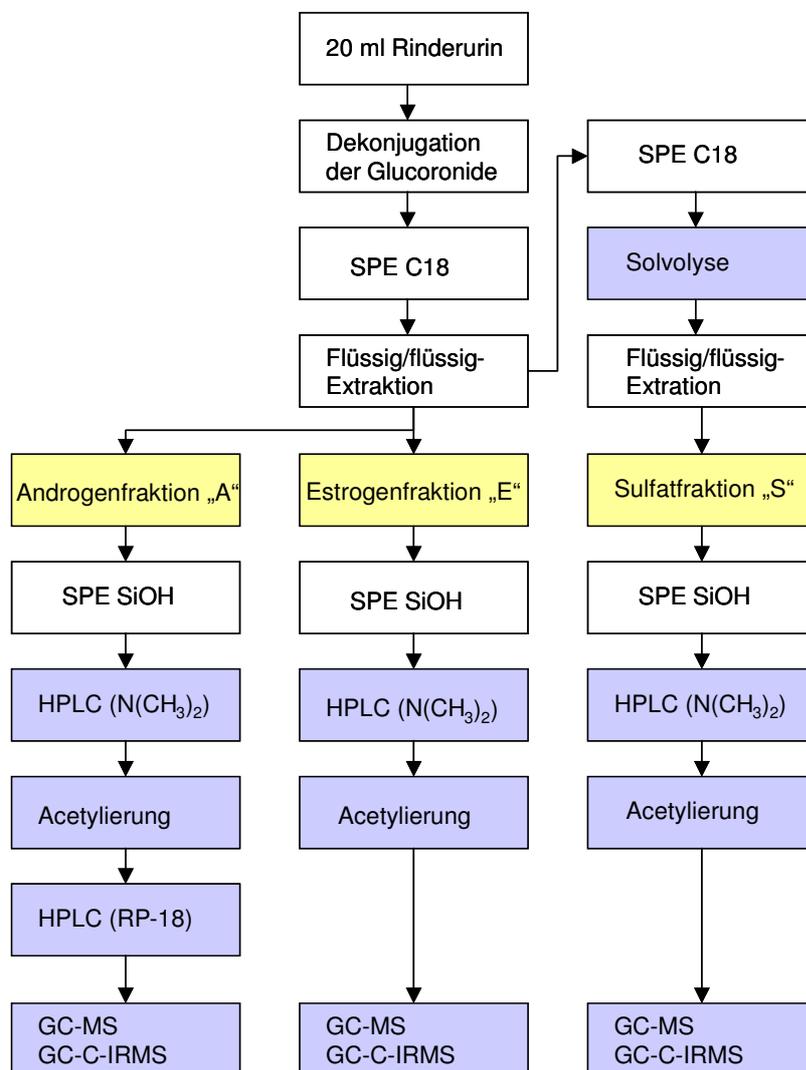


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung aller Aufarbeitungsschritte zur Isolierung und Aufreinigung der Steroidhormone aus Rinderurin; Methode nach Hebestreit et al. [2006] und Buisson et al. [2005], in dieser Arbeit näher untersuchte Einzelschritte sind blau unterlegt.

Vor der Vermessung der Proben mit der GC/C-IRMS erfolgt zunächst die Überprüfung der Aufreinigung mittels GC-MS. Hierbei werden sowohl die für die GC/C-IRMS-Bestimmung notwendige Reinheit der Extrakte überprüft als auch die Identifizierung und Quantifizierung der Analyten vorgenommen. Für die Injektion in die GC/C-IRMS werden mindestens 10 ng, optimal jedoch etwa 50–100 ng pro Analyt benötigt. Nach der Quantifizierung mit der GC-MS werden die Messlösungen für die GC/C-IRMS auf diese Konzentrationen eingestellt. Bei der Probenaufarbeitung muss sichergestellt werden, dass keine Isotopendiskriminierung erfolgt.

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der verwendeten Standardmischungen (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten Standardmischungen

Name der Mischung	Zusammensetzung der Mischung
Steroid-Acetat-Standard	DHEA-Acetat, Estron-Acetat, Testosteron-Acetat, 17 β -Estradiol-Acetat, 5 α -Androstan-3 β -ol, 5 α -Cholestan in Cyclohexan
<i>Spiked Water</i>	Epitestosteron-, DHEA-Sulfat-, DHEA-, 5-Androsten-3 α ,17 β -diol und Etiocholanolon-Glucuronid-Standards in Wasser
Alkanstandard nach Schimmelmann	Alkane der Kettenlänge C16 bis C30 in n-Hexan
Alkan-Mischung	Alkane C16, C20, C22, C24, C30, C32 in n-Hexan
Kontrollurin	Rinderurinmischung

4.1.1 Einfluss der Gesamtaufarbeitung auf die Richtigkeit der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte

Die Genauigkeit einer Messmethode setzt sich aus der Richtigkeit und der Präzision der mit ihr gemessenen Werte zusammen. Im Folgenden wird zunächst auf die Einflüsse der Probenaufarbeitung auf die Richtigkeit der $\delta^{13}\text{C}$ -Messwerte eingegangen. Am Ende dieses Kapitels werden die Aufarbeitungs- und insbesondere die Matrixeinflüsse auf die Präzision der gemessenen Stabilisotopenwerte anhand verschiedener Rinderurinproben näher betrachtet (Kap. 4.1.6).

Der Einfluss der Probenaufarbeitung ließ sich nicht für alle Schritte anhand von authentischen Proben untersuchen. In den meisten Fällen konnten diese Untersuchungen nur mit Standards durchgeführt werden, da nur so ein Vergleich der nach der Aufarbeitung erhaltenen $\delta^{13}\text{C}$ -Messwerte mit denen vor einer Aufarbeitung bestimmt werden kann. Im ISOSTER-Projekt wurden zur ständigen Überprüfung der Aufarbeitungseinflüsse auf die Messwerte und zur Beurteilung der Stabilität der Messungen Standards mit aufgearbeitet und vermessen. So wurde Wasser mit den Standardsubstanzen Epitestosteron, Etiocholanolon, 5-Androsten-3 β ,17 α -diol, DHEA und DHEA-Sulfat dotiert, wie die Proben aufgearbeitet und mit der GC/C-IRMS vermessen.

Tabelle 4.2: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einiger Standardsubstanzen vor ihrer Aufarbeitung (EA-IRMS) und nach der Aufarbeitung und Derivatisierung mit der GC/C-IRMS gemessen

	Epitestosteron	DHEA-Sulfat	DHEA	Etiocholanolon	5-Androstendiol
vor Aufarbeitung [‰]	-33,01	-29,99	-30,73	-21,94	-29,98
Standardabw. [‰]	0,024	0,086	0,053	0,066	0,009
n	5	5	5	5	5
nach Aufarbeitung [‰]	-35,54	-32,62	-33,22	-25,55	-34,26
Standardabw. [‰]	0,513	0,636	0,109	0,109	0,253
n	11	11	10	10	10
nach Aufarbeitung – vor Aufarbeitung	-2,53	-2,63	-2,49	-3,61	-4,28

Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte dieser Substanzen ohne Aufarbeitung wurden mit der EA-IRMS bestimmt. Nach der Aufarbeitung wurden für Epitestosteron, DHEA-Sulfat, DHEA und Etiocholanolon zwischen 2,5 und 2,6 % niedrigere $\delta^{13}\text{C}$ -Werte als im unbearbeiteten Zustand gemessen (s. Tabelle 4.2). Bei 5-Androsten- $3\beta,17\alpha$ -diol beträgt der Unterschied $-4,3\text{‰}$. Die Standardabweichungen liegen bei der GC/C-IRMS-Messung mit 0,11 bis 0,64 ‰ teilweise deutlich über denen der EA-Werte mit 0,01 bis 0,09 ‰. Diese signifikanten Unterschiede in den gemessenen Isotopenverhältnissen und der Präzision der Daten verdeutlichen, dass es während der Probenaufarbeitung und/oder bei der Messung der Proben zu Isotopendiskriminierungen kommt, die das Messergebnis beeinflussen. In den folgenden Kapiteln dieser Arbeit werden die Einflüsse einzelner ausgewählter Aufarbeitungsschritte und die der Messmethoden auf die Genauigkeit der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte untersucht.

4.1.2 Einfluss der Solvolyse und Hydrolyse

Die ersten Schritte der Urinaufarbeitung für die Vermessung der Steroidhormone sind die Dekonjugation der Steroid-Glucuronide mittels enzymatischer Hydrolyse und der Steroid-Sulfate mittels Solvolyse.

Eine gesonderte Betrachtung des Einflusses der enzymatischen Hydrolyse der Steroid-Glucuronide auf die Messung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes analog zur Betrachtung der Solvolyse ist nicht möglich. Bei der EA-IRMS-Messung des Steroid-Glucuronides können die C-Atome des Steroides nicht getrennt von denen des Glucuronidrestes erfasst werden. Der Sulfat-Rest der Steroid-Sulfate enthält dagegen keinen Kohlenstoff. Bei der Vermessung des DHEA-Sulfates mit der EA-IRMS werden ausschließlich die C-Atome des Steroides erfasst.

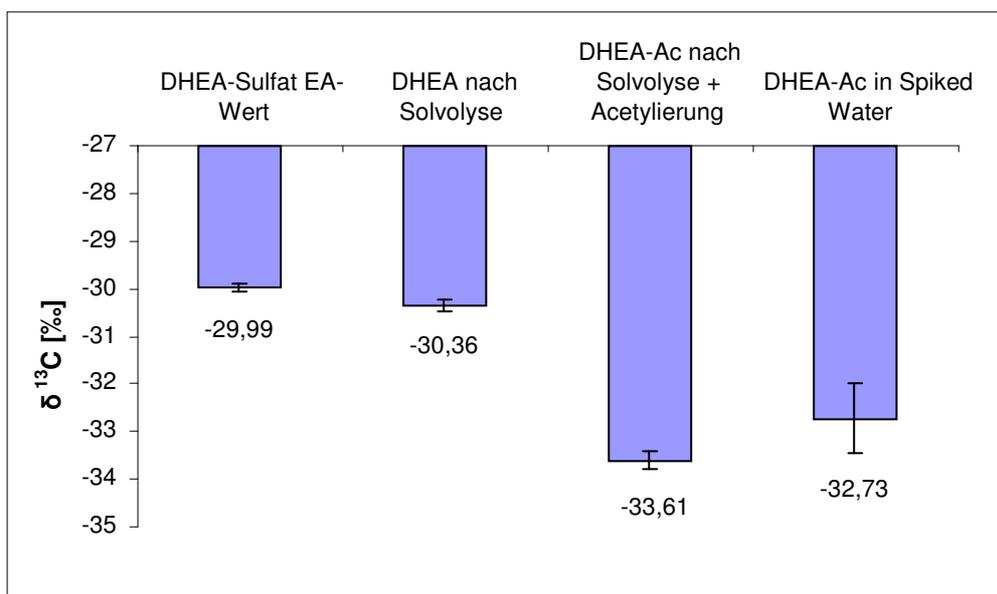


Abbildung 4.2: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von DHEA-Sulfat vor der Aufarbeitung mittels EA-IRMS bestimmt, nach der Solvolyse und nach der Acetylierung im Vergleich mit den Werten nach der Aufarbeitung in Spiked Water (jeweils mit der GC/C-IRMS gemessen)

Abbildung 4.2 zeigt am Beispiel von DHEA-Sulfat die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte nach einzelnen Aufarbeitungsschritten. Nach der Solvolyse und anschließender Extraktion mit Pentan beträgt der mit der GC/C-IRMS gemessene $\delta^{13}\text{C}$ -Wert $-30,36\text{‰}$ und ist um $0,37\text{‰}$ kleiner als der Messwert für den unbearbeiteten DHEA-Sulfat-Standard. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$) und kann zudem auf die unterschiedlichen Messverfahren (EA- und GC/C-IRMS) zurückgeführt werden (vgl. Kap. 4.6). Eine Isotopenfraktionierung während der Solvolyse des DHEA-Sulfates zu DHEA und der anschließenden Flüssig/flüssig-

Extraktion mit Pentan konnte nicht nachgewiesen werden. Der ebenfalls dargestellte Messwert des DHEA nach der Derivatisierung zum DHEA-Acetat unterscheidet sich mit $-33,61\text{ ‰}$ wie auch der Wert nach der Gesamtaufarbeitung in *Spiked Water* signifikant vom EA-Wert des DHEA-Sulfates. Dieser Unterschied ist auf die Derivatisierung zurückzuführen und wird in Kapitel 4.1.5 näher betrachtet.

Da nur DHEA-Sulfat kommerziell erhältlich ist, konnte der Einfluss der Hydrolyse nicht an weiteren Substanzen untersucht werden.

4.1.3 Fraktionierung während der HPLC-Aufreinigung

Nach der Flüssig- und Festphasenextraktion schließt sich in der Probenaufarbeitung die HPLC-Aufreinigung an. Wie auch bei der Gaschromatographie kommt es während der HPLC zu Isotopenfraktionierungen innerhalb eines HPLC-Peaks. Werden während der Probenaufreinigung mittels HPLC nicht jeweils 100 % des Ziel-Analyten aufgefangen, kann es aufgrund dieser Isotopenfraktionierung zu verfälschten Messwerten in der GC/C-IRMS kommen. Dies kann vor allem bei breiten HPLC-Peaks mit einem ausgeprägten *Fronting* und/oder *Tailing*, die nicht optimal von unerwünschten Begleitsubstanzen getrennt werden, der Fall sein. Um den Einfluss der Isotopenfraktionierung während der beiden durchgeführten HPLC-Schritte zu bestimmen, wurden Steroide (1. HPLC) und Steroid-Acetate (2. HPLC) wie in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt mittels Fraktionssammler in mehreren Fraktionen aufgefangen und diese anschließend mittels GC/C-IRMS hinsichtlich ihrer Isotopenzusammensetzung vermessen. Die Fraktionen wurden in Abständen von 0,2 min gesammelt. In Abhängigkeit von der Peakbreite des jeweiligen Analyten konnten die Peaks in unterschiedlich viele Fraktionen unterteilt werden.

Für die Untersuchungen der Isotopenfraktionierungen an der 1. HPLC (Normalphase) wurden die Analyten vor der GC/C-IRMS-Messung acetyliert. Die folgende Grafik zeigt exemplarisch den Verlauf der mit der GC/C-IRMS gemessenen relativen Peakflächen der Einzelfraktionen und der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte anhand von DHEA (Abb. 4.3a) und Epiandrosteron (Abb. 4.3b). Bei beiden Analyten bilden die beiden größten Fraktionen über 96 % der Gesamtpeakfläche. Für DHEA wurde für den vorderen Teil des HPLC-Peaks ein Isotopenverhältnis von $-34,7\text{ ‰}$ gemessen. In dieser Fraktion wurden 50,7 % des DHEA gefunden. In der darauf folgenden Fraktion, die mit 47,0 % der Gesamtfläche fast ebenso groß war (s. Abb. 4.3a), lag der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert mit $-33,32\text{ ‰}$ um 1,4 ‰ höher. Die beiden letzten Fraktionen machten zusammen 2,3 % der Fläche des DHEA-Peaks aus und hatten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von $-31,5$ bzw. $-31,3\text{ ‰}$. Bei Epiandrosteron sind die Ergebnisse ähnlich (Abb. 4.3b): Die Differenz im $\delta^{13}\text{C}$ -Wert zwischen den beiden größten Fraktionen beträgt 1,3 ‰. Auch hier ist der Wert der ersten Fraktion, die hier allerdings nur 23 % des Epiandrosteron-Peaks ausmacht, niedriger als der der zweiten Fraktion. Diese Ergebnisse zeigen, dass auf einer HPLC-Normalphase die leichteren Isotope der Steroide zuerst eluieren.

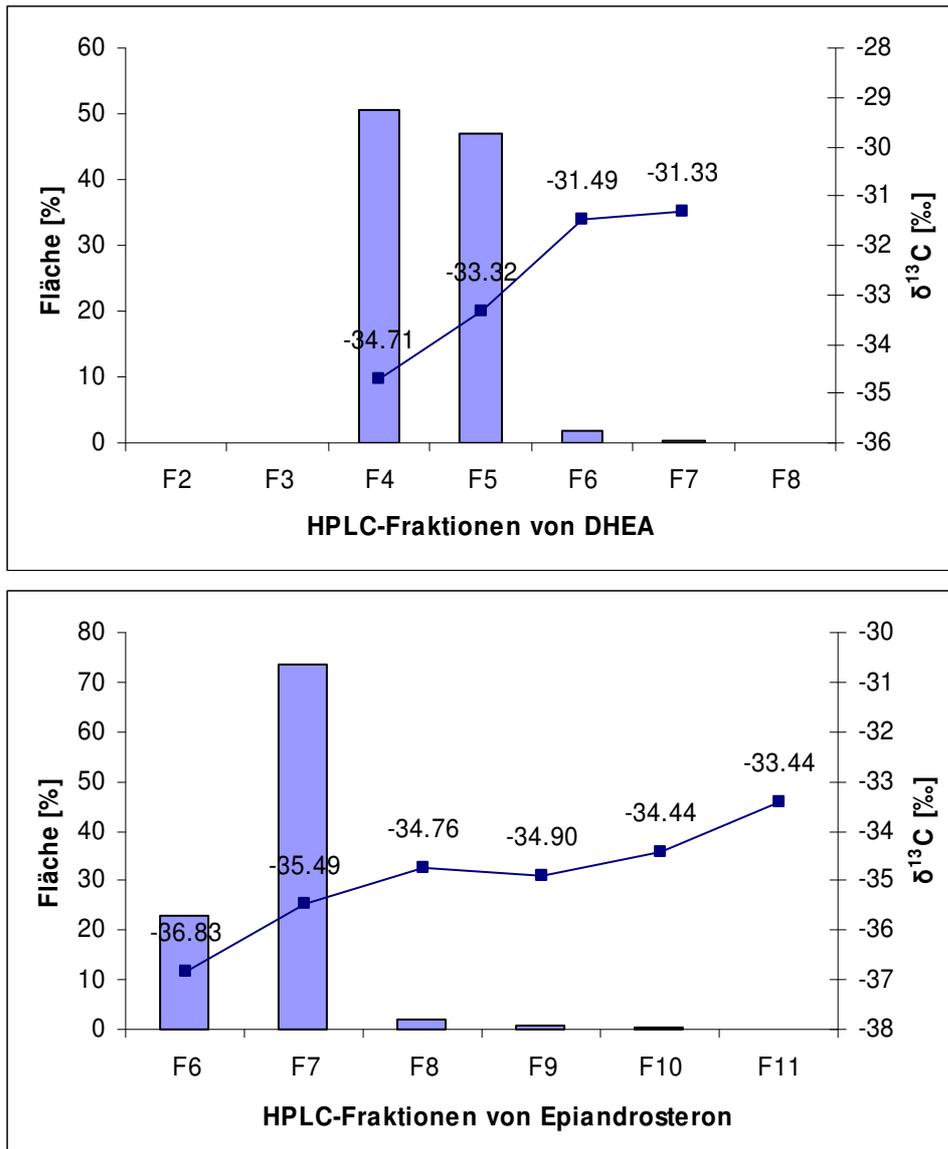


Abbildung 4.3 a+b: Darstellung der relativen Peakflächen (am GC/C-IRMS) und der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der HPLC-Fractionen (1. HPLC, Normalphase), von oben: DHEA und unten: Epiandrosteron

Anders sieht es bei der 2. HPLC mit einer *Reversed Phase* aus. Trotz gleicher Fraktionierungsweise verteilen sich die Peaks gleichmäßiger auf die gesammelten Fraktionen und der Verlauf der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte ist genau umgekehrt. 5α -Androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol-Diacetat eluiert in zwei Hauptfraktionen mit jeweils etwa 40 % der Peakfläche und zwei kleineren Fraktionen mit jeweils etwa 10 % (Abb. 4.4a). In den zuerst eluierenden 10 % wurde ein $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von $-30,2$ ‰ gemessen, in den folgenden Teilen $-35,9$ und $-38,3$ ‰ und in den letzten 10 % $-39,6$ ‰. Zwischen dem vordersten Teil und dem hintersten Teil des 5α -Androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol-Diacetat-Peaks besteht also eine Differenz von $9,3$ ‰. Es ergibt sich für die erste Peakhälfte (Fraktion F2 und F3) ein Wert von $-34,9$ ‰ und für die zweite (Fraktion F4 und F5) $-38,6$ ‰. Zwischen der ersten und der zweiten Peakhälfte besteht folglich eine Differenz im gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von $3,7$ ‰. Der Verlauf der Isotopenverhältnisse in den Teilfraktionen ist bei Epitestosteron der gleiche (Abb. 4.4b).

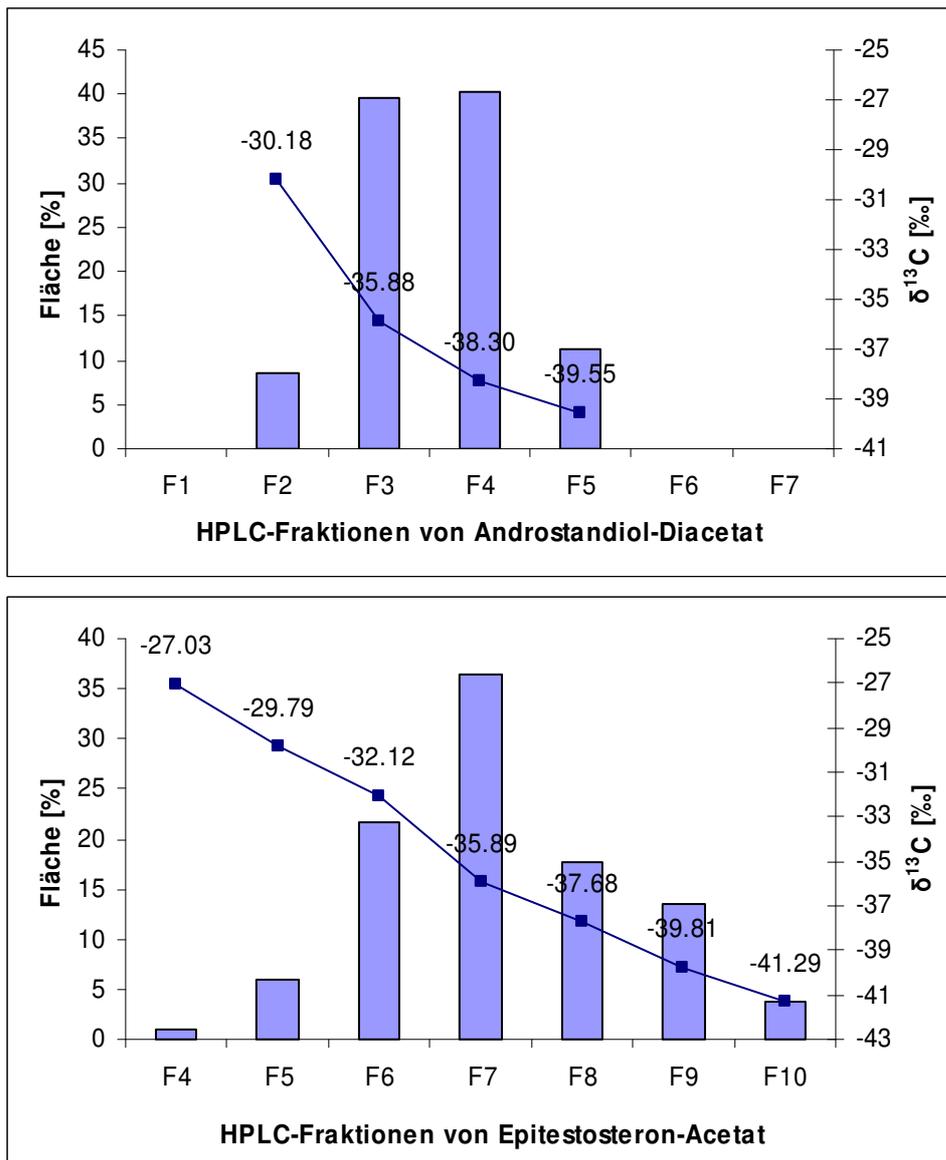


Abbildung 4.4 a+b: Darstellung der relativen Peakflächen (am GC/C-IRMS) und der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der HPLC-Fractionen (2. HPLC, Reversed Phase), von oben: 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-Diacetat und unten: Epitestosteron-Acetat

Der HPLC-Peak verteilt sich hier allerdings auf sieben Fraktionen, die jeweils zwischen 0,9 und 36,5 % der Gesamtpeakfläche besitzen. Zwischen den vordersten 7 % und den hintersten 4 % des Epitestosteron-Acetat-Peaks besteht eine Differenz des ermittelten $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von 11,9 ‰. Teilt man hier den Gesamtpeak in zwei Teile, so ergibt sich für die 1. Hälfte (F4, F5, F6 und $\frac{1}{2}$ F7) ein $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von $-33,2$ ‰ und für die zweite Hälfte ($\frac{1}{2}$ F7, F8, F9 und F10) $-37,9$ ‰. Daraus ergibt sich eine Differenz von 4,7 ‰.

Die Isotopenfraktionierung war bei den untersuchten Steroiden und Steroid-Acetaten auf der *Reversed-Phase*-HPLC deutlich ausgeprägter als auf der Normalphasen-HPLC. Während bei der Normalphasen-HPLC die leichteren Isotopomere zuerst eluierten, eluierten bei der *Reversed-Phase*-HPLC die schweren Isotope zuerst.

Der Verlust eines Teiles eines Analyten durch zu knappes Schneiden des HPLC-Peaks bei der Aufreinigung kann je nach verwendeter HPLC-Phase und analytbedingter Peakform zu deutlichen Unterschieden in den gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werten führen.

4.1.4 Einfluss der 2. HPLC-Aufreinigung

Einige Urinproben sind trotz aufwendiger Aufreinigung mit Festphasen- und Flüssigextraktionen und einer HPLC-Fraktionierung (Normalphase) noch nicht sauber genug für eine Vermessung mit der GC/C-IRMS. Dies betrifft vor allem eine Androgenfraktion, die nach der ersten HPLC die Steroide Etiocholanolon, Epitestosteron, 5-Androsten-3 β ,17 α -diol und 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol enthält. In dieser Androgenfraktion sind die Untergrundwerte höher als in anderen Fraktionen und einige Analytenpeaks sind nicht sauber von Störpeaks getrennt. Deshalb werden diese Analyten nach der Acetylierung ein zweites Mal mittels HPLC (*Reversed Phase*) aufgereinigt. Der in Hellblau dargestellte Abschnitt eines Chromatogramms in Abbildung 4.6 zeigt eine Störung des Analytpeaks 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol-Diacetat durch eine Begleitsubstanz und die gleichzeitig schlechte Trennung vom vorher eluierenden Peak des 5-Androsten-3 β ,17 α -diol-Diacetates. Nach einer zweiten Aufreinigung dieser Fraktion mit der HPLC nach der Derivatisierung der Analyten können beide Substanzen sauber von allen anderen Substanzen getrennt in zwei verschiedenen Unterfraktionen vermessen werden (hier in Dunkelblau dargestellt).

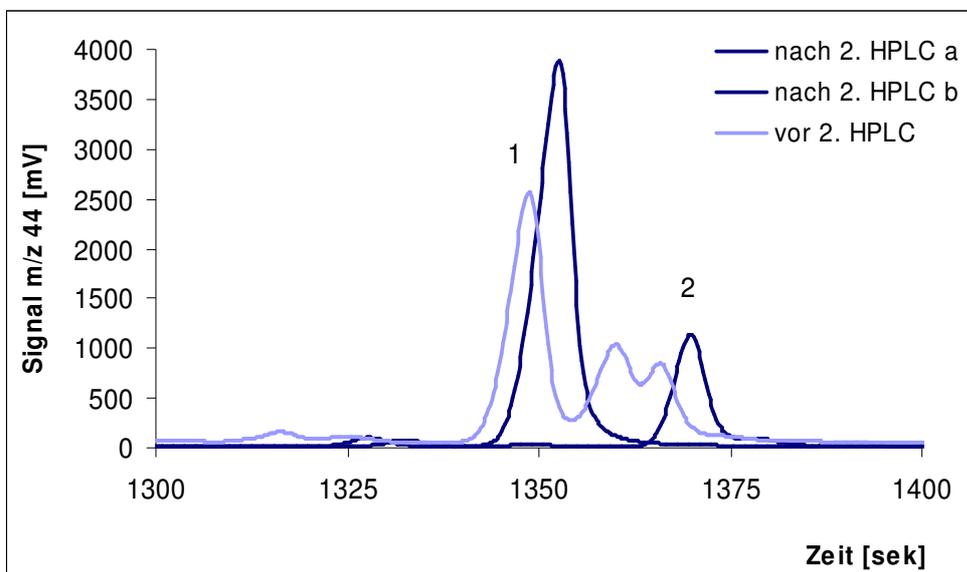


Abbildung 4.5: Ausschnitt aus der Androgenfraktion 3 einer Rinderurinprobe vor und nach einer 2. HPLC-Aufreinigung, hellblau: vor der 2. HPLC, dunkelblau: 5-Androsten-3 β ,17 α -diol (Peak Nr. 1) und 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol (Peak Nr. 2) nach der zweiten HPLC

Die nach dieser zweiten HPLC-Fraktionierung an der GC/C-IRMS gemessenen Isotopenverhältnisse der Analyten Etiocholanolon-Acetat, Epitestosteron-Acetat, 5-Androsten-3 β ,17 α -diol-Diacetat und 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol-Diacetat unterscheiden sich mit +0,9‰ bis -4,7‰ signifikant (t-Test, $p < 0,05$) von den Messwerten mit nur einer HPLC-Fraktionierung (Abb. 4.6).

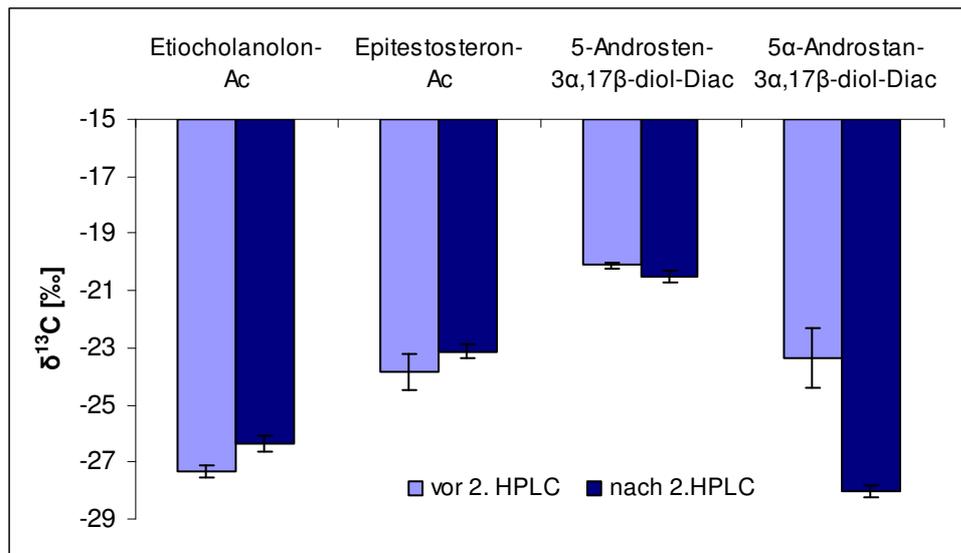


Abbildung 4.6: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Steroid-Acetate vor und nach einer zweiten HPLC-Aufreinigung, Mittelwerte und einfache Standardabweichungen aus einer sieben- bis zehnfachen Aufarbeitung derselben Probe

Der Unterschied von 4,7 % bei 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol-Diacetat ist auf den mit der 2. HPLC entfernten Störpeak zurückzuführen, der den Peak dieses Analyten überlagerte und so das Ergebnis verfälschte. Bei den nicht überlagerten Peaks fallen die Unterschiede mit – 0,4 % bis +0,9 % deutlich geringer aus. Der Einfluss der zweiten Aufreinigung auf die Richtigkeit der Ergebnisse kann nicht festgestellt werden.

Auch in der Präzision der Ergebnisse zeigten sich Unterschiede. Während nach einem HPLC-Schritt die Standardabweichungen bei einer sieben- bis zehnfachen Aufarbeitung für die einzelnen Substanzen zwischen 0,1 und 1,1 % lagen, wurden nach der zweiten HPLC für alle Substanzen 0,2 bis 0,3 % als Standardabweichung ermittelt. Die mit 1,1 % größte Standardabweichung wurde bei dem mit einem Störpeak überlagerten 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol-Diacetat gemessen.

Die zusätzliche Aufreinigung führte zu einem saubereren Untergrund und somit zu einer deutlichen Verbesserung der *Methodenpräzision* von zwei der vier untersuchten Analyten.

4.1.5 Einfluss der Derivatisierung

Ein oft notwendiger Schritt in der Probenvorbereitung für die Gaschromatographie ist die Derivatisierung schwer flüchtiger Analyten. Bei einer Derivatisierung kann es aus verschiedenen Gründen zu Änderungen der Isotopenzusammensetzung kommen. Bei einer nicht quantitativen Umsetzung der Edukte kann ein kinetischer Isotopeneffekt auftreten. Außerdem kann sich die Isotopenzusammensetzung durch die Addition weiterer C-Atome ändern. Aus dieser Addition können sich zudem chromatographische Veränderungen ergeben, wodurch sich die gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Derivate von denen der reinen Substanzen unterscheiden können. Trotz dieser Einflüsse ist eine Derivatisierung mit einer Addition weiterer C-Atome in manchen Fällen einer Vermessung ohne Derivatisierung oder mit anderen Methoden ohne C-Atom-Addition vorzuziehen. Im Fall der im ISOSTER-Projekt analysierten Steroide brachte die Acetylierung die meisten Vorteile mit sich, wie etwa die Stabilität der aufgearbeiteten Extrakte und die chromatographischen Eigenschaften der Steroid-Acetate. Die untersuchten Steroide wurden in Abhängigkeit von der Anzahl ihrer OH-Gruppen jeweils an einer oder an zwei Stellen acetyliert (vgl. Abb. 4.7).

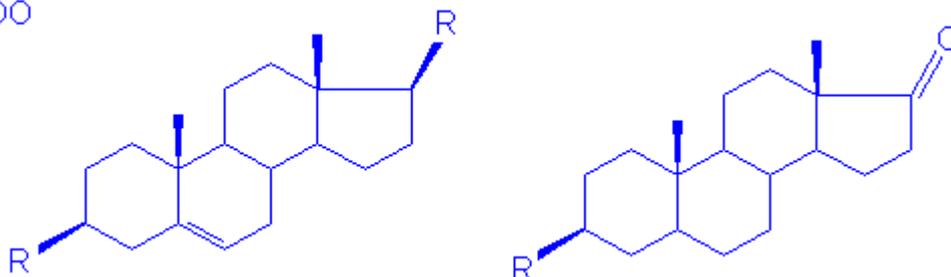
R = CH₃COO

Abbildung 4.7: Zweifach acetyliertes Steroid-Diol- und einfach acetyliertes Steroid-Keton-Grundgerüst

Zur Berechnung des Einflusses der Acetylierung wurde das eingesetzte Reagenz Essigsäureanhydrid mittels EA-IRMS vermessen. Für das für alle Derivatisierungsstudien verwendete Essigsäureanhydrid wurde ein $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von $-31,00 \pm 0,07 \text{ ‰}$ ($n = 5$) ermittelt. Dieser Wert wurde im Laufe der Zeit regelmäßig mittels EA-IRMS-Messungen überprüft und blieb innerhalb der Messgenauigkeit des EA-IRMS stabil. Anhand des Wertes für das Essigsäureanhydrid und der Isotopenverhältnisse der underivatisierten Steroide, die ebenfalls mittels EA-IRMS gemessen wurden, lassen sich theoretische Werte für die Isotopenverhältnisse der acetylierten Steroide nach Formel 2 berechnen, die dem Eintrag externer C-Atome Rechnung tragen. Durch die Acetylierung werden abhängig vom Steroid zu 18 bis 19 C-Atomen 2 oder 4 C-Atome mit dem Acetatrest eingefügt (vgl. Tabelle 4.2).

$$\delta^{13}\text{C}[\text{Steroidacetat}] = \frac{\delta^{13}\text{C}[\text{Steroid}] * n}{(n + m)} + \frac{\delta^{13}\text{C}[\text{Essigsäureanhydrid}] * m}{(n + m)}$$

Formel 4.1

mit n = Anzahl der C-Atome im Steroid, m = Anzahl der C-Atome in der Acetat-Gruppe

In der folgenden Tabelle sind die mit der obigen Formel berechneten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte am Beispiel einiger Steroide dargestellt.

Tabelle 4.3: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Steroiden und ihre theoretisch berechneten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte nach der Addition weiterer C-Atome durch die Acetylierung, ¹⁾ gemessen mit der EA-IRMS

Substanz	$\delta^{13}\text{C}$ [‰] underiv.1)	C-Atome (n)	C-Atome (m)	$\delta^{13}\text{C}$ [‰] theor. derivatisiert	Differenz
5 α -Androstan-3 β -17 α -diol	-30,27	19	4	-30,40	-0,13
5-Androsten-3 β ,17 α -diol	-28,20	19	4	-28,69	-0,49
17 α -Estradiol 1	-27,00	18	4	-27,73	-0,73
17 α -Estradiol 2	-28,99	18	4	-29,36	-0,36
17 β -Estradiol	-25,69	18	4	-26,66	-0,97
DHEA 1	-29,52	19	2	-29,66	-0,14
DHEA 2	-28,60	19	2	-28,83	-0,23
Testosteron	-27,19	19	2	-27,56	-0,36
Epitestosteron	-32,05	19	2	-31,95	0,10
Etiocholanolon	-27,44	19	2	-27,78	-0,34
Estron 1	-25,28	18	2	-25,86	-0,57
Estron 2	-26,04	18	2	-26,54	-0,50
Epiandrosteron	-32,45	19	2	-32,31	0,14

Die Unterschiede zwischen den mit der EA-IRMS ermittelten $\delta^{13}\text{C}$ -Werten der underivatisierten Steroide und den theoretisch berechneten Werten der Steroid-Acetate liegen zwischen $-0,97$ und $+0,14 \text{ ‰}$. Mit der verwendeten Formel wird allerdings ausschließlich der Änderung, die durch das Einfügen weiterer C-Atome zustande kommt, Rechnung getragen. Der kinetische Isotopeneffekt, der durch die Acetylierung verursacht wird, wird in dieser Rechnung

nicht berücksichtigt. Um diesen zu bestimmen, wurden die acetylierten Steroide mit der GC/C-IRMS untersucht und die Differenzen zu den Werten der underivatisierten Steroide gebildet. Diese werden in Abbildung 4.8 mit den theoretisch berechneten Differenzen verglichen. Die Differenzen zwischen den EA-Werten für die nicht derivatisierten Steroide und den GC/C-IRMS-Werten der acetylierten Steroide liegen bei 4,4 bis 5,2 ‰ für Steroide mit zwei OH-Gruppen, die doppelt acetyliert werden. Für die Steroide, die einfach acetyliert werden, beträgt diese Differenz in Abhängigkeit vom Analyten zwischen 2,0 und 3,1 ‰. Zieht man die theoretisch ermittelte Differenz, die nur dem Eintrag weiterer C-Atome Rechnung trägt, vom experimentell ermittelten Wert ab, erhält man die Differenz, die durch Isotopenfraktionierung oder den unvollständigen Umsatz der Analyten verursacht wird. Für die Dirole beträgt diese korrigierte Differenz 3,9 bis 4,5 ‰ und für die Ketone 1,8 bis 2,8 ‰.

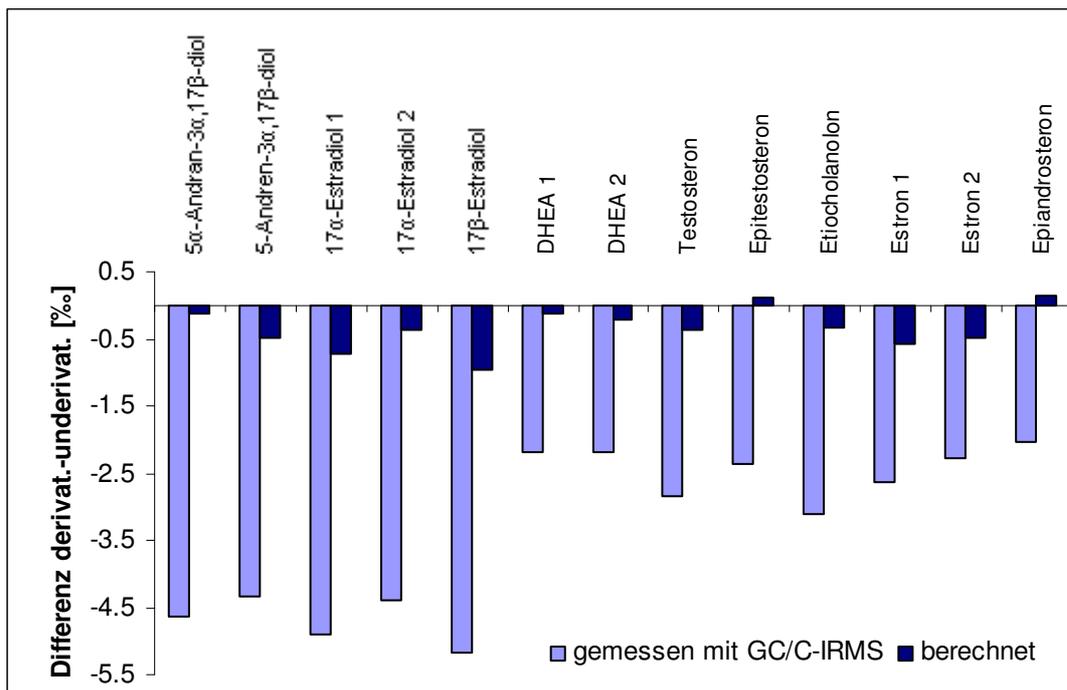


Abbildung 4.8: Differenzen der gemessenen und berechneten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Steroid-Acetate zu den Messwerten der underivatisierten Steroide

Aus den in Tabelle 4.3 dargestellten Werten lässt sich nach folgender Formel der kinetische Isotopeneffekt (KIE) berechnen:

$$KIE = 1 + \frac{\Delta(n+m)}{1000x}$$

Formel 4.2

nach Rieley [1994] mit n = Anzahl C-Atome im Steroid; m = Anzahl C-Atome Acetat-Gruppe, x = Anzahl Acetat-Gruppen und Δ = Differenz zwischen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Steroid-Acetates und theoretischem $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Steroid-Acetates (vgl. Formel 2)

Es ergeben sich dabei für die Dirole Werte zwischen 1,044 und 1,052 mit einem Mittelwert von 1,047 und für die Ketone Werte zwischen 1,035 und 1,058 mit einem Mittelwert von 1,046.

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluss der Derivatisierung auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert zu beschreiben, besteht darin, einen Korrekturfaktor zu berechnen, der beschreibt, welchen Einfluss jedes einzelne während der Derivatisierung addierte C-Atom rein rechnerisch auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Derivates hat. Nach Berechnung nach Formel 3 ergeben sich die in Abbildung 4.9 dargestellten Werte.

$$\text{Faktor } f = \left(\delta^{13}\text{C} [\text{Steroidacetat}] - \frac{\delta^{13}\text{C} [\text{Steroid}] * n}{(n + m)} \right) * \frac{(n + m)}{m}$$

Formel 4.3

mit n = Anzahl C-Atome im Steroid; m = Anzahl C-Atome Acetat-Gruppe

Aus dieser Berechnung geht hervor, dass der Einfluss jedes einzelnen bei der Acetylierung der Steroide eingefügten C-Atomes bei den Diolen und den Ketonen gleich ist. Bei den Diolen beträgt der Faktor f zwischen $-53,16$ und $-56,85$ ‰ mit einem Mittelwert von $-54,26$ ‰. Für die Ketone wurden für den Faktor f Werte von $-48,67$ bis $-60,22$ ‰ mit einem Mittelwert von $-53,97$ ‰ berechnet. Das bedeutet, dass jedes bei der Acetylierung der Steroide eingetragene C-Atom rein rechnerisch einen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von ca. -54 ‰ hat (Abb. 4.9).

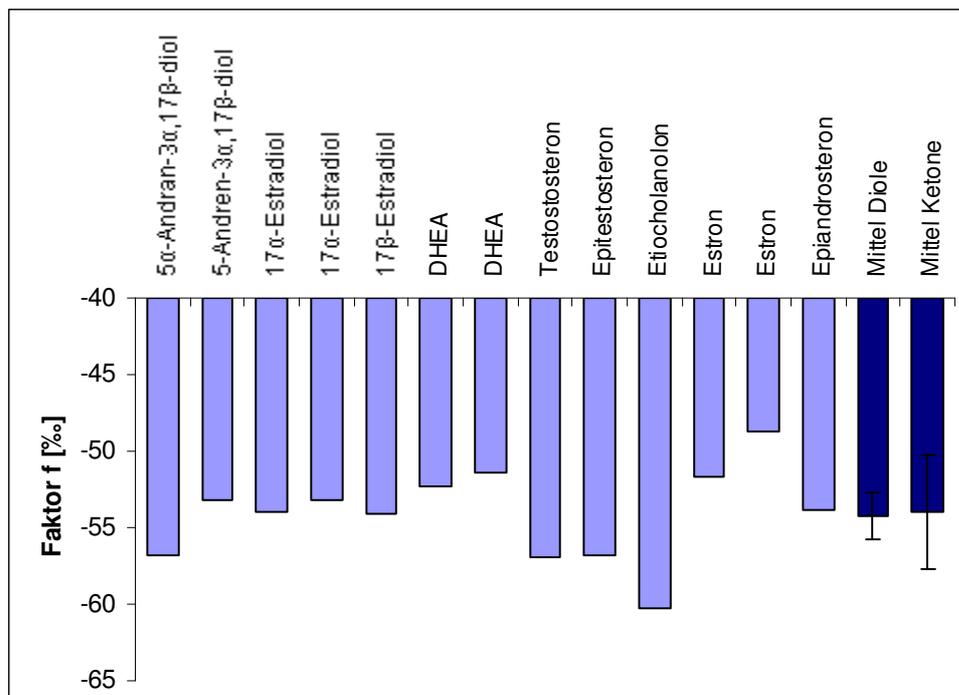


Abbildung 4.9: Theoretisch ermittelter Faktor f für jedes während der Derivatisierung eingefügte C-Atom

Die Untersuchungen zu den Einflüssen der Probenaufarbeitung der zu bestimmenden Steroide zeigen, dass der größte Einfluss auf die Richtigkeit des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von der Derivatisierung ausgeht. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte werden durch die Addition von C-Atomen und die kinetischen Isotopeneffekte bei der Acetylierung bis zu 5,2 ‰ niedriger. Bei den anderen näher untersuchten Aufarbeitungsschritten lassen sich unerwünschte Einflüsse durch Isotopendiskriminierung weitestgehend vermeiden. Die Solvolyse und anschließende Flüssig/flüssig-Extraktion führte zu keinem signifikanten Unterschied der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte. Bei der HPLC wurden Unterschiede von bis zu 11,9 ‰ zwischen der ersten und zweiten Hälfte des HPLC-Peaks gemessen. Durch vollständiges Auffangen der Peaks können negative Folgen der Isotopendiskriminierung auf den Messwert jedoch verhindert werden.

4.1.6 Einfluss der Gesamtaufarbeitung auf die Präzision der $\delta^{13}\text{C}$ -Messwerte

Um die Präzision der gesamten Methode einschließlich der Aufarbeitung zu bestimmen (*Methodenpräzision*), wurde der Urin von fünf Tieren in jeweils zehn Teilproben unterteilt, jede Teilprobe aufgearbeitet und die Isotopenzusammensetzung der relevanten Steroide mittels GC/C-IRMS bestimmt.

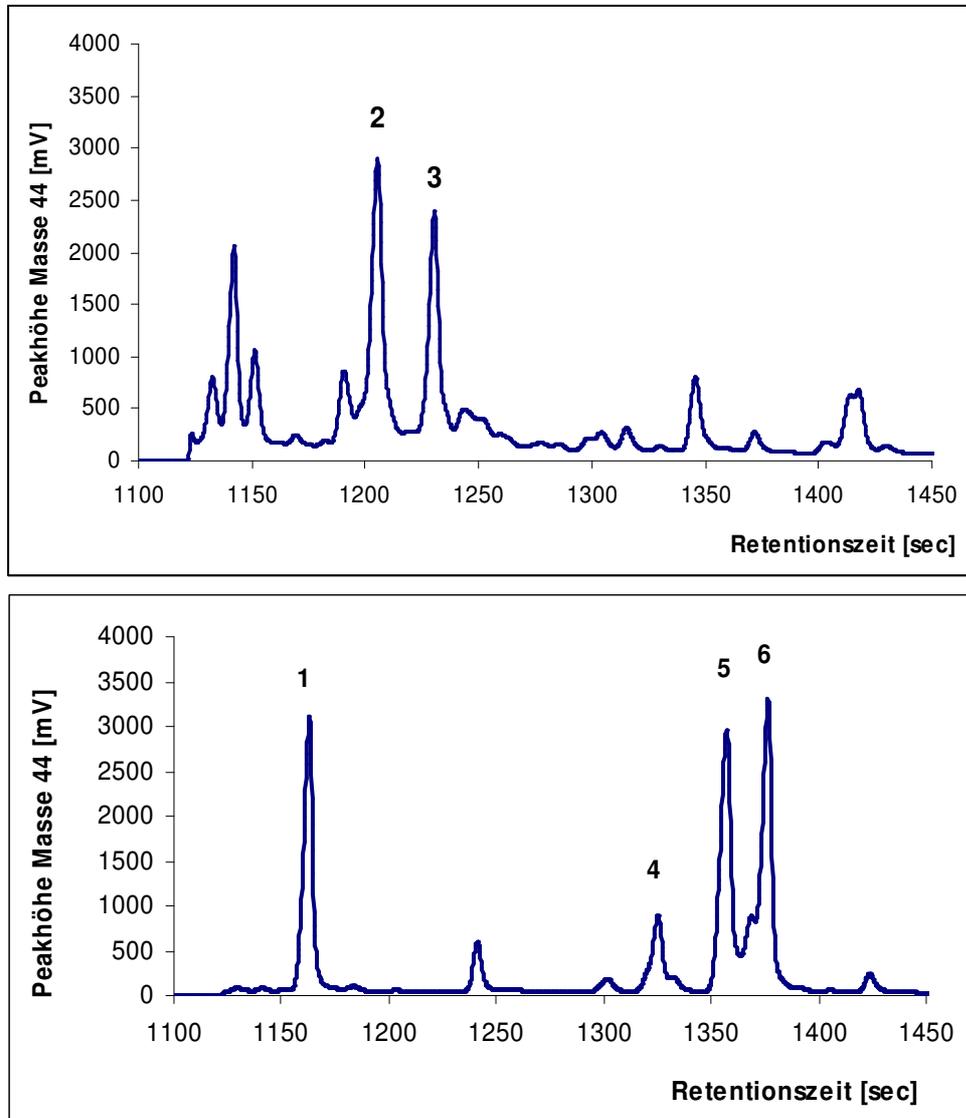


Abbildung 4.10: Beispielchromatogramme mit den Substanzen der Androgenfraktion mit 1: Etiocholanolon, 2: DHEA, 3: Epiandrosteron, 4: Epitestosteron, 5: 5-Androsten-3 β ,17 α -diol, 6: 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol

Die Proben stammen von einem nicht mit Steroiden behandelten Bullen (Urin 1), einem mit Estradiol behandelten Bullen (Urin 2), einer mit Testosteron und Estradiol behandelten Kuh (Urin 3), einem mit Testosteron behandelten Stier (Urin 4) und einem mit Testosteron behandelten Kalb (Urin 5). Durch die Auswahl weiblicher und männlicher sowie unterschiedlich behandelter Tiere konnten Daten aus Messungen mit unterschiedlicher Matrix und Steroidkonzentration gewonnen und so deren Einfluss auf die Präzision der Messwerte verglichen werden. Die Beispieldiagramme (Abb. 4.10) zeigen alle Analyten der Androgenfraktion. Die aus dieser jeweils zehnfachen Bestimmung erhaltenen $\delta^{13}\text{C}$ -Mittelwerte und die einfache Standardabweichung der acetylierten Steroide sind in Tabelle 4.4 aufgelistet.

Tabelle 4.4: Mittelwerte der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einiger Steroide (gemessen als Acetat) nach zehnfacher Aufarbeitung; n.n.: Analyt nicht oder in zu geringer Konzentration vorhanden

	Urin 1		Urin 2		Urin 3		Urin 4		Urin 5	
	$\delta^{13}\text{C}$ [‰]	s								
DHEA	-16,34	0,77	-15,94	0,52	-19,01	0,59	-18,46	0,59	-17,18	0,20
Epiandrosteron	-16,47	0,49	-16,52	0,65	-23,88	0,30	-24,11	0,38	-25,73	1,08
Etiocholanolon	-16,09	0,15	-16,03	0,29	-26,72	0,24	-27,01	0,29	-27,32	0,20
Epitestosteron	-21,94	0,44	-21,88	0,80	-28,81	0,31	-24,82	0,32	-23,87	0,63
5- α -Androst-3 α ,17 β -diol	-19,76	0,28	-20,36	0,67	-20,67	0,23	-20,76	0,52	-20,09	0,10
5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol	-20,86	0,52	-20,18	0,31	-23,69	0,26	-25,12	0,46	-23,36	1,05
DHEA-S	-15,82	0,21	-17,75	0,80	-17,74	0,09	-17,13	0,74	-17,63	0,13
EA-S	n.n.		-20,19	2,90	-23,11	0,77	n.n.		n.n.	
Estradiol	-24,08	1,86	-31,45	0,33	-31,38	0,14	n.n.		n.n.	

Die Unterschiede in den gemessenen Isotopenzusammensetzungen entstehen durch unterschiedliche Ernährung (C3- und C4-Pflanzen) und die Hormonbehandlung. Es ist kein Zusammenhang zwischen den gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werten und den Standardabweichungen erkennbar. Da die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für die Präzision nicht von Bedeutung sind, sollen hier nur die Standardabweichungen betrachtet werden, die in Abbildung 4.11 für alle Steroide und Urine grafisch dargestellt sind. Insgesamt liegen die aus den Werten einer zehnfachen Aufarbeitung ermittelten Standardabweichungen zwischen 0,09 und 2,90 ‰. Abgesehen von Etiocholanolon (0,15 bis 0,29 ‰) sind die berechneten Standardabweichungen der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Analyten in jeder Probe sehr unterschiedlich. Bei Epitestosteron wurden 0,31 bis 0,80 ‰, bei 5-Androsten-3 α ,17 β -diol 0,10 bis 0,67 ‰ und bei 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol 0,26 bis 1,05 ‰ als Standardabweichung berechnet, während die Werte für DHEA und EA aus der Glucuronidfraktion bei 0,20 bis 0,77 ‰ beziehungsweise 0,30 bis 1,08 ‰ lagen.

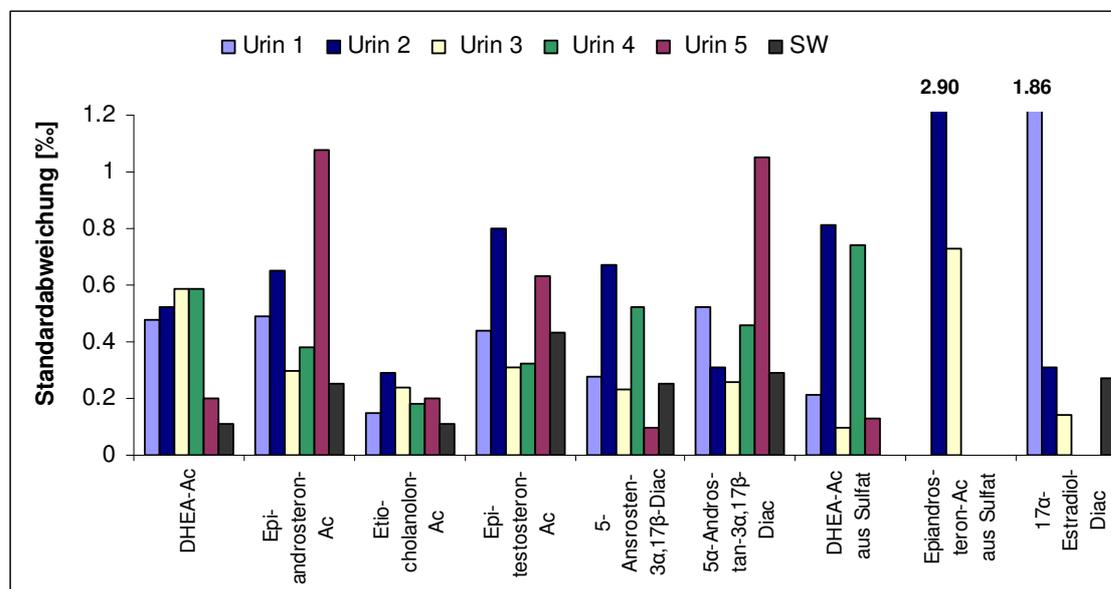


Abbildung 4.11: Standardabweichungen der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einiger Steroide nach jeweils zehnfacher Aufarbeitung der Urine von fünf verschiedenen Tieren und einer Standardlösung (SW, Spiked Water)

Bei DHEA und EA aus der Sulfatfraktion und 17 α -Estradiol hängen die Standardabweichungen mit 0,09 bis 0,80 ‰ (DHEA-S), 0,77 bis 2,90 ‰ (EA-S) und 0,14 bis 1,86 ‰ (17 α -Estradiol) von der Probe ab. Es besteht kein direkter Zusammenhang der Präzision mit einer Substanz oder einem bestimmten Tier. Die Standardabweichungen der zum Vergleich ebenfalls zehnfach aufgearbeiteten Lösung der Androgene und des 17 α -Estradiols in Wasser (*Spiked Water*) liegen für DHEA ($\pm 0,11$ ‰), Epiandrosteron ($\pm 0,25$ ‰) und Etiocholanolon ($\pm 0,11$ ‰) zum Teil deutlich unter den entsprechenden Standardabweichungen in Matrix.

Für Epitestosteron ($\pm 0,43\%$), 5-Androsten-3 α ,17 β -diol ($\pm 0,25\%$), 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol ($\pm 0,29\%$) und 17 α -Estradiol ($\pm 0,27\%$) liegt die Präzision nach zehnmaliger Aufarbeitung im Bereich der Matrixproben.

Ursache für die je nach Analyt und Probe stark unterschiedlichen Präzisionen können prinzipiell die unterschiedliche Matrix und Probenkonzentration, die Probenaufarbeitung, aber auch die Messtechnik der GC/C-IRMS sein.

Die großen Standardabweichungen von 17 α -Estradiol in Urin 1 und Epiandrosteron aus der Sulfatfraktion in Urin 2 lassen sich mit den sehr niedrigen Konzentrationen der beiden Analyten in den jeweiligen Urinen erklären. In Vorversuchen (vgl. Kap. 4.7.2 Linearität) wurde für alle Steroide in Matrix ein linearer Bereich (vgl. Kap. 3.6c) von etwa 1 bis 10 V bestimmt, innerhalb dessen mit der verwendeten GC-Säule verlässlich gemessen werden kann. Die Analyten 17 α -Estradiol aus Urin 1 und Epiandrosteron aus der Sulfatfraktion aus Urin 2 wurden mit wesentlich niedrigeren Amplituden von 123 mV und 191 mV gemessen. Für die im linearen Bereich gemessenen Substanzen konnte keine generelle Abhängigkeit der Präzision von der Peakhöhe festgestellt werden.

Die unterschiedliche Matrix der Urine der fünf verschiedenen Tiere verursacht unterschiedlich hohe Untergründe bei der GC/C-IRMS-Messung. Dieser Effekt wird dadurch verstärkt, dass die aufgereinigten Proben vor der Injektion in die GC/C-IRMS je nach Konzentration der Ziel-Analyten in Volumina zwischen 20 und 50 μ l aufgenommen und davon unterschiedliche Mengen (1–3 μ l) injiziert werden. Dadurch steigt bei niedrigen Probenkonzentrationen der Untergrund bei der GC/C-IRMS. Es konnte keine pauschale Untergrundhöhe bestimmt werden, ab der die Messwerte weniger präzise zu bestimmen sind. Vielmehr mussten auch die Art des Analyten und seine Peakhöhe mit in Betracht gezogen werden. Die in Abbildung 4.12 dargestellten Chromatogramm-Ausschnitte zeigen DHEA-Acetat und Epiandrosteron-Acetat der Sulfatfraktion aus zwei verschiedenen Urinen im Vergleich. Die Peakhöhen der Analyten sind etwa gleich, der Untergrund jedoch bei Urin 2 mit durchschnittlich 370 mV signifikant höher als bei Urin 3 (im Mittel 60 mV).

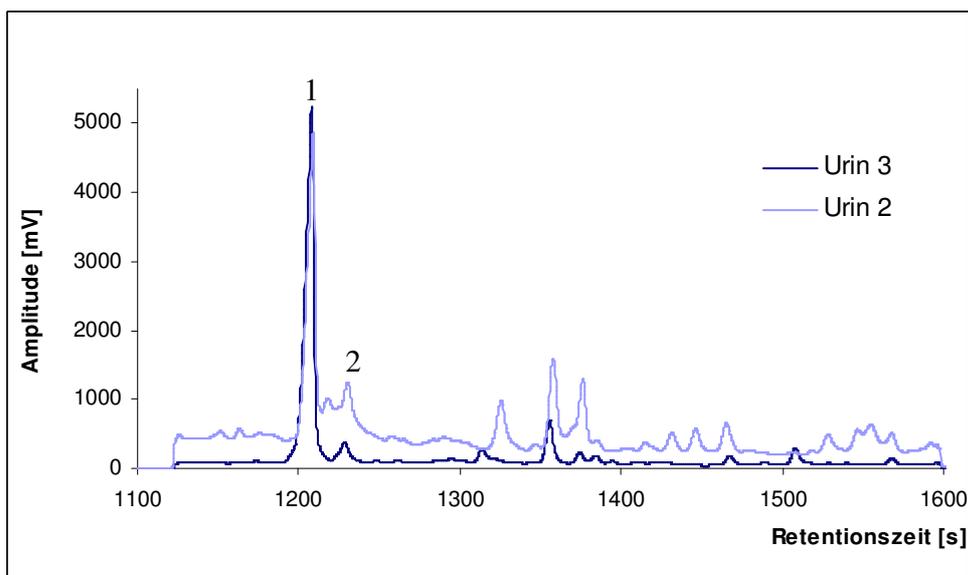


Abbildung 4.12: Ausschnitt zweier GC/C-IRMS-Chromatogramme der Sulfatfraktion mit 1: DHEA-Acetat und 2: Epiandrosteron-Acetat

Die Standardabweichungen betragen in Urin 2 für DHEA-Acetat 0,80 ‰ und für Epiandrosteron-Acetat 2,90 ‰, während sie in Urin 3 für DHEA-Acetat mit 0,09 ‰ und für Epiandrosteron-Acetat mit 0,77 ‰ bestimmt wurden.

Abhängig von der Probenmatrix kann es zu Interferenzen zwischen Analyten und unerwünschten Begleitsubstanzen kommen. Die Beispielchromatogramme (Abb. 4.10) zeigen alle Analyten in für diese Matrix optimaler Peakhöhe und guter Auflösung. Beides konnte nicht bei allen Proben erreicht werden. So ist beispielsweise der 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol-Peak in Urin 5 nicht optimal von einem unerwünschten Begleitpeak getrennt, der in allen anderen Proben nur als kleine Schulter in Erscheinung tritt (vgl. Abbildung 4.10). Die Standardabweichung ist für die Messwerte dieser Probe signifikant größer (1,05 ‰; Varianzen-F-Test $p < 0,05$) als bei den anderen vier Urinproben (0,26 bis 0,52 ‰). Eine zusätzliche HPLC-Aufreinigung dieser Fraktion, die eine optimale Abtrennung des Begleitpeaks zur Folge hat (s. Abb. 4.13), senkt die Standardabweichung aus den Messwerten derselben Substanz aus demselben Urin auf 0,21 ‰.

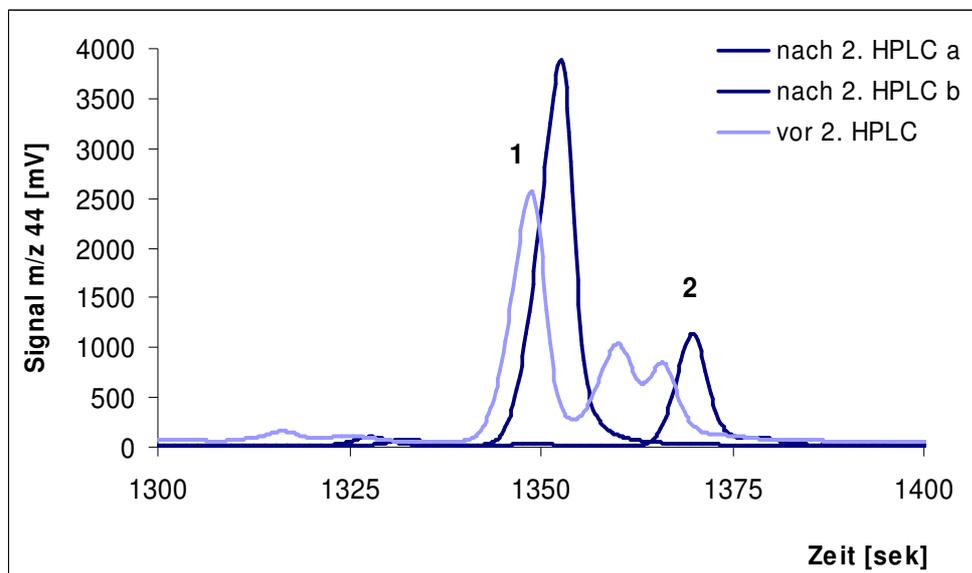


Abbildung 4.13: Ausschnitte der GC/C-IRMS-Chromatogramme von Urin 4 und 5 mit 1: $5\text{-Androsten-}3\beta,17\alpha\text{-diol}$ und 2: $5\alpha\text{-Androstan, }3\beta,17\alpha\text{-diol}$

In der Umgebung des Etiocholanolon-Peaks sind die Chromatogramme aller Urine verhältnismäßig sauber und die Peakhöhe selbst ist aufgrund der hohen Konzentration von Etiocholanolon in allen Urinen im linearen Bereich. Deshalb sind die Standardabweichungen in allen vermessenen Urinen mit 0,15 bis 0,29 ‰ annähernd gleich und vergleichsweise gering.

Die Probenmatrix und die Konzentration der zu untersuchenden Analyten wirkt sich also entscheidend auf die Präzision der GC/C-IRMS-Messungen aus. Ausreichend hohe Probenkonzentrationen zur Messung im linearen Bereich, eine gute Auflösung der Peaks und ein niedriger Untergrund wirken sich positiv auf die Präzision der Messungen aus.

Auch das Messsystem ist als Ursache für unterschiedliche Präzisionen denkbar. Alle Messwerte wurden unter identischen Bedingungen gewonnen. Die Stabilität des GC/C-IRMS-Systems wurde stets mittels einer Gerätekontrollprobe überprüft (vgl. Kap 4.8). Die Messwerte, aus denen die oben dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet wurden, wurden jeweils direkt hintereinander injiziert. Die zehnfache Messung einer Standardlösung mit den acetylierten Substanzen unter identischen Bedingungen ergab die in Tabelle 4.5 gezeigten Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Standardabweichungen liegen in einer Standardlösung ohne Matrix für alle Analyten zwischen 0,04 und 0,15 ‰ (*Messpräzision* für eine Standardlösung). Es besteht zwischen den *Messpräzisionen* für die verschiede-

nen Analyten nur ein geringer Unterschied. Eine Beeinflussung der *Methodenpräzision* durch die GC/C-IRMS-Messmethode ist somit auszuschließen.

Tabelle 4.5: Mittelwerte und Standardabweichungen derivatisierter Steroidstandards (in %) nach zehnfacher Injektion

	Etiocholanolon-Acetat	DHEA-Acetat	Epiandrosteron-Acetat	Epitestosteron-Acetat	5-Androsten-3 α ,17 β -diol-Diacetat	5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol-Diacetat	17 α -Estradiol-Diacetat
MW [%]	-30,94	-32,28	-34,41	-35,91	-33,07	-34,03	-33,60
Standardabw. [%]	$\pm 0,15$	$\pm 0,04$	$\pm 0,08$	$\pm 0,10$	$\pm 0,07$	$\pm 0,06$	$\pm 0,04$

Ebenso lässt sich die Derivatisierung der Analyten, zumindest in matrixfreier Standardlösung, als Ursache für unterschiedliche Standardabweichungen ausschließen. Tabelle 4.6 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Messwerte nach einer zehnfachen Derivatisierung der Steroidstandards und einer jeweils einfachen Injektion. Die Werte unterscheiden sich mit Standardabweichungen zwischen 0,06 und 0,16 % nicht signifikant von denen nach einer zehnfachen Injektion (Varianzen-F-Test, $p < 0,05$).

Tabelle 4.6: Mittelwerte und Standardabweichungen derivatisierter Steroidstandards (in %) nach je einfacher Injektion nach zehnfacher Derivatisierung

	Etiocholanolon-Acetat	DHEA-Acetat	Epiandrosteron-Acetat	Epitestosteron-Acetat	5-Androsten-3 α ,17 β -diol-Diacetat	5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol-Diacetat	17 α -Estradiol-Diacetat
MW [%]	-31,08	-32,32	-34,52	-35,99	-33,37	-34,08	-33,85
Standardabw. [%]	$\pm 0,16$	$\pm 0,06$	$\pm 0,08$	$\pm 0,13$	$\pm 0,07$	$\pm 0,09$	$\pm 0,06$

Andere Teilaufarbeitungsschritte konnten aufgrund des hohen zeitlichen und materiellen Aufwandes in diesem Versuch nicht gesondert hinsichtlich ihres Einflusses auf die Präzision untersucht werden, wurden aber anhand von Standards im vorangehenden Kapitel behandelt. Es wurde eine der zehn aufgearbeiteten Teilproben von Urin 1 fünf- bis siebenmal (je nach verfügbarem Probenvolumen) injiziert, um die sich daraus ergebende Standardabweichung (*Messpräzision* für Proben) mit der nach zehnfacher Aufarbeitung (*Methodenpräzision*) vergleichen zu können. Wie aus den in Abbildung 4.14 dargestellten Daten ersichtlich ist, sind mit der Ausnahme von Epitestosteron die Standardabweichungen einer mehrfach injizierten Teilprobe kleiner als die nach einer zehnmaligen Aufarbeitung.

Die Unterschiede sind bei Etiocholanolon mit 0,02 und 0,15 %, DHEA mit 0,19 und 0,77 %, 5-Androsten-3 β ,17 α -diol mit 0,08 und 0,28 % sowie 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol mit 0,24 und 0,52 % signifikant. Für Epiandrosteron wurde bei mehrmaliger Injektion einer Probe eine Standardabweichung von 0,28 % ermittelt, die sich nicht signifikant von 0,49 % für die zehnfache Aufarbeitung unterscheidet. Ebenso ist der Unterschied der Präzisionen für Epitestosteron mit 0,57 und 0,44 % nicht signifikant. Insgesamt sind bei einer zehnmaligen Aufarbeitung für alle untersuchten Steroide für die Gesamtmethode Standardabweichungen von $\leq 0,80$ % bestimmt worden (*Methodenpräzision*), wenn die Messungen mit ausreichender Größe und Auflösung der Peaks durchgeführt wurden. Bei Peakhöhen außerhalb der linearen Bereiche, hohem Untergrund und Interferenzen mit anderen Peaks wurden Standardabweichungen von bis zu 2,9 % ermittelt. Der Vergleich mit der zehnmaligen Injektion einer Standardlösung mit denselben Analyten zeigt, dass die *Messpräzision* der GC/C-IRMS für Standardlösungen mit 0,04 bis 0,15 % bedeutend besser ist als die *Messpräzision* für Matrixproben mit 0,02 bis 0,57 %.

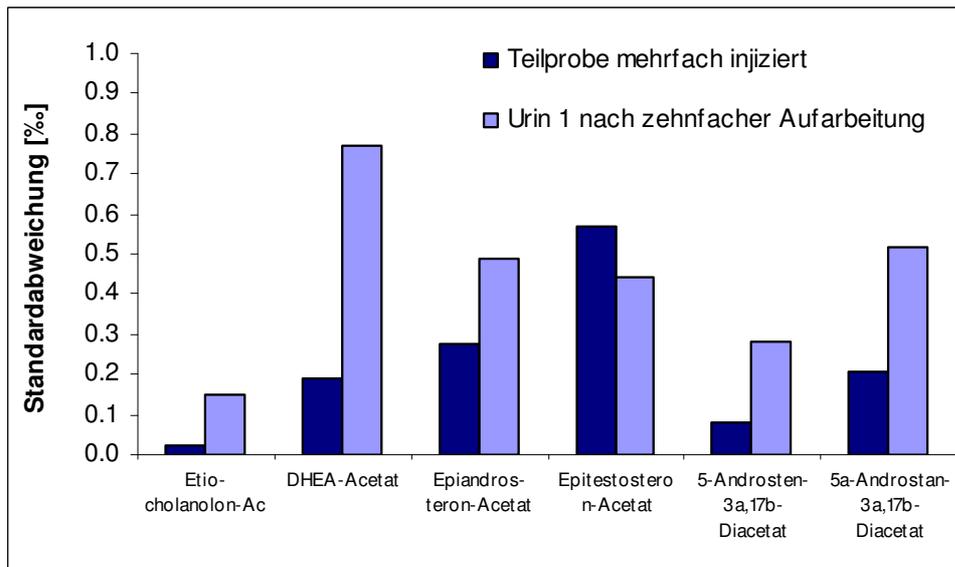


Abbildung 4.14: Standardabweichungen der Messwerte der Androgenfraktion von Teilprobe 1.4 einfach aufgearbeitet und fünf- bis siebenfach injiziert verglichen mit den Werten nach zehnfacher Aufarbeitung und jeweils einfacher Injektion

4.2 Probeninjektion

Die Probenaufgabe auf die Trennsäule ist bei der Gaschromatographie ein kritischer Punkt, weil während der Probenaufgabe über den Injektor zahlreiche Faktoren zu einer Diskriminierung einzelner oder aller zu analysierenden Analyten führen können. Wenngleich Diskriminierungen auch bei quantitativen Untersuchungen nicht erwünscht sind, müssen sie die Qualität der Messungen nicht negativ beeinflussen, wenn sie reproduzierbar sind. Ein immer gleichbleibender Verlust eines Analyten fällt bei entsprechender Standardisierung nicht auf und eine Optimierung der Injektionstechnik ist nicht nötig, solange die erforderliche Leistungsfähigkeit der Methode gegeben ist. Bei der Injektion der Proben in ein GC/C-IRMS-System kann die Diskriminierung der Analyten großen Einfluss auf die Messwerte haben, wenn es dadurch zu einer Isotopenfraktionierung der Analyten kommt. Deshalb muss bei der GC/C-IRMS durch die Auswahl einer geeigneten Injektionstechnik eine diskriminierungsfreie Probenaufgabe gewährleistet werden. Faktoren, welche die Qualität der Probeninjektion beeinflussen können, sind die Wahl der Spritze und Spritzentechnik, die Injektionsgeschwindigkeit, die Injektionstemperatur, die *Purgetime*, die Art der Injektion, die Wahl des Liners und die Position der Säule im Liner.

Für die Injektion auf Kapillarsäulen gibt es drei Basistechniken: die klassische Verdampfungsinjektion (*classical vaporizing injection*), die *programmed temperature vaporizing (PTV) injection* und die *On-column*-Injektion. Die beiden Erstgenannten gliedern sich in *split*, *splitless* und direkte Injektion [Grob 2001]. Weit verbreitet ist die Verwendung eines *Split/splitless*-Injektors. Während bei der *Split*-Injektion nur ein kleiner Teil (in der Regel zwischen 0,3 und 20 %) der verdampften Probe auf die Säule gelangt, wird bei der *Splitless*-Injektion nahezu die gesamte verdampfte Probe auf die Säule übertragen. Die *Splitless*-Injektion ist die klassische Injektionstechnik für die Spurenanalytik. Aufgrund der für die GC/C-IRMS geringen Analytkonzentrationen wurden die Steroidhormone im ISOSTER-Projekt *splitless* auf die Säule gegeben, wobei Volumina zwischen 1 und 4 µl aufgegeben wurden. Die Injektionsnadel wurde mit der „Sandwich-Technik“ befüllt und die Injektion sehr rasch (*cold needle*) durchgeführt. Bei der Sandwich-Technik wird die Injektionsnadel zuerst mit Lösemittel gefüllt von Luft, Probenlösung, Luft und abschließend Lösemittel befüllt.

4.2.1 Einfluss der Injektionsgeschwindigkeit

Bei einer zu langsamen Injektionsgeschwindigkeit besteht die Gefahr von Verlusten hochsiedender Analyten [Grob 2001]. Die im Projekt untersuchten Steroid-Acetate können zu den hochsiedenden Substanzen gezählt werden. Es wurden Versuche an Steroiden und Alkanen durchgeführt, um zu prüfen, ob es bei Verlust eines Analyten zu einer Isotopendiskriminierung kommt. Die Steroid-Acetat-Lösung wurde mit 1 $\mu\text{l/s}$, 50 $\mu\text{l/s}$ und 100 $\mu\text{l/s}$ Injektionsgeschwindigkeit injiziert und die gemessenen Isotopenverhältnisse und Peakflächen verglichen.

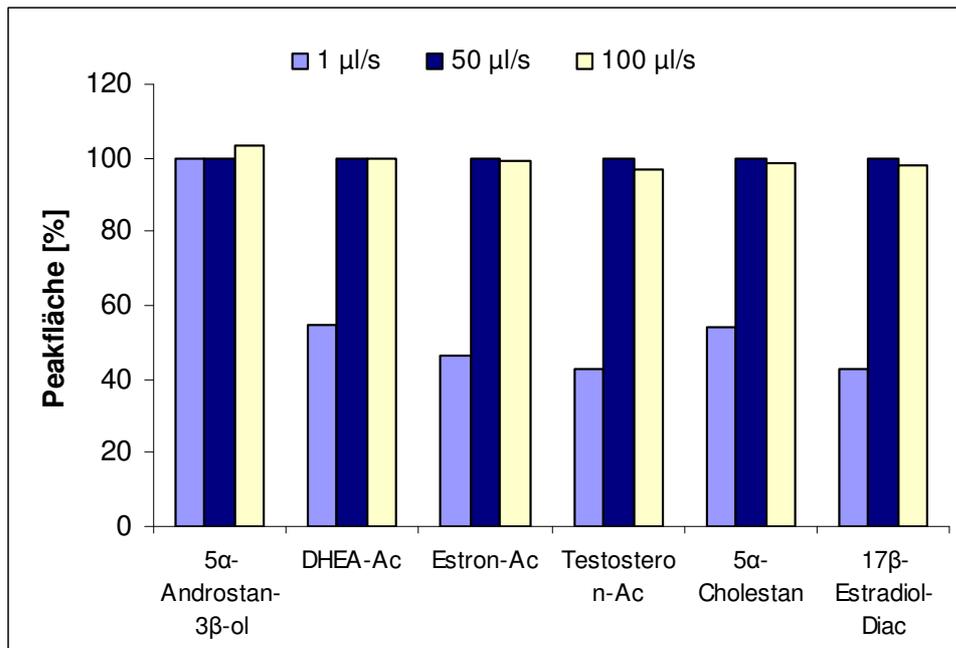


Abbildung 4.15: Peakflächen des Steroid-Acetat-Standards in Abhängigkeit von der Injektionsgeschwindigkeit (normiert auf die Peakflächen bei 50 $\mu\text{l/s}$), Anordnung der Analyten in Elutionsreihenfolge

Die Peakflächen bei einer Injektionsgeschwindigkeit von 100 $\mu\text{l/s}$ unterscheiden sich mit 97,8 bis 103,4 % nicht signifikant von denen bei 50 $\mu\text{l/s}$. Bei einer Injektion mit 1 $\mu\text{l/s}$ sind mit Ausnahme von 5 α -Androstan-3 β -ol signifikante Abnahmen der Peakflächen zu beobachten. Die Flächen betragen zwischen 42,7 und 54,9 % der Peakflächen bei einer Injektionsgeschwindigkeit von 50 $\mu\text{l/s}$ (Abb. 4.15).

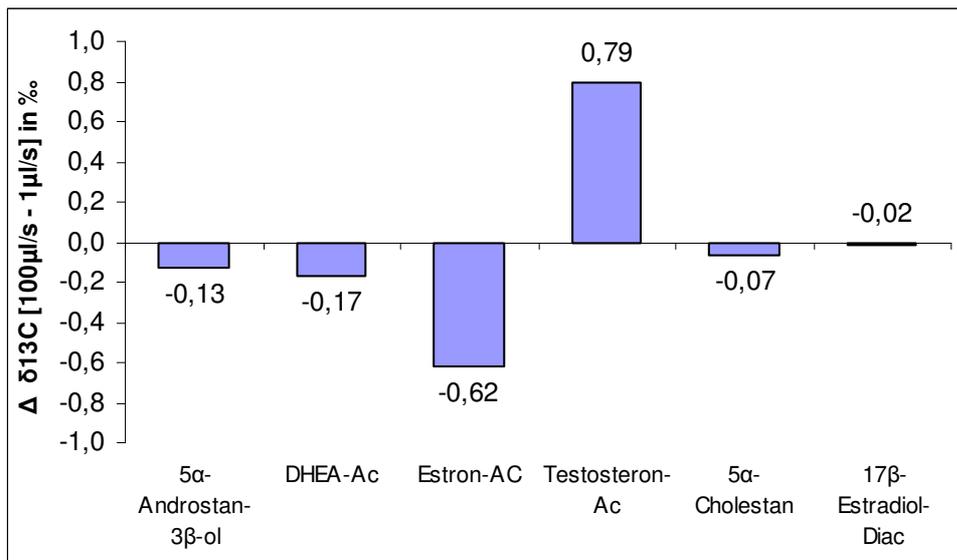


Abbildung 4.16: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Analyten des Steroid-Acetat-Standards in Abhängigkeit von der Injektionsgeschwindigkeit, Anordnung der Analyten in Elutionsreihenfolge, jeweils $n = 3$

Es wurden für zwei Substanzen signifikante Unterschiede zwischen den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten mit 1 $\mu\text{l/s}$ und 100 $\mu\text{l/s}$ ermittelt (Abb. 4.16). Für Estron-Acetat wurden nach einer schnelleren Injektion um 0,62 ‰ negativere Werte gemessen, während die Werte von Testosteron-Acetat in denselben Analysen um 0,80 ‰ positiver waren als bei der langsameren Injektion. Bei den anderen Analyten liegen die Unterschiede bei nicht signifikanten 0,02 bis 0,17 ‰. Eine Korrelation der Isotopenverhältnisse mit den Peakflächen ist bei keinem der hier untersuchten Analyten zu erkennen. Selbst der Verlust von etwa 50 % einer Substanz aufgrund der zu langsamen Injektion führt nur bei zwei von fünf Substanzen zu Abweichungen in den gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werten.

Um den Einfluss der Injektionsgeschwindigkeit auf die Analyten unterschiedlicher Kettenlänge zu untersuchen, wurde eine Alkan-Mischung mit Alkanen der Kettenlänge C16 bis C30 (Hexadecan bis Triacontan) ebenfalls mit den Geschwindigkeiten 1 $\mu\text{l/s}$, 50 $\mu\text{l/s}$ und 100 $\mu\text{l/s}$ injiziert und die gemessenen Daten wurden verglichen.

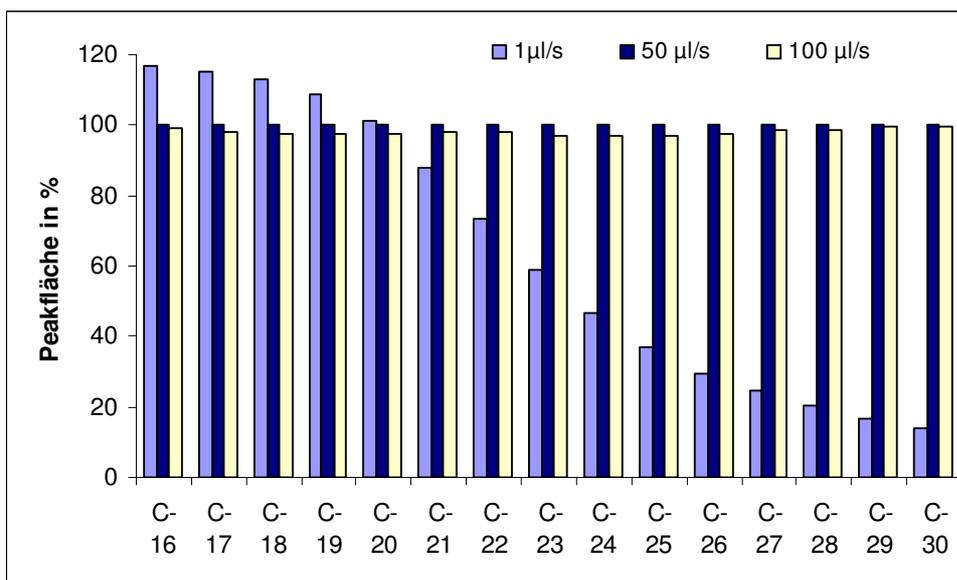


Abbildung 4.17: Peakflächen des Schimmelmann-Alkan-Mixes in Abhängigkeit von der Injektionsgeschwindigkeit (normiert auf die Peakflächen bei einer Injektionsgeschwindigkeit von 50 $\mu\text{l/s}$)

Auch hier zeigt sich bei keiner Substanz ein signifikanter Unterschied in den Peakflächen zwischen einer Injektion 50 $\mu\text{l/s}$ und 100 $\mu\text{l/s}$. Bei einer Injektionsgeschwindigkeit von 1 $\mu\text{l/s}$ ist bei den Peakflächen eine deutliche Korrelation mit der Kettenlänge der Alkane zu erkennen. Die Peakfläche des Triacotans (C30) beträgt hier nur noch 13,9 % der entsprechenden Fläche bei 50 $\mu\text{l/s}$ Injektionsgeschwindigkeit. Die Alkane mit 16 bis 19 C-Atomen haben jedoch größere Peakflächen als bei schnellerer Injektion. Bei Eicosan (C20) sind alle Flächen unabhängig von der Injektionsgeschwindigkeit gleich groß, während alle Alkane mit mehr C-Atomen bei langsamerer Injektion kleinere Flächen haben als bei einer größeren Injektionsgeschwindigkeit (s. Abb. 4.17). Die schwerer flüchtigen Alkane (ab ca. 357 °C) gelangen also im Gegensatz zu den leichter verdampfbaren bei einer zu langsamen Injektion nicht mehr vollständig auf die Säule. Dies zeigt die bekannte Diskriminierung der hochsiedenden Substanzen bei langsamer Injektion.

Vergleicht man die gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte in Abhängigkeit von der Injektionsgeschwindigkeit (Abb. 4.18), werden erst ab einer Kettenlänge von C26 (Hexacosan) signifikante Unterschiede zwischen der Injektion mit 100 $\mu\text{l/s}$ und 1 $\mu\text{l/s}$ sichtbar. Diese bewegen sich mit Ausnahme von Heptacosan (C27) zwischen 0,8 und 1,4 ‰, wobei die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte nach einer schnellen Injektion positiver als nach einer langsamen Injektion sind.

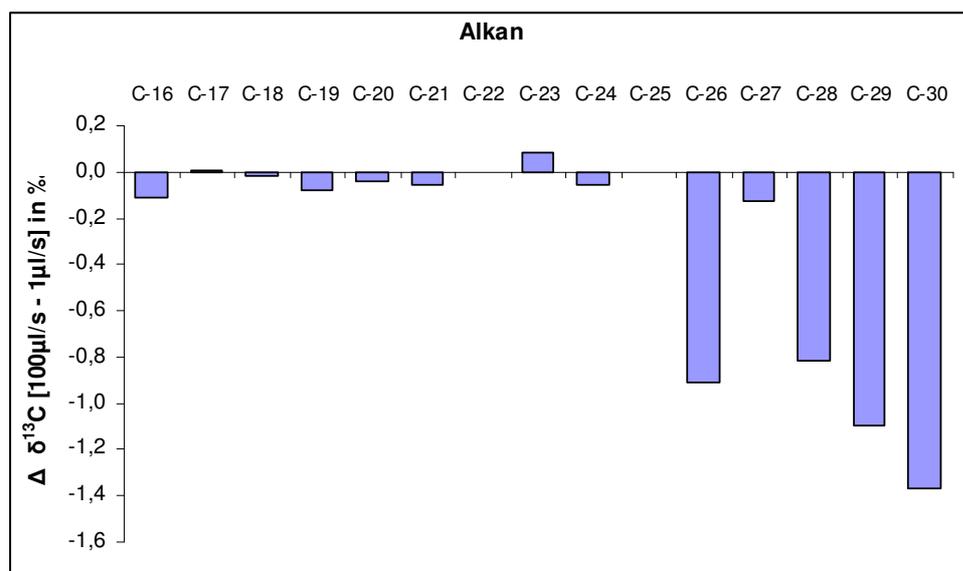


Abbildung 4.18: Differenzen in den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten [‰] bei Injektionen von 1 $\mu\text{l/s}$ und 100 $\mu\text{l/s}$ in Abhängigkeit von der Kettenlänge der Alkane

Hier ist wie auch beim zuvor dargestellten Steroid-Acetat-Standard keine Abhängigkeit der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert-Differenzen von den Peakflächen zu beobachten. Obwohl schon die Alkane ab 21 C-Atomen (Henicosan) bei einer langsamen Injektion deutlich diskriminiert werden, verändern sich die gemessenen Stabilisotopenverhältnisse erst ab einer Kettenlänge von 26 C-Atomen.

Eine Diskriminierung der Substanzen im Injektionssystem aufgrund einer zu geringen Injektionsgeschwindigkeit muss also nicht zu einer Isotopendiskriminierung führen. Kommt es dennoch zu einer Isotopendiskriminierung, so wurden mit Ausnahme von Testosteron-Acetat bei einer zu langsamen Injektionen die schweren Isotope diskriminiert.

4.2.2 Einfluss der Injektionstemperatur

Die Auswahl der Injektionstemperatur ist nicht nur für die GC/C-IRMS von Bedeutung. Mit einer ausreichend hohen Injektionstemperatur ist sichergestellt, dass alle Analyten im Injektor möglichst vollständig verdampfen und auf die Säule gelangen. Andererseits darf die Injektortemperatur nicht so hoch sein, dass sich die Analyten thermisch zersetzen. In der Literatur werden für die Analyse von Steroid-Acetat Injektionstemperaturen von 220 °C bis 285 °C beschrieben. Im ISOSTER-Projekt wurden die Steroid-Acetate bei einer Temperatur von 250 °C injiziert. Um den Einfluss der Injektortemperatur auf die Messung der Stabilisotopenverhältnisse zu bestimmen, wurde der Steroid-Acetat-Standard bei 220 °C, 250 °C und 280 °C injiziert und die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte und Peakflächen bestimmt.

Bei den Peakflächen der untersuchten Analyten wurden bei den untersuchten Injektionstemperaturen keine signifikanten Unterschiede gemessen. Es ergab sich kein Hinweis auf eine thermische Zersetzung oder eine unvollständige Verdampfung der Analyten. Erwartungsgemäß wurden auch in den gemessenen Isotopenzusammensetzungen bei keiner untersuchten Substanz signifikante Unterschiede zwischen den Injektionstemperaturen 220 °C, 250 °C und 280 °C gemessen (Abb. 4.19).

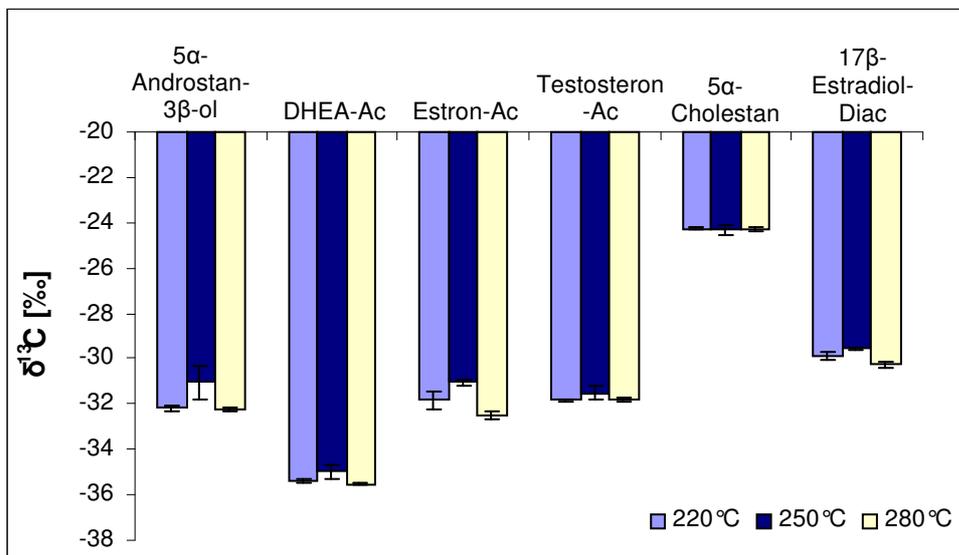


Abbildung 4.19: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Analyten des Steroid-Acetat-Standards in Abhängigkeit von der Injektortemperatur, jeweils $n = 3$

Eine Standardmischung aus den Alkanen Hexadecan (C16), Eicosan (C20), Docosan (C22), Tetracosan (C24), Triacontan (C30) und Dotriacontan (C32) wurde ebenfalls bei Injektortemperaturen von 200 °C, 250 °C und 280 °C unter sonst gleichbleibenden Bedingungen untersucht. Bei Hexadecan sind keine Unterschiede in den Flächen zu erkennen, bei Eicosan bis Tetracosan sind bei höheren Injektortemperaturen tendenziell größere Flächen zu beobachten, während bei Triacontan und Dotriacontan die Flächen bei einer Temperatur von 280 °C signifikant größer sind als bei den niedrigeren Temperaturen (Abb. 4.20).

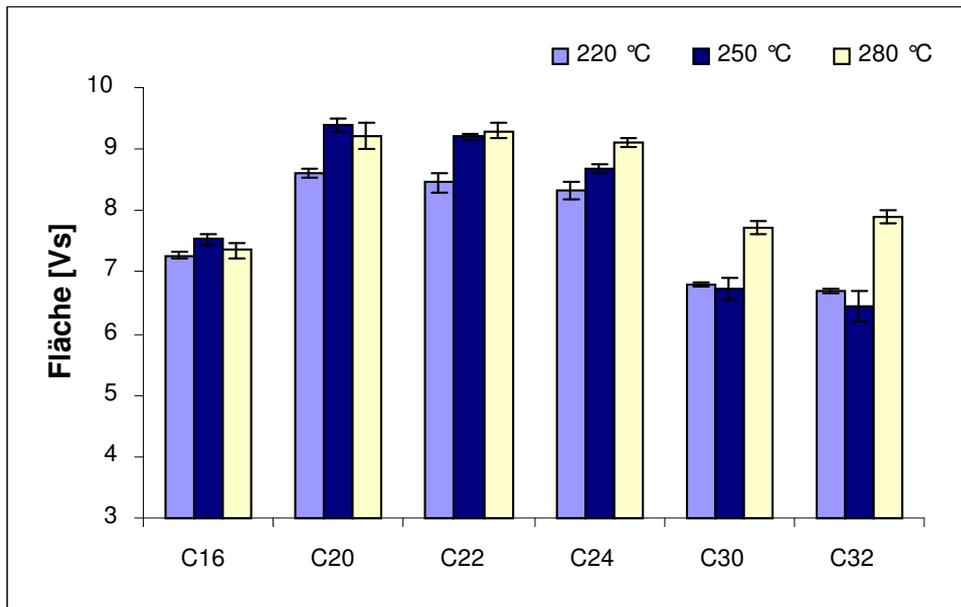


Abbildung 4.20: Peakflächen von Alkanen in Abhängigkeit von der Injektortemperatur; n = 3

Trotz der unvollständigen Verdampfung vor allem der längerkettigen Alkane bei niedrigeren Injektortemperaturen zeigte sich kein temperaturabhängiger Unterschied in den gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Alkane.

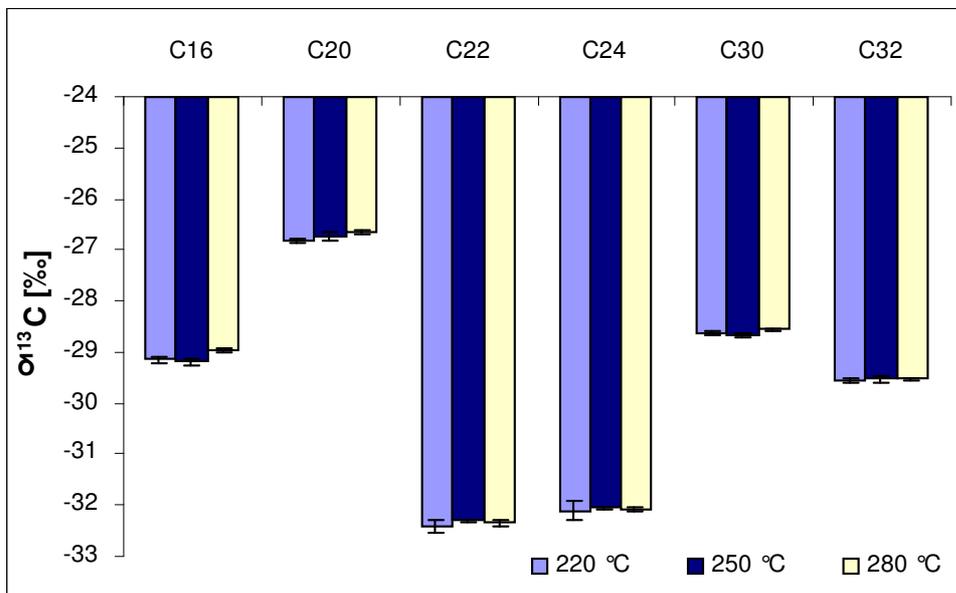


Abbildung 4.21: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Alkanen in Abhängigkeit von der Injektortemperatur; n = 3

Während der unvollständigen Vaporisierung der Alkane kommt es zu keiner messbaren Isotopenfraktionierung (Abb. 4.21). Eine Abweichung von der Injektionstemperatur um $\pm 30\text{ °C}$ führt trotz teilweise unvollständiger Vaporisierung der Analyten weder bei den untersuchten Steroid-Acetatn noch bei den Alkanen zu Unterschieden in den gemessenen Isotopenverhältnissen.

4. Einfluss des Liners

Für eine diskriminierungsfreie Aufgabe der Analyten auf die Säule ist unter anderem die Wahl eines geeigneten Liners wichtig. Für die *Splitless*-Injektion von Substanzen wie acetylierten Steroiden erwies sich ein deaktivierter, speziell beschichteter *Splitless*-Liner mit beidseitiger Verjüngung als geeignet (Liner 1). Dieser Liner wurde mit einem einfachen, mit Glaswolle gefüllten *Split/splitless*-Liner (Liner 2) hinsichtlich der gemessenen Peakflächen und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte verglichen.

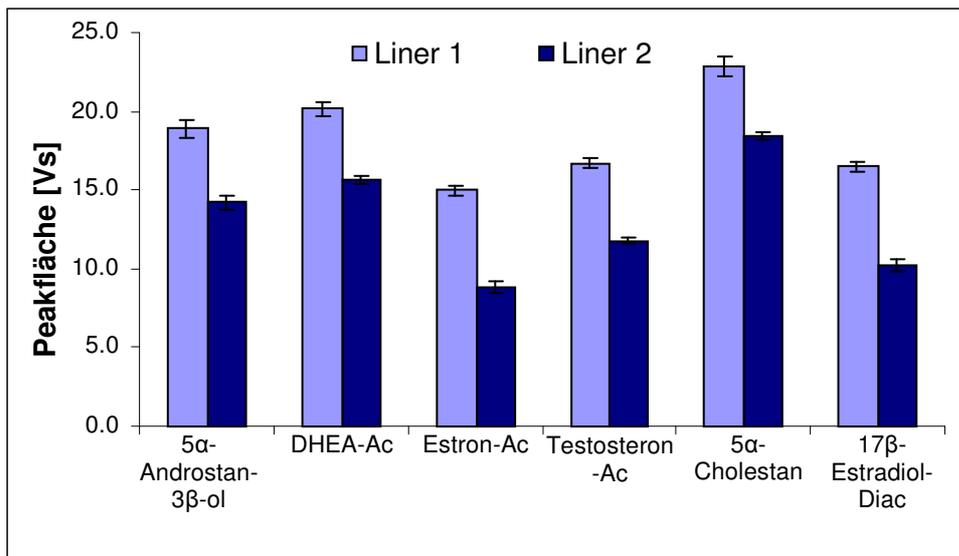


Abbildung 4.22: Peakflächen der Analyten des Steroid-Acetat-Standards mit einem *Splitless*-Liner (Liner 1) und einem *Split/splitless*-Liner mit Glaswolle (Liner 2) in Vs; n = 5

Der Vergleich der Peakflächen der injizierten Substanzen zeigt, dass die Flächen für alle untersuchten Substanzen mit Liner 1 deutlich größer sind als mit Liner 2. Die Abweichungen liegen für die Estron-Derivate Estron-Acetat und 17 β -Estradiol-Diacetat bei 6,1 bzw. 6,3 Vs. Dies entspricht einer verminderten Empfindlichkeit des Liners 2 gegenüber Liner 1 um rund 40 %. Bei allen anderen Substanzen liegt die Differenz der Flächen zwischen 4,4 und 4,9 Vs, was einer um 20 bis 25 % verringerten Empfindlichkeit entspricht (s. Abb. 4.22).

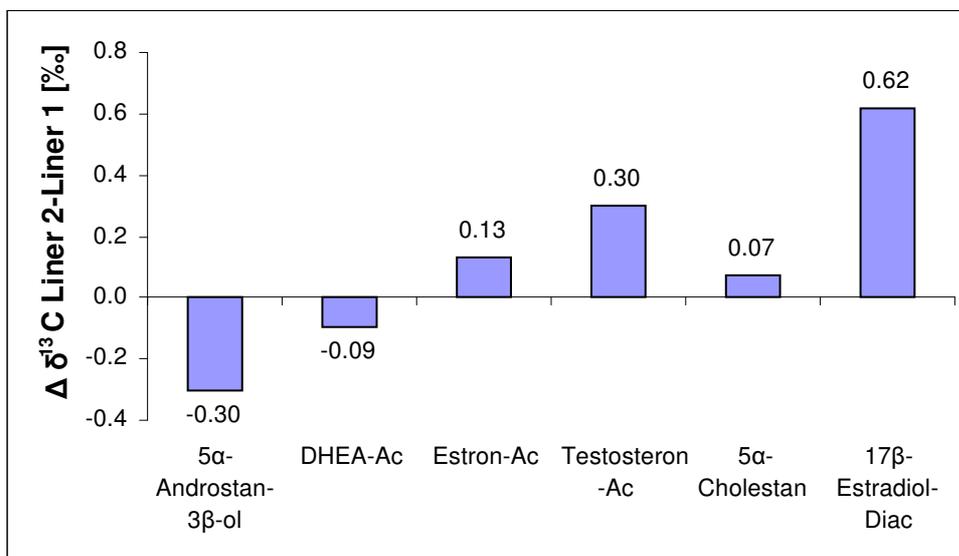


Abbildung 4.23: Differenzen der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte in % (Liner 2 – Liner 1), jeweils aus n = 5

Die Abweichungen der Mittelwerte der mit den verschiedenen Linern gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte liegen für die untersuchten Analyten bei $-0,30$ bis $+0,62$ ‰ (s. Abb. 4.23). Aufgrund der sehr niedrigen Standardabweichungen sind diese Unterschiede mit einem Signifikanzniveau von 95 % signifikant (t-Test, $p < 0,05$). Die Standardabweichungen nach einer Fünffachinjektion liegen bei den Messungen mit Liner 1 für alle Analyten unter 0,1 ‰, bei den Messungen mit Liner 2 bei bis zu 0,2 ‰. Die Analyten sind in der Abbildung 4.26 in ihrer Elutionsreihenfolge angegeben. Es zeigt sich eine Abhängigkeit der Differenzen der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von der Retentionszeit der Analyten. Die zuerst eluierenden Substanzen haben mit dem *Split/splitless*-Liner (Liner 2) negativere $\delta^{13}\text{C}$ -Werte, während bei den später eluierenden Substanzen positivere Werte als mit dem deaktivierten *Splitless*-Liner gemessen werden. Mit Liner 2, mit dem geringere Peakflächen gemessen wurden, werden bei den zuerst eluierenden Substanzen 5α -Androstan- 3β -ol und DHEA-Acetat die schweren Isotope diskriminiert, während bei den später eluierenden die leichten Isotope diskriminiert werden. Die ermittelten Abweichungen in den Isotopenverhältnissen lassen sich nicht mit den Unterschieden in den Peakflächen in Relation setzen.

4.2.1 Einfluss der *Purgetime*

Die *Purgetime* beschreibt den Zeitraum, in dem die Probe nach der Injektion *splitless* durch den Liner gespült wird. Die *Purgetime* muss so gewählt werden, dass alle Analyten auf die Säule gelangen können. Wird eine zu kurze *Purgetime* ausgewählt, kommt es zu einer Diskriminierung eines oder mehrerer Analyten und es gelangt nicht die gesamte Probe auf die Säule [Grob 2001].

Um die Auswirkung der *Purgetime* auf die Messung von Stabilisotopenverhältnissen zu untersuchen, wurden der Steroid-Acetat-Standard und eine Alkanmischung jeweils mit einer *Purgetime* von 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 min unter ansonsten identischen Bedingungen mittels GC/C-IRMS vermessen. Abbildung 4.24 zeigt, dass es bei den Steroiden in Abhängigkeit von der *Purgetime* zu erheblichen Unterschieden in der Größe der Peakfläche der Analyten kommt. Ausgehend von 100 % bei einer Zeit von 1,5 min, betragen die Flächen bei 0,1 min 9,5 bis 13,8 % und bei 0,5 min 46,8 bis 52,3 %. Bei 1,0 min *Purgetime* sind die Flächen mit 72,7 bis 86,0 % der Flächen bei 1,5 min noch immer deutlich kleiner als bei 1,5 min, wohingegen bei 2,0 min *Purgetime* mit 88,9 bis 115,2 % sowohl größere als auch kleinere Flächen als mit einer Zeit von 1,5 min gemessen wurden.

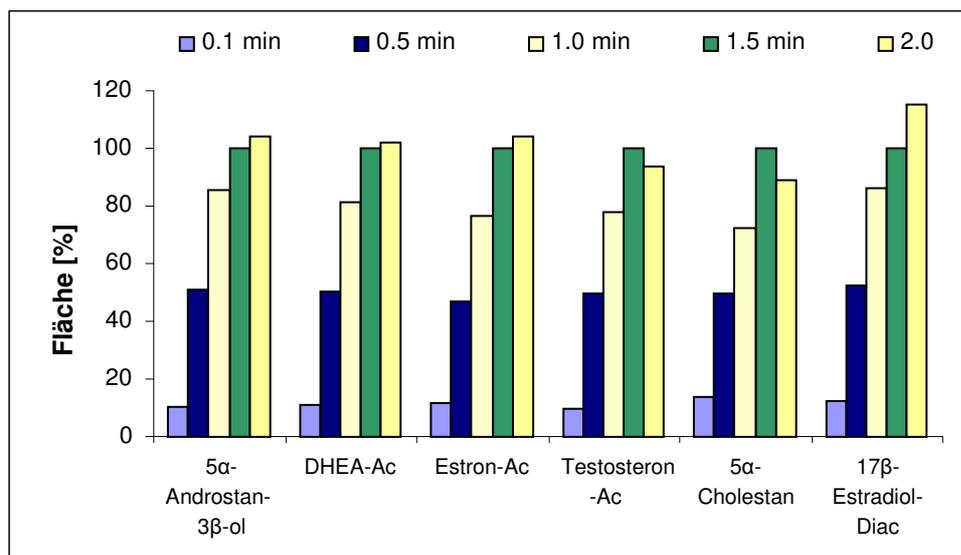


Abbildung 4.24: Peakflächen der Analyten des Steroid-Acetat-Standards in Abhängigkeit von der *Purgetime* (normiert auf 1,5 min *Purgetime*), $n = 3$

In Abbildung 4.25 sind die mit den unterschiedlichen *Purgetimes* ermittelten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für die untersuchten Analyten des Steroid-Acetat-Standards dargestellt.

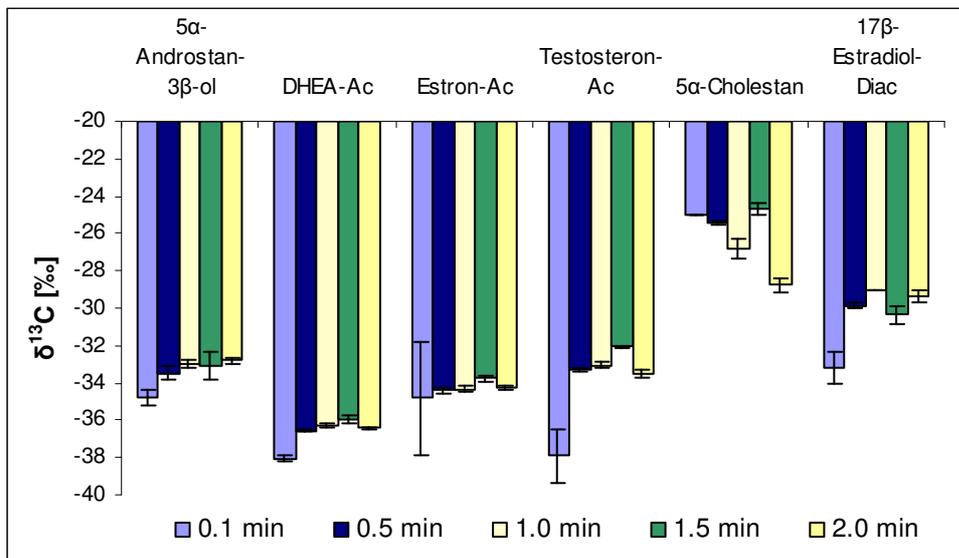


Abbildung 4.25: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Steroide des Steroid-Acetat-Standards in Abhängigkeit von der *Purgetime*

Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte liegen in Abhängigkeit von der *Purgetime* für 5 α -Androstan-3 β -ol bei $-32,8$ bis $-34,8$ ‰, für DHEA-Acetat zwischen $-36,0$ und $-38,0$ ‰ und für Estron-Acetat bei $-33,8$ bis $-34,8$ ‰. Für Testosteron-Acetat wurden Stabilisotopenverhältnisse von $-32,1$ bis $-37,9$ ‰ gemessen, für Cholestan Werte zwischen $-24,7$ und $-28,7$ ‰ und für 17 β -Estradiol-Diacetat Werte von $-29,1$ bis $-33,2$ ‰. Der Unterschied zwischen den mit der Standardeinstellung von 1,5 min und einer *Purgetime* von 0,1 min gemessenen Isotopenverhältnisse liegt für die verschiedenen Analyten zwischen 0,3 und 5,8 ‰, wobei die mit der kürzeren *Purgetime* gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte negativer sind (Abb. 4.26). Mit Ausnahme von Estron-Acetat und Cholestan sind die gemessenen Unterschiede signifikant (Vergleich der Mittelwerte mit dem t-Test, $p < 0,05$).

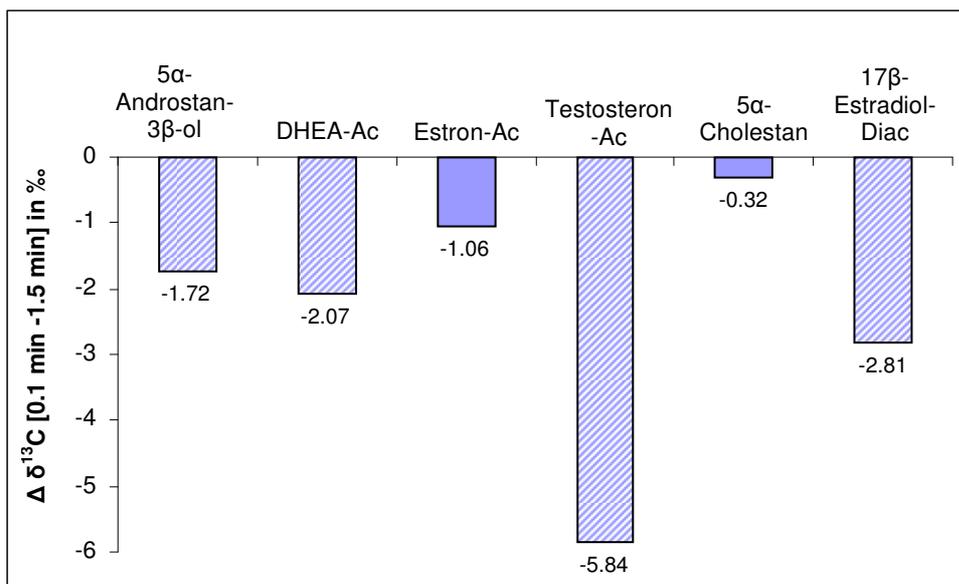


Abbildung 4.26: Differenzen der mit verschiedenen *Purgetimes* aufgenommenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte in ‰; schraffierte Balken markieren signifikante Unterschiede (t-Test, $p < 0,05$)

Der gleiche Versuch, mit den Alkanen Hexadecan (C16), Eicosan (C20), Docosan (C22), Tetracosan (C24), Triacontan (C30) und Dotriacontan (C32) durchgeführt, zeigt ebenfalls eine deutliche Abhängigkeit der gemessenen Peakflächen von der gewählten *Purgetime* (Abb 4.27).

Mit einer *Purgetime* von 0,1 min betragen die Peakflächen zwischen 12 und 15 % der Flächen mit 1,5 min *Purgetime*, während es bei 0,5 min 55 bis 57 % sind. Bei den Alkanen der Kettenlängen C16 bis C24 sind mit einer *Purgetime* von 2 min mit 99 bis 102 % keine signifikanten Unterschiede zu 1,5 min zu messen, während die Flächen der längerkettigen Alkane 9 bzw. 11 % größer sind.

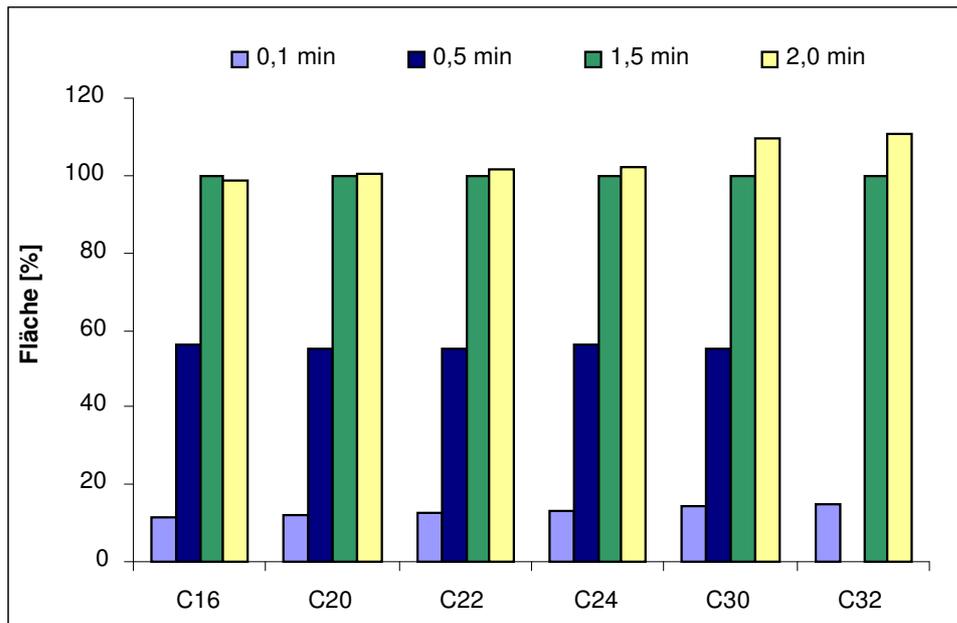


Abbildung 4.27: Peakflächen der Alkane bei verschiedenen *Purgetimes* (normiert auf eine *Purgetime* von 1,5 min), n = 3

Trotz der erwarteten deutlichen Unterschiede in den Peakflächen in Abhängigkeit von der *Purgetime* konnten bei den Alkanen keine signifikanten Unterschiede in den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten gemessen werden. Die Messwerte bei 0,1 min sind bis zu 0,7 ‰ negativer als bei 1,5 min (Abb. 4.28). Diese Unterschiede sind jedoch wegen der großen Messungenauigkeit bei einer *Purgetime* von 0,1 min nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$).

Bei zu kurzen *Purgetimes* werden sowohl bei den untersuchten Steroid-Acetat als auch bei den Alkanen deutlich kleinere Flächen gemessen. Bei den Alkanen führt dies selbst bei Verlusten von über 85 % nicht zu einer nachweisbaren Isotopenfraktionierung. Bei den Steroid-Acetat hingegen wurden unter ansonsten identischen Messbedingungen signifikante Unterschiede von bis zu 5,8 ‰ gemessen.

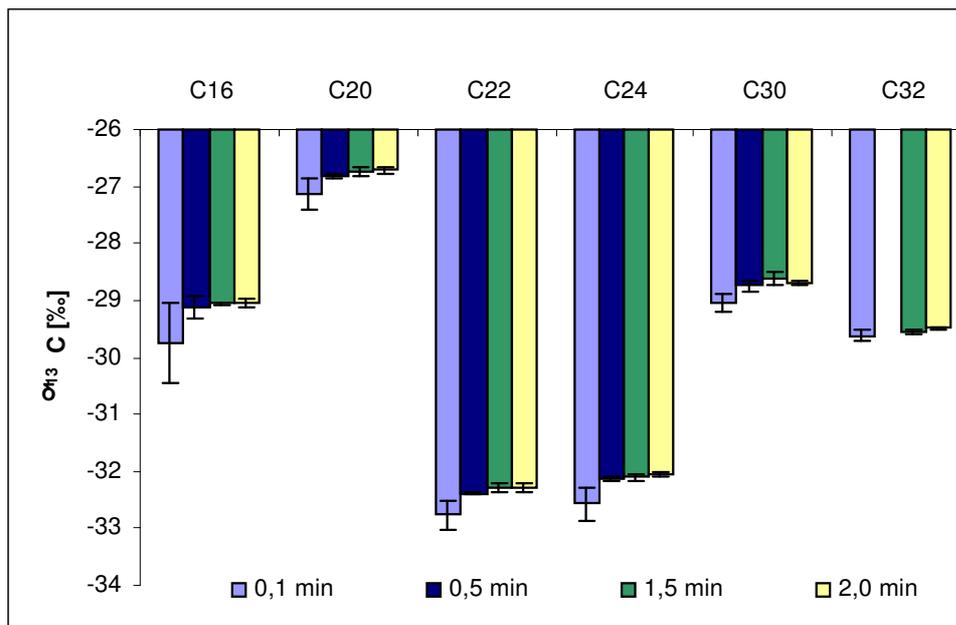


Abbildung 4.28: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Alkan-Mixes [‰] bei unterschiedlichen Purgetimes, $n = 3$

4.2.3 Einfluss der Injektionstechnik (*split* und *splitless*)

Die Wahl des Injektionsmodus *split* oder *splitless* bei der GC/C-IRMS kann sich auf die gemessenen Isotopenverhältnisse auswirken. Meier-Augenstein [1997] empfiehlt für die GC/C-IRMS ausschließlich den *Splitless*-Modus, um eine Isotopenfraktionierung im Injektor zu vermeiden.

Aufgrund der niedrigen Konzentrationen der Steroide im Rinderurin und der Tatsache, dass für die GC/C-IRMS große Analytmengen benötigt werden, wurden die Proben im ISOSTER-Projekt auch ausschließlich im *Splitless*-Modus injiziert. Da der Injektionsmodus bei der GC/C-IRMS aber prinzipiell von Bedeutung ist, wurden die im *Split*- und *Splitless*-Modus gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Standardlösungen miteinander verglichen und der Einfluss des Splitfaktors untersucht.

Hierzu wurden zunächst jeweils 100 ng des Steroid-Acetat-Standards im *Split*- und *Splitless*-Modus injiziert und die erhaltenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte miteinander verglichen. Für die Messungen im *Splitless*-Modus wurden dafür jeweils 2 μl einer 50 ng/ μl -Lösung injiziert. Außerdem wurde 1 μl einer 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -Lösung der gleichen Standard-Mischung mit einem Splitverhältnis von 1:20 injiziert. Der Vergleich der aus jeweils Dreifachbestimmungen erhaltenen Mittelwerte lässt keine signifikanten Abweichungen zwischen den beiden Injektionsmodi erkennen. Die Unterschiede liegen bei den untersuchten Substanzen zwischen 0,04 und 0,59 ‰ (Abb. 4.29).

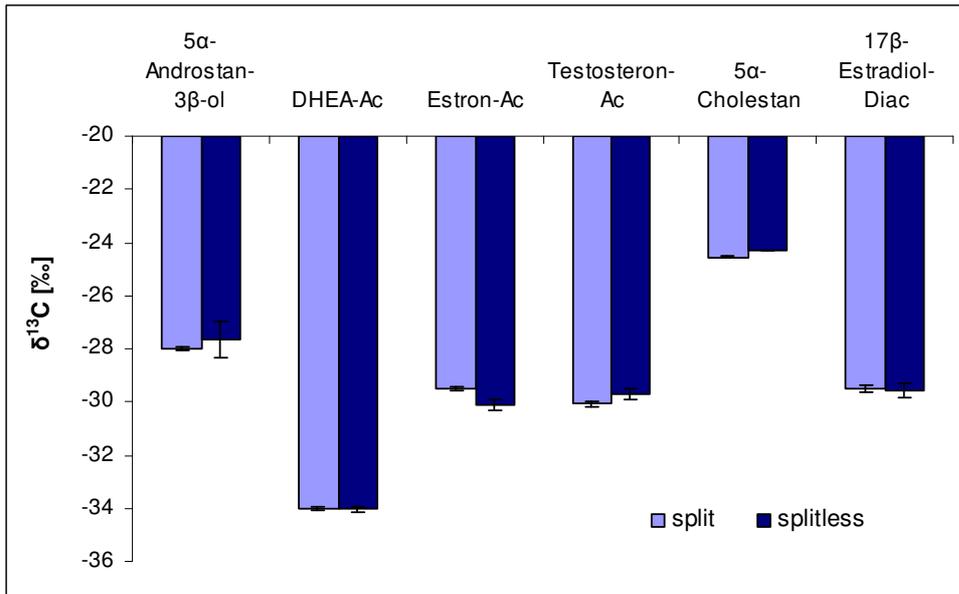


Abbildung 4.29: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Steroid-Acetat-Standards nach Split- und Splitless-Injektion, injizierte Menge jeweils 100 ng, je n = 3

Die folgende Abbildung (4.30) zeigt exemplarisch für alle untersuchten Analyten den Verlauf der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des DHEA-Acetates in Abhängigkeit von variierenden Splitverhältnissen. Die Mittelwerte aus den Dreifachinjektionen bei Splitverhältnissen von 1:10 bis 1:100 liegen zwischen $-33,7$ und $-34,0$ ‰ mit Standardabweichungen zwischen 0,05 und 0,09 ‰.

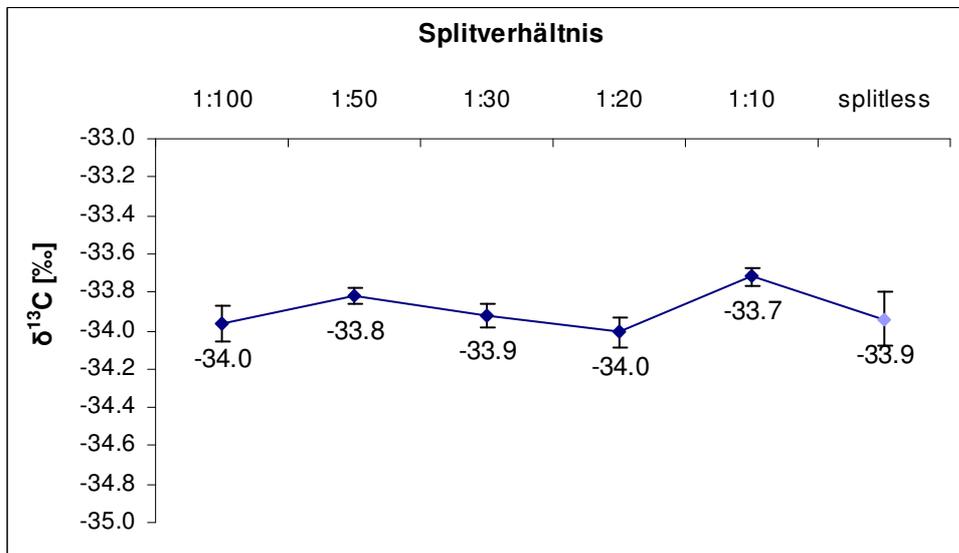


Abbildung 4.30: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte bei Splitverhältnissen von 1:10 bis 1:100 am Beispiel von DHEA-Acetat, jeweils n = 3, bei splitless n = 12

Es lässt sich wie auch bei den anderen hier nicht dargestellten Analyten keine Korrelation zwischen den Splitverhältnissen und den gemessenen Isotopenverhältnissen herstellen. Unter den gewählten Bedingungen sind also sowohl die Messwerte aus *Split*- und *Splitless*-Injektion als auch die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte aus Messungen mit unterschiedlichen Splitverhältnissen identisch.

4.2.4 Einfluss des Injektionsvolumens

Vorversuche mit Standardlösungen zeigten, dass Injektionsvolumina zwischen 0,5 und 4 µl keinen Einfluss auf das gemessene Isotopenverhältnis haben. Bei Matrixproben wie z.B. Rinderurinproben kann sich das injizierte Volumen auf das Ergebnis auswirken. Bei einem größeren Injektionsvolumen gelangt mit größeren Analytenpeaks auch mehr störende Matrix auf die Säule. Der Einfluss von Probenmatrix auf den gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert wird im Kapitel Probenaufarbeitung (Abschnitt 4.1.1 und 4.1.6) beschrieben.

4.3 Gaschromatographische Einflüsse

Die gaschromatographischen Parameter Temperaturgradient und Trägergasfluss sind neben der Auswahl der Trennsäule wichtige Faktoren für die chromatographische Trennung. In der GC/C-IRMS gewinnen sie zusätzlich an Bedeutung, da die thermodynamischen Isotopeneffekte von ihnen abhängen und sie sich somit auf die Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte auswirken können. Die thermodynamischen Isotopeneffekte sind auch als *inverse chromatographic isotope effect* bekannt, weil die schwereren Isotopomere früher eluieren als die leichteren [Cherrah et al. 1987; Meier-Augenstein et al. 1996]. Das Signal der Masse 45 ($^{13}\text{CO}_2$) kommt etwa 150 ms vor dem der Masse 44 ($^{12}\text{CO}_2$). Wie stark diese Auswirkung auf die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte verschiedener Analyten ist, wurde bisher nur wenig untersucht, sie hängt jedoch von der Polarität der Trennsäule und den Analyten ab.

4.3.1 Einfluss des Temperaturprogrammes und des Trägergasflusses

Die Alkane mit den Kettenlängen C16 bis C30 (Hexadecan bis Triacontan, Alkanstandard nach Schimmelmann) wurden mit verschiedenen GC-Temperaturmethoden vermessen, um den Einfluss auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert bestimmen zu können. Dabei wurde zum einen eine für die Alkane optimierte Methode (GC-Methode 15), mit der eine optimale Trennung der Alkane bei jeweils etwa gleicher Peakform jedes Analyten möglich ist, gewählt. Zum anderen wurden GC-Methoden, die für die Messung von Steroiden oder deren Acetate entwickelt wurden (GC-Methoden 4, 9, 11 und 12), getestet. Der Verlauf der verwendeten Temperaturprogramme ist in Abbildung 4.31 dargestellt. Die Temperaturprogramme der GC-Methoden 11 und 12 sind identisch, hier unterscheiden sich lediglich die Fließgeschwindigkeiten des Trägergases Helium. Das Gleiche gilt für die GC-Methoden 9 und 13.

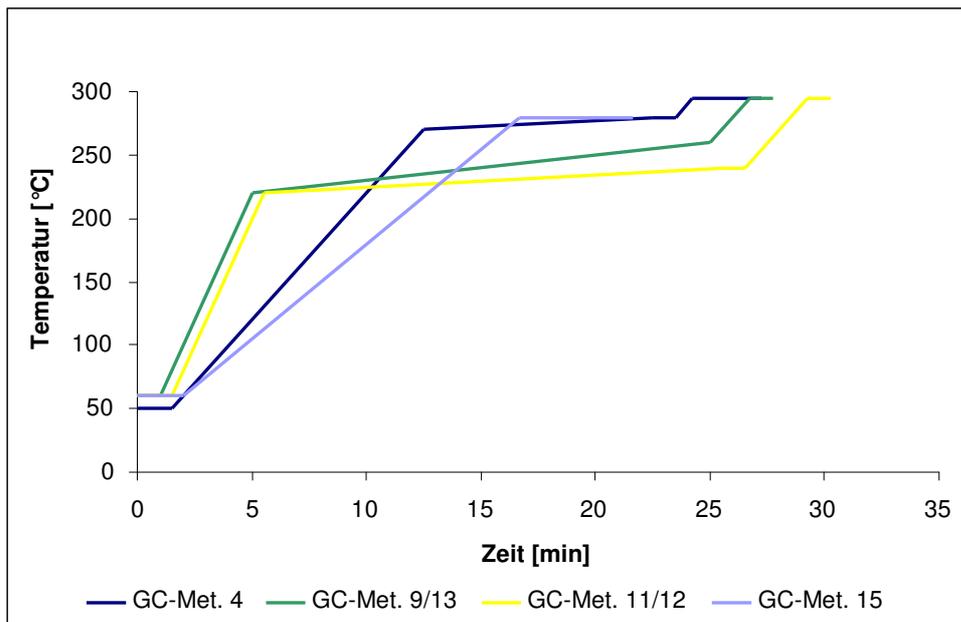


Abbildung 4.31: Temperaturverlauf der verwendeten GC-Methoden

Die verwendeten Temperaturprogramme lassen sich in zwei Gruppen aufteilen. Die GC-Methoden 4 und 15 haben eine langsamere erste Aufheizrate (20 °C/min bzw. 15 °C/min) als die anderen Methoden (40 °C/min).

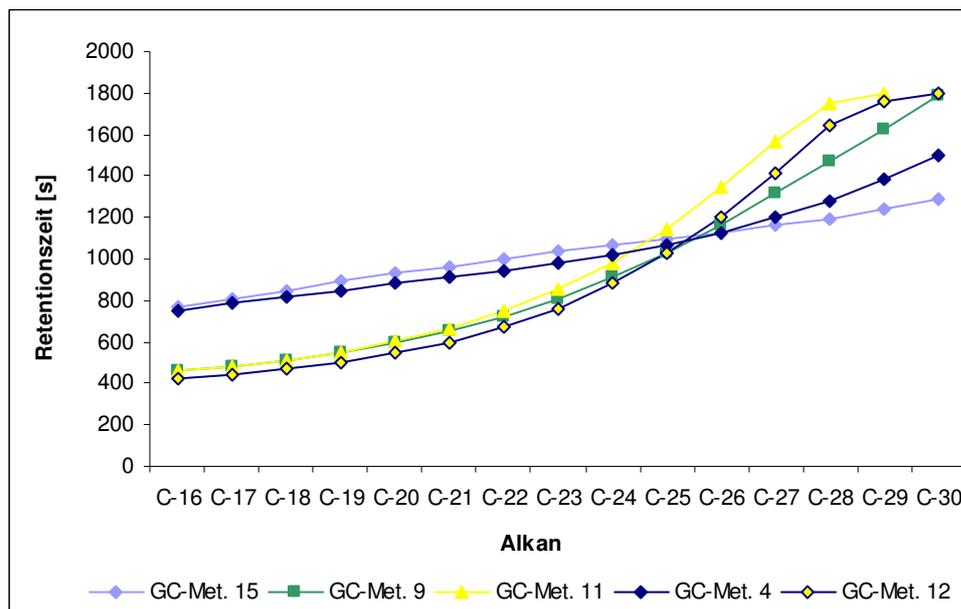


Abbildung 4.32: Retentionszeiten der untersuchten Alkane in Abhängigkeit vom verwendeten GC-Temperaturprogramm

Die Retentionszeiten aller Alkane mit den verschiedenen GC-Programmen sind in Abbildung 4.32 dargestellt. Für die GC-Methoden 9, 11 und 12 liegen die Zeiten zwischen etwa 400 s für Hexadecan (C16) und etwa 1800 s für Triacontan (C30). Bei den Methoden 4 und 15 eluieren die Analyten in einem deutlich kürzeren Zeitraum von etwa 750 s für Hexadecan bis etwa 1300 s bzw. 1500 s für Triacontan.

Auch bei den mit diesen Methoden erhaltenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werten lassen sich die gleichen zwei Gruppen bilden. Bei den Methoden 9, 11 und 12 sind die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte aller gemessenen Alkane negativer als der jeweilige Referenzwert, wobei die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte mit zunehmender Ketten-

länge immer positiver werden (Abb. 4.33). Die Abweichung der Messwerte des Hexadecans vom Sollwert beträgt bei diesen Methoden im Schnitt $-1,1\text{‰}$ und die Abweichung für Nonacosan (C29) im Mittel $+0,1\text{‰}$. Bei den beiden anderen Temperaturprogrammen besteht die gleiche Abhängigkeit der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von der Kettenlänge der Alkane, allerdings in ausgeprägterer Form. Die Differenzen der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zum Sollwert reichen hier von $-1,7\text{‰}$ für Hexadecan bis $+0,9\text{‰}$ für Nonacosan.

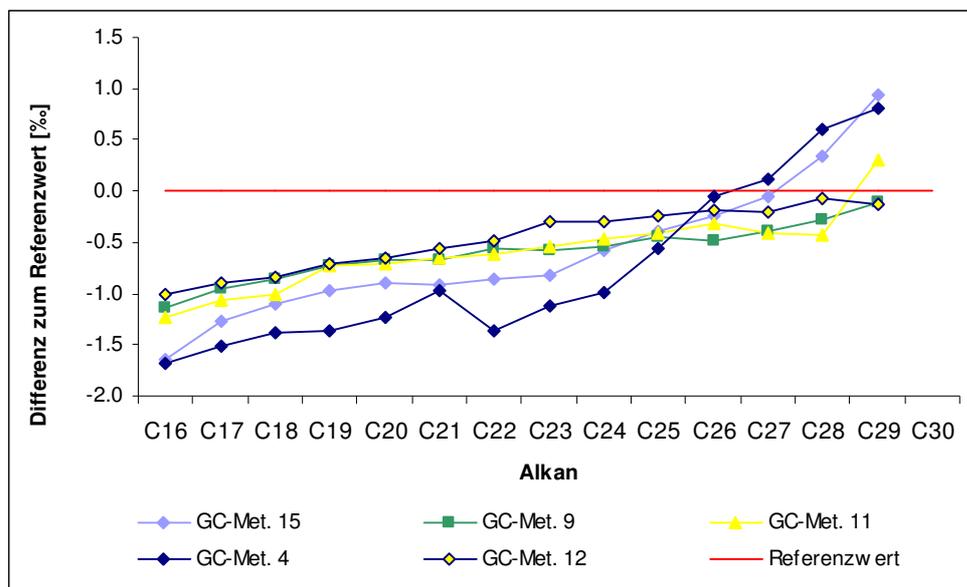


Abbildung 4.33: Abhängigkeit des gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes (im Verhältnis zum Referenzwert) vom verwendeten GC-Temperaturprogramm

Bei den GC-Methoden 4 und 15, bei denen die Retentionszeiten kürzer sind, ist eine andere Entwicklung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der längerkettigen Alkane zu beobachten.

Um unter bekannten Messbedingungen selbst hergestellte Alkanstandards für die Untersuchungen der GC-Bedingungen zu erhalten, wurden die Alkane Hexadecan (C16), Eicosan (C20), Docosan (C22), Tetracosan (C24), Triacontan (C30) und Dotriacontan (C32) mit der Elemental-Analyzer- (EA-)IRMS hinsichtlich ihrer $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse gemessen. In Tabelle 4.7 sind die mittels EA-IRMS gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der untersuchten Alkane dargestellt. Die Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von reinen Feststoffen und Flüssigkeiten ist im Isotopenlabor des BfR mit einer Genauigkeit von $0,2\text{‰}$ möglich. Eine größere Abweichung hiervon kann durch eine nicht ausreichend homogene Probe verursacht werden. Es lagen jeweils nur einige Milligramm jedes Alkanstandards vor, weshalb eine Homogenisierung der kristallin vorliegenden Substanzen wegen des damit verbundenen Substanzverlustes nicht möglich war. Mit Standardabweichungen unter $0,3\text{‰}$ liegen die in diesem Versuch ermittelten Werte im akzeptablen Bereich.

Tabelle 4.7: ^{13}C -Isotopenverhältnisse einiger Alkane [‰], gemessen mit der EA-IRMS

Name	Anzahl C-Atome	$\delta^{13}\text{C}$ -Wert [‰]	Standardabweichung	n
n-Hexadecan	16	-29,11	0,060	3
Eicosan	20	-27,62	0,185	3
Docosan	22	-33,24	0,206	4
Tetracosan	24	-32,89	0,276	3
Triacontan	30	-29,52	0,104	3
Dotriacontan	32	-30,15	0,078	3

Aus diesen Alkanen wurde ein Mix in Cyclohexan hergestellt und mit den gleichen Methoden wie der Schimmelmann-Standard vermessen.

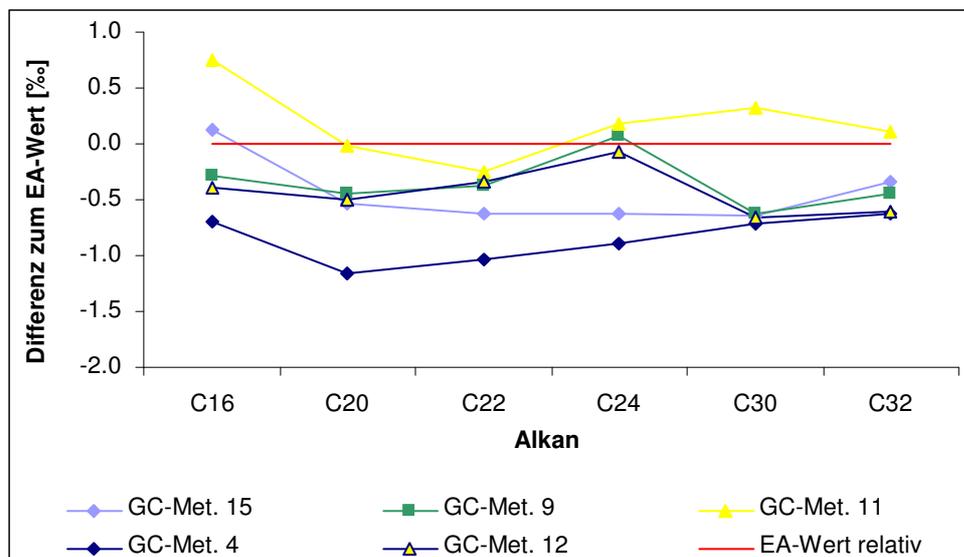


Abbildung 4.34: Abhängigkeit des gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes einiger Alkane (im Verhältnis zum EA-Wert) in Abhängigkeit vom verwendeten GC-Temperaturprogramm

Die Differenz zum EA-Wert liegt bei der GC-Methode 15 zwischen +0,12 und -0,65 ‰ und bei Methode 4 zwischen -0,62 und -1,15 ‰. Die Ergebnisse der Methoden 9 und 12 sind mit Abweichungen von +0,08 bis -0,63 ‰ bzw. -0,08 bis -0,65 ‰ zum Sollwert fast identisch. Die Abweichungen der Messwerte mit Methode 11 zu den EA-Werten liegen zwischen +0,75 und -0,34 ‰. Zwischen den sich in den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten am stärksten unterscheidenden Methoden 4 und 11 betragen die Differenzen je nach Alkan 0,73 bis 1,44 ‰.

Bei den $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnissen dieser selbst hergestellten Alkan-Mischung ist im Gegensatz zu den Alkanen des Standards nach Schimmelmann kein Trend in Abhängigkeit von der Kettenlänge im Vergleich mit dem Sollwert zu erkennen. Dies lässt die Vermutung zu, dass der beim Alkanstandard nach Schimmelmann gemessene Trend in Abhängigkeit von der Kettenlänge der Alkane nicht in den selbst verwendeten Methoden zu suchen ist, sondern eventuell an der Messmethode, mit der die vorliegenden Referenzwerte gemessen wurden, liegt. Die Versuche mit den Alkanen zeigen, dass es zu Unterschieden in den gemessenen Isotopenverhältnissen in Abhängigkeit von der verwendeten GC-Methode kommen kann.

Für die Vermessung von Steroid-Acetat en wurden im Laufe des Projektes vier verschiedene GC-Methoden erarbeitet, von denen sich jeweils zwei nur durch unterschiedliche Trägergasflüsse unterscheiden (GC-Methode 9, GC-Methode 11, GC-Methode 12, GC-Methode 13). Im Folgenden werden diese Methoden und ihre Auswirkung auf die Peakflächen und die ermittelten Isotopenverhältnisse miteinander verglichen. Die folgenden Abbildungen (4.35) zeigen die Chromatogramme, die mit den unterschiedlichen GC-Methoden aufgenommen wurden.

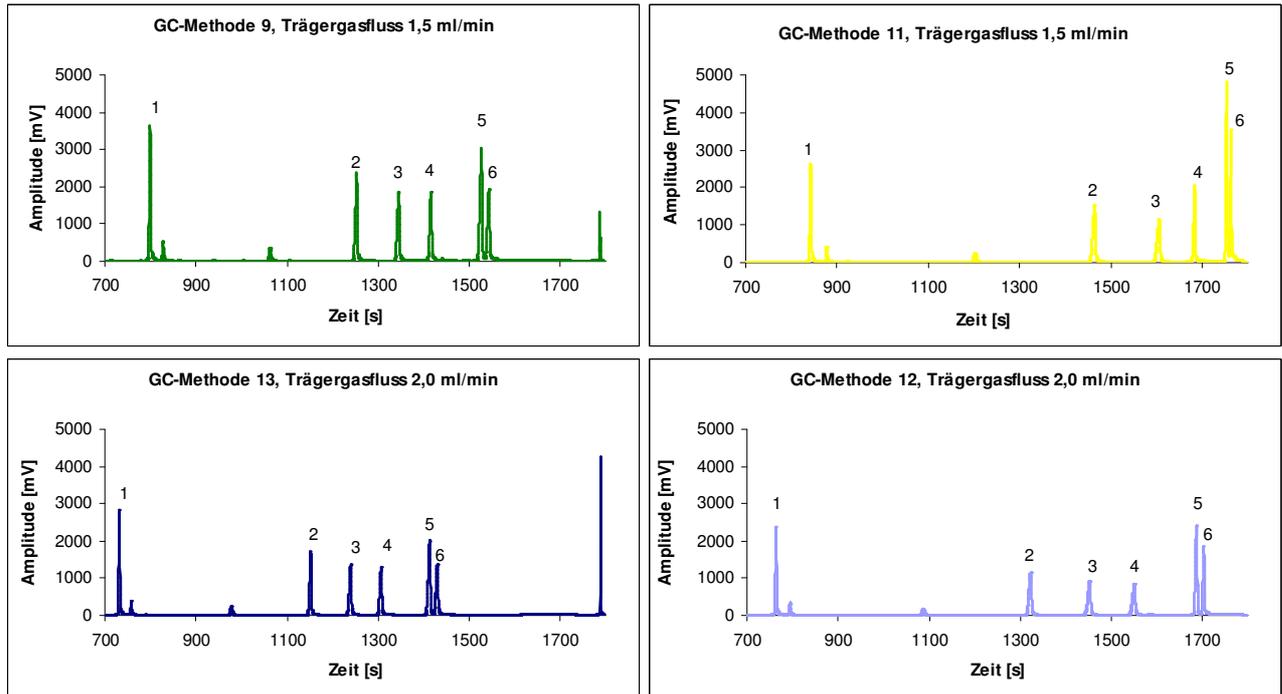


Abbildung 4.35: IRMS-Chromatogramme eines Steroid-Acetat-Standards mit verschiedenen GC-Methoden aufgenommen; mit 1: AOL, 2: DHEA-Acetat, 3: EA-Acetat, 4: Estron-Acetat, 5: Cholestan, 6: 17 β -Estradiol

Für diesen Versuch wurde der Steroid-Acetat-Standard eingesetzt. Die mit den Methoden 9 und 11 ermittelten Peakflächen unterscheiden sich bei gleicher injizierter Menge signifikant von denen mit den Methoden 12 und 13 ermittelten. Dies ist auf die unterschiedliche Trägergasflussgeschwindigkeit und die damit verbundenen Einflüsse im *Open-Split-Interface* zurückzuführen (vgl. Kapitel 4.5 Interface). Die Peaks jeder Substanz, die mit unterschiedlichen Temperaturprogrammen, aber identischem Trägergasfluss aufgenommen wurden, sind gleich groß (Abb. 4.36). Die Änderung des Temperaturprogrammes bei Beibehaltung des Trägergasflusses führt zu keiner signifikanten Änderung der Peakflächen.

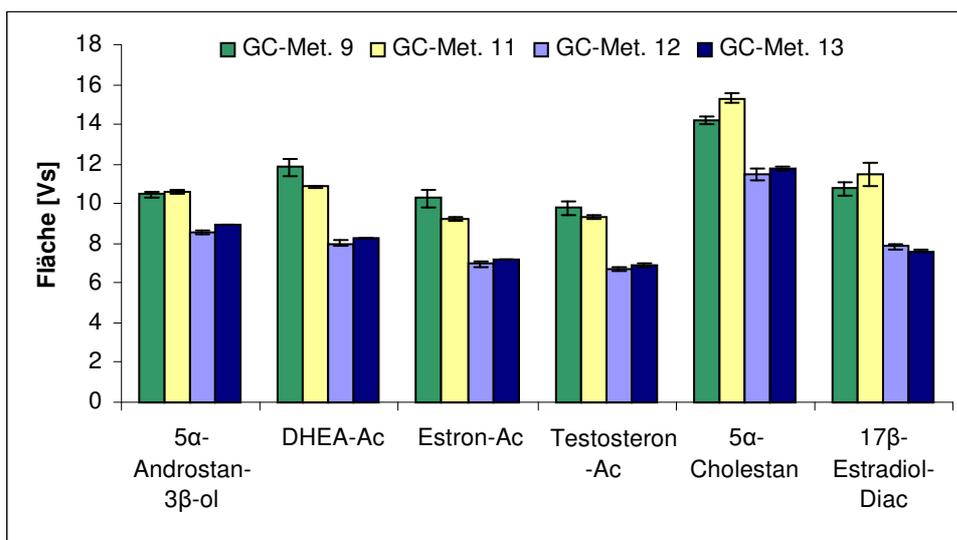


Abbildung 4.36: Peakflächen des Steroid-Acetat-Mixes [Vs] in Abhängigkeit von der verwendeten GC-Methode

Mit diesen GC-Methoden wurden für 5 α -Androstan-3-ol $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen $-28,5$ und $-29,1$ ‰, für DHEA-Acetat zwischen $-33,7$ und $-34,0$ ‰ und für Estron-Acetat von $-28,8$ und $-29,2$ ‰ gemessen. Bei Testosteron-Acetat lagen die Messwerte zwischen $-29,7$ und $-30,1$ ‰, bei Cholestan zwischen $-24,1$ und $-24,2$ ‰ und bei 17 β -Estradiol zwischen $-29,1$ und $-29,8$ ‰ (Abb. 4.37). Die gemessenen Unterschiede sind nicht signifikant (t-Test, $p > 0,5$). In den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten lassen sich weder in Abhängigkeit von der GC-Temperaturmethode noch vom Trägergasfluss signifikante Unterschiede erkennen.

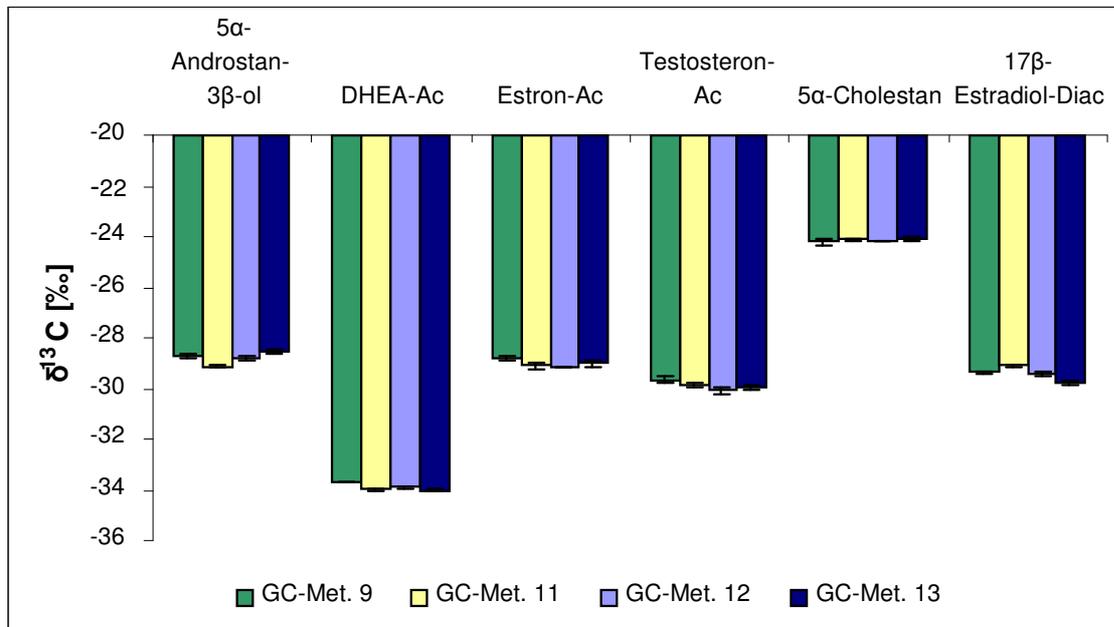


Abbildung 4.37: Isotopenverhältnisse des Steroid-Acetat-Standards [‰] in Abhängigkeit von der verwendeten GC-Methode

Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen aus derselben Versuchsreihe mit Alkanen. Eine Erklärung könnte sein, dass sich die verwendeten Methoden, die zu einer Trennung der Steroid-Acetate geeignet sind, nicht ausreichend voneinander unterscheiden. Die erste Heizrate ist bei allen vier Methoden mit 40 °C/min identisch. In Vorversuchen wurden Steroide underivatisiert und acetyliert mit der GC-Methode 9 sowie der GC-Methode 4 gemessen. Mit der GC-Methode 4 können die untersuchten Analyten nicht getrennt werden, sodass alle Analyten einzeln vermessen werden mussten. Diese unterscheidet sich im Temperaturverlauf deutlich von den zuvor miteinander verglichenen GC-Methoden (vgl. Abb. 4.31). Sowohl bei den underivatisierten als auch bei den acetylierten Steroiden sind die Messwerte, die mit der GC-Methode 4 aufgenommen wurden, positiver als die Ergebnisse der GC-Methode 9.

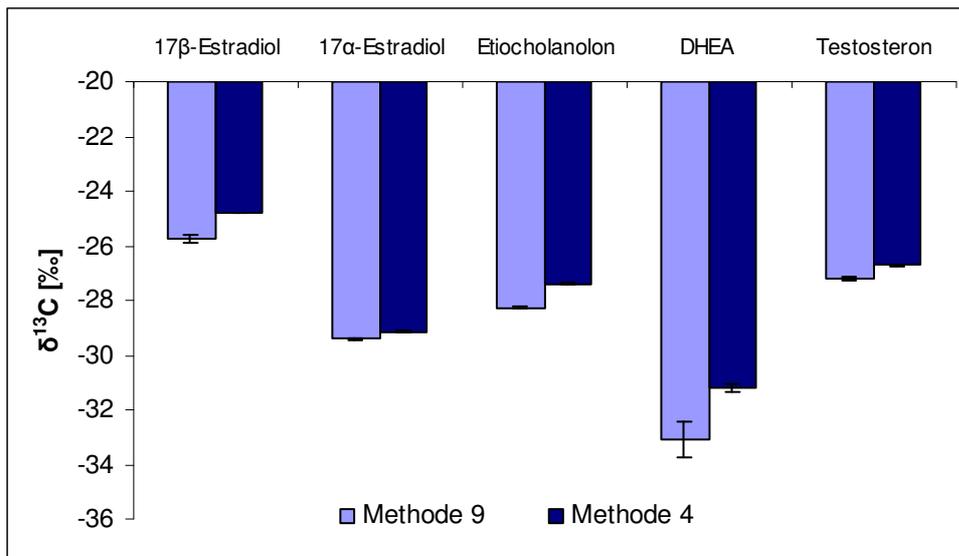


Abbildung 4.38: Isotopenverhältnisse einzeln vermessener Steroide in Abhängigkeit von der verwendeten GC-Methode, n = 3

Bei den underivatisierten Steroiden beträgt die Differenz zwischen $-0,28$ und $-1,89$ ‰ (Abb. 4.38), alle Unterschiede sind – teilweise aufgrund der niedrigen Standardabweichungen – signifikant (t-Test, $p < 0,05$). Bei den acetylierten Steroiden fallen die Differenzen zwischen den Messwerten mit $-0,12$ bis $-0,60$ ‰ geringer aus, bis auf Etiocholanolon-Acetat sind die Unterschiede auch hier signifikant (Abb. 4.39).

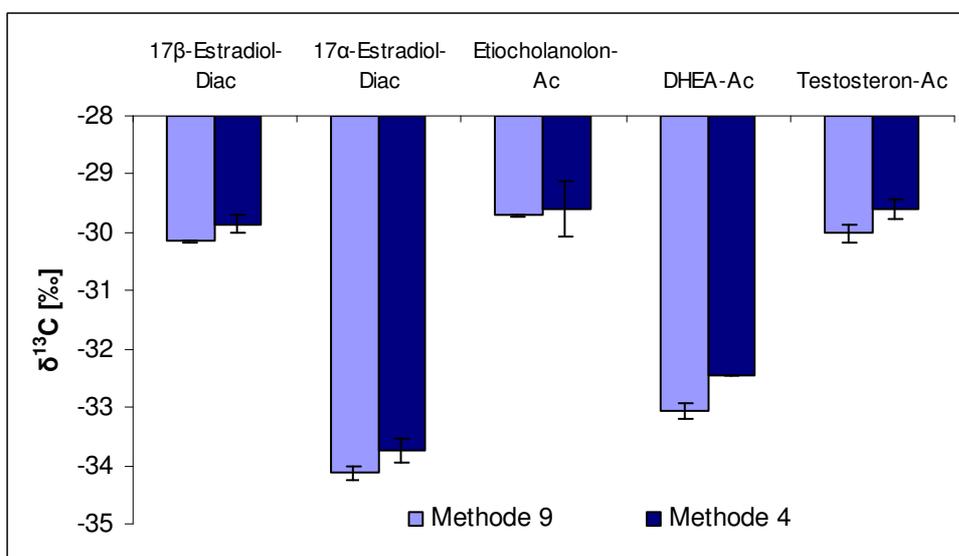


Abbildung 4.39: Isotopenverhältnisse einzeln vermessener Steroid-Acetate in Abhängigkeit von der verwendeten GC-Methode, n = 3

Im Gegensatz zu den oben dargestellten Ergebnissen mit den GC-Methoden 9, 11, 12 und 13, bei denen keine signifikanten Unterschiede in den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten zu erkennen waren, werden mit der GC-Methode 4, deren Temperaturverlauf sich deutlich von den anderen vier Methoden unterscheidet (vgl. Abb. 4.31), signifikant positivere Isotopenverhältnisse gemessen.

Es zeigten sich sowohl bei den untersuchten Alkanen als auch bei den Steroid-Acetataten teilweise signifikante Unterschiede in den gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werten in Abhängigkeit von der gewählten GC-Methode. Bei den Alkanen werden auch bei vergleichbaren GC-Methoden Unterschiede gemessen, während bei den Steroiden und deren Acetataten erst bei einem sehr unterschiedlichen Temperaturverlauf signifikante Unterschiede zu beobachten sind. Eine

Änderung der Peakintensitäten muss hingegen nicht mit einer Änderung der Isotopenverhältnisse einhergehen.

4.3.2 Peakintegration

Bei der Stabilisotopenanalytik ist es von großer Wichtigkeit, jeweils den gesamten Peak zu integrieren, da die leichten und schweren Isotope unterschiedlich eluieren. Abbildung 4.40 zeigt das Verhältnis der Massen 45 und 44 innerhalb eines DHEA-Acetat-Peaks zueinander. Zuerst eluieren die schweren Isotope, dann die leichten.

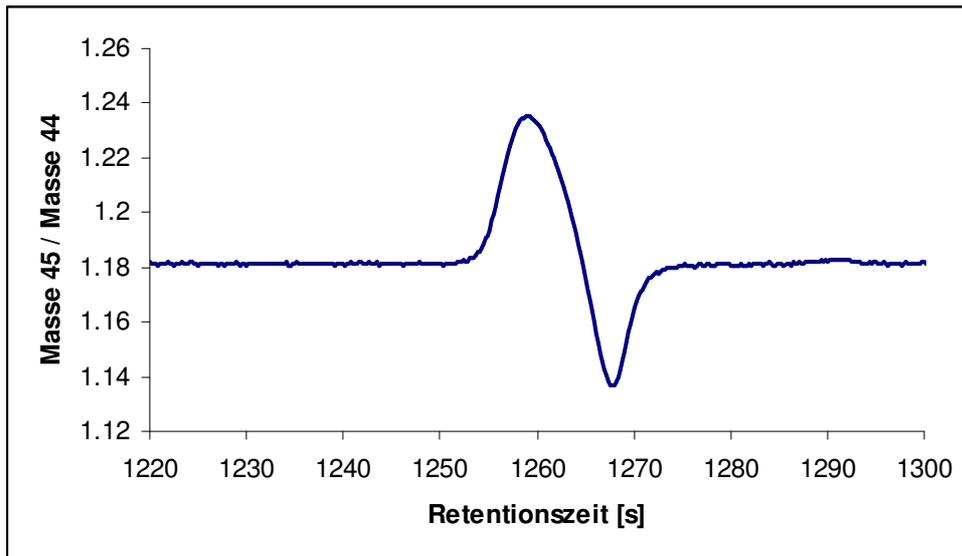


Abbildung 4.40: Verhältnis der Masse 45 zur Masse 44 innerhalb eines DHEA-Acetat-Peaks (vgl. Abb. 3.4 in Kap. 3.3 – GC/C-IRMS)

Die Peaks werden von der Software ISODAT automatisch integriert und über die Flächenverhältnisse der Massen 44 und 45 wurden die Isotopenverhältnisse bestimmt. Für alle Messungen wurde als Startpunkt eine Steigung von 0,2 mV/s und als Endpunkt 0,4 mV/s gewählt, welche der Standardeinstellung entsprechen. Vorversuche an Standardsubstanzen mit anderen Start- und Endpunkten führten zu keiner Veränderung der ermittelten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte. Bei unzureichender Auflösung von Peaks bzw. schlechter Trennung von Störpeaks kann nicht der gesamte Peak integriert werden, was sich maßgeblich auf den erhaltenen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert auswirkt. In diesen Fällen muss die Peakintegration häufig von Hand vorgenommen werden. Die in Abbildung 4.41 dargestellten Differenzen der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der ersten und zweiten Peakhälften verschiedener Substanzen verdeutlichen die Inhomogenität der Isotopen innerhalb eines Peaks.

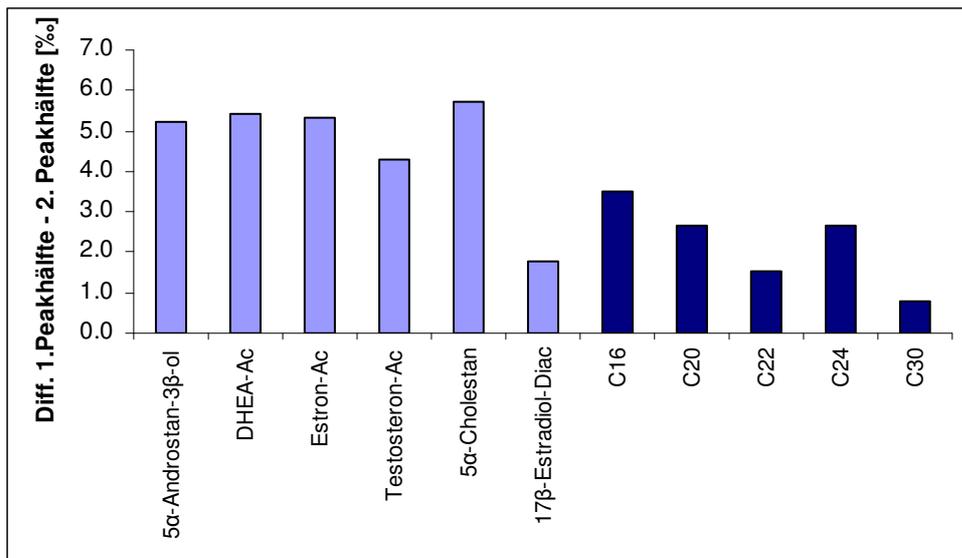


Abbildung 4.41: Differenzen der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der ersten und zweiten Peakhälften der Standards des Steroid-Acetat-Mixes und einiger Alkane

Bei den Analyten des Steroid-Acetat-Standards waren die ersten Peakhälften zwischen 1,8 und 5,4 ‰ positiver als die zweiten, während bei den untersuchten Alkanen Differenzen zwischen 0,8 und 3,5 ‰ gemessen wurden.

4.3.3 Background-Korrektur

Bei der *Background*-Korrektur wird die Isotopenzusammensetzung der den Peak umgebenden Matrix bestimmt und damit der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Substanzpeaks berichtigt. Die Korrektur des Untergrundes erfolgte stets über die Verwendung des Modus „*individual background*“, bei dem der *Background* soweit möglich immer unmittelbar vor dem jeweiligen Peak ermittelt wird. Die Software ISODAT ermöglicht zahlreiche weitere *Background*-Modi, die bei der Vermessung von reinen Standardlösungen jedoch keinen nennenswerten Unterschied zum verwendeten Modus ergeben. Bei Matrixproben liegen in der Umgebung der Analyten häufig Störsubstanzen mit vom Untergrund abweichenden $\delta^{13}\text{C}$ -Werten. Hier ist die Art der Korrektur von großer Bedeutung. Es kommt häufig vor, dass die automatische *Background*-Korrektur zu keinem befriedigenden Ergebnis führt und eine manuelle Korrektur für jeden einzelnen Peak durchgeführt werden muss.

Bei der Vermessung von verschiedenen Urinproben waren die mit der manuellen *Background*-Korrektur ermittelten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte bis zu 2,6 ‰ positiver als die automatisch mit dem „*Individual-background*“-Modus berechneten. Bei den im Diagramm (Abb. 4.42) nicht dargestellten Analyten korrigierte das Programm die Untergründe ebenso wie bei manueller Korrektur. Während dies bei den Analyten Etiocholanolon-Acetat, Epi-testosteron-Acetat, 5-Androstendiol-Diacetat und 5 α -Androstandiol-Diacetat überwiegend der Fall war beziehungsweise die Unterschiede zur manuellen Korrektur deutlich unter einem Promille lagen, zeigten sich bei DHEA-Acetat und Epiandrosteron-Acetat große Differenzen. Diese beiden Substanzen wurden in einer eigenen Fraktion vermessen, die um die Zielanalyten herum viel Matrix aufwies, sodass die Software keine geeignete Stelle zur Korrektur finden konnte. Wäre das Ziel der GC/C-IRMS-Messung das Ermitteln der Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Etiocholanolon-Acetat und DHEA-Acetat, würden mit dem „*Individual-background*“-Modus Abweichungen von 1,2 bis 1,7 ‰ zu den Werten mit manueller *Background*-Korrektur gemessen.

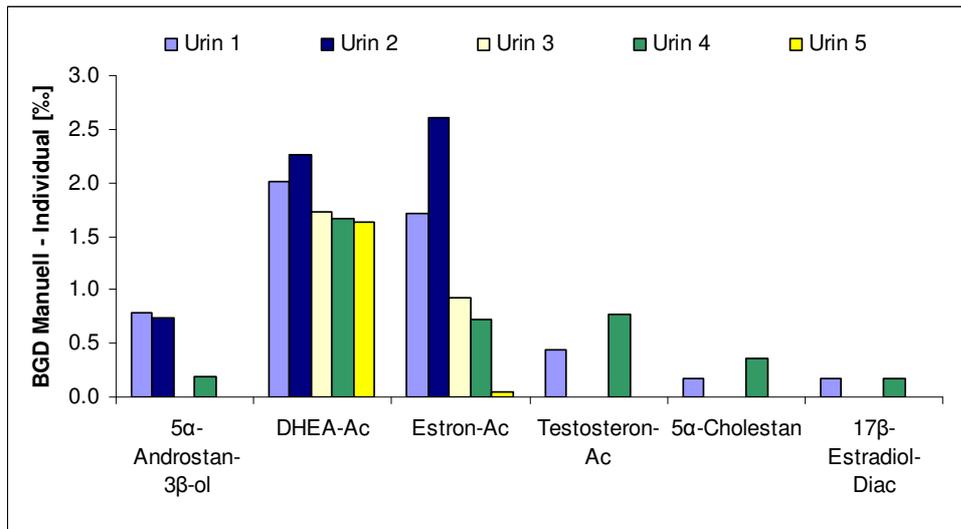


Abbildung 4.42: Unterschied in den ermittelten $\delta^{13}\text{C}$ -Werten [%] einiger Steroide aus Rinderurinen in Abhängigkeit von der Art der Background-Korrektur

4.3.4 ^{17}O -Korrektur

Mit der Masse 45 werden nicht nur die $^{12}\text{C}^{13}\text{C}^{16}\text{O}$ -Moleküle erfasst, sondern auch die $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ -Moleküle. Zur rechnerischen Korrektur dieses Fehlers bietet die Software ISODAT zwei verschiedene Korrektur-Modelle an, die nach ihrer Auswahl automatisch zur Berechnung der Isotopenverhältnisse angewendet werden: zum einen das Modell nach Craig [Craig 1957] und zum anderen jenes nach Santrock, Studley und Hayes (SSH) [Santrock et al. 1985]. Beide Modelle berechnen den Anteil der $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ -Moleküle an der Masse 45 über das durchschnittliche Verhältnis von ^{17}O zu ^{18}O . Aus der neben den Massen 44 und 45 miterfassten Masse 46 wird hierfür der Anteil des ^{18}O berechnet. Alle für diese Arbeit gewonnenen Daten wurden zunächst nach Craig korrigiert.

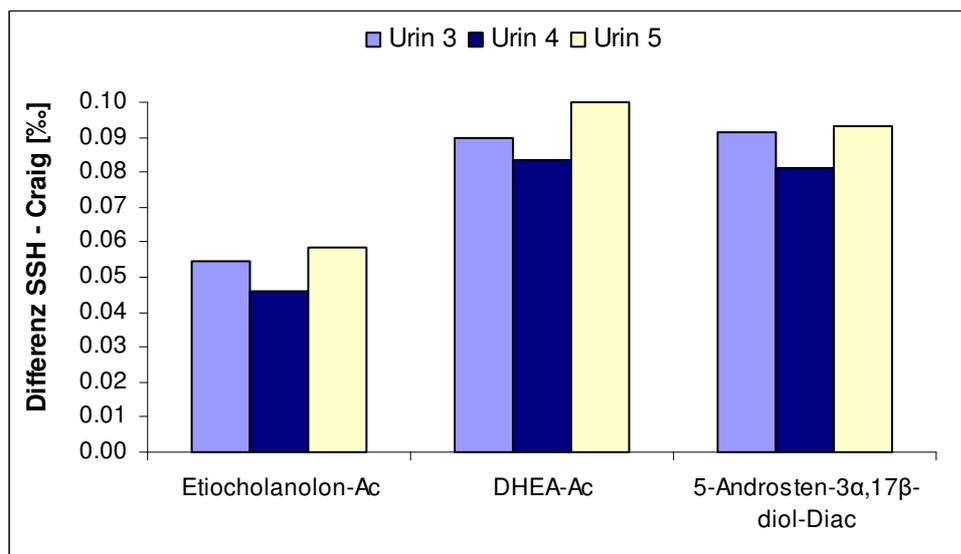


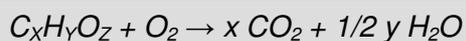
Abbildung 4.43: Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einiger Steroide aus Urinproben zwischen der ^{17}O -Korrektur nach Craig und nach Santrock, Studley, Hayes (SSH)

Eine stichpunktartige Untersuchung ergab, dass der Unterschied zwischen beiden Modellen bei Steroid- und Steroid-Acetat-Standards bei 0 bis 0,04 ‰ liegt, wobei keine signifikanten Unterschiede (t-Test, $p > 0,05$) zwischen verschiedenen Analyten ermittelt werden konnten. Bei den Alkanen des Schimmelmann-Standards und des Alkan-Mixes sind die Daten nach Craig um 0,06 bis 0,09 ‰ negativer als die nach SSH. Bei den Steroiden Etiocholanolon, DHEA und 5-Androstendiol aus drei Urinproben waren die Daten nach Craig um 0,05 bis 0,10 ‰ negativer als nach SSH, wobei tendenziell auch eine Abhängigkeit von der Art des Analyten und der jeweiligen Urinprobe zu erkennen war (Abb. 4.43). Bei den Analyten aus Probe 4 waren die Abweichungen etwas geringer als bei Probe 3 und 5, wie auch bei Etiocholanolon geringere Abweichungen als bei DHEA und 5-Androstendiol beobachtet wurden. Insgesamt hat die Wahl des ^{17}O -Korrekturmodells keine signifikante Auswirkung auf die Messung der Isotopenzusammensetzung der untersuchten Analyten, da die Abweichungen kleiner sind als bei allen anderen untersuchten Faktoren.

Die Wahl des GC-Temperaturprogrammes und die vollständige Integration der Probenpeaks wirken sich deutlich auf den gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Steroiden und Alkanen aus. Es werden Unterschiede von bis zu 1,4 ‰ gemessen. Die Art der *Background*-Korrektur spielt nur bei Proben mit viel Matrix eine entscheidende Rolle, während die Wahl des ^{17}O -Korrektur-Modus keinen signifikanten Einfluss auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert hat.

4.4 Einflüsse der Combustion

Für die Messung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses einer Probe mittels IRMS muss die Probe zunächst vollständig zu CO_2 verbrannt werden (*Combustion*). Dieser Schritt geschieht nach der gaschromatographischen Trennung der Analyten. Das GC-Eluat wird dabei direkt in den Verbrennungsofen geleitet und dort bei über 900 °C unter Entstehung von CO_2 und Wasser verbrannt:



Formel 4.6

Bei der Verbrennung von stickstoffhaltigen Analyten entstehen außerdem Stickoxide, die im nachfolgenden Reduktionsofen zu elementarem Stickstoff reduziert werden. Der hier verwendete Oxidationsofen besteht aus einem mit Kupfer-, Nickel- und Platindraht gefüllten Keramikrohr. Vor der Messung wird dem Ofen Sauerstoff zugeführt, der bei einer Temperatur von 600 bis 650 °C zur Oxidation von Kupfer und Nickel führt. Bei der Betriebstemperatur von über 940 °C wird der Sauerstoff gemäß Gleichung 5 [Holleman-Wieberg] abgegeben und steht für die Oxidation der Analyten zur Verfügung.



Formel 4.7

Für eine vollständige Oxidation aller Analyten – Voraussetzung für die korrekte Bestimmung der Isotopenverhältnisse – ist neben der richtigen Temperatur und der richtigen Platzierung der Säule im Ofen auch die Verfügbarkeit von genügend Sauerstoff entscheidend. Deshalb muss dem Ofen in regelmäßigen Abständen der verbrauchte Sauerstoff wieder zugeführt werden, wobei die Kupfer- und Nickeldrähte oxidiert werden. Wie häufig dies zu geschehen hat, hängt von der Art der Analyten, der Probenmatrix, dem Säulenbluten und der Philosophie des Anwenders ab. Es kann in kleineren Abständen für kürzere Zeit oder in größeren Abständen für längere Zeit reoxidiert werden. Bei leicht verbrennbaren Analyten, die einen hohen Sauerstoffanteil haben, ist dieser Punkt der GC/C-IRMS nicht so kritisch wie bei schwerer verbrennbaren Substanzen mit geringem Sauerstoffanteil. Der Gerätehersteller

empfiehlt pauschal für alle Anwendungen, den Oxidationsofen ca. alle 200 Injektionen eine Stunde lang zu reoxidieren. In Vorversuchen zeigte sich jedoch, dass dieser Zyklus für die Steroid-Acetate nicht ausreichte.

4.4.1 Einfluss des Sauerstoffgehaltes des *Combustion*-Ofens

Mit dem vom Hersteller empfohlenen Reoxidationszyklus konnten etwa 20 Injektionen unter gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt werden. Um den genauen Einfluss eines unzureichend oxidierten Oxidationsofens auf die Qualität der Messwerte zu bestimmen, wurde nach einer einstündigen Oxidation der Steroid-Acetat-Standard 172-mal unmittelbar hintereinander injiziert und die Kohlenstoffisotopen-Verhältnisse aller Analyten (5α -Androstan- 3β -ol, 5α -Cholestan, DHEA-Acetat, Estron-Acetat, Testosteron-Acetat, 17β -Estradiol-Diacetat) im Verlauf der Messungen bestimmt. Innerhalb dieser Messreihe wurden zudem zwei verschiedene GC-Methoden eingesetzt (GC-Methoden 9 und 12, vgl. Abb. 4.31 aus Kap. 4.3.1), und zwar im Wechsel nach jeweils zwei Injektionen. Diese beiden Methoden unterscheiden sich nicht nur in der Aufheizgeschwindigkeit, sondern auch in der Trägergasgeschwindigkeit (1,5 und 2,0 ml/min). Durch die somit bedingte unterschiedlich lange Durchflussdauer durch den Oxidationsofen schienen abweichende Ergebnisse nicht unwahrscheinlich.

Das Diagramm 4.44 zeigt den Verlauf der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der untersuchten Substanzen im Verlauf der Messreihe anhand der Messungen mit der GC-Methode 9. Es waren bei den verschiedenen Substanzen stark unterschiedliche Verläufe der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zu erkennen, die in Tabelle 4.8 in Form von Mittelwerten, Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerten für jede der untersuchten Substanzen verdeutlicht werden. Während die gemessenen Isotopenverhältnisse des Cholestans langsam und gleichmäßig im Verlauf der Messungen um 4,3 ‰ negativer werden, kommt es beispielsweise bei den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten des DHEA-Acetes zu einem unregelmäßigen Abfall der Werte um insgesamt 10,8 ‰. Die Bereiche, in denen eine Substanz mit diesen Versuchsparametern über mehrere Messungen stabil, also mit geringer Streuung, gemessen werden können, sind von Analyt zu Analyt unterschiedlich, liegen jedoch bei allen Substanzen innerhalb der ersten 80 Messungen.

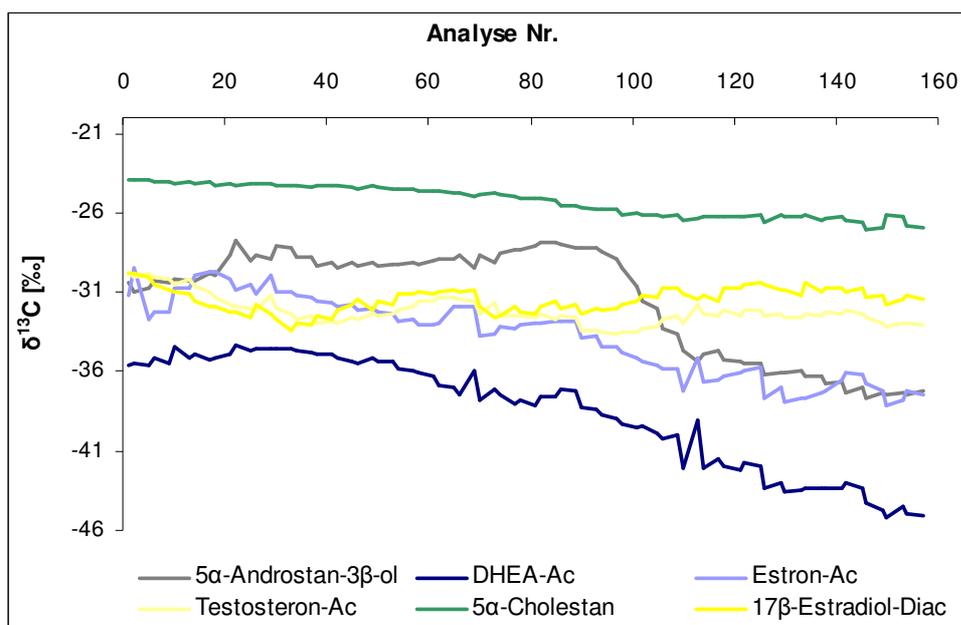


Abbildung 4.44: Darstellung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Steroid-Acetat-Standards in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung des Oxidationsofens

Die sechs untersuchten Analyten lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: in die zuerst eluierenden Substanzen 5 α -Androstan-3 β -ol, DHEA-Acetat und Estron-Acetat und die später eluierenden Testosteron-Acetat, 5 α -Cholestan und 17 β -Estradiol-Diacetat. Bei den zuerst eluierenden sind im Verlauf der Messreihe mit abnehmender Sauerstoffsättigung des Oxidationsofens Messwertdifferenzen zwischen 8,7 und 10,8 ‰ zu beobachten; die Standardabweichung über alle Messwerte liegt zwischen 2,5 und 3,6 ‰. In der zweiten Gruppe fallen die Differenzen und die Standardabweichungen deutlich geringer aus, obwohl die Daten aus denselben Analysen unter identischen Bedingungen gewonnen wurden.

Tabelle 4.8: Auswertung der Messwerte des Steroid-Acetat-Standards gemessen unter sinkender Sauerstoffsättigung im Oxidationsofen, aufgenommen mit GC-Methode 9, n = 85, alle Werte in ‰

	5 α -Androstan-3 β -ol	DHEA-Ac	Estron-Ac	Testosteron-Ac	5 α -Cholestan	17 β -Estradiol-Diac
Mittelwert [‰]	-31,89	-38,76	-33,88	-32,21	-25,42	-31,44
Standardabw. [‰]	$\pm 3,63$	$\pm 3,51$	$\pm 2,47$	$\pm 0,88$	$\pm 1,10$	$\pm 0,75$
Max [‰]	-27,74	-34,33	-29,51	-29,69	-23,91	-29,81
Min [‰]	-38,33	-45,15	-38,18	-33,65	-28,26	-33,36
Min – Max [‰]	-10,59	-10,82	-8,67	-3,97	-4,35	-3,54

Die Differenzen zwischen den am Anfang positiveren und am Ende der Messreihe negativeren $\delta^{13}\text{C}$ -Werten liegen hier zwischen 3,5 und 4,4 ‰ und fallen somit nur halb so groß aus wie bei den anderen drei Analyten. Die Standardabweichungen wurden mit 0,8 bis 1,1 ‰ berechnet.

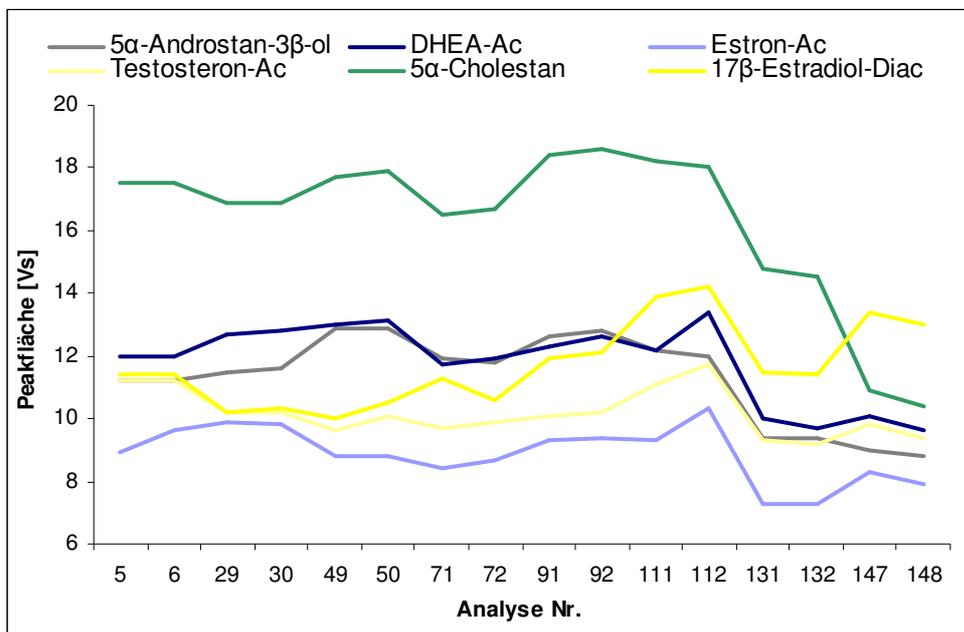


Abbildung 4.45: Verlauf der Peakflächen der untersuchten Analyten in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung des Oxidationsofens (in Abhängigkeit von der Anzahl der Analysen)

Die Peakflächen der Analyten im Verlauf der Versuchsreihe sind in Abbildung 4.45 verdeutlicht. Zwischen der Analyse Nr. 112 und der Analyse Nr. 131 kommt es bei allen untersuchten Substanzen zu einem deutlichen Abfall der Peakflächen. Von dieser Auffälligkeit abgesehen, entwickeln sich die Peakflächen in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung des Oxidationsofens vollkommen unterschiedlich. Bei 5 α -Cholestan kommt es bis zur 148. Analyse zu einer Abnahme der Peakfläche um rund 40 %, während die Peaks des 17 β -Estradiols am Ende der Sequenz, also bereits mit stark veränderten $\delta^{13}\text{C}$ -Werten, sogar größer sind als am Anfang. Bei keiner der untersuchten Substanzen lässt sich eine Abhängigkeit der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von der Größe des Peaks ableiten. Eine solche Abhängigkeit

wäre jedoch zu erwarten gewesen, da sich bei einer unvollständigen Verbrennung der Analyten im Oxidationsofen nicht nur die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte ändern sollten, sondern auch die Intensitäten des gemessenen CO_2 -Signals.

Ein Vergleich der bereits dargestellten Messwerte der GC-Methode 9 mit den in derselben Sequenz im Wechsel aufgenommenen Werten mit der GC-Methode 12 zeigt, dass der Verlauf der Messwerte und die in Abhängigkeit vom Oxidationsgrad des Ofens entstehenden Differenzen im Wesentlichen gleich ist. Die Mittelwerte aus allen Werten beider GC-Methoden unterschieden sich bei Estron-Acetat um 0,69 ‰, während die Mittelwerte bei den anderen Analyten mit Differenzen zwischen 0,07 und 0,24 ‰ noch geringere Unterschiede aufwiesen.

Tabelle 4.9: Auswertung der Messwerte des Steroid-Acetat-Standards gemessen unter sinkender Sauerstoffsättigung im Oxidationsofen, aufgenommen mit GC-Methode 12, n = 87 und Unterschiede zu den Werten der GC-Methode 9, alle Werte in ‰

	5 α -Androstan-3 β -ol	DHEA-Ac	Estron-Ac	Testosteron-Ac	5 α -Cholestan	17 β -Estradiol-Diac
Mittelwert	-31,62	-38,87	-34,57	-32,45	-25,31	-31,37
Standardabweichung	$\pm 3,46$	$\pm 3,83$	$\pm 3,34$	$\pm 1,14$	$\pm 1,13$	$\pm 0,59$
Max [‰]	-27,77	-33,58	-29,59	-29,65	-23,96	-29,65
Min [‰]	-37,63	-45,22	-40,95	-34,28	-28,39	-32,60
Min – Max [‰]	-9,86	-11,64	-11,37	-4,63	-4,44	-2,95
Met. 12 – Met. 9	0,27	-0,11	-0,69	-0,24	0,11	0,07
Diff. der Spannweiten	-0,74	0,81	2,70	0,66	0,09	-0,60

Vergleicht man die jeweiligen maximalen Spannweiten der im Verlauf der Sequenz gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (Differenz Min – Max [‰]), so sind die Unterschiede für alle Analyten mit Ausnahme von Estron-Acetat mit 0,09 bis 0,81 ‰ gering; bei Estron-Acetat beträgt der Unterschied 2,70 ‰.

Die gewählte GC-Methode spielte für den Verlauf der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte in Abhängigkeit vom Oxidationsgrad des Ofens keine Rolle. Der Geschwindigkeitsunterschied des Trägergases von 0,5 ml/min und somit die Verweildauer der Analyten im Oxidationsofen hatten keinen Einfluss auf die mit unzureichend oxidiertem Ofen gemessenen Isotopenverhältnisse.

Wie die vorgestellten Daten zeigen, ist eine vollständige Verbrennung aller Analyten in einem ausreichend mit Sauerstoff versorgten Oxidationsofen für die Bestimmung der Stabilisotopenverhältnisse äußerst wichtig. Der Oxidationszyklus wurde für das bearbeitete Projekt optimiert. Für die Analyse von Steroid-Acetaten wurde alle 80–100 Injektionen 12 h bei einer Temperatur von 600 bis 650 °C Sauerstoff zugeführt und anschließend mindestens 2 h mit erhöhtem Heliumdruck der nicht gebundene Sauerstoff aus dem System gespült. Auf diese Weise konnten mindestens über 80 Injektionen alle interessierenden Substanzen ausreichend stabil gemessen werden. Diese Stabilität wurde in jeder Sequenz mit dem Steroid-Acetat-Standard überprüft (vgl. Kap. 4.8 Validierung). Konnten mit dieser Vorgehensweise keine stabilen Ergebnisse mehr erzielt werden und wurden die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zu negativ, wurde der Oxidationsofen, dessen Kapazität nach einigen hundert Injektionen erschöpft ist, gewechselt.

4.4.1 Einfluss der Oxidationstemperatur

Für eine vollständige Verbrennung aller Analyten ist neben der optimalen Sauerstoffversorgung eine ausreichende Verbrennungstemperatur zu gewährleisten. Vom Hersteller wird eine Temperatur von 940 °C empfohlen. Bei einer zu niedrigen Temperatur werden die Analyten nicht vollständig verbrannt und es kommt zu falschen Ergebnissen bei den gemessenen Stabilisotopenwerten.

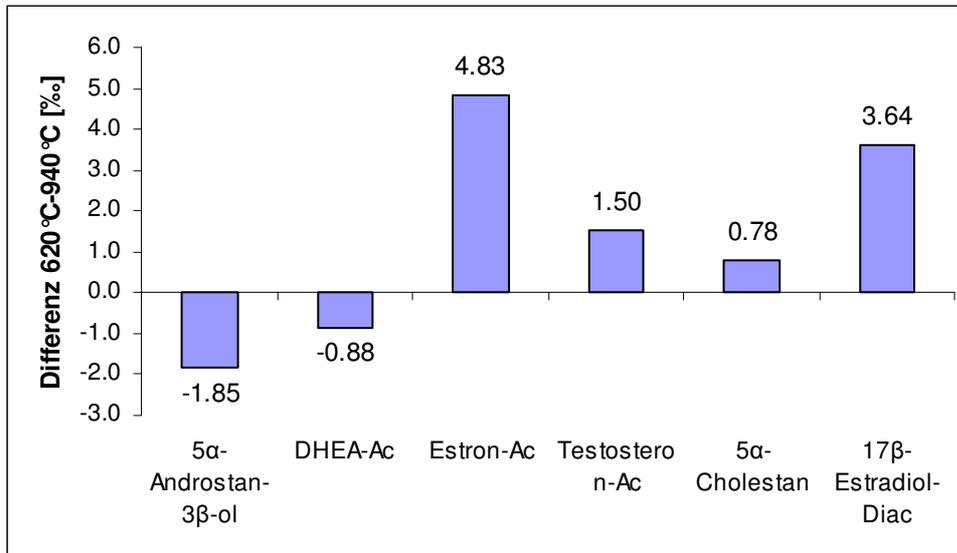


Abbildung 4.46: Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte [%] von Steroiden bei einer Ofentemperatur von 620 °C gegenüber einer Temperatur von 940 °C (jeweils $n = 3$)

Ein Versuch mit dem Steroid-Acetat-Standard zeigte, dass die Analyten bei einer um 320 °C reduzierten *Combustion*-Temperatur unterschiedliche Abweichungen im $\delta^{13}\text{C}$ -Wert aufwiesen (Abb. 4.46), je nach Analyt zwischen 1,85 % negativer und 4,83 % positiver als bei der empfohlenen Verbrennungstemperatur. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der beiden zuerst eluierenden Substanzen werden bei niedrigerer Temperatur negativer, während die der übrigen Substanzen positiver werden. Die in den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten gemessenen Unterschiede sind bei Estron-Acetat mit 4,83 % und 17β-Estradiol-Diacetat mit 3,64 % besonders hoch. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen der Messwerte sind alle Differenzen, ausgenommen die des DHEA-Acetates, signifikant (t-Test, $p < 0,05$).

Die Auswertung der Peakdaten Höhe und Fläche in Abhängigkeit von der gewählten Oxidationstemperatur zeigt, dass diese sich ebenfalls von Analyt zu Analyt unterschiedlich verhalten und sich weder in ihrer Richtung noch in ihrer Intensität in einen Zusammenhang mit den Unterschieden in den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten bringen lassen. Während bei Estron-Acetat mit 4,83 % der größte Unterschied in der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Zusammensetzung beobachtet wurde, fällt die Differenz in den Peakflächen mit $-0,28$ Vs gering aus (Abb. 4.47). Umgekehrt ist bei Cholestan die Peakfläche bei herabgesetzter Temperatur um 1,93 Vs größer, das entspricht 9,2 %, während der Unterschied im $\delta^{13}\text{C}$ -Wert mit 0,78 % zwar signifikant, aber vergleichsweise gering ist.

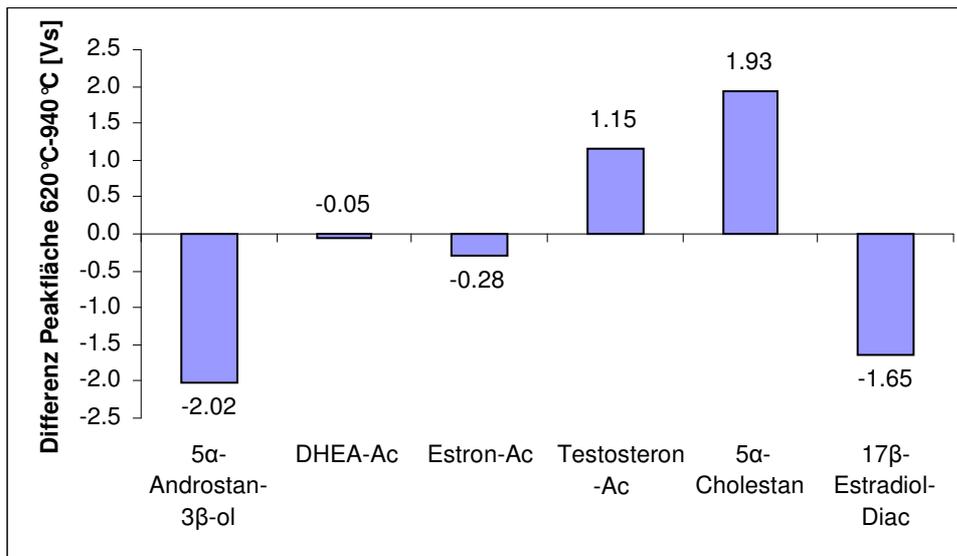


Abbildung 4.47: Veränderung der Peakflächen [Vs] bei einer Herabsetzung der Ofentemperatur auf 620 °C, jeweils n = 3

Bei einer Abweichung der Oxidationstemperatur von 320 °C vom vorgegebenen Wert 940 °C waren deutliche Veränderungen in den gemessenen Stabilisotopenwerten der untersuchten Steroid-Acetate zu beobachten. Ein weiterer Versuch mit Alkanen mit einer um 100 °C reduzierten Temperatur zeigte, dass in diesem weniger drastischen Fall keinerlei signifikante Unterschiede hinsichtlich der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (Abb. 4.48) oder der Peakflächen gemessen werden konnten (t-Test, $p < 0,05$).

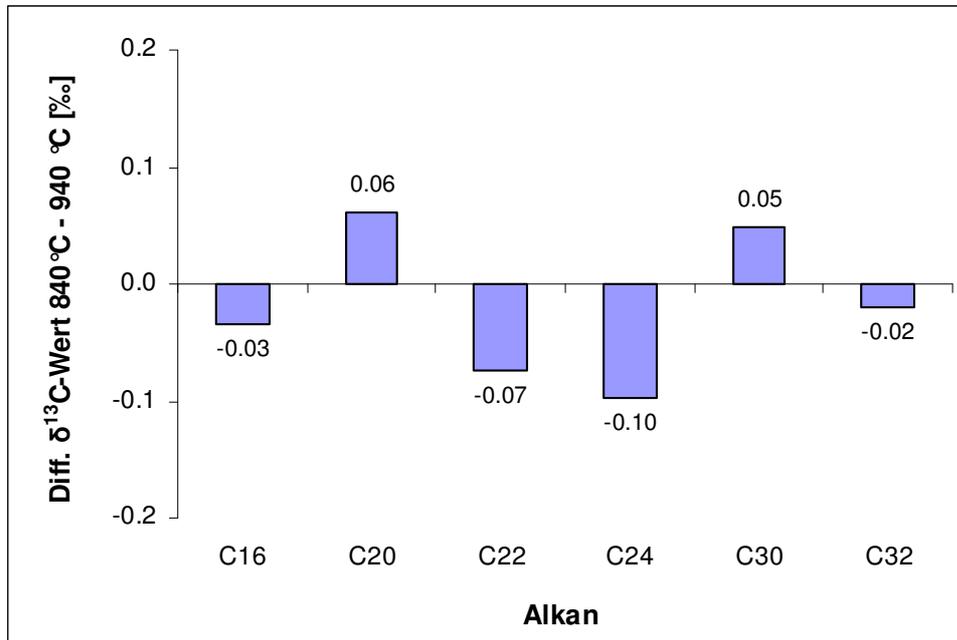


Abbildung 4.48: Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte [‰] von Alkanen bei einer Ofentemperatur von 840 °C gegenüber einer Temperatur von 940 °C (jeweils n = 3)

Geringe Abweichungen der Oxidationstemperatur führten also zu keiner Veränderung der erhaltenen Messwerte, während deutlich niedrigere Temperaturen die gemessenen Isotopenverhältnisse signifikant beeinflussen können.

Zu wenig Sauerstoff im Oxidationsofen und wesentlich zu niedrige Oxidationstemperaturen führen zu deutlichen Abweichungen der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte.

4.5 Einflüsse am Interface

Im *GC/C-Interface* (vgl. Abb. 3.3 in Kap. 3.3 GC/C-IRMS) wird das zuvor im *Combustion-Ofen* in das Messgas überführte GC-Eluat in einem *Open-Split-System* (Abb. 4.49) mit Helium verdünnt und anschließend dem Isotopenverhältnis-Massenspektrometer zugeführt. Die Verbindung des Gaschromatographen mit dem Massenspektrometer erfolgt über eine *Open-Split-Verbindung*, damit der Druck in der Ionenquelle von den schwankenden Drücken im restlichen System unabhängig und somit konstant bleibt.

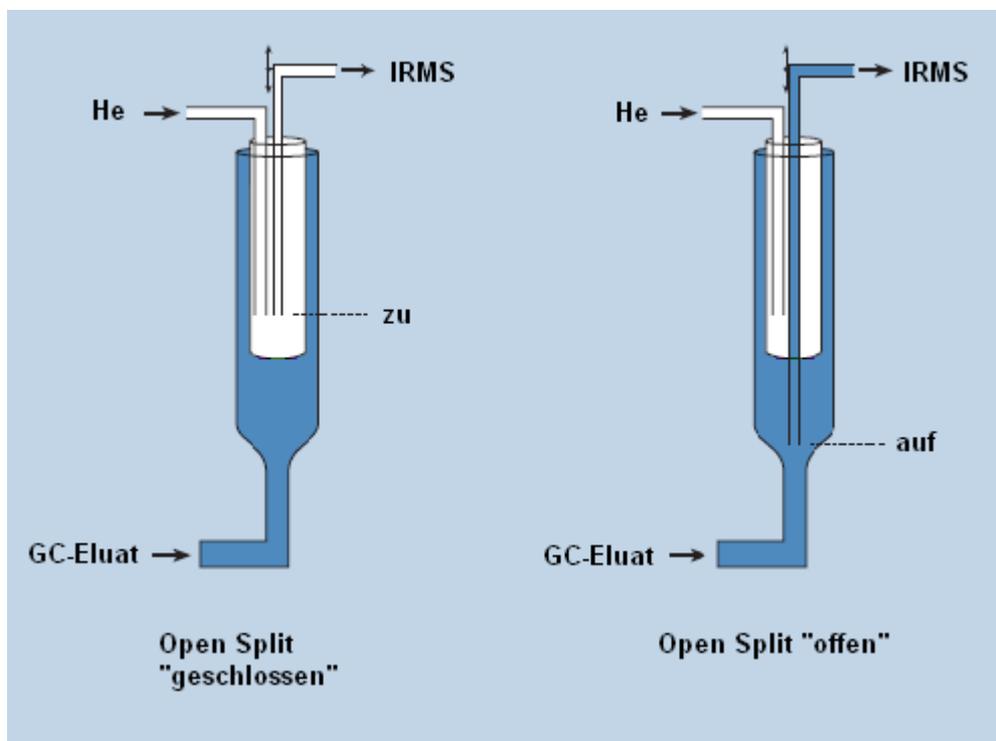


Abbildung 4.49: Funktionsweise des verwendeten Open-Split-Ventils

Das Verhältnis des Messgases zum Trägergas Helium kann zum einen über den am *GC/C-Interface* einstellbaren Heliumdruck geregelt werden und wird zum anderen von der Flussgeschwindigkeit im Gaschromatographen beeinflusst. Die Flussgeschwindigkeit dieses Gemisches Richtung Massenspektrometer hängt jedoch ausschließlich von der Länge und dem Durchmesser der vom *Open-Split* zum Massenspektrometer führenden Kapillare und dem Vakuum in der Ionenquelle ab.

Außerdem wird im Interface über den Referenzgas-Einlass das CO_2 mit Helium gemischt (Abb. 4.50) und über eine weitere Kapillare in das IRMS geleitet.

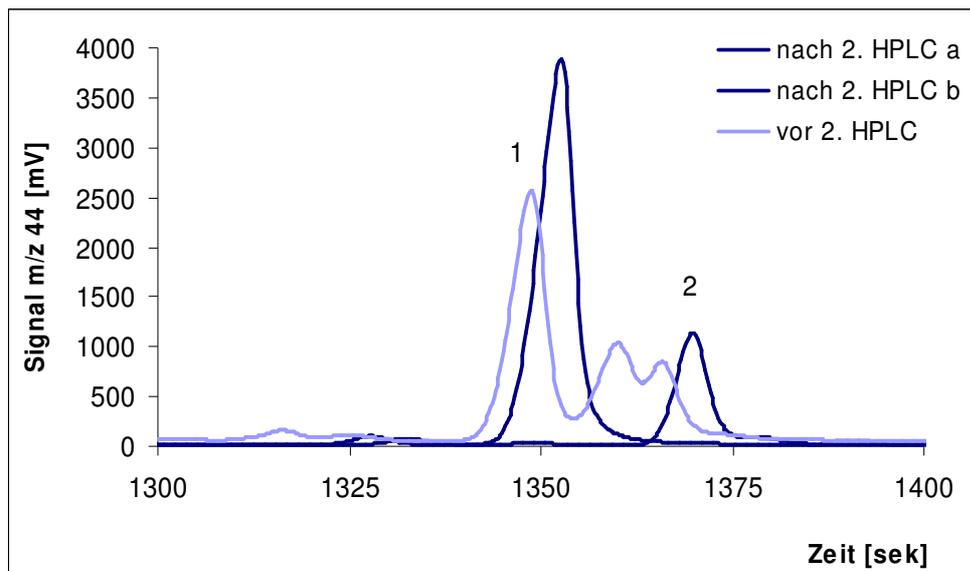


Abbildung 4.50: Funktionsweise des Referenzgas-Einlasses

Der Druck und somit der Fluss des Referenzgases Kohlendioxid kann ebenfalls am *GC/C-Interface* geregelt werden. Alle Gasflüsse und -drücke können die Größe der zu untersuchenden Peaks im Chromatogramm beeinflussen. Da die Peakhöhen ein für die Linearität (vgl. Kap. 4.6) entscheidender Faktor sind, können die Gasflüsse theoretisch somit auch die Messergebnisse für die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte beeinflussen. Außerdem können die unterschiedlichen Gasflüsse im *Open-Split* und im Referenzgas-Einlass zu Verformungen der Peaks führen, die sich ebenfalls auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert auswirken können [Goodman und Brenna 1994; Brand 1996; Meier-Augenstein 1996; Goodman und Brenna 1998].

4.5.1 Einfluss des Helium- und des Kohlendioxidflusses

Um die Einflüsse der am *GC/C-Interface* frei variierbaren Helium- und Kohlendioxiddrücke zu bestimmen, wurden ausgehend von der verwendeten Standardeinstellung sowohl der Heliumdruck als auch der Kohlendioxiddruck verändert und anschließend der Steroid-Acetat-Standard hinsichtlich der Isotopenzusammensetzung seiner Analyten vermessen. Bei einem konstanten Heliumdruck von 1,0 bar wurden CO_2 -Drücke zwischen 0,8 und 1,6 bar untersucht. Wird der Druck ausgehend von der Standardeinstellung von 1,1 bar um 0,5 bar erhöht, werden die ermittelten Isotopenverhältnisse fast aller untersuchten Substanzen zwischen 0,19 und 0,39 ‰ positiver (Abb. 4.51). Für 5α -Cholestan wurde ein um 0,06 ‰ negativerer Wert gemessen. Nur bei DHEA-Acetat ist die ermittelte Differenz signifikant (t-Test, $p < 0,05$). Nach einer Absenkung des Druckes auf 0,8 bar werden im Vergleich zur Standardeinstellung je nach Substanz um 0,27 bis 0,86 ‰ negativere Werte gemessen, wobei die Unterschiede bei den Substanzen DHEA-Acetat, Estron-Acetat und Testosteron-Acetat signifikant waren. Die Differenz zwischen den Werten mit 0,8 bar und 1,6 bar Referenzgasdruck am Interface liegt je nach Analyt bei bis zu 1,04 ‰.

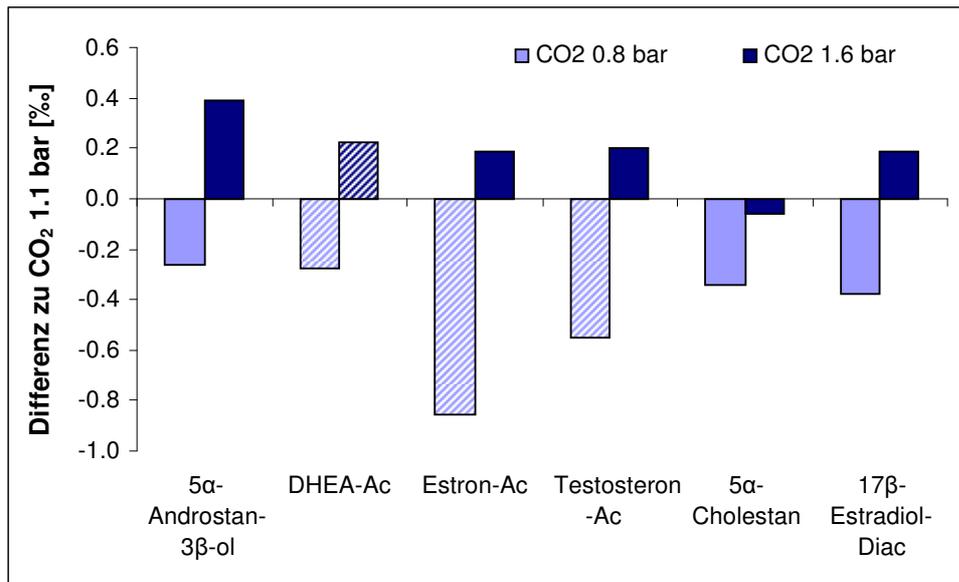
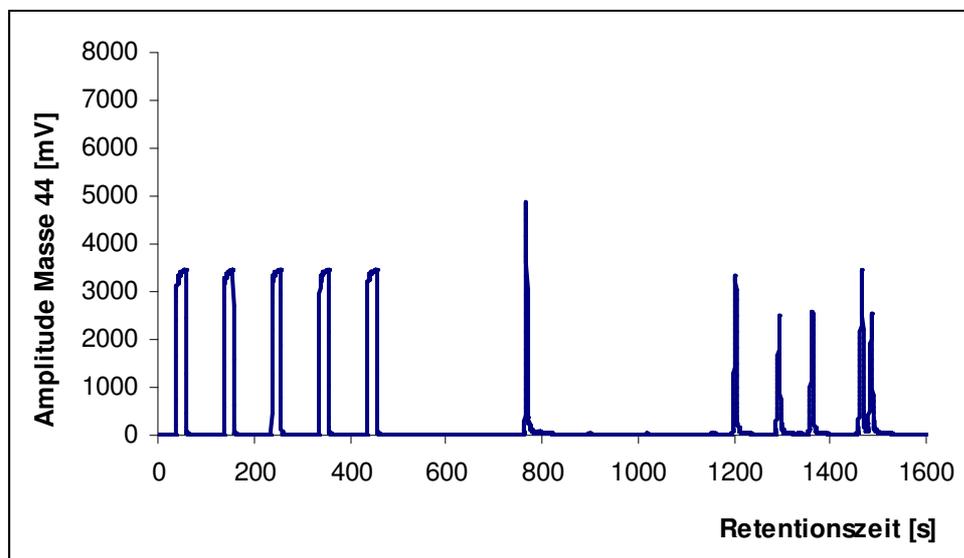


Abbildung 4.51: Einfluss des CO₂-Druckes auf die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Substanzen des Steroid-Acetat-Standards, dargestellt als Differenz zum $\delta^{13}\text{C}$ -Wert bei einem CO₂-Druck von 1,1 bar (bei einem gleichbleibenden He-Druck von 1,0 bar), schraffierte Balken kennzeichnen signifikante Unterschiede (t-Test, $p < 0,05$); aus jeweils $n = 3$

Die Peakdaten der vermessenen Analyten ändern sich bei diesem Versuch nicht mit der Veränderung der Drücke, alle Peakflächen beziehungsweise -höhen bleiben gleich, wie in Abbildung 4.52 deutlich wird. Allerdings variiert die Höhe der CO₂-Referenzgaspeaks in Abhängigkeit vom gewählten CO₂-Druck. Während die Referenzgaspeaks mit einem Druck von 0,8 bar durchschnittlich 3488 mV hoch sind, sind es bei 1,1 bar 5460 mV, 7483 mV bei 1,4 bar und bei 1,6 bar 9156 mV.



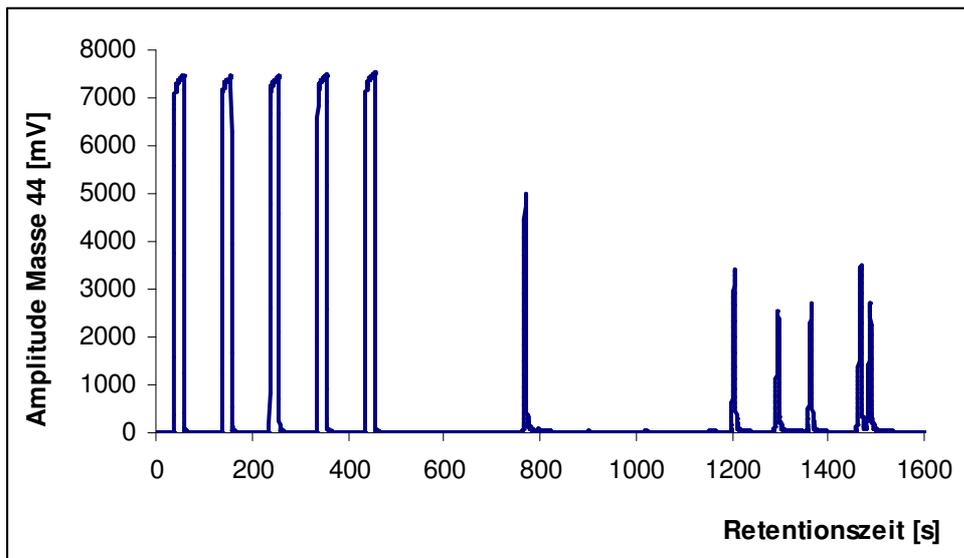


Abbildung 4.52: Chromatogramme des Steroid-Acetat-Standards mit einem Referenzgasdruck von 0,8 bar (oben) und 1,4 bar (unten), vorne im Chromatogramm jeweils fünf Referenzgaspeaks, gefolgt von 5 α -Androstan-3 β -ol, DHEA-Acetat, Estron-Acetat, Testosteron-Acetat, 5 α -Cholestan und 17 β -Estradiol-Diacetat

Wird bei einem gleichbleibenden Referenzgasdruck von 1,1 bar der Heliumdruck im GC/C-Interface verändert, wirkt sich das ebenfalls nicht auf die Peakflächen der Analyten, wohl aber auf die der Referenzgaspeaks aus. Bei den untersuchten Heliumdrücken von 0,7, 1,0 und 1,3 bar waren die Referenzgaspeaks durchschnittlich 8220 mV, 5157 mV und 3644 mV hoch. Je größer der Heliumdruck ist, desto kleiner sind die Referenzgaspeaks, da mit dem Helium das Kohlendioxid im Referenzgas-Einlass verdünnt wird. Die Veränderungen der Isotopenverhältnisse sind allerdings nicht so deutlich wie die mit variierenden Referenzgasdrücken. Bei vier der sechs untersuchten Substanzen sind die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte mit einem um 0,3 bar verringerten Heliumdruck um 0,10 bis 0,29 % positiver, während bei 17 β -Estradiol-Diacetat kein Unterschied gemessen wurde und bei Testosteron-Acetat der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert 0,19 % negativer ist (Abb. 4.53). Bei 5 α -Androstan-3 β -ol und DHEA-Acetat sind die Unterschiede signifikant (t-Test, $p < 0,05$).

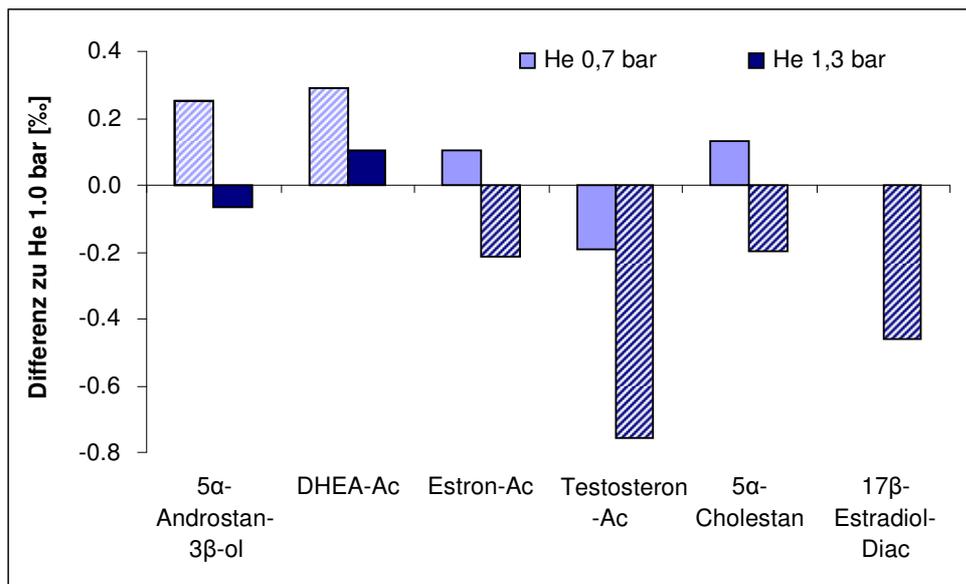


Abbildung 4.53: Einfluss des Heliumdruckes auf die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Substanzen des Steroid-Acetat-Standards, dargestellt als Differenz zum $\delta^{13}\text{C}$ -Wert bei einem Heliumdruck von 1,0 bar (bei einem gleichbleibenden CO_2 -Druck von 1,1 bar); schraffierte Balken kennzeichnen signifikante Unterschiede; aus jeweils $n = 3$

Bei einem erhöhten Heliumdruck ist der Messwert bei fünf Substanzen zwischen 0,07 und 0,76 ‰ negativer als mit der Standardeinstellung, während bei DHEA-Acetat ein um 0,11 ‰ positiverer Wert gemessen wurde (Abb. 4.53). Die Unterschiede bei Estron-Acetat, Testosteron-Acetat, 5 α -Cholestan und 17 β -Estradiol-Diacetat sind signifikant (t-Test, $p < 0,05$).

4.5.2 Einfluss des GC-Trägergasflusses

Im Kapitel 4.3 wurden mit den verschiedenen GC-Temperaturprogrammen auch unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten des Heliums untersucht. Da sich dieser Parameter bei der GC/C-IRMS nicht nur auf die Chromatographie auswirkt, sondern aufgrund des Designs des Interfaces auch auf die Verdünnung des Messgases im *Open-Split* (vgl. Abb. 4.49), wird er hier noch einmal aufgegriffen. Die Untersuchungen zu den Mischungsverhältnissen der Gase im Referenzgas-Einlass haben gezeigt, dass Einflüsse auf die gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte bestehen. Ähnliche Einflüsse sind auch im *Open-Split* denkbar. Das Mischungsverhältnis von Messgas zu Helium hängt von der GC-Fließgeschwindigkeit ab und ist für die verwendeten Methoden in Tabelle 4.10 als Verdünnungsfaktor dargestellt.

Tabelle 4.10: Verdünnung des GC-Eluates im „Open-Split“ in Abhängigkeit von der GC-Flussgeschwindigkeit

GC-Methoden	GC-Fluss	Verdünnungsfaktor
GC-Methode 4	0,9 ml/min	~ 1 : 2
GC-Methoden 9 + 11	1,5 ml/min	~ 1 : 3,75
GC-Methoden 12 + 13	2,0 ml/min	~ 1 : 5

Je langsamer die Fließgeschwindigkeit des Heliums ist, desto geringer ist die Verdünnung des vorher zu CO_2 verbrannten Analyten im *Open-Split* des Interfaces. Deshalb werden die Peaks bei gleicher Analytkonzentration mit zunehmender Fließgeschwindigkeit kleiner.

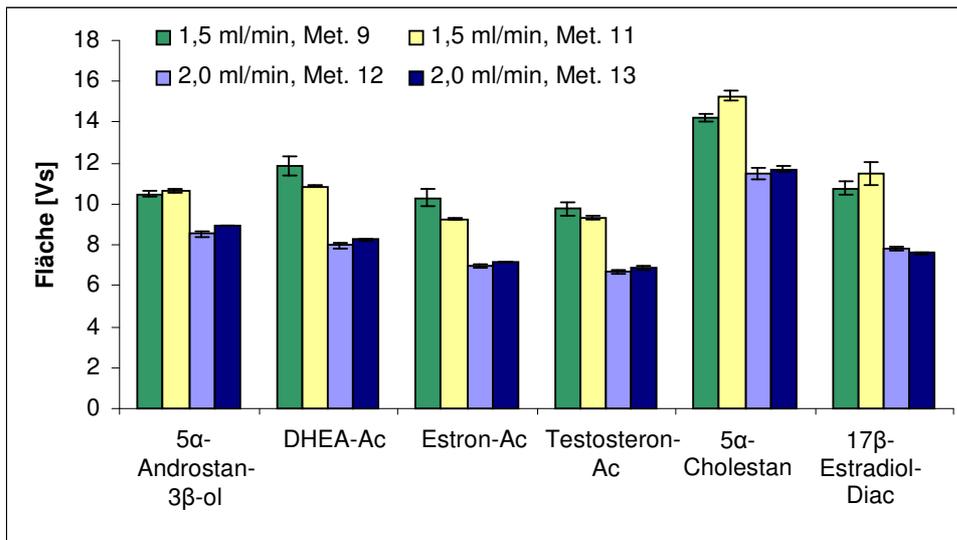
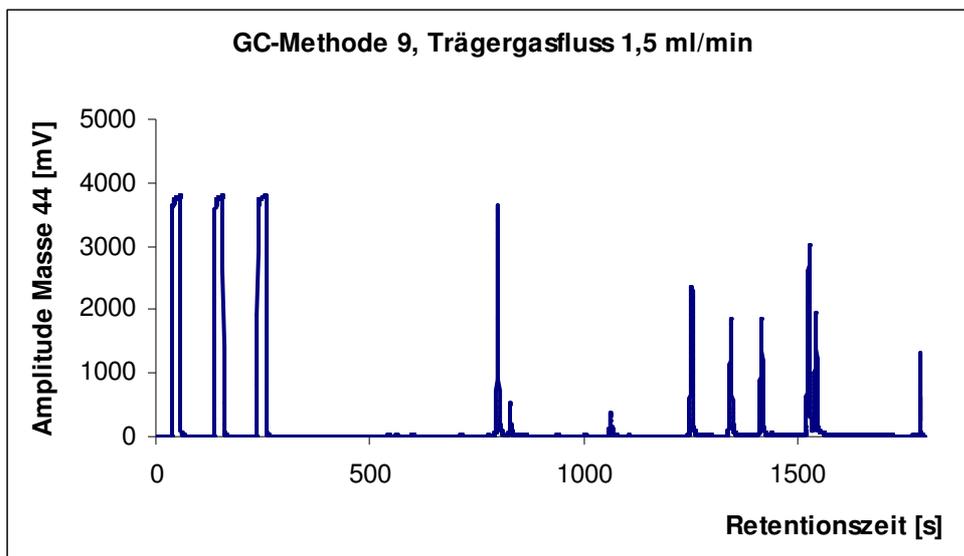


Abbildung 4.54: Peakflächen des Steroid-Acetat-Standards [Vs] in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit während der Gaschromatographie, Temperaturprogramm jeweils bei Methoden 9 und 13 bzw. 11 und 12 identisch

Die bereits im Kapitel 4.3 dargestellten Ergebnisse zeigten eine deutliche Abhängigkeit der Peakflächen von der gewählten Fließgeschwindigkeit im GC. Bei identischem Temperaturverlauf während der gaschromatographischen Trennung betragen bei GC-Methode 13 die Flächen der Steroid-Acetate mit einer Fließgeschwindigkeit von 2,0 ml/min nur 70 % der Flächen, die mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 ml/min aufgenommen wurden (GC-Methode 9). Für 5α-Androstan-3β-ol bzw. 5α-Cholestan sind es 85 % bzw. 82 % der Flächen von GC-Methode 9 (Abb. 4.54). Mit der GC-Methode 12 (Fließgeschwindigkeit 2,0 ml/min) betragen die Flächen aller untersuchten Analyten 68 bis 81 % der Flächen mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 ml/min (GC-Methode 11).



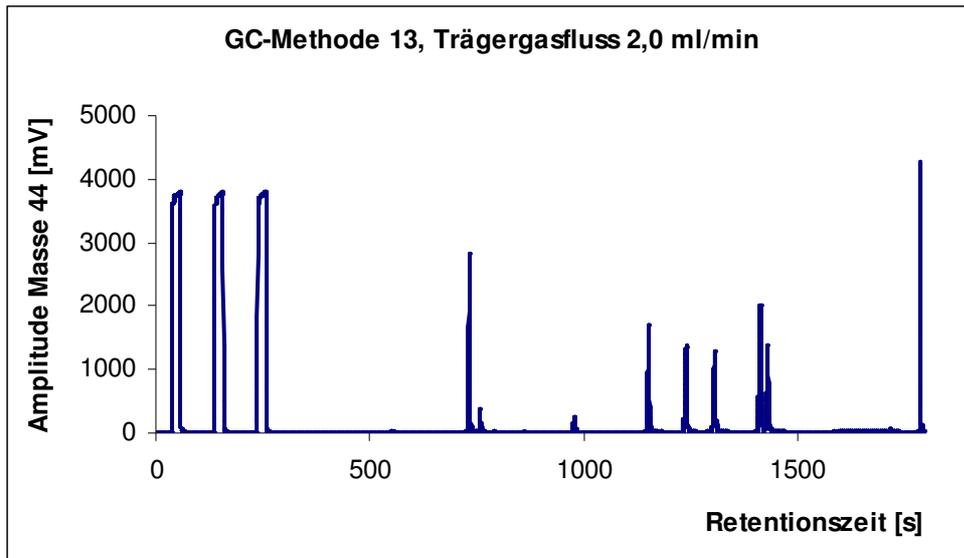


Abbildung 4.55: Chromatogramme des Steroid-Acetat-Standards mit einem Trägergasfluss von oben: 1,5 ml/min und unten: 2 ml/min bei identischem GC-Temperaturverlauf; jeweils vorne drei Referenzgaspeaks, gefolgt von den Analyten

Im Gegensatz zu den Versuchen mit unterschiedlichen Helium- und Kohlendioxid drücken im Interface bleiben die Flächen der Referenzgaspeaks unverändert, da die Verhältnisse im Referenzgas-Einlass nicht von der Fließgeschwindigkeit des Trägergases beeinflusst werden (Abb. 4.55). Die Unterschiede der Messwerte der Isotopenverhältnisse sind weniger deutlich als die der Peakflächen. Es wurden beim Vergleich der GC-Methoden 13 (2 ml/min) und 9 (1,5 ml/min) Unterschiede zwischen +0,11 und -0,42 % und bei den Methoden 12 (2,0 ml/min) und 11 (1,5 ml/min) zwischen +0,34 und -0,36 % ermittelt (Abb. 4.56). Dabei sind die Unterschiede bei beiden Vergleichen für 5 α -Androstan-3 β -ol und bei 17 β -Estradiol-Diacetat signifikant (t-Test, $p < 0,05$).

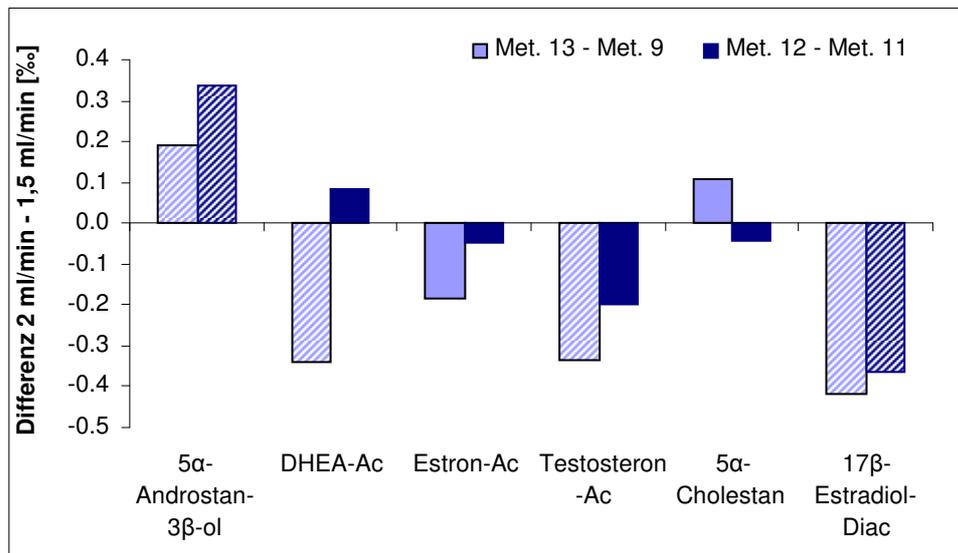


Abbildung 4.56: Einfluss der Fließgeschwindigkeit im Gaschromatographen auf die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Analyten des Steroid-Acetat-Standards, dargestellt als Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen Messungen mit 2 ml/min und 1,5 ml/min, signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind schraffiert dargestellt

Ein einheitlicher Trend in Richtung positiverer oder negativerer $\delta^{13}\text{C}$ -Werte bei zunehmender bzw. abnehmender Fließgeschwindigkeit des Trägergases ist bei den untersuchten Analyten nicht zu erkennen.

Alle untersuchten Änderungen der Drücke beziehungsweise Flüsse des Trägergasstroms im Gaschromatographen, des Heliums am GC/C-Interface und des Referenzgases CO_2 am Interface führen zu signifikanten Veränderungen der Peakflächen der Referenzgaspeaks oder der Analyten. Änderungen in den gemessenen Isotopenverhältnissen der untersuchten Analyten des Steroid-Acetat-Standards sind teilweise signifikant. Lediglich bei der Änderung des Referenzgasdruckes ist ein eindeutiger Trend bei allen Analyten mit Ausnahme des 5α -Cholestans zu erkennen.

4.6 Linearität – mengenabhängige Isotopenfraktionierung

Der lineare Bereich ist in der IRMS der Konzentrationsbereich eines Analyten, in dem der gemessene $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im Idealfall unabhängig von seiner Signalhöhe ist, innerhalb dessen es also zu keiner mengenabhängigen Isotopenfraktionierung kommt. Eine gewisse Abhängigkeit des Messwertes von der Signalhöhe ist allerdings normal. Laut Hersteller des GC/C-IRMS-Gerätes darf im linearen Bereich der Quelle, der bei Peakhöhen von etwa 2 bis 7 Volt liegen soll, bei optimaler Fokussierung der Quelle die Steigung nicht mehr als $0,06\text{‰}/\text{V}$ betragen. Mit diesem Wert wird jedoch nur die Linearität der Quelle beschrieben, nicht die des gesamten GC/C-IRMS-Systems.

Der lineare Bereich der verwendeten Ionenquelle alleine lässt sich nicht exakt ermitteln. Wenn durch das Einleiten von unterschiedlichen Mengen Referenzgas eine mengenabhängige Isotopenfraktionierung bestimmt werden soll, wird der Einfluss, den die unterschiedlichen Gasflüsse verursachen (vgl. Kapitel 4.5 Interface), automatisch mit erfasst. Über das *Open-Split*-Ventil wurde das Referenzgas Kohlendioxid in verschiedenen Mengen in die Quelle geleitet, wozu am Interface Drücke von 0,2 bis 1,6 bar eingestellt wurden. Für diese Gasdrücke wurden mit beiden untersuchten Ionenquellen Amplituden von etwa 600 bis 9000 mV gemessen. Zwischen dem kleinsten und größten gemessenen Signal ergeben sich für den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert Differenzen von 1,1 ‰, 1,8 ‰, 0,9 ‰ und 1,5 ‰ (s. Abbildung 4.57), wobei die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte mit steigender Amplitude negativer werden. Die Werte lassen sich in eine logarithmische Abhängigkeit bringen. Eine lineare Abhängigkeit konnte bei allen Messungen erst ab einer Signalhöhe von mindestens 3 V festgestellt werden. Zwischen 2 und 10 V betragen die mittleren Steigungen im Laufe von drei Jahren $-0,08\text{‰}/\text{V}$, $-0,09\text{‰}/\text{V}$, $-0,06\text{‰}/\text{V}$ und $-0,10\text{‰}/\text{V}$ und sind somit etwas schlechter als vom Hersteller für die Ionenquellen angegeben. Da hier aber auch der Einfluss des Interfaces mit erfasst wird, kann keine genaue Aussage über die Linearität der Quelle alleine getroffen werden. Im unteren Amplitudenbereich von bis zu etwa 3,5 V betragen die Steigungen zwischen $-0,23$ und $-0,44\text{‰}/\text{V}$. Die mengenabhängige Isotopenfraktionierung ist bei kleinen Amplituden also deutlich ausgeprägter als bei größeren ab etwa 2 V. Die Unterschiede der Isotopenfraktionierungen in Abhängigkeit vom Messzeitraum könnten sich mit unterschiedlichen Fokussierungen der Ionenquelle erklären lassen. Zwischen den beiden verwendeten Quellen ist kein Unterschied in der Linearität zu erkennen.

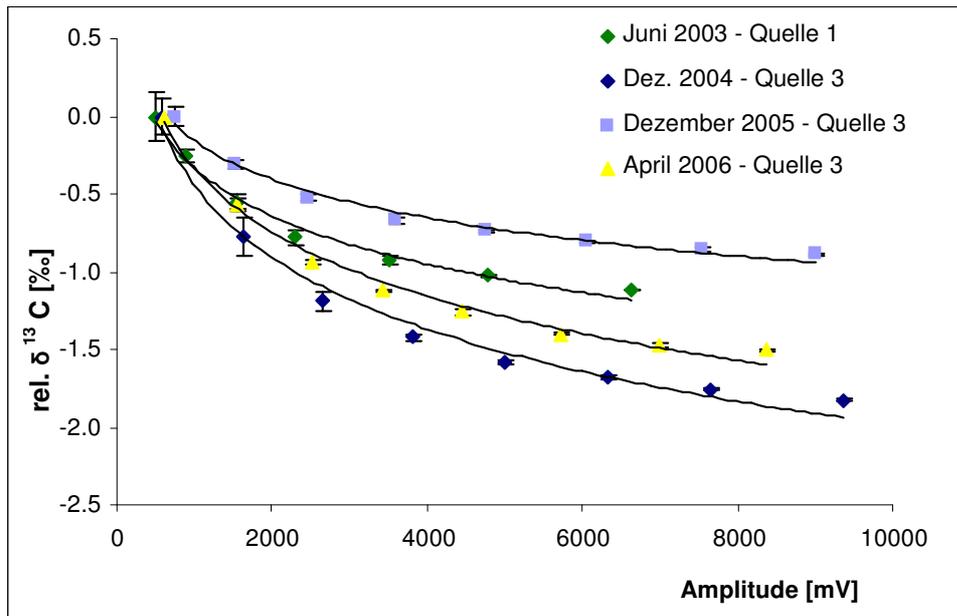


Abbildung 4.57: Abhängigkeit des relativen $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes [%] von der Intensität des Referenzgaspeaks [mV], gemessen mit zwei verschiedenen Quellen zu verschiedenen Zeitpunkten

Interessanter als die mengenabhängige Fraktionierung der Ionenquelle alleine ist in der GC/C-IRMS jedoch die Abhängigkeit des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes eines Analyten vom jeweiligen Probenignal, die nicht nur von der Ionenquelle, sondern auch von anderen Faktoren wie der Chromatographie beeinflusst wird.

Für die Alkane Hexadecan (C16), Eicosan (C20), Docosan (C22), Tetracosan (C24), Triacontan (C30) und Dotriacontan (C32) wurde die Linearität im Bereich von 340 bis 10392 mV untersucht. Für diese Signalhöhen wurden von jedem Analyten zwischen 5 und 40 ng vermessen. Im Gegensatz zum reinen CO_2 -Referenzgas ist hier die Abhängigkeit der gemessenen Isotopenzusammensetzung von der Signalhöhe nicht logarithmisch, sondern im gesamten untersuchten Bereich linear (Abb. 4.58). Außerdem werden die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte mit steigender Amplitude positiver. Ab einer Peakhöhe von etwa 2 V beträgt die Abweichung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für Hexadecan 0,13 ‰/V und für die übrigen untersuchten Alkane 0,03 bis 0,07 ‰/V. Betrachtet man den gesamten untersuchten Messbereich von 340 bis 10392 mV (abhängig vom Alkan), erhält man für Hexadecan einen Wert von 0,19 ‰/V und für die übrigen Analyten Steigungen von 0,06 ‰/V bis 0,10 ‰/V. Abgesehen von Hexadecan ist die Linearität bei allen vermessenen Alkanen im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich gut. Betrachtet man nur die Daten ab etwa 2 V Peakhöhe, ist die Linearität sogar sehr gut (verglichen mit den Anforderungen des Geräteherstellers).

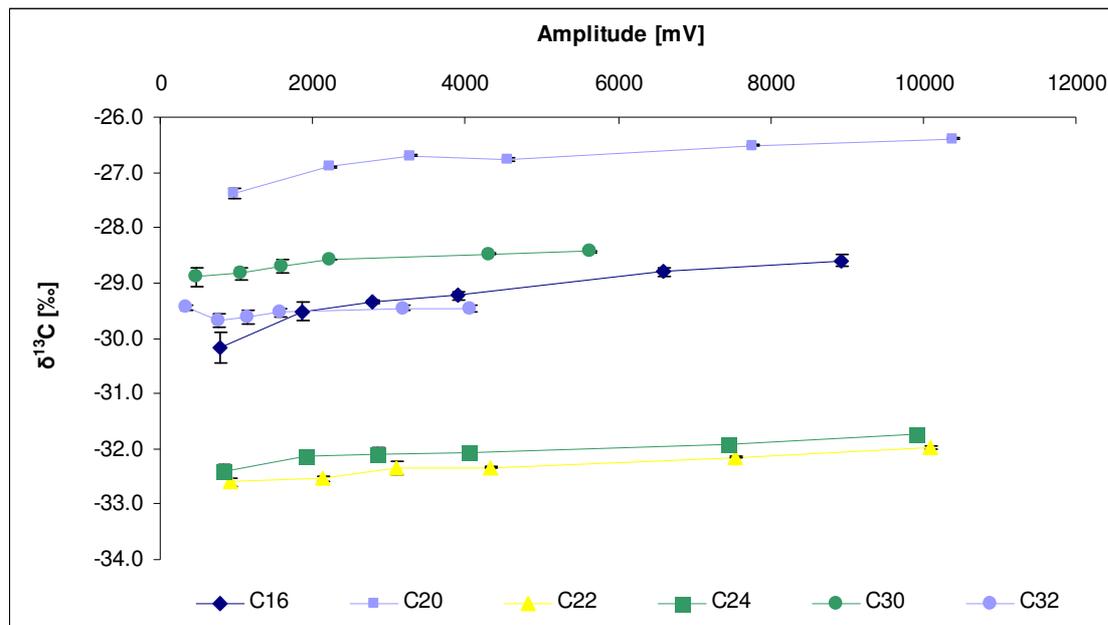


Abbildung 4.58: Abhängigkeit des $\delta^{13}\text{C}$ -Messwertes [%] einiger Alkane von der Intensität des Probenpeaks [mV]

Für die Bestimmung des linearen Messbereiches der Steroide wurden mehrere Untersuchungen mit dem Steroid-Acetat-Standard (5α -Androstan- 3β -ol, DHEA-Acetat, Estron-Acetat, Testosteron-Acetat, 5α -Cholestan, 17β -Estradiol-Diacetat) und einer weiteren Standard-Mischung (Etiocholanolon-Acetat, DHEA-Acetat, Epiandrosteron-Acetat, Epitestosteron-Acetat, 5-Androstendiol-Diacetat und 5α -Androstandiol-Diacetat) durchgeführt. Alle in Abbildung 4.59 dargestellten Untersuchungen wurden mit derselben Ionenquelle gemessen. Es wurden von den oben genannten Analyten Mengen zwischen 2,5 ng und 200 ng injiziert, um den Messbereich von 0 bis etwa 7 V abzudecken. Abbildung 4.59 zeigt am Beispiel des DHEA-Acetes die Abhängigkeiten der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von der Amplitude. Die Messwerte wurden im Laufe von drei Jahren ermittelt. Die Messwerte werden jeweils relativ zu dem Wert, der mit der kleinsten Menge, also der kleinsten Peakhöhe, gemessen wurde, dargestellt. Bei den meisten Messreihen zeigt sich ab einer Amplitude von etwa einem Volt ein linearer Zusammenhang zwischen der Peakhöhe und der ermittelten Isotopenzusammensetzung. Lediglich bei der in Abbildung 4.59 grau dargestellten Messung aus Serie 8 beginnt der lineare Bereich erst bei etwa 3 V. Innerhalb des linearen Bereiches wurde mit zwei Ausnahmen eine maximale Abweichung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von 0,05 bis 0,14 ‰/V ermittelt. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen der Alkane. Bei den Messungen aus Serie 4 und Serie 8 beträgt diese Abweichung 0,23 ‰/V. Die mit Amplituden unterhalb der jeweiligen linearen Bereiche gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte weichen um bis zu 2 ‰ von denen im linearen Bereich ab. Bei den durchgeführten Untersuchungen konnte keine obere Grenze für den linearen Bereich bestimmt werden. Mit den hierfür erforderlichen Analytmengen wäre die GC-Säule stark überladen und der Oxidationsofen überlastet worden. Obwohl in den meisten Fällen ab ca. 1 V Peakhöhe der lineare Bereich beginnt, sind die Korrelationen bei den verschiedenen Messungen doch sehr verschieden. Dies kann zum einen an unterschiedlichen Fokussierungen der Ionenquelle liegen, zum anderen aber auch an gaschromatographischen Faktoren, die im gewählten Untersuchungszeitraum – hauptsächlich wegen anfallender Reparaturarbeiten – nicht absolut konstant gehalten werden konnten.

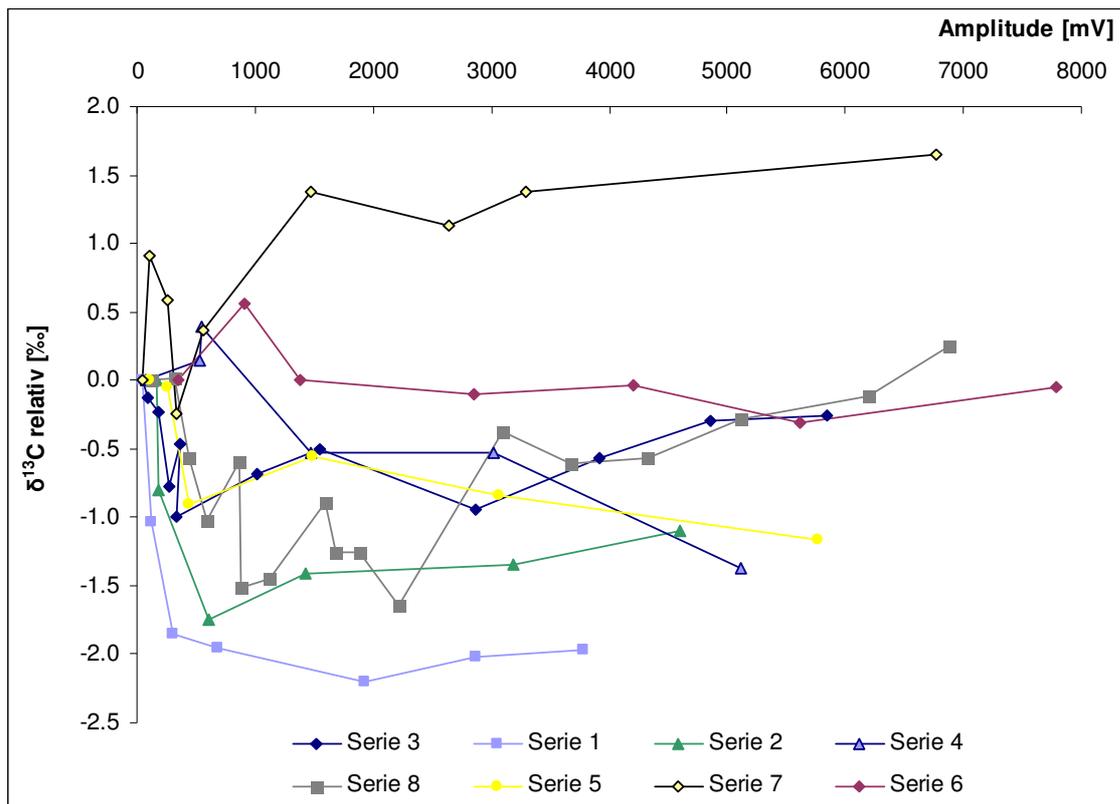


Abbildung 4.59: Linearität von DHEA-Acetat, dargestellt als relativer $\delta^{13}\text{C}$ -Wert [%] in Abhängigkeit von der Peakhöhe [mV]

Im folgenden Diagramm (Abb. 4.60) sind die Ergebnisse der Linearitätsmessung der sechsten Serie für alle untersuchten Analyten des Steroid-Acetat-Standards dargestellt. Die in derselben Serie zeitgleich gemessenen Ergebnisse unterscheiden sich teilweise deutlich voneinander. Bei DHEA-Acetat und 17β -Estradiol-Diacetat liegt im gesamten Messbereich mit Ausnahme jeweils eines Datenpunktes ein linearer Zusammenhang zwischen der Amplitude und dem $\delta^{13}\text{C}$ -Wert vor. Unter Nichtberücksichtigung dieser einzelnen Datenpunkte beträgt die maximale Abweichung für DHEA-Acetat $0,04\text{‰/V}$ und für 17β -Estradiol-Diacetat $0,10\text{‰/V}$. Bei 5α -Cholestan und Testosteron-Acetat werden die Isotopenverhältnisse mit steigender Amplitude der Peaks deutlich negativer. Zwischen 0 und 2 V liegen die Abweichungen bei etwa 1‰ . Im Messbereich über 2 V hingegen beträgt die maximale Abweichung jeweils $0,06\text{‰/V}$. Bei 5α -Androstan- 3β -ol sinken die Messwerte bis zu einer Amplitude von etwa 4 V rapide ab, der Unterschied liegt bei $2,2\text{‰}$, also $0,63\text{‰}$ pro Volt. Oberhalb von 4 V beträgt die Abweichung $0,06\text{‰/V}$. Das stärkste Gefälle wurde bei Estron-Acetat verzeichnet. Bis etwa 2 V beträgt es $1,74\text{‰/V}$. Ab 2 V liegt die Abweichung jedoch bei akzeptablen $0,11\text{‰/V}$.

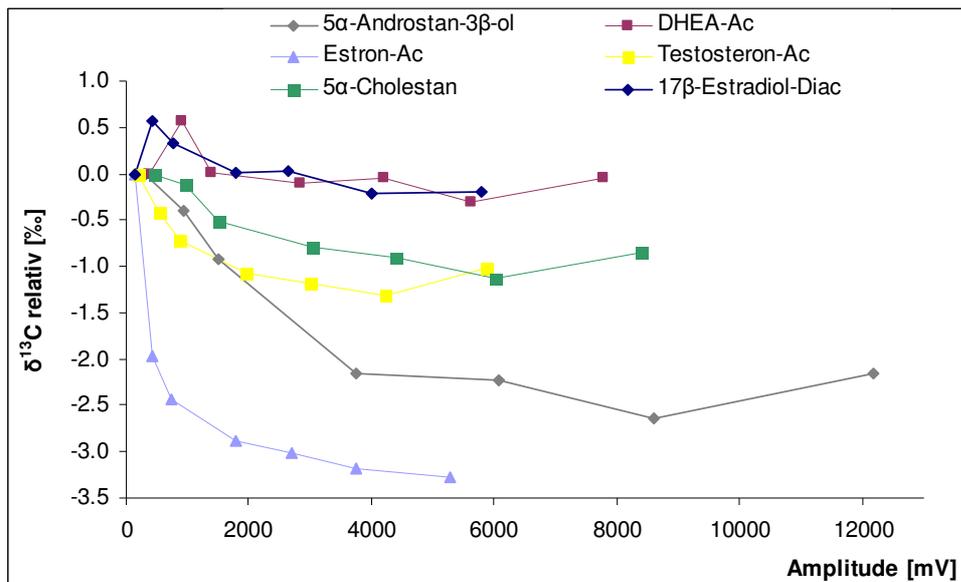


Abbildung 4.60: Linearität der Analyten des Steroid-Acetat-Standards, dargestellt als Abhängigkeit des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes [%] (relativ zum Messwert mit der kleinsten Amplitude) von der Peakhöhe [mV]

Die Unterschiede der linearen Bereiche der untersuchten Steroide und Steroid-Acetate sind groß, besonders im Vergleich zu den oben beschriebenen Alkanen, die sich unabhängig von ihrer Kettenlänge hinsichtlich der Linearität sehr ähnlich verhalten. Mit Ausnahme des 5 α -Androstan-3 β -ol beginnt aber bei allen untersuchten Analyten bei etwa 2 V der lineare Bereich mit einer akzeptablen bis sehr guten Abhängigkeit des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von der Amplitude des Peaks. Auch bei den Alkanen wurde eine bessere Linearität bei Amplituden über 2 V als darunter erreicht. Diese Grenze deckt sich mit den Herstellerangaben. Nach oben konnte bei keinem Analyten eine Begrenzung des linearen Bereiches erfasst werden. Der limitierende Faktor bei diesen Untersuchungen ist die Kapazität der verwendeten GC-Säule und des Oxidationsofens.

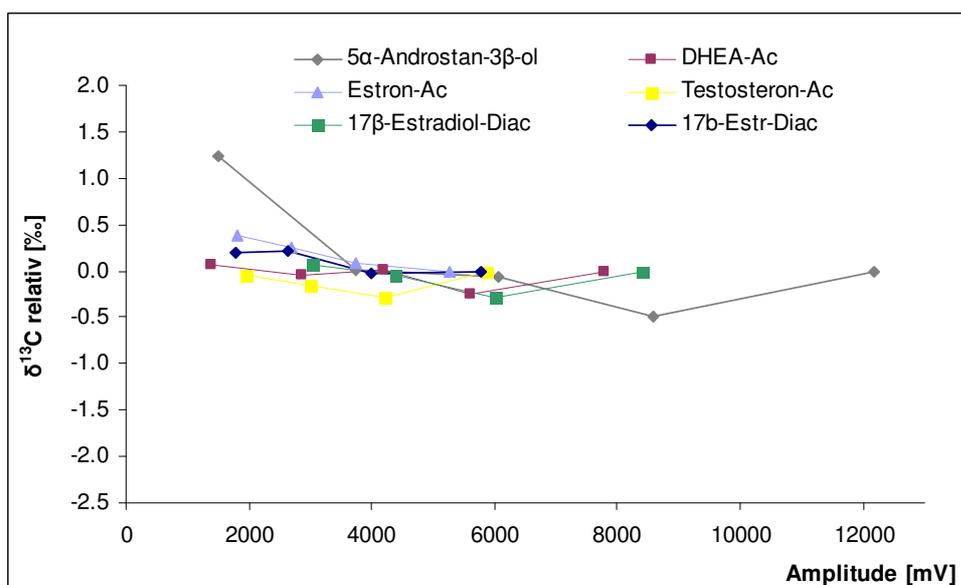


Abbildung 4.61: Linearität der Analyten des Steroid-Acetat-Standards, dargestellt als Abhängigkeit des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes [%] (relativ zum Messwert mit der größten Amplitude) von der Peakhöhe [mV], alle Daten ab einer Peakhöhe von etwa 2 V

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass mit wenigen Ausnahmen alle untersuchten Analyten zu allen Messzeitpunkten ab einer Amplitude von 2 V zuverlässig im linearen Bereich messbar sind. Einige Analyten konnten auch mit geringeren Amplituden schon zuverlässig vermessen werden. Um jeden Fehler durch eine mengenabhängige Isotopendiskriminierung in der Quelle und den anderen Schritten der GC/C-IRMS zu vermeiden, müsste jeder zu untersuchende Analyt immer in derselben Menge, die eine immer gleiche Signalhöhe von mindestens 3 V erzeugt, injiziert werden. Dies ist in der Praxis selten möglich. In der Analytik von Steroiden aus Rinderurin liegen wie bei vielen anderen Fragestellungen alle Zielanalyten in verschiedenen Konzentrationen vor, sodass es bei der Probenaufarbeitung unmöglich ist, Lösungen mit identischen Konzentrationen aller Analyten herzustellen. Jede Lösung mehrmals in unterschiedlichen Verdünnungen zu injizieren, sodass jeder Analyt in der gewünschten Menge vorliegt, ist wenig praktikabel. Zum einen wäre damit ein enormer zeitlicher und apparativer Aufwand verbunden, zum anderen wäre für diese Art der Analyse häufig nicht genügend Probenmaterial vorhanden.

4.7 Kalibrierung

Das Kalibrieren von Messgeräten und Analysemethoden wird üblicherweise mit zertifiziertem Referenzmaterial mit bekannten Sollwerten durchgeführt. Bei der Messung der Stabilisotopenverhältnisse werden keine absoluten Messwerte wie z.B. die Konzentration einer Substanz in der quantitativen Analytik bestimmt, sondern die gemessenen absoluten Werte werden zur besseren Vergleichbarkeit und Handhabbarkeit prinzipiell in Bezug zu einem Vergleichsstandard gesetzt. Aus Mangel an zertifizierten GC/C-IRMS-Standards (vgl. Einleitung Kap. 3.3.1) wurde die Kalibrierung des Messgases mittels der EA-IRMS durchgeführt. Aufgrund der bereits dargestellten chromatographischen Eigenschaften und Phänomene während der Probeninjektion bei der GC/C-IRMS ist jedoch eine Richtigkeit der so gewonnenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte nicht selbstverständlich und bedarf deshalb der Überprüfung. Die folgenden Daten wurden zum einen zur Überprüfung der Eignung der gewählten Kalibrierung und zum anderen als Suche von Alternativen zur Kalibrierung über die EA-IRMS erhoben.

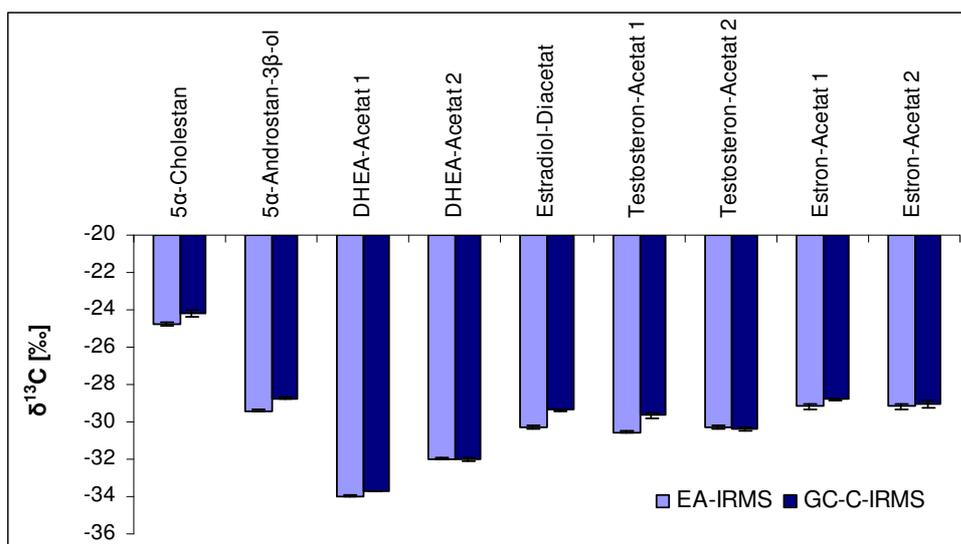


Abbildung 4.62: Vergleich der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einiger als Standard für die GC/C-IRMS verwendeter Substanzen, Anzahl der Messwerte EA-IRMS n = 5, GC/C-IRMS n = 3

Abbildung 4.62 zeigt die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einiger als Standard für die GC/C-IRMS verwendeter Steroid-Acetate, aufgenommen mit der EA-IRMS und der GC/C-IRMS. Die Unterschiede der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werten lagen bei $-0,08$ bis $+0,92$ ‰. Alle Unterschiede, ausgenommen die der Substanzen DHEA-Acetat 2, Testosteron-Acetat 2 und Estron-Acetat 2, waren signi-

fikant (t-Test, $p < 0,05$). Wurden signifikante Unterschiede gemessen, waren die Werte der GC/C-IRMS stets positiver als die der EA-IRMS.

Die Substanzen, bei denen kein signifikanter Unterschied gemessen werden konnte, stammen alle vom selben Hersteller (Steraloids), während die anderen Substanzen von anderen Herstellern bezogen wurden. Es ist denkbar, dass bei Steraloids die Steroid-Acetate reiner sind oder eventuelle Verunreinigungen keine vom Analyten stark abweichende Isotopenzusammensetzung haben und deshalb nicht messbar waren.

Auch bei anderen im Hinblick auf ihre Tauglichkeit als GC/C-IRMS-Standard untersuchten Substanzen wurden Unterschiede zwischen den Messwerten der beiden IRMS-Techniken beobachtet. Bei den Alkanen (Abb. 4.63) waren die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte, die mit der GC/C-IRMS aufgenommen wurden, um 0,28 bis 0,86 ‰ positiver als die Werte, die mit der EA-IRMS gemessen wurden. Alle Unterschiede, ausgenommen der des n-Hexadecans (C16), waren signifikant (t-Test, $p < 0,05$).

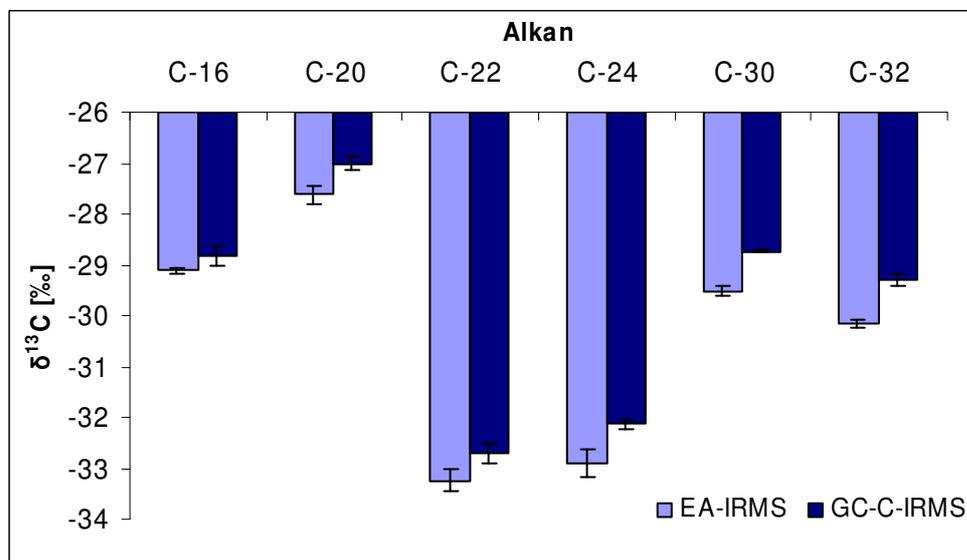


Abbildung 4.63: Vergleich von $\delta^{13}\text{C}$ -Werte [‰] von Alkanen, mit EA-IRMS und GC/C-IRMS aufgenommen, Anzahl der Messwerte je $n = 3$

Bei den Substanzen, die im Rahmen eines Ringversuches (EU-Projekt Nr. G6RD-CT-2001-00515 vom 24.03.2005) hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit als Standards für die GC/C-IRMS untersucht wurden, konnte die gleiche Beobachtung gemacht werden. Die Daten der am BfR gemessenen Substanzen Tetramethylanilin, Dimethalanilin, Methyl-N-methyl-anthranilat, Dodecan, Octanol, Methyldecanoat, Methyl-dodecanoat und Vanillin sind in Abbildung 4.64 dargestellt. Die Differenzen zwischen den beiden Messmethoden liegen für die einzelnen Substanzen zwischen $-0,63$ und $+0,03$ ‰. Auch hier sind die mit der GC/C-IRMS aufgenommenen Werte zumeist positiver als die der EA-IRMS, wobei alle Unterschiede bis auf die $0,03$ ‰ bei Octanol signifikant sind.

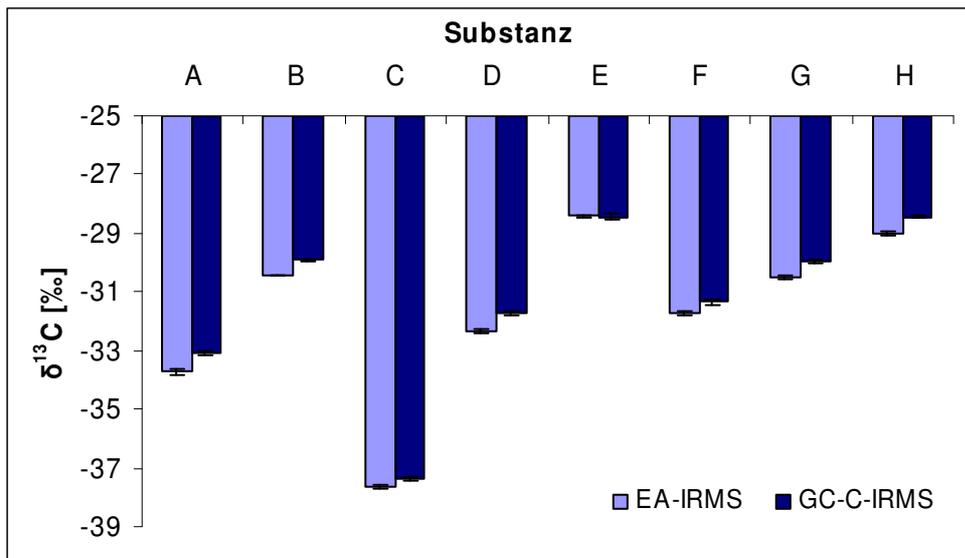


Abbildung 4.64: Vergleich der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von A: Tetramethylanilin, B: Dimethylanilin, C: Methyl-N-methyl-anthranilat, D: Dodecan, E: Octanol, F: Methyldecanoat, G: Methyl-dodecanoat, H: Vanillin, gemessen mit EA-IRMS und GC/C-IRMS, Anzahl der Messwerte je $n = 3$

Betrachtet man die Daten aller Teilnehmer dieses Ringversuches im Vergleich mit denen des BfR, fällt auf, dass mit der EA-IRMS eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den Messwerten des BfR und dem Mittelwert aller Teilnehmer besteht. Die Unterschiede liegen für die untersuchten Substanzen zwischen $-0,11$ und $+0,17$ ‰ (Abb. 4.65). Bei den mit der GC/C-IRMS gemessenen Daten liegen die Unterschiede zwischen dem BfR und dem Mittelwert aller teilnehmenden Labore zwischen $-0,22$ und $+2,26$ ‰. Sie sind wegen der großen Streuung der Werte aller Labore jedoch nicht signifikant (Abb. 4.66).

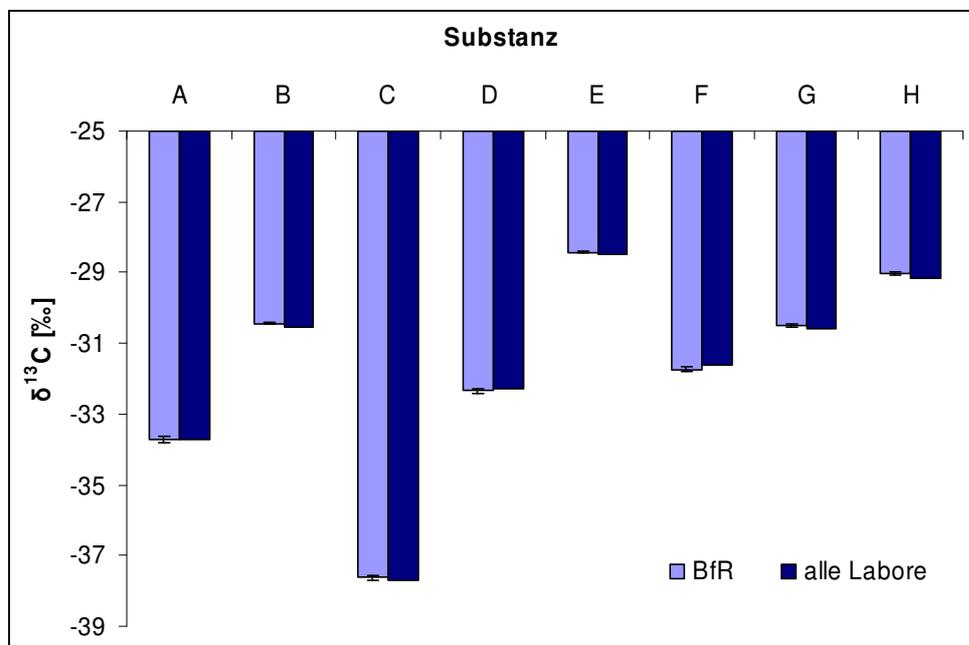


Abbildung 4.65: Vergleich der EA-IRMS-Messwerte des BfR mit dem Mittelwert aller Teilnehmer des Ringversuches EU-Projekt Nr. G6RD-CT-2001-00515 vom 24.03.2005; mit A: Tetramethylanilin, B: Dimethylanilin, C: Methyl-N-methyl-anthranilat, D: Dodecan, E: Octanol, F: Methyldecanoat, G: Methyl-dodecanoat, H: Vanillin

Die hohe Streuung der GC/C-IRMS-Messwerte aller Labore verdeutlicht, dass im Gegensatz zu EA-IRMS-Messungen die Vergleichbarkeit der Daten noch sehr schlecht ist. Sicherlich ist der Grund hierfür auch in den fehlenden Standardsubstanzen für die GC/C-IRMS zu suchen. Die Streuung zeigt aber auch, dass die GC/C-IRMS noch eine wenig standardisierte Methode mit vielen Fehlerquellen ist.

Bei allen untersuchten Substanzen bestehen größtenteils signifikante Unterschiede zwischen den Messwerten der EA-IRMS und der GC/C-IRMS bei Messungen mit demselben Referenzgas und identischer Kalibrierung dieses Gases. Die Unterschiede liegen bei bis zu 0,92 ‰. Aufgrund dieser Abweichungen in den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten der einzelnen Analyten im Vergleich zur EA-IRMS fällt es auch schwer, statt der Kalibrierung des Referenzgases über die EA-IRMS mit zertifiziertem Material geeignete Tertiärstandards für die Kalibrierung des Referenzgases über die GC/C-IRMS zu verwenden. Versuche, das Referenzgas direkt über die GC/C-IRMS mit einem oder mehreren Steroid-Acetat-Standards zu kalibrieren, führten zu unbefriedigenden Ergebnissen.

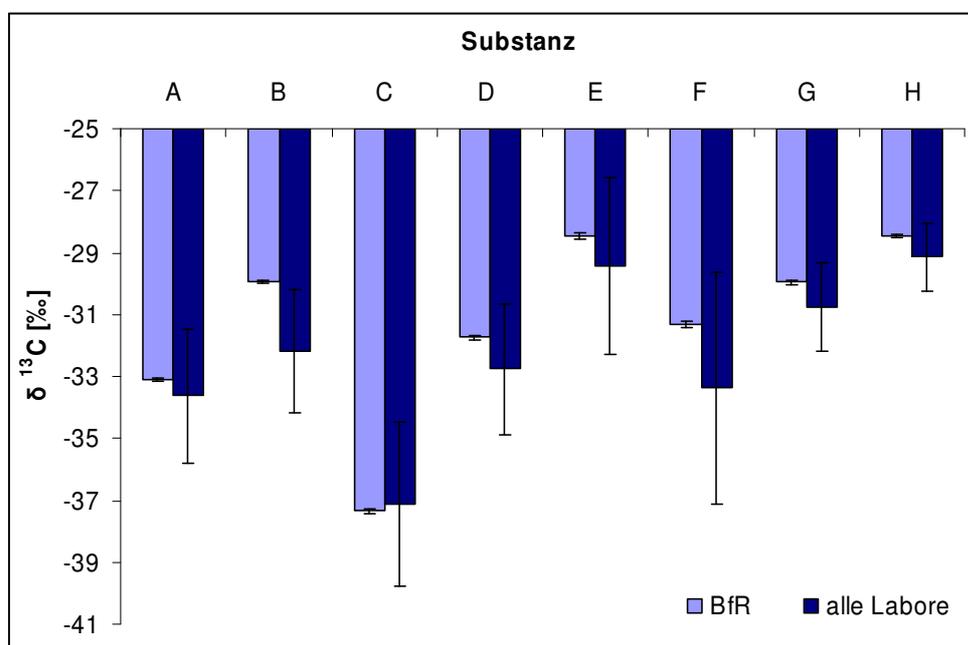


Abbildung 4.66: Vergleich der GC/C-IRMS-Messwerte des BfR mit denen aller Teilnehmer des Ringversuches EU-Projekt Nr. G6RD-CT-2001-00515 vom 24.03.2005; mit A: Tetramethylanilin, B: Dimethylanilin, C: Methyl-N-methyl-anthranilat, D: Dodecan, E: Octanol, F: Methyldecanoat, G: Methyldecanoat, H: Vanillin

Auch der Alkanstandard nach Schimmelmann (C16 bis C30), der als „Quasistandard“ für die GC/C-IRMS angeboten wird, erwies sich für diese Zwecke als nicht geeignet. Wie in Abbildung 4.33 erkennbar und in Kapitel 4.3 (Gaschromatographie) ausführlich diskutiert, ist die Differenz zwischen dem Referenzwert und dem gemessenen Wert je nach Kettenlänge des Alkans unterschiedlich groß und zudem noch abhängig vom gewählten GC-Temperaturprogramm.

Wenn auch alle untersuchten Substanzen nicht für die direkte Kalibrierung der GC/C-IRMS geeignet scheinen, so waren doch die eigenen Messwerte mit der GC/C-IRMS und der EA-IRMS in den meisten Fällen vergleichbar. Dass dies als Zufall zu werten ist, zeigen zum einen die Ergebnisse aller Teilnehmer des Ringversuches, aber auch die am BfR routinemäßig durchgeführte $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Stabilisotopenbestimmung von Ethanol aus Wein mittels GC/C-IRMS.

Für die Stabilisotopenmessungen an Wein und anderen Alkoholika existieren Alkoholstandards mit bekannten $\delta^{13}\text{C}$ -Werten. Der Sollwert für den Reference Alkohol BCR N° 656 beträgt $-26,91$ ‰. Mit der an der EA-IRMS etablierten Kalibrierung wurde für diesen Alkohol mit der EA-IRMS ein Wert von $-26,65$ ‰ gemessen. Mit demselben Referenzgas wurden für denselben Standard an der GC/C-IRMS in Abhängigkeit von der Injektionsart jedoch Werte von $-25,44$ ‰ und $-24,20$ ‰ an einem IRMS-Messgerät und $-22,91$ ‰ an einem weiteren GC/C-IRMS-Gerät gemessen (Abb. 4.67).

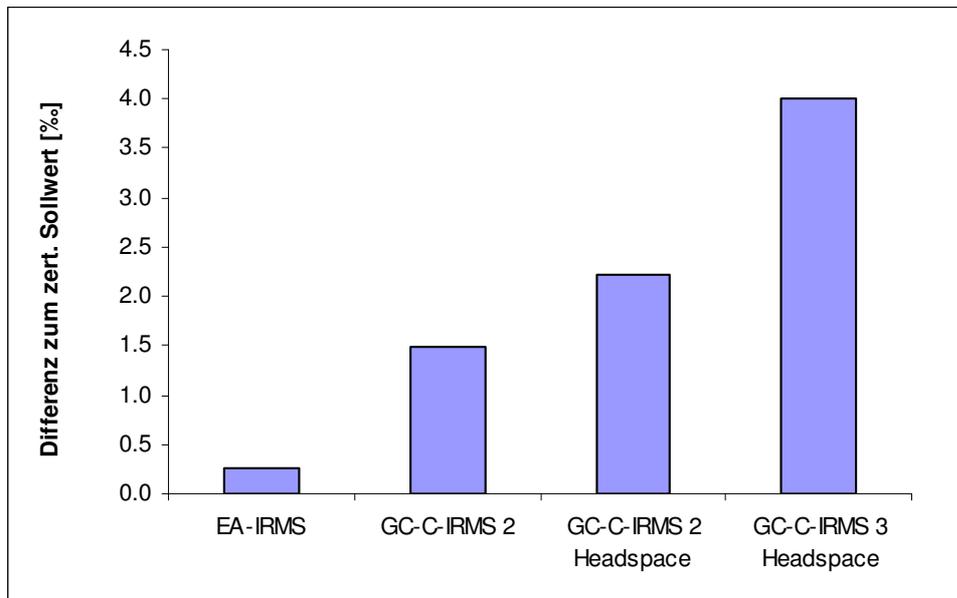


Abbildung 4.67: Differenzen der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des BCR-Standards N 656 zum zertifizierten Sollwert in Abhängigkeit von der Messmethode und dem verwendeten Gerät

Die Abweichung ist bei der Vermessung am EA-IRMS mit $0,26$ ‰ erwartungsgemäß gering. Bei den GC/C-IRMS-Messungen liegen die Differenzen zum Sollwert zwischen $1,5$ und $4,0$ ‰. Die großen Differenzen der GC/C-IRMS-Werte rühren von den unterschiedlichen Injektionsmethoden her. Bei der konventionellen Injektion wurde 1 μl mit einem Split von $1:50$ injiziert. Bei der Headspace-Injektion wurden 2 μl aus dem Gasraum des Probenvials, das den reinen Referenzalkohol enthielt, mit einem Split von $1:20$ injiziert. Die Headspace-Injektion wurde zum Vergleich an zwei unterschiedlichen GC/C-IRMS-Geräten, die mit demselben Referenzgas versorgt werden, durchgeführt. Zwischen den Ergebnissen mit diesen beiden GC/C-IRMS-Geräten wurde für den BCR-Ethanol ein Unterschied von $1,8$ ‰ ermittelt. Dieses Ergebnis zeigt, dass bei einer externen Kalibrierung – hier mittels EA-IRMS – in Abhängigkeit von der Methode und vom Gerät selbst unterschiedlich große Abweichungen zum Sollwert gemessen werden können.

4.8 Validierung

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Einflussgrößen der Aufarbeitung und der GC/C-IRMS-Messmethode auf die Genauigkeit der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte untersucht. Einige für eine Methodvalidierung relevante Parameter wurden in diesen Kapiteln bereits beschrieben. In Kapitel 4.1.6 ist die *Methodenpräzision* für unterschiedliche Urinmatrizes beschrieben. Die Kapitel 4.2 Probeninjektion, 4.3 Gaschromatographische Einflüsse, 4.4 Combustion und 4.5 Interface enthalten Daten, welche die Robustheit der GC/C-IRMS-Methode beschreiben. Der lineare Bereich für alle untersuchten Analyten wurde in Kapitel 4.6 Linearität – mengenabhängige Isotopenfraktionierung dargestellt.

Im Folgenden werden weitere Validierungsparameter dargestellt. Sowohl die gesamte Methode inklusive der Aufarbeitung als auch die GC/C-IRMS alleine müssen überprüft werden, um richtige und präzise Ergebnisse zu gewährleisten.

4.8.1 GC/C-IRMS

Es wurden messtägliche Tests durchgeführt, um die Messbereitschaft des GC/C-IRMS-Gerätes zu überprüfen. Darüber hinaus wurden innerhalb jeder Sequenz Standards zur Überprüfung der Stabilität der Messwerte mitgeführt. Da vor allem Steroide in acetylierter Form vermessen werden sollten, wurde zu diesem Zweck ein Mix aus DHEA-Acetat, Estron-Acetat, Testosteron-Acetat und Estradiol-Diacetat zusammen mit 5α -Cholestan und 5α -Androstan- 3β -ol verwendet. Über die Peakhöhen und -flächen, die Retentionszeiten und die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Substanzen dieses Steroid-Acetat-Standards konnten neben der Chromatographie und der Injektion auch der Zustand des Oxidationsofens und das Isotopenverhältnis-Massenspektrometer überprüft werden. Von der Substanz DHEA-Acetat lagen die meisten Messwerte vor und sie erwies sich als ausreichend empfindlich gegenüber einem Sauerstoffmangel im Oxidationsofen (vgl. hierzu Kap. 4.4 Combustion). Deshalb wurde eine Qualitätsregelkarte mit den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten des DHEA-Acetats geführt (Abb. 4.68). Der mit der EA-IRMS ermittelte Referenzwert beträgt für das verwendete DHEA-Acetat $-33,99\text{‰}$, der Mittelwert an der GC/C-IRMS liegt im dargestellten Zeitraum bei $-33,63\text{‰}$ mit einer Standardabweichung von $\pm 0,22\text{‰}$. In Abhängigkeit von Reparatur- und Wartungsarbeiten schwankten die langzeitigen Mittelwerte für das DHEA-Acetat zwischen $-33,6$ und $-34,0\text{‰}$. Zeigt die Qualitätsregelkarte ins Positive abweichende $\delta^{13}\text{C}$ -Werte, kann dies auf eine Undichtigkeit im System hinweisen, während ein zu negativer Wert meistens auf einen nicht ausreichend oxidierten bzw. defekten Oxidationsofen schließen lässt.

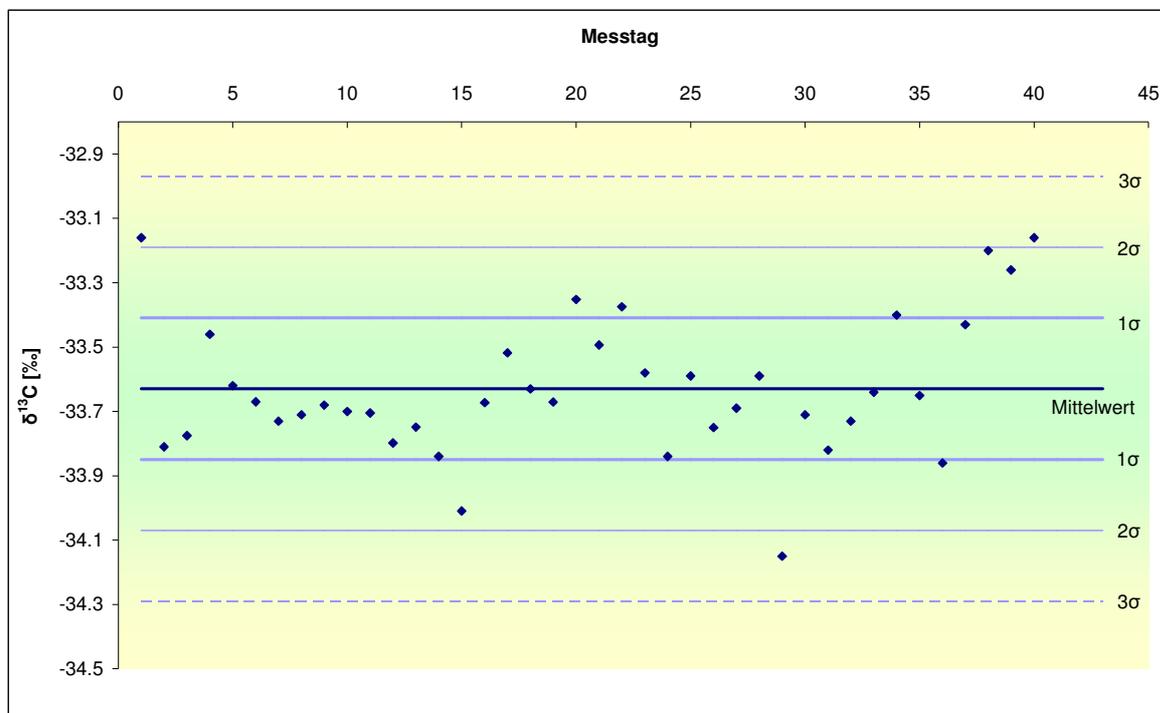


Abbildung 4.68: Beispiel einer Qualitätsregelkarte: messtägliche Mittelwerte [‰] von DHEA-Acetat aus einem Zeitraum von sechs Monaten

Die Wiederholstandardabweichung s_r , also die Standardabweichung der DHEA-Acetat-Messungen eines Messtages, liegt zwischen 0,10 und 0,47 ‰. Die Vergleichstandardabweichung s_R beträgt im hier dargestellten Zeitraum 0,22 ‰.

4.8.2 Interner Standard

Da mit dem Messen einer Standardlösung wie dem Steroid-Acetat-Standard zwar der momentane Zustand der GC/C-IRMS innerhalb einer Sequenz überprüft werden kann, nicht aber der Zustand während der jeweiligen Analysen, schien das Verwenden von internen Standards für die Steroidanalytik mittels GC/C-IRMS sinnvoll. Solche Standards müssen, wie auch solche zur internen Kalibrierung, dem Zielanalyten stark ähneln, dürfen aber nicht zu Interferenzen führen [Merrit et al. 1994]. Für die Steroidanalytik im ISOSTER-Projekt wurden die Substanzen 5α -Cholestan und 5α -Androstan- 3β -ol zu diesem Zweck näher untersucht. Sie boten sich wegen ihrer Steroidstruktur und ihrer Retentionszeiten an. 5α -Androstan- 3β -ol eluiert vor allen interessierenden Steroiden, während 5α -Cholestan im hinteren Bereich des Chromatogramms liegt (s. Abbildungen 4.69 und 4.70). Die beiden Standards wurden in Hexan gelöst, in dem die aufgearbeiteten Proben vor der GC/C-IRMS-Messung aufgenommen wurden.

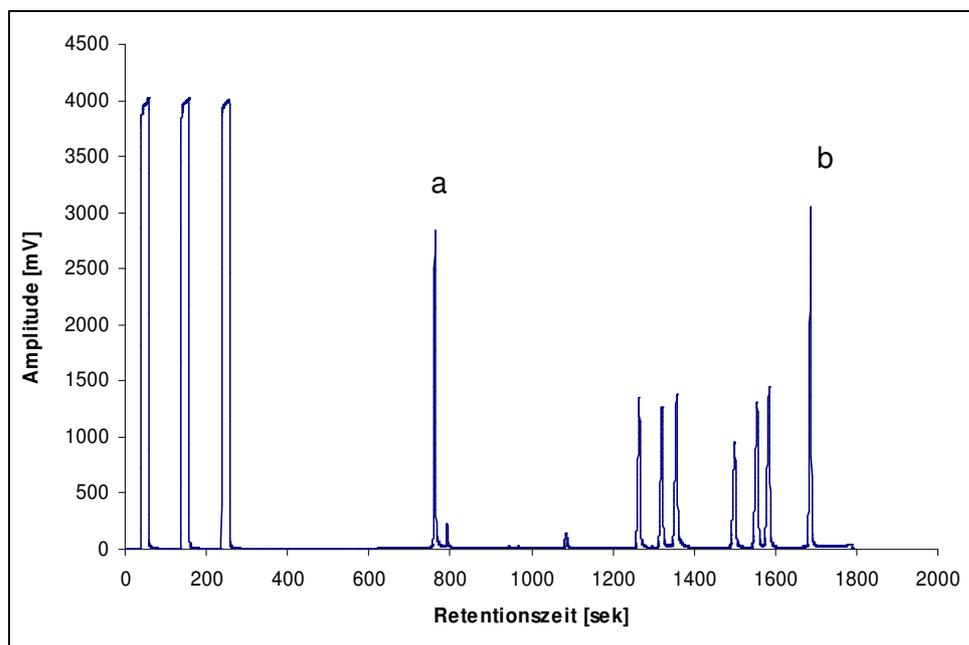


Abbildung 4.69: Steroid-Acetat-Standard-Mix mit a: 5α -Androstan- 3β -ol und b: 5α -Cholestan als interne Standards

Erste Auswertungen der Standards zeigten, dass 5α -Cholestan ausgesprochen stabile Messwerte liefert, auch wenn die Messbedingungen für die Zielsubstanzen nicht mehr ideal sind, während die Messwerte des 5α -Androstan- 3β -ol in der Stabilität denen anderer Steroid-Acetat-Standards entspricht. Auch in Matrix gab es keine Interferenzen von 5α -Cholestan und 5α -Androstan- 3β -ol mit den Zielanalyten. 5α -Cholestan ließ sich zudem gut von Matrixbestandteilen trennen. 5α -Androstan- 3β -ol eluiert jedoch gemeinsam mit unerwünschten Begleitsubstanzen, die sich negativ auf die oxidative Kapazität des Oxidationsofens auswirken und deshalb bevorzugt ausgeblendet wurden.

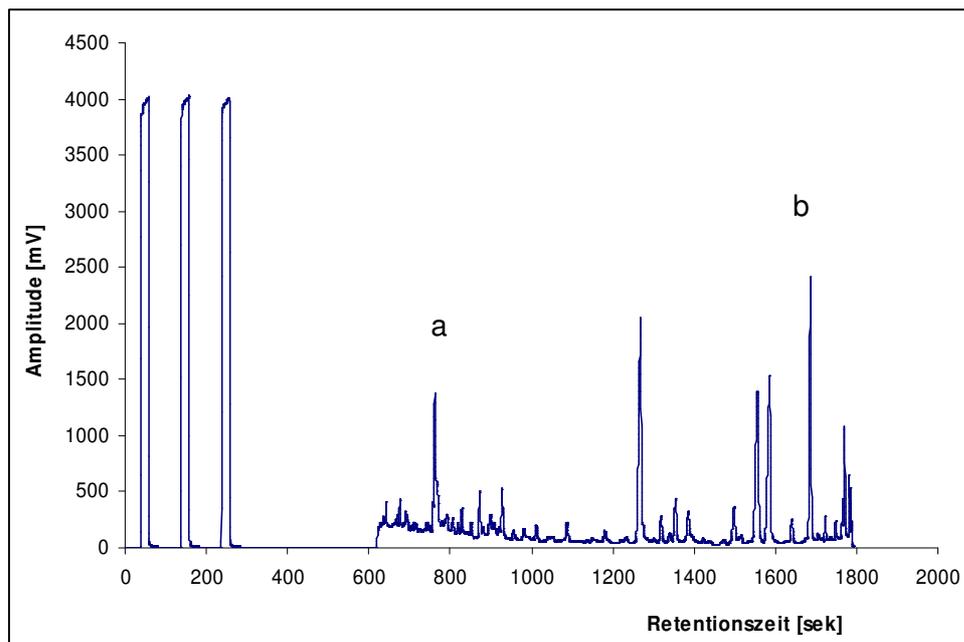


Abbildung 4.70: Urinmix mit a: 5 α -Androstan-3 β -ol und b: 5 α -Cholestan als interne Standards

Es wurde für die im ISOSTER-Projekt verwendete Methode kein geeigneter interner Standard gefunden.

4.8.3 Aufarbeitung

Im ISOSTER-Projekt wurde zur Überprüfung der Aufarbeitung und der GC/C-IRMS-Messung zusammen mit den Urinproben stets ein Kontrollurin mit aufgearbeitet und vermessen. Das heißt, es wurde immer die gleiche Probe an unterschiedlichen Tagen von verschiedenen Mitarbeitern aufgearbeitet und anschließend an immer demselben GC/C-IRMS-Gerät mit derselben Methode von einer Person vermessen. Genauso wurde mit einer wässrigen Standardlösung mit drei Zielanalyten (*Spiked Water*) verfahren. Auf diese Weise wurde die Aufarbeitung mit und ohne Matrix durchgeführt. Zusätzlich wurde mit jeder Aufarbeitung eine Standardlösung mit den Zielanalyten acetyliert (*GC/C-IRMS-Standard*). Die Ergebnisse dieser Kontrollmessungen werden beispielhaft für den Analyten Etiocholanolon einiger Sequenzen in Tabelle 4.11 dargestellt.

Tabelle 4.11: Vergleich der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Etiocholanolon-Acetat aus *Spiked Water*, Positive Control Urin und dem GC-IRMS-Standard

Sequenz Nr.	<i>Spiked Water</i>	Kontrollurin	<i>GC/C-IRMS-Standard</i>
13	-25,475	-20,126	-30,497
14	-25,051	-20,533	-30,559
16	-25,236	-19,849	-30,526
18	-24,971	-20,350	-30,851
34	-26,246		-29,687
35	-25,189	-20,038	-30,282
39	-25,252	-19,957	-30,300
40	-26,095	-20,214	-30,711
41	-25,838		-30,707
42	-25,918	-21,165	-30,819
54	-25,781	-21,750	-30,452
57	-24,666	-21,070	-30,375
58	-25,060		-30,452
Mittelwert [%]	-25,44	-20,51	-30,48
Stabw [%]	$\pm 0,49$	$\pm 0,62$	$\pm 0,30$
Anzahl n	13	10	13

Die *Wiederholpräzisionen* der Messwerte für Etiocholanolon-Acetat aus jeweils zehn beziehungsweise 13 Sequenzen liegen bei 0,49 ‰ für *Spiked Water*, 0,62 ‰ für den Kontrollurin und 0,30 ‰ für den *GC/C-IRMS-Standard*. Die Standardabweichung für die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Etiocholanolon-Acetates nach der Aufarbeitung des Kontrollurins ist signifikant größer als die der *GC-IRMS-Standard*-Werte (Varianzen-F-Test, $p < 0,05$). Die absoluten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte können nicht miteinander verglichen werden, da die Etiocholanolon-Quellen aus den dargestellten Messreihen unterschiedlich sind. Das Etiocholanolon des *Spiked Waters* stammt aus einem Etiocholanolon-Glucuronid-Standard, jenes aus dem Kontrollurin ist natürlichen Ursprungs und für den *GC/C-IRMS-Standard* wurde ein Etiocholanolon-Standard eingesetzt.

Zur Bestimmung der Richtigkeit der nach der Probenaufarbeitung gemessenen Isotopenverhältnisse wurden Standardlösungen mit einigen Zielanalyten aufgearbeitet (*Spiked Water*). Die hierbei erhaltenen Messwerte wurden mit denen vor der Aufarbeitung (EA-IRMS) verglichen (Tabelle 4.12). Die Unterschiede zwischen den Werten vor und nach der Aufarbeitung sind für alle Analyten signifikant. Bei Epitestosteron, DHEA-Sulfat und DHEA betragen sie zwischen 2,5 und 2,6 ‰, bei Etiocholanolon 3,6 ‰ und bei 5-Androsten-3 α ,17 β -diol 4,3 ‰. In Kapitel 4.1 wurde der Einfluss der Acetylierung auf die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der einzelnen Steroide berechnet. Zieht man die durch die Acetylierung verursachte Differenz von der Differenz, die nach der gesamten Aufarbeitung gemessen wurde, ab, erhält man Abweichung vom EA-IRMS-Wert zwischen + 0,07 und –0,49 ‰.

Tabelle 4.12: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einiger Standardsubstanzen vor ihrer Aufarbeitung (EA-IRMS) und nach der Aufarbeitung (GC-C-IRMS) gemessen

	Epitestosteron	DHEA-Sulfat	DHEA	Etiocholanolon	5-Androsten-3 α ,17 β -diol
EA-IRMS [‰]	–33,01	–29,99	–30,73	–21,94	–29,98
Stabw [‰]	0,024	0,086	0,053	0,066	0,009
n	5	5	5	5	5
GC-C-IRMS [‰]	–35,54	–32,62	–33,22	–25,55	–34,26
Stabw [‰]	$\pm 0,513$	$\pm 0,636$	$\pm 0,109$	$\pm 0,109$	$\pm 0,253$
n	11	11	10	10	10
GC-C-IRMS – EA-IRMS [‰]	–2,53	–2,63	–2,49	–3,61	–4,28
Einfluss Acetylierung [‰]	–2,35	–2,18	–2,18	–3,12	–4,35
Restdifferenz [‰]	–0,18	–0,45	–0,31	–0,49	+0,07

Die Unterschiede nach Abzug des Acetylierungseinflusses sind bei DHEA mit –0,31 ‰ und Etiocholanolon mit –0,49 ‰ wegen der niedrigen Standardabweichungen signifikant ($p < 0,05$), bei den übrigen Analyten jedoch nicht.

Die Richtigkeit der Messwerte nach der Probenaufarbeitung konnte nicht an Matrixproben untersucht werden, weil keine Urinmatrix ohne die zu untersuchenden Analyten zur Verfügung stand, um diese als Standards mit bekannten $\delta^{13}\text{C}$ -Werten zudotieren zu können.

5 Diskussion

Es wurden in dieser Arbeit sowohl die Probenaufarbeitung von Steroiden aus Rinderurin als auch zahlreiche Parameter der GC/C-IRMS-Methode hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Genauigkeit der gewonnenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte untersucht. Meier-Augenstein hat in verschiedenen Publikationen potenzielle Quellen von Isotopendiskriminierung während der GC/C-IRMS-Messung selbst und auch bei Probenaufarbeitungsschritten genannt [Meier-Augenstein 1999; Meier-Augenstein 2002; Meier-Augenstein 2004], die hier anhand der Steroide aus Rinderurin und teilweise anhand von Alkanen näher untersucht wurden.

5.1 Probenaufarbeitung gesamt

Nach der Aufarbeitung einiger Standards in wässriger Lösung analog zur Probenaufarbeitung der Rinderurine wurden für Epitestosteron, DHEA und DHEA aus DHEA-Sulfat mit der GC/C-IRMS zwischen 2,5 und 2,6 ‰ negativere $\delta^{13}\text{C}$ -Werte gemessen als ohne Aufarbeitung mit der EA-IRMS. Bei 5-Androsten-3 β ,17 α -diol und Etiocholanolon beträgt der Unterschied –4,3 ‰ bzw. –3,6 ‰. Die Differenz zwischen EA-IRMS- und GC/C-IRMS-Messungen verschiedener Steroid-Acetate betrug in einem anderen Versuch zwischen –0,08 und +0,92 ‰, wobei die GC/C-IRMS-Ergebnisse meistens positiver als die Ergebnisse der EA-IRMS waren. Die Verwendung unterschiedlicher Messsysteme kann die oben genannten Differenzen deshalb nicht erklären. Die anschließende Untersuchung der einzelnen Aufarbeitungsschritte ergab, dass der größte Einfluss von der Derivatisierung der Substanzen ausgeht. Nach der Korrektur der Messwerte um die von der Derivatisierung verursachte Verschiebung der Isotopenverhältnisse liegen die Unterschiede bei –0,5 bis +0,1 ‰. Diese Unterschiede sind nicht größer als die *Methodenpräzision* und liegen in derselben Größenordnung wie die Einflüsse der Aufarbeitung in anderen Arbeiten. Baume et al. [2006] untersuchten die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einiger für das Humandoping relevanter Steroide wie z.B. Testosteron und Etiocholanolon vor und nach der Probenaufarbeitung für die Messung mit der GC/C-IRMS. Die Probenaufarbeitung ähnelt mit einer Festphasenextraktion (C18) und einer Hydrolyse gefolgt von einer weiteren Festphasenextraktion (C18) und der Acetylierung der Steroide der hier untersuchten Methode. Die Unterschiede in den gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werten vor und nach einer Extraktion aus Urin lagen für alle Steroide unter 0,7 ‰. Auch Saudan et al. [2004] ermittelten nach einer vergleichbaren Aufarbeitung von menschlichem Urin für Androstenol, Etiocholanolon, 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol, 5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol und Androsteron Unterschiede von unter 0,5 ‰.

5.1.1 Solvolyse und Flüssig/flüssig-Extraktion

Auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des aus DHEA-Sulfat erhaltenen DHEA hatte die Solvolyse mit der anschließenden Flüssig/flüssig-Extraktion mit Pentan keinen messbaren Einfluss. Der Unterschied der vor und nach der Solvolyse gemessenen Isotopenverhältnisse war mit –0,37 ‰ nicht signifikant. Bei der Solvolyse wird der Sulfat-Rest mit Hilfe von Ethylacetat und Schwefelsäure vom Steroidgerüst abgetrennt. Da der Sulfat-Rest keinen Kohlenstoff enthält, konnte keine Änderung der Isotopenverhältnisse durch stöchiometrische Veränderungen eintreten. Aber auch eine theoretisch mögliche Beeinflussung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes durch nicht vollständigen Umsatz des DHEA-Sulfates mit einer schnelleren Reaktion der leichteren Moleküle konnte durch diese Untersuchung ausgeschlossen werden. Die Solvolyse lief unter den untersuchten Bedingungen entweder vollständig ab oder führte bei Unvollständigkeit nicht zu einer Isotopenfraktionierung.

5.1.2 Fraktionierung während der HPLC

Bei Untersuchungen von Unterfraktionen der HPLC-Peaks einiger Steroide und Steroid-Acetate sind deutliche Isotopenfraktionierungen innerhalb der HPLC-Peaks gemessen worden. Während bei der Normalphase-HPLC ($N[CH_3]_2$) die leichteren Isotopomere zuerst eluierten, waren bei der *Reversed-Phase*-HPLC (RP-18) die schweren Isotope im vorderen Teil des HPLC-Peaks zu finden. Bei der Normalphase wurden zwischen den beiden Hauptfraktionen vergleichsweise geringe Differenzen von 1,4 ‰ bei DHEA und 1,3 ‰ bei Epiandrosteron gemessen. Zwischen dem Anfang und dem Ende der Peaks lagen bei DHEA und bei Epiandrosteron jeweils 3,4 ‰. Für DHEA konnte dieses Ergebnis innerhalb des ISOSTER-Projektes in einem anderen Labor bestätigt werden [uisson et al. 2005]. Die Differenzen zwischen der ersten und zweiten Peakhälfte bei der *Reversed Phase* waren mit 3,7 ‰ für Androstandiol-Diaceat und 4,7 ‰ für Epitestosteron-Acetat deutlich höher. Zwischen dem Anfang und dem Ende des Peaks liegt bei Androstandiol-Diacetat eine Differenz von 9,3 ‰ und bei Epitestosteron-Acetat von 14,3 ‰. Buisson et al. [2005] stellten mit den gleichen HPLC-Säulen für DHEA-Acetat eine Differenz zwischen den Peakenden von 17 ‰ und für 17α -Estradiol von 18 ‰ fest.

Aufgrund der in diesem Fallbeispiel schmalen Peaks und der moderaten Unterschiede in den Isotopenzusammensetzungen im vorderen und hinteren Peakteil ist bei der Normalphasen-HPLC eher keine große Verfälschung des mit der GC/C-IRMS gemessenen $\delta^{13}C$ -Wertes zu erwarten. Bei der als Zweites durchgeführten *Reversed-Phase*-HPLC ist allerdings zum einen die Wahrscheinlichkeit größer, einen Teil des relativ breiten Peaks abzuscheiden, während man die Analyten von unerwünschten Begleitstoffen trennt. Zum anderen ist hier auch die Isotopenfraktionierung innerhalb eines Peaks ausgeprägter. Im Falle des Androstandiol-Acetates würde der $\delta^{13}C$ -Wert um $-0,6$ ‰ bzw. um $+0,4$ ‰ verfälscht, wenn nur die ersten 9 oder die letzten 11 % des HPLC-Peaks abgeschnitten würden. Bei Epitestosteron-Acetat bewegen sich mögliche Abweichungen mit $-0,5$ ‰ bei einem Wegschnitt der vordersten 7 % und $+0,5$ ‰ bei einem Wegfall der hinteren 17 % in derselben Größenordnung. Ohne das letzte Drittel des Peaks ist der $\delta^{13}C$ -Wert von Epiandrosteron-Acetat $1,7$ ‰ positiver als im Gesamtpeak.

Caimi und Brenna [1997a] untersuchten die Isotopenverhältnisse innerhalb eines Methylpalmitatpeaks auf einer *Reversed-Phase*-HPLC. Zwischen dem vordersten und hintersten Teil des Peaks ermittelten sie Unterschiede von bis zu 7 ‰, wobei im vorderen Teil der Peaks die ^{13}C -Isotope angereichert sind. Aguilera et al. [1999] weisen auf das Risiko der Isotopen-diskriminierung während der HPLC hin und ersetzen die HPLC-Aufreinigung der Steroid-Acetate durch eine Flüssig/flüssig-Extraktion. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Braunsdorf et al. [1993] bei der Untersuchung der Fraktionierung von Octanal, Decanal und Dodecanal auf einer *Reversed-Phase*-Säule. Die Unterschiede zwischen der ersten und der zweiten Peakhälfte betragen zwischen 4,6 und 7,2 ‰.

Die durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass während der HPLC-Aufarbeitung von Steroiden und deren Acetaten eine Isotopenfraktionierung auftritt, die den $\delta^{13}C$ -Wert deutlich verfälschen kann, wenn die Analyten nicht quantitativ erfasst werden. Diese potenzielle Isotopendiskriminierung hat allerdings keinen Einfluss auf die gemessene Isotopenzusammensetzung, wenn die HPLC-Peaks der Ziel-Analyten vollständig ausgeschnitten werden können, wie es in der Aufarbeitung der Steroide aus Rinderurin der Fall war.

5.1.3 Einfluss der zweiten HPLC-Aufreinigung

Die Androgenfraktion mit den Analyten Etiocholanolon, Epitestosteron, 5-Androsten-3 β ,17 α -diol und 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol enthielt nach der ersten HPLC-Aufreinigung häufig noch zu viele unerwünschte Begleitsubstanzen für die GC/C-IRMS und wurde deshalb ein zweites Mal mittels HPLC gereinigt. In der näher untersuchten Urinprobe eluierte nach dem ersten HPLC-Schritt zwischen 5-Androsten-3 β ,17 α -diol und 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol ein Störpeak, der teilweise mit 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol überlagerte. Für 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol wurde nach der zweiten HPLC ein 4,7 ‰ negativerer $\delta^{13}\text{C}$ -Wert gemessen als ohne diesen Aufarbeitungsschritt. Außerdem verringerte sich die Standardabweichung von 1,1 ‰ auf 0,2 ‰. Der den Analyten überlagernde Peak führte also nicht nur zu einem falschen Messwert, sondern verschlechterte auch die Präzision der Messung. Auch der Messwert des 5-Androsten-3 β ,17 α -diol ist nach der zusätzlichen Aufarbeitung negativer als zuvor (um 0,4 ‰). Möglicherweise wurde auch er zuvor durch den positiveren Störpeak beeinflusst. Etiocholanolon und Epitestosteron hingegen konnten schon vor der zweiten HPLC ohne sichtbare Beeinträchtigung mittels GC/C-IRMS vermessen werden. Die nach weiterer HPLC-Aufreinigung gemessenen Isotopenverhältnisse weichen mit 0,9 ‰ (Etiocholanolon) und 0,8 ‰ (Epitestosteron) positiveren $\delta^{13}\text{C}$ -Werten dennoch signifikant von denen mit nur einem HPLC-Schritt ab. Die Ursache hierfür könnte sein, dass durch die zweite Aufreinigung Verunreinigungen entfernt wurden, die vorher eventuell vorhanden, aber im GC/C-IRMS-Chromatogramm nicht sichtbar waren. Isotopenfraktionierung während der zweiten HPLC scheint als Ursache unwahrscheinlich, da die Analyten in diesem Aufreinigungsschritt quantitativ erfasst werden konnten. Da die Lösungen vor und nach einer erneuten HPLC-Aufreinigung innerhalb einer GC/C-IRMS-Sequenz unmittelbar hintereinander unter identischen Bedingungen gemessen wurden, scheiden systematische Fehler während der Vermessung ebenfalls als mögliche Ursache aus.

5.1.4 Einfluss der Derivatisierung

Im ISOSTER-Projekt wurden alle Steroide vor ihrer Vermessung mit der GC/C-IRMS acetyliert. Dadurch wurde eine Verdampfung und gaschromatographische Trennung der Analyten bei gleichzeitig hoher Stabilität der Analyten ermöglicht. Die Änderung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte durch die Addition weiterer C-Atome wurde aus den Isotopenverhältnissen der Steroide und des zur Derivatisierung verwendeten Essigsäureanhydrids über eine einfache Massebalancegleichung berechnet. Die theoretische Abweichung vom nicht acetylierten Steroid beträgt je nach Analyten zwischen $-0,97$ und $+0,14$ ‰. Die mit der GC/C-IRMS gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von dreizehn Steroidstandards nach ihrer Acetylierung sind um 1,8 bis 4,5 ‰ negativer als der theoretisch berechnete Wert, der die Addition von C-Atomen berücksichtigt. Diese Differenz wird durch den kinetischen Isotopeneffekt (KIE) verursacht und ist bei den Ketonen mit $-1,8$ bis $-2,8$ ‰ in etwa halb so groß wie bei den Diolen mit $-3,9$ bis $-4,5$ ‰. Daraus lassen sich für die verschiedenen Steroide Korrekturfaktoren von $-48,7$ bis $-60,2$ ‰ für jedes während der Acetylierung addierte C-Atom berechnen. Die Isotopeneffekte (KIE) für das gesamte Molekül betragen bei der Acetylierung der Steroide zwischen 1,035 und 1,058. Die Isotopeneffekte und die dadurch zu berechnenden Korrekturfaktoren und Differenzen sind unter gleichbleibenden Bedingungen reproduzierbar. Bei Änderungen der Acetylierungsreaktionen oder der gaschromatographischen Bedingungen müssen diese Werte allerdings neu berechnet werden.

Die Voraussetzung für das Auftreten kinetischer Isotopeneffekte während der Derivatisierung ist die nicht quantitative Umsetzung der Reaktanden im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion. Ursache für kinetische Isotopeneffekte sind die unterschiedlichen Vibrationsenergielevels der Bindungen zwischen den Atomen. Die Bindungen mit schwereren Atomen sind stärker, haben also eine größere potenzielle Energie. Das führt zu unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten für Reaktionen mit unterschiedlichen Isotopen. Isotopen-

effekte werden in primäre und sekundäre Isotopeneffekte unterteilt. Bei der Änderung einer Kohlenstoffbindung im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt einer Reaktion ist der primäre Isotopeneffekt der weitaus bedeutsamere. Für ^{13}C gegen ^{12}C beträgt der Isotopeneffekt (KIE) zwischen 1,01 und 1,10. Der sekundäre Isotopeneffekt hat die Substitution eines schwereren Isotopes in einer zur gespaltenen Bindung benachbarten Position zur Folge. Wegen der relativ kleinen Masse von Kohlenstoffatomen ist dieser Effekt hier nicht von Bedeutung [Rieley 1994; Meier-Augenstein 2002].

Theoretisch können neben der Änderung der Isotopenzusammensetzung aufgrund der Addition weiterer Kohlenstoffatome aus den Derivatisierungsreagenzien und den kinetischen Isotopeneffekten auch die Änderung der gaschromatographischen Bedingungen und die unvollständige Umsetzung des Ziel-Analyten eine Veränderung der gemessenen Isotopenverhältnisse verursachen. Diese beiden Phänomene konnten hier jedoch nicht gesondert untersucht und quantifiziert werden.

Der Einfluss der Acetylierung von Steroidhormonen auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Messwert wurde bisher wenig untersucht, obwohl es einige Veröffentlichungen zur GC/C-IRMS-Analytik von Steroiden gibt, in denen die Analyten vor der GC/C-IRMS-Analyse acetyliert wurden [Shackleton et al. 1997a; Ferchaud et al. 1998;]. Der Arbeitskreis von Aguilera und Becchi beobachtete ebenso wie Shackleton et al. [1997b] keine signifikante Änderung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Steroiden nach ihrer Acetylierung [Becchi et al. 1994; Aguilera et al. 1996; Aguilera et al. 1999]. Allerdings sind in den Veröffentlichungen keine konkreten Daten zu finden, die auf eine systematische Untersuchung dieses Phänomens schließen lassen. Prevost et al. [2001] fanden nach der Acetylierung von Steroiden neben den Diacetaten auch mono- und unacetylierte Steroide und beschrieben diese Derivatisierung deshalb als instabil und unzureichend. Mathurin et al. [2001] sowie Desroches et al. [2002] und Saudan et al. [2004] berechnen Korrekturfaktoren für die Acetylierung von Steroidhormonen, die zwischen $-48,8$ und $-50,1$ ‰ liegen. Diese Werte liegen im Bereich jener, die in dieser Arbeit berechnet wurden. Allerdings handelt es sich lediglich um pauschale Korrekturwerte, die für alle Steroide verwendet werden, und nicht, wie in dieser Arbeit, um einen Korrekturfaktor für jeden Analyten. In den zitierten Arbeiten wird zudem der Korrekturfaktor als $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Acetylierungsreagenzes angegeben und nicht, wie eigentlich richtig, als Korrekturfaktor, der den kinetischen Isotopeneffekt berücksichtigt. Eine experimentelle Ermittlung der Isotopenzusammensetzung der Acetylierungsreagenzien wurde in den genannten Arbeiten nicht vorgenommen. Auch Jones et al. [1991] berechneten einen Korrekturfaktor, den sie ebenso mit dem $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der aus dem Derivatisierungsreagenz stammenden C-Atome gleichsetzten, und korrigierten auf diese Weise die Einflüsse einer Trimethylsilylierung auf u.a. Cholesterol und 24-Ethylcholestanol. In einer weiteren Arbeit wird der Einfluss der gesamten Aufarbeitung inklusive einer Acetylierung bestimmt ($<0,7$ ‰), nicht jedoch die Derivatisierung alleine [Baume et al. 2006].

Für einige andere Analyten wurden die Einflüsse der Acetylierung und anderer Derivatisierungen auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert jedoch bereits untersucht. Dautraix et al. [1996] maßen mittels EA-IRMS und GC/C-IRMS zwischen $3,7$ und $4,0$ ‰ negativere Werte als theoretisch berechnet für acetyliertes Acetaminophen. Für die Acetate von verschiedenen Aminosäuren wurden zwischen $3,2$ und $6,1$ ‰ negativere Isotopenverhältnisse als berechnet mittels GC/C-IRMS gemessen [Demmelmaier und Schmidt 1993]. Daraus ergeben sich für den kinetischen Isotopeneffekt (KIE) Werte von $1,030$ bis $1,062$, die in derselben Größenordnung liegen wie die der hier untersuchten Steroid-Acetate. Die Abweichungen der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Aminosäureisopropylestern vom berechneten Wert liegen zwischen $+0,6$ und $-1,6$ ‰, während sie für dieselben Aminosäuren als Trifluoressigsäure-Isopropylester zwischen $-1,0$ und $-3,3$ ‰ liegen [Silfer et al. 1991]. Aus diesen Daten ermittelte Rieley [1994] kinetische Isotopeneffekte (KIE) zwischen $1,013$ und $1,025$. Corr et al. [2007] untersuchten den kinetischen Isotopeneffekt bei sieben verschiedenen Derivatisierungsmethoden an 15 Aminosäuren und erhielt für KIE Werte zwischen $1,004$ und $1,067$. Metges und Daenzer [2000] ermittelten für 14 Amino-

säuren nach einer Veresterung in Abhängigkeit von der Derivatisierungsmethode zwischen 1,13 und 2,52 ‰ (NPP-Ester) bzw. zwischen 2,36 und 3,97 ‰ negativere $\delta^{13}\text{C}$ -Werte als berechnet. In einer weiteren Arbeit wurden für die Alditolacetate von Monosacchariden zwischen 12,3 und 13,9 ‰ negativere $\delta^{13}\text{C}$ -Werte gemessen als zuvor berechnet [Docherty et al. 2001]. Macko et al. [1998] maßen mit der gleichen Derivatisierung an drei Monosacchariden 9,9 bis 11,1 ‰ negativere Werte als theoretisch ermittelt. In allen genannten Arbeiten wurden die Derivatisierungen als stabil und die resultierenden Isotopeneffekte als reproduzierbar dargestellt, weshalb diese über für jede Substanz individuelle Korrekturfaktoren herausgerechnet werden können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit den Resultaten derjenigen Arbeitsgruppen überein, welche die kinetischen Isotopeneffekte während einer Derivatisierung für reproduzierbar und rechnerisch korrigierbar halten. Daten für die Acetylierung einzelner Steroide lagen bisher nicht vor.

Die Acetylierung hat von allen hier untersuchten Parametern und Aufarbeitungsschritten den größten Einfluss auf den gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert. Wenn die absoluten Isotopenverhältnisse von Interesse sind, ist deshalb eine genaue Bestimmung von Korrekturfaktoren für jeden Analyten unvermeidlich. Wenn lediglich das Verhältnis zweier Isotopenverhältnisse zueinander bestimmt werden soll, können in manchen Fällen auch die nicht korrigierten Messwerte miteinander verglichen werden. Werden im Fall der Steroid-Analytik aber beispielsweise die Isotopenverhältnisse des Testosteronvorläufers DHEA und des Testosteronmetaboliten 5α -Androstan- $3\beta,17\alpha$ -diol miteinander verglichen, so entsteht alleine durch die Acetylierung eine Differenz von ungefähr 2,5 ‰.

5.1.5 Betrachtung der Präzision bei der Gesamtaufarbeitung

Die Standardabweichung der Messwerte nach einer zehnmaligen Injektion einer Standardlösung lag für die Androgene DHEA, Epiandrosteron, Etiocholanolon, Epitestosteron, 5α -Androstendiol und 5α -Androstandiol bei $\pm 0,04$ bis $\pm 0,15$ ‰. Die fünf bis siebenfache Vermessung einer Urinprobe mit denselben Analyten ergab etwas höhere Standardabweichungen von 0,02 bis 0,57 ‰. Diese Werte beschreiben die *Messpräzision* des verwendeten GC/C-IRMS-Systems. Die Präzision der Gesamtmethode einschließlich der Aufarbeitung und der Matrixeffekte (*Methodenpräzision*) wurde durch die Aufarbeitung und Vermessung von je zehn Teilproben von fünf Urinen bestimmt, wobei unter guten Bedingungen Standardabweichungen von $\pm 0,10$ bis $\pm 0,80$ ‰ für die oben genannten Steroide erreicht wurden.

Veröffentlichte Vergleichswerte zu Präzisionen von Messungen von Steroiden sind rar. Meist ist nur die *Messpräzision* der GC/C-IRMS-Methode angegeben oder es ist nicht eindeutig ersichtlich, ob es sich um die *Methoden-* oder die *Messpräzision* handelt. Aguilera et al. [2001] bestimmten die *Messpräzision* des verwendeten GC/C-IRMS-Instrumentes durch die viermalige Injektion zweier Urinextrakte und erhielten für die acetylierten Steroide 5β - und 5α -Androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol und 5β -Pregnan- $3\alpha,20\alpha$ -diol Werte zwischen $\pm 0,08$ und $\pm 0,59$ ‰. Sie lagen damit im selben Bereich wie in dieser Arbeit ermittelt. Ferchaud et al. [1998 und 2000] akzeptierten für die Dreifachbestimmung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von DHEA, Epitestosteron und Etiocholanolon aus Rinderurin eine Standardabweichung von $\pm 0,5$ ‰. Saudan et al. [2004] erhielten für die Substanzen Androstenol, Etiocholanolon, 5α -Androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol, 5β -Androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol und Androsteron Standardabweichungen zwischen $\pm 0,16$ und $\pm 0,29$ ‰, wenn sie 5 Aliquote am selben Tag aufarbeiteten und jeweils einmal injizierten (*within assay*). Für dieselben Analyten lagen die Standardabweichungen zwischen $\pm 0,16$ und $\pm 0,59$ ‰, wenn 16 Aliquote innerhalb eines Jahres jeweils einmal injiziert wurden (*between assay*). Balisz et al. [2004] bestimmten die Isotopenzusammensetzung von DHEA, Etiocholanolon, Epitestosteron und Testosteron aus dem Urin von vier jungen Bullen mittels GC/C-

IRMS mit *large volume injection* ohne vorherige Derivatisierung. Für eine reine Standardlösung ermittelten sie für die *Messpräzision* Standardabweichungen von $\pm 0,47$ bis $\pm 1,27$ % ($n = 24$), während die *Methodenpräzision* für die einzelnen Steroide bei $\pm 0,71$ bis $\pm 2,10$ % lag. Bei der Bestimmung der Isotopenzusammensetzung von Androstandiol und Cholesterol aus der Galle von Rindern maßen Mason et al. [1998] bei Zwei- bis Sechsfach-Bestimmungen Standardabweichungen von $\pm 0,01$ bis $\pm 2,02$ %. Prevost et al. [2001] untersuchten den Einfluss der Silylierung der Steroide auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert und die Präzision für die Steroide DHEA und 19-Nortestosteron. Die *Methodenpräzision* lag abhängig von der Derivatisierung für DHEA bei $\pm 0,92$ bzw. $\pm 0,35$ % und für 19-Nortestosteron bei $\pm 1,51$ bzw. $\pm 0,32$ %. Der Unterschied wird mit einer effektiveren Derivatisierung und einer besseren Stabilität der Derivate für die letztere Methode erklärt. Zwischen der ebenfalls getesteten Acetylierung der Steroide und der effektiveren Silylierung konnten Prevost et al. [2001] keine signifikanten Unterschiede in der Präzision finden. Aus dem Gebiet des Humandopings werden folgende Angaben zur Präzision von GC/C-IRMS-Messungen von Steroiden in Urin getroffen: Die Arbeitsgruppe um Aguilera et al. [1996] und Becchi et al. [1994] beschreiben $\pm 0,4$ % als typische *Messpräzision* (bei zwei- bis dreifacher Injektion) für die $\delta^{13}\text{C}$ -Bestimmung von DHEA, Etiocholanolon und anderen Steroiden nach der Isolation aus menschlichem Urin und Acetylierung. Shackleton et al. [1997] ermittelten für Doppelinjektionen mittlere Standardabweichungen von $\pm 0,21$ % für Pregnandiol, $\pm 0,11$ % für 5α -Androstandiol und $\pm 0,25$ % für 5β -Androstandiol aus menschlichem Urin.

Die *Messpräzision* für Standardlösungen ist in dieser Arbeit besser als veröffentlichte Vergleichswerte, während die *Messpräzision* für Urinproben mit den publizierten Werten vergleichbar ist. Meier-Augenstein [1999a] gibt eine pauschale durchschnittliche Messpräzision von 0,3 % für GC/C-IRMS-Messungen an, die in dieser Arbeit für matrixbelastete Proben durchschnittlich erreicht wurden. Die *Methodenpräzision* ist mit 0,10 bis 0,80 % analyt- und matrixabhängig und ebenfalls mit veröffentlichten Werten vergleichbar.

5.2 Probeninjektion

Sowohl bei den untersuchten Steroid-Acetat- als auch bei den Alkanen wurden beim Vergleich der Injektionsgeschwindigkeiten $1\ \mu\text{l/s}$, $50\ \mu\text{l/s}$ und $100\ \mu\text{l/s}$ teilweise große Unterschiede in den Peakflächen der Analyten gemessen. Die Peakflächen der mit $1\ \mu\text{l/s}$ injizierten Analyten DHEA-Acetat, Estron-Acetat, Testosteron-Acetat, 5α -Cholestan und 17β -Estradiol-Diacetat betragen 42,7 bis 54,9 % der Flächen nach einer Injektion mit $50\ \mu\text{l/s}$. Für das zuerst eluierende 5α -Androstan- 3β -ol wurde hingegen kein Unterschied festgestellt, was daran liegen könnte, dass der Siedepunkt des 5α -Androstan- 3β -ol deutlich niedriger ist als der der anderen untersuchten Steroide, sodass die Substanz durch schnelles Verdampfen vollständig auf die Säule gelangt. Grob [2001] beschreibt die Diskriminierung hochsiedender Substanzen bei zu langsamer Injektion und begründet sie damit, dass bei einer langsamen Injektion der Verdampfungsprozess wichtiger wird als das mechanische Herausdrücken der Probe aus der Spritze. Bei den Alkanen war eine starke Abhängigkeit der Peakflächen von der Kettenlänge zu beobachten. Bei einer Injektionsgeschwindigkeit von $1\ \mu\text{l/s}$ wurde mit zunehmender Kettenlänge die Peakfläche kleiner. Triacontan (C30) hatte nur 13,9 % der Fläche bei einer Injektionsgeschwindigkeit von $50\ \mu\text{l/s}$. Die Ergebnisse der mit den unterschiedlichen Geschwindigkeiten gemessenen Isotopenverhältnisse zeigen jedoch, dass die Diskriminierung der Steroide bei geringen Injektionsgeschwindigkeiten nicht in gleichem Maße mit einer Isotopenfraktionierung einhergeht. Von den Analyten des Steroid-Acetat-Standards wurden bei Estron-Acetat bei $1\ \mu\text{l/s}$ um 0,6 % positivere Werte gemessen als bei einer schnelleren Injektion, also die leichteren Isotope diskriminiert, während bei Testosteron-Acetat um 0,8 % negativere Werte gemessen wurden, also die schweren Isotope diskriminiert wurden. Für dieses unterschiedliche Verhalten von sehr ähnlichen Analyten wurde keine Ursache gefunden. Bei den Alkanen wurden ab dem Hexacosan (C26) mit einer zu

langsamen Injektion zwischen 0,8 und 1,4 ‰ negativere Isotopenverhältnisse gemessen. Das bedeutet, dass wie auch beim Testosteron-Acetat die schweren Isotope durch die zu langsame Verdampfung der Substanzen diskriminiert wurden. Bei den Alkanen wurde dieser Effekt allerdings erst ab einem Siedepunkt von ca. 357 °C beobachtet.

Die Variation der Injektionstemperatur um ± 30 °C ausgehend von 250 °C führte weder bei den Alkanen noch bei den Steroid-Acetaten zu messbaren Unterschieden in den Isotopenverhältnissen. Bei den höhersiedenden Alkanen war allerdings die Peakfläche bei 280 °C signifikant größer als bei niedrigeren Injektortemperaturen, was sich mit den Ausführungen von Grob [2001] deckt, der die mengenmäßige Diskriminierung langkettiger Alkane im Injektor selbst bei sehr hohen Temperaturen von 400 °C beschreibt.

Die Wahl des Liners beeinflusste bei den Steroid-Acetaten die Größe der Peakflächen deutlich, die Unterschiede zwischen einem deaktivierten *Splitless*-Liner (Liner 1) und einem mit Glaswolle gefüllten Universal-Liner (Liner 2) lagen unter sonst identischen Bedingungen zwischen 20 und 40 %. Die Differenzen in den gemessenen Isotopenwerten hingen von der Retentionszeit der Analyten ab. Die zuerst eluierenden Analyten hatten mit dem Universal-Liner bis zu $-0,3$ ‰ negativere $\delta^{13}\text{C}$ -Werte als mit dem *Splitless*-Liner, während es sich bei den später eluierenden Substanzen mit bis zu $+0,6$ ‰ genau umgekehrt verhielt. Da die Abweichungen zwischen den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von Analyt zu Analyt unterschiedlich sind, müssen alle zu vergleichenden Messungen mit dem gleichen Linertypen durchgeführt werden.

Das Herabsetzen der *Purgetime* von 1,5 min auf 0,1 min hatte sowohl bei den Steroiden als auch bei den Alkanen eine Verringerung der Peakflächen von um bis 90 % zur Folge. Bei einer *Purgetime* von 0,5 min betrug die Flächen ungefähr 50 % derjenigen bei 1,5 min und mit einer einminütigen *Purgetime* 73 bis 86 %. Eine Erhöhung der *Purgetime* auf 2,0 min führte im Durchschnitt zu gleichen Peakgrößen wie 1,5 min. Mit 0,1 min *Purgetime* wurden für die untersuchten Steroide zwischen 0,3 und 5,8 ‰ negativere Isotopenverhältnisse gemessen als mit 1,5 min. Vier von sechs Unterschieden waren trotz der schlechten Präzisionen für die Messungen bei 0,1 min signifikant. Bei den Alkanen wurden mit 0,1 min bis zu 0,7 ‰ negativere Isotopenverhältnisse gemessen. Die Unterschiede waren jedoch aufgrund der großen Messunsicherheit nicht signifikant. Es kommt also bei einigen Substanzen zu einer Isotopenfraktionierung, wenn aufgrund einer zu kurzen *Purgetime* nicht die gesamte Probe auf die Säule gelangt, wobei die schweren Isotope diskriminiert werden. Bei allen untersuchten Analyten sind die Standardabweichungen der Messwerte bei einer *Purgetime* von 0,1 min im Vergleich zu den anderen Einstellungen sehr groß.

Meier-Augenstein [1997] empfiehlt, den Splitter 10 s nach der Injektion zu öffnen, um ein Peak tailing, das häufig bei der *Splitless*-Injektion auftritt, zu vermeiden. Dies entspricht einer *Purgetime* von 0,17 min, die bei den hier untersuchten Steroid-Acetaten zu signifikanten Verringerungen der Peakfläche und Veränderungen der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte führte und deshalb für diese Anwendung nicht praktikabel ist.

Es wurden weder beim Vergleich von *Split*- und *Splitless*-Injektionen noch mit verschiedenen *Split*-Verhältnissen signifikante Unterschiede in den gemessenen Isotopenverhältnissen erhalten. Die Abweichungen betrugen zwischen einer *Splitless*- und einer *Split*-1:20-Injektion in Abhängigkeit vom untersuchten Steroid zwischen 0,04 und 0,59 ‰. Meier-Augenstein [1997] empfiehlt für die GC/C-IRMS-Analytik ausschließlich splitlose Probenaufgabe, da es bei einer *Split*-Injektion zu Isotopenfraktionierungen im Injektor kommen kann. Diese Aussage konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Eine pauschale Empfehlung zur Art der Injektion kann nicht getroffen werden. Glaser und Amelung [2002] verglichen die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Aminosäuren-PFP-Isopropylester im *Splitless*-Modus und mit einem *Split* von 1:12. Dabei erhielten sie mit einem Splitfaktor von 1:12 9,2 ‰ negativere bis 9,7 ‰ positivere Werte als mit einer *Splitless*-Injektion. Bei zehn flüchtigen organischen Substanzen wie z.B. Benzol und Tetrachlormethan ermittelten Zwank et al. [2003] nach einer Injektion mit einem

Splitfaktor von 1:50 um $-2,31$ bis $+1,12$ ‰ abweichende $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zu denen nach einer *Splitless*-Injektion. Mit Ausnahme eines Wertes waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant. Im Gegensatz zu Ergebnissen von Versuchen mit anderen Analyten wurde in dieser Arbeit keine Isotopendiskriminierung der Steroid-Acetate bei einer *Split*-Injektion beobachtet.

Bei allen Variationen der Injektionsbedingungen, die eine Änderung der Peakfläche nach sich ziehen, kann ein Unterschied der gemessenen Isotopenverhältnisse sowohl durch die Diskriminierung der leichteren oder schwereren Isotopomere im Injektor als auch aufgrund der mengenabhängigen Isotopendiskriminierung zustande kommen. Werden aufgrund der Analytverluste im Injektor sehr kleine Peaks gemessen, besteht die Gefahr, dass man außerhalb des sogenannten linearen Bereichs misst und die Messwerte deshalb verschoben sind. Beide Phänomene können sich hierbei sowohl addieren als auch bei gegenläufigen Effekten relativieren.

5.3 Gaschromatographische Einflüsse

Es wurden verschiedene Temperaturprogramme und Trägergasflüsse hinsichtlich ihres Einflusses auf die gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Steroid-Acetaten und Alkanen untersucht. Die für die Trennung der relevanten Steroide geeigneten und untersuchten Temperaturprogramme führten zu keinen signifikanten Unterschieden in den ermittelten Isotopenzusammensetzungen. Der Vergleich von zwei weiteren Temperaturgradienten, mit denen die Steroide und ihre Acetate aufgrund nicht ausreichender Trennleistung nur einzeln vermessen werden konnten, zeigte im Gegensatz dazu einen Einfluss auf die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte, der bei den underivatisierten Analyten mit Abweichungen von $0,3$ bis $1,9$ ‰ deutlicher war als bei den acetylierten Steroiden ($0,1$ bis $0,6$ ‰). Bei den Messungen der Alkanstandards war eine deutlichere Abhängigkeit der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von den gewählten Temperaturprogrammen zu erkennen. Bei der selbst hergestellten Alkan-Mischung mit Alkanen der Kettenlängen von C16 bis C32 betragen die Unterschiede zwischen den sich am meisten unterscheidenden Methoden je nach Alkan zwischen $0,7$ und $1,4$ ‰.

Die Abweichungen der Werte der einzelnen Alkane vom durch eine EA-IRMS-Messung erhaltenen Vergleichswert liegen durchschnittlich für alle untersuchten GC-Methoden für die einzelnen Alkane zwischen $0,1$ und $0,5$ ‰, wobei die GC/C-IRMS-Ergebnisse negativer als die EA-IRMS-Ergebnisse sind. Eine Abhängigkeit dieser Differenz von der Kettenlänge der Alkane konnte nicht beobachtet werden.

Anders verhielt es sich bei den Ergebnissen der Vermessung des Alkanstandards nach Schimmelmann, der mit Alkanen der Kettenlängen C16 bis C29 eine ähnliche Zusammensetzung hat wie die zuvor diskutierte Alkan-Mischung. Zusätzlich zu den GC-methodenbedingten Unterschieden, die je nach Alkan zwischen zwei Methoden bis zu $0,9$ ‰ betragen, wurden je nach Kettenlänge unterschiedlich große Differenzen zum Referenzwert beobachtet. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der kurzkettigeren Alkane sind bis zu $1,7$ ‰ negativer als der Referenzwert und nähern sich mit zunehmender Kettenlänge dem Vergleichswert an. Bei zwei GC-Methoden wurden ab einer Kettenlänge von C27 um bis zu $0,9$ ‰ positivere $\delta^{13}\text{C}$ -Werte als der Referenzwert gemessen. Da dieses Phänomen bei der selbst hergestellten Alkan-Mischung nicht auftrat, liegt die Vermutung nahe, dass die Ursache hierfür in der Messmethode, die für die Generierung der Referenzwerte des Alkanstandards nach Schimmelmann verwendet wurde, liegt. Die Referenzwerte wurden allerdings ebenfalls mit der EA-IRMS gemessen [Schimmelmann 2009], weshalb sich die Unterschiede nicht mit unterschiedlichen GC-Temperaturmethoden erklären lassen können.

Meier-Augenstein [1996b] bestimmte den Einfluss der gaschromatographischen Parameter Temperaturgradient und Trägergasfluss auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Fettsäuremethylestern (FA-

MEs). Mit der Verwendung eines GC/C-IRMS-Systems, das keine *time shift correction* gegen den *chromatographic isotope effect* durchführt, erhielt er in Abhängigkeit von der Säule und dem zur relativen Berechnung ausgewählten internen Standard mit der Änderung des Temperaturgradienten Unterschiede von 1,8 bis 3,3 ‰. Derselbe Versuch mit einem GC/C-IRMS-Instrument, das mit der Software ISODAT (mit *time shift correction*) betrieben wird, ergab lediglich Verschiebungen in den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von 0,13 bis 0,65 ‰. Die auch für diese Arbeit verwendete Software ISODAT kompensiert automatisch die chromatographische Trennung der Isotopomere.

Die schweren Isotope eluieren vor den leichten, wobei Parameter wie die Eigenschaften des Analyten und der Säule bedeutend sind. Die Differenzen in den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten zwischen der ersten und der zweiten Peakhälfte betragen bei den Steroiden bis zu 5,4 ‰. Eine Auswirkung auf die gemessene Isotopenzusammensetzung ist nur dann zu erwarten, wenn große Teile des Peaks nicht mitintegriert werden, was bei der GC/C-IRMS nicht üblich ist.

In Proben mit hoher Matrixbelastung und niedriger Analytkonzentration ist die automatische Erfassung und Subtraktion des Untergrundes mit der Software schwierig. In den untersuchten Urinproben wurden bei einigen Analyten Abweichungen von bis zu 2,6 ‰ gefunden. Deshalb wurden bei kritischen Proben alle Integrationen und *Background*-Korrekturen kontrolliert und gegebenenfalls manuell korrigiert. Auch Dautraix et al. [1995] erwähnen eine schwierige Interpretierbarkeit von $\delta^{13}\text{C}$ -Werten verhältnismäßig kleiner Probenpeaks auf hohem *background* und die Notwendigkeit einer zuverlässigen *Background*-Korrektur.

Der angewandte ^{17}O -Korrekturmodus hat auf den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der Analyten keinen signifikanten Einfluss.

Sowohl bei den Steroiden als auch bei den untersuchten Alkanen kann es bei Variationen der gaschromatographischen Parameter zu signifikanten Veränderungen in den gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werten kommen, die sich jedoch durch Konstanthalten aller Parameter vermeiden lassen. Mit welchen Einstellungen allerdings die richtigen Werte gemessen werden, konnte nicht abschließend geklärt werden, da keine zertifizierten Standardmaterialien für die GC/C-IRMS zur Verfügung standen. Einen Anhaltspunkt kann der Vergleich mit den EA-IRMS-Messwerten darstellen.

5.4 Combustion

In Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Sauerstoff im Oxidationsofen wurden je nach Analyt Unterschiede zwischen 3,5 und 10,8 ‰ gemessen, wobei die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte negativer werden, je weniger Sauerstoff vorhanden ist. Dies lässt darauf schließen, dass bei einem Sauerstoffmangel die Analyten nicht mehr vollständig verbrannt werden und vorrangig die leichten Isotopomere oxidiert werden. Es kommt bei einer Abnahme des verfügbaren Sauerstoffs zu einer Verkleinerung der Peaks, die jedoch nicht direkt mit der Veränderung der gemessenen Isotopenzusammensetzung korreliert.

In der Stabilisotopenanalytik sind die Isotopenverhältnisse der Analyten häufig nicht als Absolutwerte interessant, sondern in Verhältnis zu einer Vergleichssubstanz. Beim Nachweis eines illegalen Einsatzes von Steroiden wird der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert eines möglicherweise verabreichten Hormons (z.B. Testosteron) oder seiner Metaboliten mit dem $\delta^{13}\text{C}$ -Wert einer Vorläufersubstanz im Stoffwechsel verglichen. Es werden also Differenzen zwischen den Messwerten verschiedener Analyten gebildet. Bei einer Differenzbildung zwischen den Messwerten des 5α -Cholestan und denen des DHEA-Acetates jedes Laufes ergeben sich mit verschiedenen Sauerstoffsättigungen des Oxidationsofens Werte zwischen 10,1 und 19,0 ‰. Diese unter Extrembedingungen aufgenommenen Daten zeigen, dass es für die GC/C-IRMS-Analytik

essentiell ist, dass der Reoxidationszyklus so gewählt wird, dass alle Ziel-Analyten stabil und richtig gemessen werden können. Es reicht nicht aus, diese Stabilität anhand einer einzelnen Substanz der entsprechenden Stoffklasse oder sogar anhand von Gerätekontrollen mit anderen Substanzen zu untersuchen. Die Substanz DHEA-Acetat hatte sich als besonders empfindlich gegen sich verändernde Bedingungen erwiesen und wurde deshalb als Indikator für die Steroid-Analytik ausgewählt.

Auch Zwank et al. [2003] maßen große Abweichungen vom eigentlichen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert, wenn der Oxidationsofen nicht regelmäßig reoxidiert wurde. Bei chlorhaltigen Substanzen wie z.B. Dichlorethylen und Tetrachlormethan betrug diese Abweichungen zwischen $-0,93$ und $-8,95$ ‰, bei halogenfreien Analyten wurde hingegen kein Unterschied gemessen.

Um eine ausreichende Verbrennung aller Steroide zu gewährleisten, wurde der Oxidationsofen alle 80–100 Injektionen 12 h lang reoxidiert. Führt die Reoxidation zu keiner Stabilisierung der Messwerte, muss der Ofen ausgetauscht werden. Die Ursache ist häufig die Bildung von Kupfer-I-oxid (Cu_2O), welches durch seine leuchtend rote Farbe erkennbar ist und die Leistung des Oxidationsofens nachhaltig herabsetzt. Aguilera et al. [2001] oxidierten den Oxidationsofen für die Vermessung von Steroid-Acetat alle 30 Injektionen eine Stunde lang und wechselten den Ofen alle 500 Injektionen.

Eine Herabsetzung der empfohlenen Verbrennungstemperatur von 940 °C auf 840 °C wirkte sich nicht auf die gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Alkanen (C16 bis C32) aus. Bei einer Verminderung der Ofentemperatur um 320 °C wurden bei Steroid-Acetat Abweichungen von $-1,9$ bis $+4,8$ ‰ gemessen. Bei einer unvollständigen Verbrennung der Substanzen im Oxidationsofen aufgrund zu niedriger Temperaturen wurde eine Verschiebung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte in negativere Bereiche erwartet, wie auch bei einer unvollständigen Verbrennung aufgrund schlechter Sauerstoffversorgung beobachtet. Tatsächlich wurden aber die größeren Unterschiede in der entgegengesetzten Richtung gemessen. Auch bei den Peakflächen konnten neben deutlichen Abnahmen bei einigen Analyten bei der herabgesetzten Oxidationstemperatur auch um bis zu 9 % größere Peaks beobachtet werden. Für diese Beobachtung wurde keine Erklärung gefunden.

Sowohl die Verbrennungstemperatur als auch die Sauerstoffversorgung können sich empfindlich auf die Messung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte auswirken, weshalb diese Parameter stets konstant gehalten werden müssen. Merrit et al. [1995] beschreiben die vollständige Verbrennung als wichtigsten Schlüssel für die Richtigkeit der Messwerte bei der GC/C-IRMS-Untersuchung von organischem Material. Daraus folgt, dass für stabile Messbedingungen je nach Art der Probenmatrix und Analyten der Oxidationszyklus und die Verbrennungstemperatur individuell angepasst werden müssen.

5.5 Interface

Bei einer Variation des Referenzgasdruckes am Interface zwischen $0,8$ und $1,6$ bar unter sonst identischen Bedingungen werden Unterschiede in den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von Steroid-Acetat von bis zu 1 ‰ gemessen. Die Amplituden der Referenzgaspeaks liegen unter diesen Bedingungen zwischen 3500 und 9100 mV, während die Peaks der zu untersuchenden Analyten unverändert bleiben. Wird der Heliumdruck am Interface ausgehend von der Standardeinstellung von $1,0$ bar um $0,3$ bar angehoben oder abgesenkt, werden ebenfalls veränderte Amplituden der Referenzgaspeaks, nicht aber der Analyten festgestellt. Durch die Verdünnung mit Helium sinkt die CO_2 -Amplitude bei $1,3$ bar Heliumdruck auf 3600 mV, während sie bei $0,7$ bar auf 8200 mV steigt. Die Unterschiede der für die Steroid-Acetat gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte sind nur teilweise signifikant und liegen zwischen $-0,8$ und $+0,3$ ‰.

Bei beiden Versuchen zum Einfluss von Gasflüssen im *GC/C-Interface* (gemessen als Gasdruck) werden die für den Steroid-Acetat-Standard ermittelten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte tendenziell positiver, wenn die Referenzgaspeaks größer sind, und entsprechend bei kleineren Referenzgaspeaks negativer. Die Ursache hierfür könnte in unterschiedlichen Diskriminierungen der CO_2 -Moleküle im Referenzgas-Einlass in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis mit Helium liegen. Wenn bei einer Mischung von verhältnismäßig viel Helium und vergleichsweise wenig Kohlendioxid im Referenzgas-Einlass des *GC/C-Interfaces* die schweren $^{13}\text{CO}_2$ -Moleküle gegenüber den leichten $^{12}\text{CO}_2$ -Molekülen diskriminiert würden, wäre die Isotopenzusammensetzung der Referenzgaspeaks negativer als zuvor. Da dem Referenzgaspeak aber nach wie vor derselbe – jetzt zu positive – Referenzwert zugeordnet wird, sind die auf ihn bezogenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der vermessenen Analyten zu positiv. Umgekehrt führt ein im Verhältnis zum Helium großer Kohlendioxiddruck vermutlich zu einer Diskriminierung der leichteren $^{12}\text{CO}_2$ -Moleküle und somit zu negativeren Messwerten.

Der GC-Trägergasfluss beeinflusst ebenfalls die Gesamtgasflussverhältnisse im Interface. Je größer der GC-Trägergasfluss ist, desto größer ist die Verdünnung des Trägergasstromes im *Open-Split* des Interfaces. Daraus resultieren kleinere Peaks bei größeren GC-Gasflüssen. Bei den Steroid-Acetaten betragen die Flächen bei einem Fluss von 2,0 ml/min bei ansonsten identischen Parametern zwischen 70 und 85 % der Flächen bei einem Fluss von 1,5 ml/min. Im Gegensatz zu Veränderungen an den Gasdrücken am Interface beeinflusst diese Änderung nicht die Peakflächen der Referenzgaspeaks. Die aus der Variation des Trägergasflusses resultierenden Differenzen in den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von Steroid-Acetaten lagen zwischen $-0,4$ und $+0,3$ ‰. Meier-Augenstein [1996b] ermittelte mit Trägergasflüssen von 0,8 ml/min bis 1,54 ml/min bei sonst konstanten Bedingungen Verschiebungen in den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von 0,03 bis 0,67 ‰ bei Fettsäuremethylestern mit Kettenlängen von C10 bis C20.

Goodman und Brenna [1994] konstatieren wie auch Meier-Augenstein [1996b] eine Verstärkung der Isotopenfraktionierung, die während der chromatographischen Trennung stattfindet, während der Passage der inzwischen zu CO_2 verbrannten Analyten durch das Interface zum Massenspektrometer. Diese kommt durch zahlreiche Kapillarverbindungen und Änderungen der Kapillardurchmesser wie auch durch das *Open-Split*-System zustande. Goodman und Brenna [1994] bemerkten außerdem, dass die Peakform von den Flussverhältnissen im *Open-Split* abhängt. Dies kann auch die abweichenden Messergebnisse bei sich ändernden Gasdrücken in dieser Arbeit erklären.

5.6 Linearität – mengenabhängige Isotopenfraktionierung

In der quantitativen Analytik beschreibt der lineare Bereich jenen Konzentrationsbereich, innerhalb dessen sich die Analytmenge linear zum Messsignal verhält. In der Isotopenanalytik dagegen ist der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im Idealfall im sogenannten linearen Bereich von der Konzentration bzw. der Signalhöhe unabhängig. Die mengenabhängige Isotopenfraktionierung hat jedoch zur Folge, dass auch im günstigsten Konzentrationsbereich eine Abhängigkeit des Messwertes von der Signalhöhe besteht, die laut Herstellerangaben bei dem verwendeten Gerät nicht mehr als 0,06 ‰ pro Volt betragen sollte. Mit dem Referenzgas CO_2 wurde eine lineare Abhängigkeit des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von der Peakhöhe ab einer Amplitude von etwa 2 Volt bestimmt. Mit unterschiedlichen Quellen und Fokussierungen wurden innerhalb von drei Jahren Steigungen von $-0,06$ bis $-0,10$ ‰/V ermittelt. Im Bereich unter 2 Volt besteht eine logarithmische Abhängigkeit der gemessenen Isotopenverhältnisse von der Peakhöhe mit wesentlich größeren Abweichungen.

Für die Alkane Eicosan (C20), Docosan (C22), Tetracosan (C24), Triacontan (C30) und Dotriacontan (C32) wurden im gesamten untersuchten Messbereich (340 bis 10392 mV; 5 bis 40 ng) Abhängigkeiten des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von der Signalhöhe von 0,06 ‰/V bis 0,10 ‰/V

gemessen. Die Linearität von Hexadecan war mit 0,19 ‰/V etwas schlechter. Bei den untersuchten Steroiden war der lineare Bereich vom Analyten und dem Zeitpunkt der Messserie abhängig. Verschiedene Linearitätsmessungen von DHEA-Acetat ergaben in sieben von acht Fällen einen Beginn des linearen Bereiches ab einer Amplitude von ca. 1 Volt. Innerhalb dieses Bereiches betrug die maximale Abweichung in zwei Serien 0,23 ‰/V und in den übrigen Serien zwischen 0,05 und 0,14 ‰/V. Der Vergleich des Verlaufs der mengenabhängigen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte mehrerer Steroide zeigte eine starke Abhängigkeit vom jeweiligen Analyten. Während für DHEA-Acetat und 17 β -Estradiol-Diacetat mit der Ausnahme jeweils eines Messpunktes ab 300 mV der lineare Bereich mit maximalen Abweichungen von 0,04 ‰/V für DHEA-Acetat und 0,10 ‰/V für 17 β -Estradiol-Diacetat beginnt, ist dies bei 5 α -Cholestan und Testosteron-Acetat mit 0,06 ‰/V erst ab 2 Volt der Fall. Bei 5 α -Androstan-3 β -ol sinken die $\delta^{13}\text{C}$ -Messwerte bis zu einer Amplitude von etwa 4 V rapide ab, der Unterschied liegt bei 2,2 ‰, also 0,63 ‰ pro Volt. Oberhalb von 4 V beträgt die Abweichung 0,06 ‰/V. Das stärkste Gefälle wurde bei Estron-Acetat verzeichnet. Bis etwa 2 V beträgt es 1,74 ‰/V. Ab 2 V liegt die Abweichung jedoch bei 0,11 ‰/V. Da alle Analyten nach der gaschromatographischen Trennung zu CO₂ verbrannt werden und im nachfolgenden System (Interface und Isotopenverhältnis-Massenspektrometer) in identischer Form vorliegen, ist die Ursache für die unterschiedlichen linearen Bereiche in Abhängigkeit von der injizierten Menge bei der Injektion, der Chromatographie oder der Verbrennung zu suchen.

Aguilera et al. [2001] bestimmten die Linearität für drei Substanzen in Abhängigkeit von der absolut injizierten Menge, nicht jedoch von der Signalhöhe. Für die Substanzen 5 β - und 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diyl-Diacetat war der gemessene $\delta^{13}\text{C}$ -Wert in einem Bereich von 2,5 bis 150 ng linear, während der Bereich unter gleichen Bedingungen für 5 β -Pregnan-3 α ,20 α -diyl-Diacetat bei 5 bis 150 ng lag. Bei geringeren Probenmengen war der gemessene $\delta^{13}\text{C}$ -Wert bis zu 1,5 ‰ negativer als im linearen Bereich. Saudan et al. [2004] ermittelten mit 20 bis 200 ng einen ähnlichen linearen Bereich für Androstenol, Etiocholanolon, 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol, 5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol und Androsteron. In einer Studie von Mathurin et al. [2001] wurde die Linearität anhand von 19-Norandrosteron-Acetat in einem Bereich von 30 bis 600 ng untersucht. Bei einer Probenaufgabe von 600 ng betrug die Peakhöhe etwa 9 nA (entspricht etwa 3000 mV), womit die Empfindlichkeit der Messung deutlich schlechter ist als bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen. Der akzeptable lineare Messbereich von 19-Norandrosteron-Acetat liegt bei Mathurin et al. [2001] zwischen 300 und 3000 mV, innerhalb dessen mit einer Richtigkeit von $\pm 0,8$ ‰ gemessen werden kann. Glaser und Amelung [2002] konnten keine mengenabhängige Isotopenfraktionierung des Referenzgases CO₂ feststellen. Auch die Injektion unterschiedlicher CO₂-Mengen in den GC/C-IRMS führte zu identischen $\delta^{13}\text{C}$ -Werten. Die Injektion von 10 bis 200 ng von Aminosäuren-PFP-Isopropylestern zeigte jedoch auch bei Glaser und Amelung [2002] eine starke (logarithmische) Abhängigkeit der gemessenen Isotopenzusammensetzung von der injizierten Menge mit Unterschieden von bis zu 10 ‰. Deshalb sehen sie als Ursache dieser Isotopendiskriminierung die Chromatographie und die Combustion, halten aber die Ionenquelle als Ursache für unwahrscheinlich. So vermuten sie z.B. eine unvollständige Verbrennung der Analyten bei höheren Konzentrationen und eine damit einhergehende Isotopenfraktionierung. In dieser Arbeit wurde im Gegensatz dazu eine Abhängigkeit des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von der Amplitude auch beim Referenzgas beobachtet. Laut Schmitt et al. [2003] können für diese Isotopendiskriminierung jedoch auch sich bei diesem Versuch ändernde *flow conditions* im Interface verantwortlich sein, die schon zuvor von Goodman und Brenna [1994] beschrieben wurden. Unter diesem Aspekt sind die oben dargestellten Ergebnisse der Linearitätsmessungen mit dem Referenzgas nur unter Vorbehalt auf eine Isotopendiskriminierung in der Quelle zurückzuführen. Der Einfluss der Quelle konnte nicht abschließend geklärt werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die mengenabhängige Linearität ein wichtiger Validierungsparameter für die GC/C-IRMS ist und für jeden einzelnen Analyten eine Überprüfung des linearen Bereiches erfolgen muss. Eine Vorhersage des linearen Be-

reiches über beispielsweise die chemische Struktur des Analyten oder dessen Retentionsverhalten auf der GC-Säule kann nicht getroffen werden.

5.7 Kalibrierung

Da bisher keine zertifizierten GC/C-IRMS-Standards erhältlich sind, wurde das Messgas CO₂ über die EA-IRMS kalibriert. Ein Vergleich der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einiger sowohl mit der EA-IRMS als auch mit der GC/C-IRMS mit demselben Messgas und derselben Kalibrierung untersuchten Steroide und Steroid-Acetate ergab Unterschiede zwischen 0,08 und 0,92 ‰. Bei den untersuchten Alkanen lagen die Differenzen zwischen 0,28 und 0,86 ‰. In der gleichen Größenordnung lagen mit 0,03 bis 0,63 ‰ die Unterschiede weiterer im Rahmen eines Ringversuches getesteter Analyten. Mögliche Ursachen für die Unterschiede der Messwerte der EA-IRMS von denen der GC/C-IRMS können neben einer möglichen Verunreinigung der Standardsubstanzen die Kalibrierung des GC/C-IRMS-Systems oder die durch die Injektion in die GC/C-IRMS und die Chromatographie entstehenden Isotopeneffekte sein. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der GC/C-IRMS sind bei allen untersuchten Substanzklassen auffällig häufig positiver als die der EA-IRMS. Dies lässt eine systematische Abweichung, wie sie z.B. durch bauliche Unterschiede der verwendeten und verglichenen Geräte verursacht werden könnte, vermuten. Das Referenzgas wurde in der EA-IRMS mit einem von dem des GC/C-IRMS leicht abweichenden *Open-Split*-System mit dem Trägergas Helium gemischt und in die Ionenquelle eingeleitet. Dadurch sind unterschiedlich starke Isotopendiskriminierungen bei der Einleitung des Referenzgases in beide Systeme möglich, die für die systematische Abweichung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte verantwortlich sein können. Aber auch die durch die Injektion der Substanzen in den Gaschromatographen verursachte Isotopendiskriminierung kann zu einer systematischen Abweichung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte führen. Die unterschiedlich hohen Differenzen zwischen den Messwerten beider Systeme innerhalb einer Stoffklasse lassen jedoch zusätzlich zu den möglicherweise bestehenden systematischen Abweichungen analytenspezifische Isotopeneffekte während der Chromatographie vermuten.

Zwank et al. [2003] bestimmten von zehn verschiedenen flüchtigen organischen Substanzen, die sie zuvor mit der EA-IRMS untersucht hatten, mittels GC/C-IRMS die Isotopenzusammensetzung und maßen bei drei Substanzen signifikante Unterschiede zwischen $-1,14$ und $+0,93$ ‰.

Es gab in den letzten Jahren bereits Ringversuche zur Etablierung verschiedener Analyten wie z.B. Vanillin, Tetramethylanilin, Dimethalanilin, Methyl-N-methyl-anthranilat, Dodecan, Octanol, Methyldecanoat, Methyldecanoat als GC/C-IRMS-Standard [Serra et al. 2007]. Ein Vergleich der EA-Werte der getesteten Analyten aller Teilnehmer zeigt eine sehr gute Übereinstimmung der meisten Labore sowie gute Präzisionen mit Standardabweichungen zwischen 0,1 und 0,2 ‰. Die GC/C-IRMS-Werte derselben Analyten und Labore zeigten jedoch eine wesentlich schlechtere Vergleichbarkeit. Die Standardabweichungen der von allen Laboren gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte lagen für die untersuchten Analyten zwischen 0,4 und 1,9 ‰. Dies verdeutlicht, dass die GC/C-IRMS eine Methode ist, die noch nicht so gut standardisierbar ist wie beispielsweise die EA-IRMS und deshalb zu weniger vergleichbaren Ergebnissen führt.

Da keine zertifizierten Standards für die GC/C-IRMS zur Verfügung stehen und auch keine geeigneten Alternativen gefunden wurden, wurde das CO₂ für die GC/C-IRMS über die EA-IRMS kalibriert. Der Nachteil der Kalibrierung mittels des Referenzgases CO₂ ist, dass die in der Gaschromatographie auftretenden Effekte mit dieser Methode nicht kompensiert werden können.

Als interne Standards wurden die Substanzen 5 α -Androstan-3 β -ol und 5 α -Cholestan näher untersucht. 5 α -Androstan-3 β -ol kam wegen starker Interferenzen mit Probenmatrix, die zu instabilen $\delta^{13}\text{C}$ -Werten führten, nicht als interner Standard infrage. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des 5 α -Cholestans hingegen waren wesentlich stabiler als die der zu untersuchenden Analyten, weshalb sich auch 5 α -Cholestan nicht als Maßstab für die Ziel-Analyten eignet. Baume et al. [2006] verwendeten für die Untersuchung von Steroiden aus menschlichem Urin 5 α -Androstan-3 β -ol-Acetat als internen Standard. Dabei akzeptierten sie für den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Standards eine Abweichung vom maximal ± 2 Standardabweichungen (S.D. 0,20 ‰). Aufgrund des in vielen Extrakten hohen Untergrundes konnte kein geeigneter interner Standard mit angebrachter Retentionszeit und den Anforderungen entsprechender Stabilität der $\delta^{13}\text{C}$ -Messwerte gefunden werden. Dieses Problem erkannten auch Juchelka et al. [1998], weshalb auch sie die Kalibrierung gegen das Messgas CO_2 präferierten.

Die Kalibrierung des GC/C-IRMS-Systems über die EA-IRMS kann zu abweichenden Ergebnissen führen und es gibt selten einen geeigneten internen Standard. Deshalb ist es schwierig, mit der GC/C-IRMS absolute Messwerte zu erhalten, die mit denen anderer Labore vergleichbar sind. Dies spiegelt sich auch in den von Serra et al. [2007] veröffentlichten Ringversuchsdaten (s. oben) wider.

5.8 Validierung

In den vorangegangenen Kapiteln wurden bereits einige validierungsrelevante Parameter diskutiert. Zur ständigen Überprüfung der Messbereitschaft des GC/C-IRMS-Systems wurde am Anfang, während und am Ende jeder Sequenz eine Standardlösung der Analyten DHEA-Acetat, Estron-Acetat, Testosteron-Acetat, Estradiol-Diacetat, 5 α -Cholestan und 5 α -Androstan-3 β -ol injiziert und anhand der Peakform und -größe sowie anhand der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte ausgewertet. DHEA-Acetat zeigt sich besonders empfindlich gegenüber einem Sauerstoffmangel im Oxidationsofen. Deshalb wurde eine Qualitätsregelkarte mit DHEA-Acetat geführt. Die Wiederholstandardabweichung eines Messtages betrug in einem als repräsentativ ausgewählten Zeitraum von sechs Monaten zwischen 0,10 und 0,47 ‰. Im selben Zeitraum lag die laborinterne Vergleichsstandardabweichung bei 0,22 ‰.

Zur Überprüfung der Qualität der Aufarbeitung der Urinproben wurde ein Kontrollurin mit aufgearbeitet und vermessen. Außerdem wurde eine matrixfreie Standardlösung mit unterschiedlichen Ziel-Analyten (*Spiked Water*) mit jeder Aufarbeitungsserie aufgearbeitet und ebenfalls vermessen. Zusätzlich wurde bei jeder Acetylierung eine Standardlösung (*GC/C-IRMS-Standard*) acetyliert, um die Derivatierung zu überprüfen. Der Vergleich der Wiederholpräzisionen von Etiocholanolon-Acetat, das in allen genannten Kontrolllösungen enthalten ist, zeigt, dass die Standardabweichungen zwischen zehn Sequenzen beim Kontrollurin mit 0,62 ‰ signifikant größer ist als bei der nicht aufgearbeiteten Standardlösung mit 0,30 ‰, jedoch vergleichbar mit den 0,49 ‰ des aufgearbeiteten *Spiked Water*. Saudan et al. [2004] ermittelten für ihre Aufarbeitung vergleichbare Werte. Aus 16 Aliquoten von Androstenol, Etiocholanolon, 5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol, 5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol und Androsteron, innerhalb eines Jahres jeweils einmal injiziert, berechneten sie Standardabweichungen zwischen 0,16 und 0,59 ‰ (*between assay*).

5.9 Zusammenfassung

In den folgenden Tabellen sind die untersuchten Aufarbeitungsschritte und GC/C-IRMS-Messparameter zusammengefasst und ihre Relevanz für die Genauigkeit, also die Richtigkeit und die Präzision, der ermittelten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der untersuchten Analyten angegeben.

Tabelle 5.1: Darstellung der Relevanz aller untersuchten Aufarbeitungsschritte für die Richtigkeit und die Präzision der mittels GC/C-IRMS gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Steroiden aus Rinderurin, \emptyset = kein signifikanter Einfluss, ++ = signifikanter Einfluss auf alle untersuchten Analyten, + = signifikanter Einfluss auf einzelne Analyten

Aufarbeitungsschritte	Signifikanter Einfluss auf Richtigkeit der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte	Signifikanter Einfluss auf Präzision der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte
Gesamtaufarbeitung	++	\emptyset
Hydrolyse/Pentanextraktion	\emptyset	\emptyset
1. HPLC	\emptyset	\emptyset
2. HPLC	+	+
Derivatisierung	++	\emptyset

Die Derivatisierung wirkt sich, wenn sie nicht rechnerisch korrigiert wird, bei allen Analyten auf die Richtigkeit, nicht jedoch auf die Präzision der ermittelten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte aus (Tab. 5.1). Der Einfluss der Gesamtaufarbeitung auf die Richtigkeit des Messwertes lässt sich fast vollständig auf den Derivatisierungseinfluss zurückführen. Die Hydrolyse der Steroid-Sulfate und die anschließende Pentanextraktion sowie der erste HPLC-Aufreinigungsschritt mittels einer Normalphase hatten keine signifikante Auswirkung auf die Richtigkeit oder die Präzision der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte. Während der *Reversed-Phase*-HPLC, die als weitere Aufreinigung einiger Extrakte durchgeführt wurde, wurden bei einigen Analyten sowohl die Richtigkeit als auch die Präzision der Messwerte signifikant verändert.

Von den untersuchten Messparametern der GC/C-IRMS wirkten sich die meisten signifikant auf die Richtigkeit des gemessenen Isotopenverhältnisses aus (Tab. 5.2). Die GC/C-IRMS-Messmethode ist somit nicht robust gegenüber Veränderungen der Messparameter.

Tabelle 5.2: Darstellung der Relevanz aller untersuchten Geräte- und Messparameter für die Richtigkeit der mittels GC/C-IRMS gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Steroiden und Alkanen; \emptyset = kein signifikanter Einfluss, ++ = signifikanter Einfluss auf alle untersuchten Analyten, + = signifikanter Einfluss auf einzelne Analyten

GC/C-IRMS-Einflüsse	Signifikante Einflüsse auf die Richtigkeit	Bemerkungen
Injektionsgeschwindigkeit	+	Parameter kann konstant gehalten werden
Injektionstemperatur	\emptyset	Parameter kann konstant gehalten werden
Liner	+	Parameter kann konstant gehalten werden
Split/Splitless	\emptyset	Parameter kann konstant gehalten werden
Purgetime	++	Parameter kann konstant gehalten werden
GC-Temperaturprogramm	+	Parameter kann konstant gehalten werden
Peakintegration	+	nur bei ungünstiger Matrix relevant
Untergrundkorrektur	+	bei hohen Untergründen, viel Matrix
^{17}O -Korrektur	\emptyset	
Combustion, Sauerstoffgehalt	++	kann durch geeigneten Oxidationszyklus vermieden werden
Combustion-Temperatur	+	kann konstant gehalten werden
Interface: Heliumfluss	+	Parameter kann konstant gehalten werden
Interface: CO_2 -Fluss	+	Parameter kann konstant gehalten werden
GC-Trägergasfluss	\emptyset	
Linearität	++	kann durch Auswahl eines geeigneten Messbereiches minimiert werden
Kalibrierung	++	kann durch sorgfältige Überprüfung minimiert werden

Veränderungen der Injektionstemperatur, des Injektionsmodus (*split/splitless*), der ^{17}O -Korrektur und des Trägergasflusses wirkten sich nicht signifikant auf die Richtigkeit der ermittelten $\delta^{13}\text{C}$ -Messwerte aus.

Messparameter wie die Injektionsgeschwindigkeit, die Art des Liners, die *Purgetime*, das GC-Temperaturprogramm, die *Combustion*-Temperatur und der Helium- und CO_2 -Fluss im Interface haben sich zum Teil deutlich auf die Richtigkeit der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte ausgewirkt. Sie können aber bei zu vergleichenden Messungen innerhalb eines Labors problemlos konstant gehalten werden und müssen deshalb keinen Einfluss auf die Messwerte haben.

Matrixabhängige Peakintegrationen und Untergrundkorrekturen sind probenabhängig und können nicht vermieden, sondern nur durch eine sorgfältige Aufarbeitung minimiert werden, weshalb sie einen bedeutenden Einfluss auf die Richtigkeit der gemessenen Isotopenverhältnisse ausüben. In einigen Fällen führt dies dazu, dass keine zuverlässige Auswertung der Messwerte durchgeführt werden kann.

Der lineare Bereich jedes Ziel-Analyten ist ebenso wie die Art der Kalibrierung des Messgases sorgfältig auszuwählen und regelmäßig zu überprüfen, um die sonst deutlichen Einflüsse auf die Richtigkeit der Messwerte zu minimieren.

Bei der Gesamtbewertung der Einflüsse auf die Richtigkeit der Messwerte muss berücksichtigt werden, dass sich die Einflüsse sowohl addieren als auch relativieren können. Bei der Aufarbeitung von Steroiden aus Rinderurin und deren Vermessung mittels GC/C-IRMS sowie der Untersuchung von Alkanen wurden zahlreiche kritische Parameter, deren Einflüsse auf die Genauigkeit der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte teilweise groß sind, identifiziert und quantifiziert. Die GC/C-IRMS ist wenig robust gegen Veränderungen von Injektions- und GC-Parametern sowie gegen Variationen von Einstellungen am Interface. Allerdings lassen sich die meisten relevanten Parameter konstant halten und weitere Einflüsse lassen sich durch sorgfältige Auswahl geeigneter Messbereiche gering halten.

5.10 Fazit

Bei Rinderurin handelt es sich um eine komplexe biologische Matrix, die eine mehrstufige Aufarbeitung vor der Isotopenanalyse einzelner Komponenten wie der Steroidhormone nötig macht. Die in dieser Arbeit untersuchten Aufarbeitungsschritte für die Messung von Steroiden aus Rinderurin konnten weitgehend isotopendiskriminierungsfrei durchgeführt werden. Die Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass sich jede Änderung eines Messparameters unterschiedlich auf verschiedene Analyten auswirkt. Deshalb können keine für alle Matrixen und Analyten geeigneten Injektionsmodi, GC-Temperaturprogramme oder Einstellungen am GC/C-IRMS-Interface empfohlen werden. Es lassen sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit aber folgende Empfehlungen zur Probenaufarbeitung und GC/C-IRMS-Messungen ableiten:

- Es ist ein hohes Maß an Standardisierung von GC/C-IRMS-Methoden und Qualitätssicherung nötig, um innerhalb eines Labors vergleichbare Messwerte zu erhalten.
- Die Probenaufarbeitung muss kontinuierlich durch das Mitführen von Standards und gegebenenfalls bekannten Matrixproben überprüft werden, um eine Isotopendiskriminierung ausschließen oder erkennen zu können.
- Während der Derivatisierung kann es zu Isotopendiskriminierungen und einer deutlichen Verschiebung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte kommen. Werden die Derivatisierungsmethode, die Reagenzien und die Messmethoden konstant gehalten, lassen sich diese rechnerisch korrigieren. Dies ist für die Ermittlung der absoluten Isotopenverhältnisse unerlässlich. Hierfür müssen allerdings die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Derivatisierungsreagenzes sowie von Standards

der zu untersuchenden Analyten bekannt sein, z.B. durch ihr Vermessen mittels EA-IRMS.

- Das vorherige Untersuchen der aufgearbeiteten Lösungen mittels GC-MS zur Quantifizierung der Ziel-Analyten und zur Überprüfung des Erfolges der Aufreinigung wird dringend empfohlen.
- Es ist sinnvoll, eine Lösung je nach Konzentration der Ziel-Analyten in verschiedenen Verdünnungen oder mit unterschiedlichen Volumina zu injizieren, damit jede Substanz innerhalb des für sie geltenden linearen Bereiches gemessen werden kann.
- Es empfiehlt sich, durch das sorgfältige Ausblenden von Lösemittelpeaks und anderen unerwünschten Substanzen den Oxidationsofen zu schonen und ein Verschmutzen der Ionenquelle zu verhindern.
- Nach einer – auch kleinen – Änderung eines Messparameters ist unbedingt die Auswirkung auf jeden einzelnen Ziel-Analyten zu überprüfen, da der Effekt für einzelne Substanzen – auch derselben Substanzklasse – unterschiedlich groß sein kann.
- Das gesamte Messsystem sollte vor, während und nach jeder Sequenz mittels Standardlösungen überprüft werden. So werden Fehler bei der Injektion, chromatographische Probleme, Lecks im System oder eine unzureichende Sauerstoffsättigung des Oxidationsofens rechtzeitig erkannt.
- Eine laborinterne Validierung von GC/C-IRMS-Methoden ist möglich. Auf einem GC/C-IRMS-Gerät entwickelte Methoden können nicht ohne Weiteres auf andere Geräte übertragen werden. Ein Abgleich der Messwerte über Standardlösungen oder einen *Proficiency Test* ist unbedingt nötig, um die Messwerte von verschiedenen Geräten beziehungsweise aus verschiedenen Laboren vergleichbar zu machen. Deshalb wären zertifizierte Standards für die GC/C-IRMS für die Zukunft wünschenswert.

Wird sowohl eine potenzielle Isotopenfraktionierung während der Probenaufarbeitung als auch die GC/C-IRMS-Messung durch für die jeweilige Anwendung geeignete Kontrollmessungen kontinuierlich überprüft, erweist sich die GC/C-IRMS als genaue Methode für die Bestimmung von Isotopenverhältnissen auch aus komplexer biologischer Matrix wie die von Steroidhormonen.

6 Experimenteller Teil

6.1 Chemikalien und Messgase

Es wurden für die durchgeführten Versuche folgende Chemikalien und Messgase verwendet:

Steroide

- Testosteron-Acetat CAS 1045-69-8 (Steraloids, USA)
- Estron-Acetat CAS 901-93-9 (Steraloids, USA)
- Dehydroepiandrosteron- (DHEA-)Acetat CAS 853-23-6
- 17 β -Estradiol-Diacetat CAS 3434-88-6
- Etiocholanolon CAS 53-42-9
- Dehydroepiandrosteron (DHEA) CAS 53-43-0
- Epitestosteron CAS 481-30-1
- Epiandrosteron CAS 481-29-8
- 5-Androsten-3 β ,17 α -diol (Steraloids, USA) CAS 1963-03-7
- 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol (Steraloids, USA) CAS 5856-11-1
- Estron CAS 53-16-7
- 17 α -Estradiol CAS 57-91-0
- 17 β -Estradiol CAS 50-28-2
- Dehydroepiandrosteron (DHEA)-Sulfat Natriumsalz CAS 78590-17-7
- Etiocholanolon-Glucoronid CAS 3602-09-3
- 5 α -Cholestan (Steraloids, USA) CAS 481.21.0
- 5 α -Androstan-3 β -ol (Steraloids, USA) CAS 1224-92-6

Alkane

- Alkanstandard nach Schimmelmann (Mix A, Alkane C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25, C26, C27, C28, C29, C30) jeweils 0,7 mg in 0,5 ml n-Hexan (Indiana University, USA)
- n-Hexadecan (C16) CAS 544-76-3 (Fluka)
- Eicosan (C20) CAS 112-95-8 (Fluka)
- Docasan (C22) CAS 629-97-0 (Fluka)
- Tetracosan (C24) CAS 646-31-1 (Fluka)
- Triacontan (C30) CAS 638-68-6 (Fluka)
- Dotriacontan (C32) CAS 544-85-4 (Fluka)

Messgase (verschiedene Quellen)

- Helium 5.0 mit Gas Purifier CAS 7440-59-7
- Kohlendioxid 4.5 CAS 124-38-9
- Sauerstoff 4.5 CAS 7782-44-7

Sonstige

- Essigsäureanhydrid p.A. CAS 108-24-7
- Pyridin getrocknet über Molekularsieb (max. 0,01 % H₂O) CAS 110-86-1
- Cyclohexan p.A. CAS 110-82-7
- n-Hexan CAS 110-54-3

Kalibrierstandards und Gerätekontrollen EA-IRMS

- IAEA-Standard NBS 22 (Öl), ¹³C/¹²C-Isotopenverhältnis vs. PDB –29,7 ‰ (IAEA, Wien, Österreich)
- IAEA-Standard IAEA-CH-7 (Polyethylen-Folie), ¹³C/¹²C-Isotopenverhältnis vs. PDB –31,8 ‰ (IAEA, Wien, Österreich)
- Fruktose (GKP 2), ¹³C/¹²C-Isotopenverhältnis vs. PDB –24,5 ‰ CAS 57-48-7

Standardlösungen für die GC/C-IRMS

- Steroid-Acetat-Standard: Androstanol, DHEA-Acetat, Estron-Acetat, Testosteron-Acetat, 17 β -Estradiol-Acetat, Cholestan, je 50 ng/ μ l in Cyclohexan
- Alkanstandard nach Schimmelmann: Alkane C16, C17, C18, C19, C20, C21, C22, C23, C24, C25, C26, C27, C28, C29, C30, jeweils 28 ng/ μ l in n-Hexan
- Alkan-Mischung: Alkan C16, C20, C22, C24, C30, C32, jeweils 20 ng/ μ l in n-Hexan

Weitere für die Aufarbeitung der Proben verwendete Reagenzien und Lösungen sind den in Buisson et al. [2005] und Hebestreit et al. [2006] veröffentlichten Methoden zu entnehmen.

6.2 Geräteparameter Basiseinstellungen

6.2.1 GC/C-IRMS

Im Folgenden werden die Basisparameter der GC/C-IRMS dargestellt, die für alle Untersuchungen zur Aufarbeitung verwendet wurden. Alle Untersuchungen wurden mit einer DB-5-Säule durchgeführt. Die für die Untersuchungen der Einflüsse auf die Messparameter vorgenommenen Änderungen werden unter 6.3 aufgelistet.

Gaschromatograph

Name: Agilent 6890N
Autosampler: MPS 2L von Gerstel (Mühlheim a.d.R, Deutschland)
Säule: DB-5ms fused silica column (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, J&W Scientific) mit Retention Gap (Fused Silica deactivated, 5 m x 0,25 mm)
Injektor: Split/Splitless-Injektor (Agilent)
Liner: Splitless-Liner, Double Gooseneck, 4 mm, Siltek (Nickel-Stahl-Legierung) (Restek GmbH, Bad Homburg, Deutschland)
Trärgas: Helium

Interface

Name: GC/C-III von Thermo Finnigan (Bremen, Deutschland)
Gasdrücke: Helium 1,0 bar
Referenzgas Kohlendioxid 1,1 bar
Sauerstoff für Reoxidation 0,8 bar
Oxidationsofen: Füllung: Platin, Kupferoxid, Nickeloxid; 940 °C
Reduktionsofen: Füllung: Kupfer; 650 °C
Wasserfalle: Nafion[®]-Membran, Raumtemperatur

Isotopenverhältnis-Massenspektrometer

Name: MAT 253 von Thermo Finnigan (Bremen, Deutschland)
Kollektor: 3-fach Faraday Cups

Auswertung

Software: Isodat 1.5, später Isodat 2.0 (Thermo Finnigan, Bremen)
Parameter: *Background*-Korrektur: Individual Background
¹⁷O-Korrektur nach Craig

Für die Untersuchung der Aufarbeitung verwendete GC-Methode

Injektion: *splitless*, 250 °C, Injektionsvolumen 1-2 µl, Helium 1,5 ml/min
 GC-Programm: 60 °C (1,5 min halten), anschließend mit 40 °C/min auf 220 °C, gefolgt von 1 °C/min bis 240 °C (1 min halten), dann mit 20 °C/min bis 295 °C (1 min halten) (GC-Methode 11)

Anmerkung: Alle Verbindungen zwischen Kapillaren im GC-System wurden ausschließlich mit deaktivierten *Pressfit*-Verbindern aus Glas hergestellt. An Metallkonnektoren besteht die Gefahr einer Kondensation der hochsiedenden Steroide an aktiven Stellen. Außerdem wurde ein modifiziertes Valco-Ventil für die Verbindung der GC-Kapillare mit dem Oxidationsrohr verwendet, mit dem die Kapillare einige Zentimeter in das Oxidationsrohr hineinragt. Zusätzlich wurde das Oxidationsrohr mittels einer modifizierten Büroklammer etwas angehoben. Beide Maßnahmen sorgen dafür, dass das GC-Eluat direkt in die heiße Zone des Ofens gelangt.

6.2.2 EA-IRMS

Alle EA-IRMS-Messungen wurden mit folgenden Geräteparametern durchgeführt:

Elementaranalysator (EA)

Name: EA 1110 CHN von CE Instruments, ThermoQuest Italia S.p.A (Rodano, Italien)
 Autosampler: AS 200
 Gasdrücke: Eingangs-O₂-Druck: 150 kPa
 Eingangs-He-Druck: 150 kPa
 Heliumfluss: 80 ml/min
 Oxidationsrohr: Füllung: Chrom(III)oxid und versilbertes Kobaltoxid, 1040 °C
 Reduktionsrohr: Füllung: reduziertes Kupfer und Kupfer(II)oxid, 650 °C
 GC-Säule: Porapak, 50 °C
 Wasserfalle: Magnesiumperchlorat, Raumtemperatur

Interface

Name: ConFlow II von Thermo Finnigan (Bremen, Deutschland)
 Gasdrücke: Helium-Dilution: ~1,3 bar
 Referenzgas CO₂: ~1,15 bar

Isotopenverhältnis-Massenspektrometer

Name: DeltaPlus von Thermo Finnigan (Bremen, Deutschland)
 Kollektor: 3-fach Faraday Cups

6.3 Probenvorbereitung für die EA-IRMS

Alle Analyten wurden so in Zinnkapseln (für Feststoffe 3,2 mm x 4 mm, Zinnreinheit 97,4 %, für Flüssigkeiten 5 mm x 2 mm Ø, Zinnreinheit 99,9 %) eingewogen, dass die Menge eine Amplitude von 3 bis 4 V ergab, und die Zinnkapseln fest verschlossen. Flüchtige Proben wurden sofort vermessen, andere der EA-IRMS über den Autosampler zugeführt.

Tabelle 6.1: Einwaagen für die EA-IRMS

Analyt	Einwaage bzw. Probenvolumen
alle Steroide und Steroid-Acetate	0,5 bis 0,6 mg
Essigsäureanhydrid	~ 1 µl
Polyethylen-Folie	~ 0,6 mg
Fruktose	1,1 bis 1,2 mg
Octan, Hexadecan	~ 1 µl
Eicosan, Docosan, Tetracosan, Triacontan, Dotriacontan	~ 0,5 mg

6.4 Referenzgaskalibrierung

Das Referenzgas CO₂ wurde sowohl für die GC/C-IRMS- als auch für die EA-IRMS-Messungen mit der EA-IRMS gegen folgende Standards kalibriert:

IAEA-Standard NBS 22 (Öl), ¹³C/¹²C-Isotopenverhältnis vs. PDB -29,7 ‰

IAEA-Standard IAEA-CH-7 (Polyethylen-Folie), ¹³C/¹²C-Isotopenverhältnis vs. PDB -31,8 ‰

6.5 Aufarbeitung

Für die Untersuchung des Einflusses der **Gesamtaufarbeitung** auf die Richtigkeit der δ¹³C-Werte (Kap. 4.1.1) wurde eine wässrige Lösung mit den Substanzen Epitestosteron, Etiocholanolon, 5-Androsten-3β,17α-diol, DHEA und DHEA-Sulfat (Konzentration: 125 µg/l) analog zu der von Buisson et al. [2005] und Hebestreit et al. [2006] veröffentlichten und in der Einleitung beschriebenen Methoden durchgeführt. Die aufgearbeitete Lösung wurde mit der GC/C-IRMS mit der GC-Methode 11 fünfmal vermessen.

Für den Einfluss der **Solvolyse** (Kap. 4.1.2) wurden zehn Aliquote (je 50 µl) einer wässrigen DHEA-Sulfat-Lösung mit einer Konzentration von 100 ng/µl der Solvolyse wie von Hebestreit et al. [2006] beschrieben unterzogen und das DHEA anschließend mit Pentan extrahiert [Hebestreit et al. 2006]. Fünf Aliquote wurden direkt ohne eine Derivatisierung mittels GC/C-IRMS mit der GC-Methode 4 vermessen, die übrigen fünf wurden zuvor derivatisiert, in jeweils 100 µl Ethylacetat/Cyclohexan aufgenommen und mit der GC-Methode 11 vermessen. Zum Vergleich wurde das DHEA-Acetat fünfmal mit der EA-IRMS analysiert. Die Standardlösung *Spiked Water* enthielt unter anderem DHEA-Sulfat und wurde mit jeder Probensequenz wie Urinproben aufgearbeitet und ebenfalls mit Methode 11 vermessen.

Für die Untersuchung der **Fraktionierung während der HPLC-Aufreinigung** wurden je 5 µg eines Steroides bzw. Steroid-Acetates mit den in Hebestreit et al. [2006] beschriebenen HPLC-Methoden analysiert, wobei jeder Peak in jeweils 12 Fraktionen aufgetrennt wurde. Die Fraktionen der Steroide wurden in jeweils 10 µl Ethylacetat und 10 µl Cyclohexan aufgenommen, bevor sie mit der GC-Methode 11 mit der GC/C-IRMS untersucht wurden. Die Steroid-Acetate wurden in jeweils 20 µl Cyclohexan aufgenommen und mit der GC-Methode 11 der GC/C-IRMS vermessen. Für diese Studie wurde von jeder Fraktion nur eine Einfachbestimmung durchgeführt.

Der Einfluss der **zweiten HPLC auf die δ¹³C-Werte** wurde ermittelt, indem Urinproben nach der ersten HPLC-Aufreinigung [Hebestreit et al. 2006] in zwei Fraktionen unterteilt wurden. Die erste wurde nach der Derivatisierung direkt mittels GC/C-IRMS untersucht, die zweite wurde zunächst über eine weitere HPLC [Hebestreit et al. 2006] aufgereinigt und dann in die GC/C-IRMS injiziert. Beide Fraktionen wurden sieben- bis zehnfach mit der GC/C-IRMS mit der GC-Methode 11 vermessen.

Der Einfluss der **Derivatisierung** auf den gemessenen δ¹³C-Wert wurde anhand von Steroid-Standards ermittelt. Zunächst wurden alle untersuchten Steroide im underivatisierten Zustand mittels EA-IRMS (dreifach) vermessen. Dann wurden von den zu untersuchenden Steroiden jeweils 250 µl einer ethanolischen S2-Lösung in einem Glasröhrchen zur Trockne eingedampft. Der Trocknungsrückstand wurde mit jeweils 100 µl Pyridin und Essigsäureanhydrid versetzt, verschlossen, geschüttelt und 45 min bei 60 °C im Trockenschrank inkubiert. Anschließend wurden die Derivatisierungsreagenzien unter Stickstoff eingedampft (bis zur Geruchslosigkeit), in 100 µl Cyclohexan aufgenommen und in ein Probenvial mit Glasinsert überführt. Die Konzentration der Steroid-Acetat-Lösungen betrug nun 25 ng/µl. Jede Lösung wurde dreifach per GC/C-IRMS vermessen. Jeweils 2 µl dieser Lösungen wurden *splitless* in das GC/C-IRMS injiziert und mit GC-Methode 4 (50 °C [1,5 min halten], mit 20 °C/min auf

270 °C, dann mit 1 °C/min auf 280 °C [1 min halten] und mit 20 °C/min bis 295 °C) mit einem Trägergasfluss von 0,9 ml/min analysiert.

6.6 Einfluss von GC/C-IRMS-Geräteparametern

Für die Untersuchung des **Lösemiteleinflusses** wurden dreimal 200 µl einer 50 ng/µl-Lösung von DHEA-Acetat, Testosteron-Acetat und Estron-Acetat in Ethanol unter Stickstoff eingedampft und anschließend in jeweils 200 µl Isohexan, n-Hexan, Ethylacetat oder Cyclohexan aufgenommen. Aus jeder Lösung wurde eine Dreifachbestimmung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte mittels GC/C-IRMS durchgeführt.

Für alle im Folgenden beschriebenen Versuche zu den **Einflüssen von Injektorparametern (Kap. 4.2) und gaschromatographischen Parametern (Kap. 4.3)** wurden der Steroid-Acetat-Standard, der Alkanstandard nach Schimmelmann und die Alkan-Mischung verwendet (siehe Chemikalien und Messgase: Standardlösungen).

Für die **Untersuchung der Injektorparameter** wurde der Steroid-Acetat-Standard stets mit der GC-Methode 11 vermessen (siehe Geräteparameter Basiseinstellungen). Der Alkanstandard nach Schimmelmann und die Alkan-Mischung wurden mit GC-Methode 15 vermessen (siehe Geräteparameter Basiseinstellungen). Mit jeder Lösung und jeder Einstellung wurde eine Dreifachinjektion durchgeführt. Die Einstellungen wurden stets alternierend geändert, um eventuelle systematische Fehler nicht fehlzuinterpretieren. Folgende Parameter wurden bei sonst gleichbleibenden Einstellungen untersucht:

Injektionsgeschwindigkeit: 50 µl/s, 1 µl/s, 100 µl/s
 Injekortemperatur: 250 °C, 280 °C, 220 °C
 Liner: Liner 1: *Splitless*-Liner, Double Gooseneck, 4 mm, Siltek (Nickel-Stahl-Legierung) deaktiviert
 Liner 2: Split-Liner mit Glaswolle, 4 mm (Agilent, Deutschland)
 Purgetime: 2,0 min; 0,1 min; 1,5 min; 0,5 min; 1,0 min
 Split-Verhältnisse: 2 µl einer 50 ng/µl-Lösung *splitless* vs. 1 µl einer 2 µg/µl-Lösung mit *split* 1:20 und
Split-Verhältnisse 1:100, 1:50, 1:30, 1:20 und 1:10

Folgende **GC-Temperatur-Programme** wurden miteinander verglichen:

Tabelle 6.2: Verwendete GC-Temperaturprogramme

Name	Anfangs-temperatur	Rampe 1	Rampe 2	Rampe 3	Flow [ml/min]
GC-Met. 4	50 (1,5 min)	20 %/min auf 270 °C	1 %/min auf 280 °C (1 min)	20 %/min auf 295 °C	0,9
GC-Met. 9	60 (1,0 min)	40 %/min auf 220 °C	2 %/min auf 260 °C	20 %/min auf 295 °C (1 min)	1,5
GC-Met. 11	60 (1,5 min)	40 %/min auf 220 °C	1 %/min auf 240 °C (1 min)	20 %/min auf 295 °C (1 min)	1,5
GC-Met. 12	60 (1,5 min)	40 %/min auf 220 °C	1 %/min auf 240 °C (1 min)	20 %/min auf 295 °C (1 min)	2,0
GC-Met. 13	60 (1,0 min)	40 %/min auf 220 °C	2 %/min auf 260 °C	20 %/min auf 295 °C (1 min)	2,0
GC-Met. 15	60 (2,0 min)	15 %/min auf 295 °C	(5 min)		1,5

Die Einflüsse der über die Auswerte-Software Isodat 1.5 bzw. Isodat 2.0 veränderbaren **Korrekturparameter** wurden anhand von ausgewählten Urinproben und Steroid-Acetat-Standards nach den eigentlichen Messvorgängen untersucht. Alle Messungen wurden mit einer automatischen *Individual-Background*-Korrektur aufgenommen. Die **backgrounds** einiger Chromatogramme wurden nach der Messungen manuell korrigiert und die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Analyten darauf von der Software neu berechnet. Auch der Einfluss der **^{17}O -Korrektur** wurde untersucht, indem nach der Messung ausgewählter Urinproben der Korrekturmodus verändert und die Isotopenverhältnisse neu berechnet wurden. Es wurden die von der Soft-

ware unterstützten Modi nach Craig und nach Santrock, Studley und Hayes (SSH) miteinander verglichen. Von jeder Probe wurden mindestens drei Messungen nachträglich korrigiert.

Für die Untersuchung des Einflusses des **Sauerstoffgehaltes des Combustion-Ofen** wurde der Ofen zunächst eine Stunde lang mit einem Sauerstoffdruck von 1 bar reoxidiert und anschließend der überschüssige Sauerstoff eine weitere Stunde mit erhöhtem Heliumfluss ausgespült. Dann wurde der Steroid-Acetat-Standard (50 ng/μl) 172-mal direkt hintereinander injiziert und abwechselnd mit GC-Methode 9 und 12 gemessen. Aus jedem *Vial* wurde nur zehnmal injiziert, um Aufkonzentrationen der Analyten durch Verdunstung des Hexan zu vermeiden.

Der Einfluss der **Oxidationstemperatur** wurde ermittelt, indem der Steroid-Acetat-Standard dreimal bei einer auf 620 °C herabgesetzten Oxidationsofen-Temperatur vermessen wurde und anschließend ebenfalls dreifach bei 940 °C unter sonst identischen Messbedingungen (siehe 6.2). Die Alkanmischung wurde bei 840 und 940 °C unter sonst identischen Bedingungen jeweils dreifach vermessen (GC-Methode 15).

Für die Untersuchung der **Einflüsse der Parameter am GC/C-Interface** wurde der Steroid-Acetat-Standard zunächst dreifach mit den unter 6.2 genannten Einstellungen und Methoden vermessen. Dann wurde der CO₂-Referenzgasdruck am GC/C-Interface zuerst auf 0,8 bar herabgesetzt und anschließend auf 1,6 bar angehoben und der Steroid-Acetat-Standard unter sonst identischen Bedingungen jeweils dreifach vermessen. Außerdem wurde ausgehend von den Basiseinstellungen der Heliumdruck am Interface erst auf 0,7 bar herabgesetzt und anschließend auf 1,3 bar eingestellt und mit beiden Einstellungen jeweils dreimal der Steroid-Acetat-Standard vermessen.

Die **mengenabhängige Isotopenfraktionierung** wurde folgendermaßen bestimmt: In regelmäßigen Abständen wurde die sogenannte **Linearität der Quelle** bestimmt, indem eine „Referenzgas-Standard-on-off“-Messung mit unterschiedlich großen Signalen durchgeführt wurde. Dazu wurde das Referenzgas in Pulsen in die Quelle eingelassen und der δ¹³C-Wert der einzelnen Pulse gemessen. Am Interface wurde jeweils nach 2 bzw. 3 CO₂-Pulsen manuell der CO₂-Druck verändert (von 0,2 bis 1,6 bar in 0,2-bar-Schritten). Zur Auswertung wurde der δ¹³C-Wert in Abhängigkeit von der jeweiligen Peakhöhe grafisch aufgetragen. Die **mengenabhängige Isotopenfraktionierung im Gesamtsystem** wurde sowohl mit der Alkan-Mischung als auch mehrmals mit dem Steroid-Acetat-Standard bestimmt. Für die Vermessung der Alkan-Mischung wurden Lösungen in den Konzentrationen 5, 10, 15, 20, 30 und 40 ng/μl hergestellt und jeweils 1 μl injiziert. Jede Konzentration wurde dreifach vermessen. Die Reihenfolge der Konzentrationen in der Messsequenz wurde randomisiert, um systematische Fehler auszuschließen. Für die wiederholten Vermessungen des Steroid-Acetat-Standards in verschiedenen Jahren wurden die Konzentrationen der Analyten der aktuellen Empfindlichkeit des Messsystems angepasst, wobei jeweils der Amplitudenbereich zwischen 0 und 7 Volt mit mindestens sieben Konzentrationen untersucht wurde. Dazu wurden Lösungen mit Konzentrationen zwischen 2,5 ng und 200 ng/μl hergestellt und jeweils 1 μl in die GC/C-IRMS injiziert. Es wurden jeweils alle Messungen am selben Messtag unter identischen Bedingungen in randomisierter Reihenfolge und jeweils dreifach durchgeführt.

Zur Überprüfung der Eignung verschiedener Substanzen zur **Kalibrierung der GC/C-IRMS** wurden die Steroide Cholestan, AOL, DHEA-Acetat (von zwei Herstellern), Estradiol-Diacetat, Testosteron-Acetat (von zwei Herstellern) und Estron-Acetat (von zwei Herstellern) und die Alkane n-Hexadecan (C16), Eicosan (C20), Docosan (C22), Tetracosan (C24) und Triacontan (C30) sowohl mittels EA-IRMS als auch mit der GC/C-IRMS mit den oben genannten Parametern vermessen. Für beide Systeme wurde das gleiche Referenzgas mit identischer Kalibrierung verwendet. Für die Steroide wurde eine Fünffachbestimmung durchgeführt und für die Alkane eine Dreifachbestimmung. Die Steroide wurden in Lösungen mit einer Konzentration von jeweils 50 ng/μl und der GC-Methode 9 jeweils dreifach vermessen. Die

Alkane wurden in einer Standard-Mischung mit einer Konzentration von 20 ng/μl untersucht, von der jeweils 1 μl bei einer Injektortemperatur von 280 °C mit der GC-Methode 15 injiziert wurde. Darüber hinaus wurden im Rahmen eines Ringversuches Tetramethylanilin, Dimethylanilin, Methyl-N-methyl-anthranilat, Dodecan, Octanol, Methyldecanoat, Methyldecanoat und Vanillin sowohl an der EA-IRMS mit den Standardparametern (jeweils dreifach) als auch mittels GC/C-IRMS vermessen. Für die GC/C-IRMS-Analyse wurde eine 0,02 %ige Vanillinlösung in Methyl-tert-Butylether (MTBE) und eine ebenfalls 0,02 %ige Mischung aus den übrigen Analyten in MTBE hergestellt. Beide Lösungen wurden je dreifach mit folgenden GC-Parametern vermessen: Heliumfluss 1,8 ml/min; 1 μl mit einem *split* von 1:20, Temperaturprogramm: 40 °C (5 min halten), mit 5 °C/min bis 250 °C (10 min halten). Die übrigen Parameter sind dem Abschnitt 6.2 zu entnehmen.

Für den Vergleich der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des **BCR-Referenzalkohols** mit verschiedenen Geräten und Methoden wurden die Messungen mit folgenden Einstellungen durchgeführt: Die fünffache Vermessung an der EA-IRMS erfolgte mit den in Abschnitt 6.2 beschriebenen Parametern. An den beiden GC/C-IRMS-Geräten wurden die Proben bei 180 °C injiziert und bei 150 °C isotherm analysiert. Der Heliumfluss lag bei 2 ml/min. Die GC/C-IRMS 2 war mit einer DB-WAX-Säule ausgestattet (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), die GC/C-IRMS 3 wurde mit der unter 6.2 beschriebenen Ausstattung betrieben. Für die konventionelle Injektion an der GC/C-IRMS 2 wurde jeweils 1 μl des BCR-Alkohols mit einem *split*-Verhältnis von 1:50 injiziert. Für die Headspace-Injektionen an der GC/C-IRMS 2 und 3 wurden jeweils 100 μl des Alkohols in ein 2-ml-*Vial* gegeben und 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Aus der Gasphase dieser *Vials* wurden jeweils 2 μl mit einer gasdichten Spritze mit einem *split*-Verhältnis von 1:20 injiziert. Alle Messungen wurden mindestens fünffach durchgeführt.

Validierung: Für die **messtätliche Überprüfung der GC/C-IRMS** wurde der Steroid-Acetat-Standard (siehe Abschnitt 6.1, Standardlösungen) verwendet. Es wurde jeweils 1 μl mit den unter 6.2 aufgelisteten Standardparametern vermessen. Mindestens am Anfang und am Ende einer Sequenz wurde dieser Standard jeweils mindestens zweimal injiziert. Mit den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten des DHEA-Acetates wurde eine Qualitätskontrollkarte geführt. Zusätzlich wurden die Chromatographie und die Messempfindlichkeit anhand dieses Standards überprüft.

Für die Überprüfung der Eignung von **internen Standards** wurde mit den Substanzen 5α-Cholestan und 5α-Androstan-3β-ol eine Lösung in Cyclohexan mit der Konzentration von 50 ng/μl hergestellt. Mit dieser Lösung wurden am Ende der Probenaufarbeitung nach der Acetylierung die Analyten aufgenommen und wie gewohnt mittels GC/C-IRMS (Parameter siehe 6.2) untersucht.

Die **Überprüfung der Aufarbeitung** erfolgte anhand eines Kontrollurins und einer wässrigen Lösung (*Spiked Water*). Hierzu wurde in jeder Serie ein Aliquot eines Urines mit den anderen Proben zusammen aufgearbeitet (nach Buisson et al. [2005] und Hebestreit et al. [2006]) und mit der GC/C-IRMS mit den in Abschnitt 6.2 dargestellten Parametern analysiert. Für das *Spiked Water* wurden jeweils 20 ml Wasser mit 250 μl einer Spike-Lösung (Eitestosteron, DHEA-Sulfat und Etiocholanolon-Glucuronid, jeweils 10 ng freies Steroid/μl in Ethanol) versetzt und ebenfalls wie die Proben aufgearbeitet und vermessen.

Zusätzlich wurde bei jeder Aufarbeitung die Acetylierung anhand einer Standard-Mischung (GC/C-IRMS-Standard) überprüft. Hierzu wurden eine Androgenlösung mit den Analyten DHEA, Eitestosteron, Etiocholanolon, Epiandrosteron, 5α-Androstan-3β,17α-diol und 5-Androsten-3β,17α-diol und eine Estrogenlösung mit Estron, 17α-Estradiol und 17β-Estradiol jeweils mit 10 ng/μl in Ethanol hergestellt. Jeweils 250 μl dieser Lösungen wurden zur Trockene eingedampft und wie oben beschrieben derivatisiert.

7 Literaturverzeichnis

Aguilera, R.; Becchi, M.; Grenot, C.; Casabianca, H.; Hatton, C.K. (1996a): Detection of testosterone misuse: comparison of two chromatographic sample preparation methods for gas chromatographic-combustion/isotope ratio mass spectrometric analysis, *J Chromatogr B*, 687, 43–53

Aguilera, R.; Becchi, M.; Casabianca, H.; Hatton, C.K.; Catlin, D.H.; Tarcevic, B.; Pope, H.G. (1996b): Improved method of detection of testosterone abuse by gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids, *J Mass Spectrometry*, 31 (2), 169–176

Aguilera, R.; Catlin, D.H.; Becchi, M.; Phillips, A.; Wang, C.; Swerdloff, R.S.; Pope, H.G.; Hatton, C.K. (1999): Screening urine for exogenous testosterone by isotope ratio mass spectrometric analysis of one pregnanediol and two androstanediols, *J Chromatogr B*, 727 (1–2), 95–105

Aguilera, R.; Chapman, T.E.; Catlin, D.H. (2000): A rapid screening assay for measuring urinary androsterone and eticholanolone $\delta^{13}\text{C}$ (per thousand) values by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 14 (23), 2294–2299

Aguilera, R.; Chapman, T.E.; Starcevic, B.; Hatton, C.K.; Catlin, D.H. (2001): Performance characteristics of a carbon isotope ratio method for detecting doping with testosterone based on urine diols: controls and athletes with elevated testosterone/epitestosterone ratios, *Clinical Chemistry*, 47(2), 292–300

Aguilera-Cisneros, B.O.; Lopez, M.G.; Richling, E.; Heckel, F.; Schreier, P. (2002): Tequila authenticity assessment by headspace SPME-HRGC-IRMS analysis of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios in ethanol, *J Agric Food Chem*, 50, 7520–7523

Angerosa, F.; Camera, L.; Cunitini, S.; Gleixner, G.; Reniero, F. (1997): Carbon stable isotopes and olive oil adulteration with pomace oil, *J Agric Food Chem*, 45, 3044–3048

Angerosa, F.; Breas, O.; Contento, S.; Guillou, C.; Reniero, F.; Sada, E. (1999): Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils, *J Agric Food Chem*, 47, 1013–1017

Balitz, 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, 323–330

Barrie, A.; Bricout, J.; Koziat, J. (1984): Gas chromatography-stable isotope ratio analysis at natural abundance levels, *Biomed Mass Spec*, 11 (11), 583–588

Baume, N.; Saudan, C.; Desmarchelier, A.; Strahm, E.; Sottas, P.-E.; Bagutti, C.; Cauderay, M.; Schumacher, Y.O.; Mangin, P.; Saugy, M. (2006): Use of isotope ratio mass spectrometry to detect doping with oral testosterone undecanoate: inter-individual variability of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio, *Steroids*, 71, 364–370

Becchi, M.; Aguilera, R.; Farozin, 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 (4), 304–308

Begley, I.S.; Scrimgeour, C.M. (1997): High-precision $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ measurement for water and volatile organic compounds by continuous-flow pyrolysis isotope ratio mass spectrometry, *Anal Chem*, 69, 1530–1535

Bensaid, F.F.; Wietzerbin, K.; Martin, G.J. (2002): Authentication of natural vanilla flavorings: isotopic characterization using degradation of vanillin into guaiacol, *J Agric Food Chem*, 50 (22), 6271–6275

Bilke, S.; Mosandl, A. (2002): Authenticity assessment of lavender oils using GC-P-IRMS: H-2/H-1 isotope ratios of linalool and linalyl acetate, *Eur Food Res Technol*, 214 (6), 532–535

Bourgogne, E.; Herrou, V.; Mathurin, J.C.; Becchi, M.; de Ceaurriz, J. (2000): Detection of exogenous intake of natural corticosteroids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: application to misuse in sport, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 14 (24), 2343–2347

Brand, W.A. (1996): High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry, *J Mass Spectrometry*, 31, 225–235

Braunsdorf, R.; Hener, U.; Stein, S.; Mosandl, A (1993a): Comprehensive GC-IRMS analysis in the authenticity control of flavours and essential oils. Part I. Lemon Oil, *Z Lebensm Unters Forsch*, 197, 137–141

Braunsdorf, R.; Hener, U.; Przibilla, G.; Piecha, S.; Mosandl, A. (1993b): Analytische und technologische Einflüsse auf das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis von Orangenöl-Komponenten, *Z Lebensm Unters Forsch*, 197, 24–28

Breas, O.; Reniero, F.; Serrini, G. (1994): Isotope ratio mass spectrometry: analysis of wines from different European countries, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 8, 967–970

Buisson, C.; Hebestreit, M.; Preiss-Weigert, A.; Heinrich, K.; Fry, H.; Flenker, U.; Banneke, S.; Prevost, S.; Andre, F.; Schaenzer, W.; Houghton, E.; Le Bizec, B. (2005): Application of stable isotope ratio analysis to the detection of $^{17}\beta$ -estradiol administration to cattle, *J Chromatogr A*, 1093 (1–2), 69–80

Caimi, R.J.; Brenna, J.T. (1997): Quantitative evaluation of carbon isotopic fractionation during reversed-phase high performance liquid chromatography, *J Chromatogr A*, 757, 307–310

Calderone, G.; Naulet, N.; Guillou, C.; Reniero, F. (2004): Characterization of European wine glycerol: stable carbon isotope approach, *J Agric Food Chem*, 52 (19), 5902–5906

Calderone, G.; Guillou, C.; Reniero, F.; Naulet, N. (2007): Helping to authenticate sparkling drinks with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of CO_2 by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry, *Food Res Intern*, 40 (3), 324–331

Cherrah, Y.; Falconnet, J.B.; Desage, M.; Brazler, J.L.; Zini, R.; Tillement, J.P. (1987): Study of deuterium isotope effects on protein binding by gas chromatography/mass spectrometry. Caffeine and deuterated isotopomers, *Biomed Environ Mass Spectrom*, 14, 653–657

Corr, L.T.; Berstan, R.; Evershed, R.P. (2007): Optimisation of derivatisation procedures for the determination of $\delta^{13}\text{C}$ -values of amino acids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 21, 3759–3771

Craig, H. (1957): Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide, *Geochim Cosmochim Acta*, 12, 133–149

Dautraix, S.; Gerola, K.; Guilluy, R.; Brazier, J.-L.; Chateau, A.; Guichard, E.; Etievant, P. (1995): Test of isotopic fractionation during liquid-liquid extraction of volatile components from fruits, *J Agric Food Chem*, 43, 981–983

Dautraix, S.; Guilluy, R.; Chaudron-Thozet, H.; Brazier, J.L.; Lamotte, A. (1996): ^{13}C Isotopic analysis of an acetaminophen and diacetylmorphine mixture, *J Chromatogr A*, 756, 203–210

Demmelair, H.; Schmidt, H.-L. (1993): Precise $\delta^{13}\text{C}$ -determination in the range of natural abundance on amino acids from protein hydrolysates by gas-chromatography-isotope ratio mass spectrometry, *Isotopenpraxis*, 29, 237–250

Desroche, M.C.; Mathurin, J.C.; Richard, Y.; Delahaut, P.; de Ceaurriz, J. (2002): Urinary 19-norandrosterone purification by immunoaffinity chromatography: application to gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometric analysis, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 16 (5), 370–374

Docherty, G.; Jones, V.; Evershed, R. (2001): Practical and theoretical considerations in the gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry $\delta^{13}\text{C}$ -analysis of small polyfunktional compounds, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 15 (9), 730–738

Fauhlhaber, S.; Hener, U.; Mosandl, A. (1997a): GC/IRMS analysis of mandarin essential oils. 1. $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}$ values of methyl N-methylantranilate, *J Agric Food Chem*, 45 (7), 2579–2583

Fauhlhaber, S.; Hener, U.; Mosandl, A. (1997b): GC/IRMS analysis of mandarin essential oils. 2. $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ values of characteristic flavor components, *J Agric Food Chem*, 45 (12), 4719–4725

Fayet, B.; Saltron, F.; Guerere, M. (1999): Contribution à la caractérisation isotopique des gousses de vanille, *Ann Fals Exp Chim*, 92 (946), 11–16

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, 2617–2620

Ferchaud, V.; Le Bizec, B.; Monteau, F.; Andre, F. (2000): Characterization of exogenous testosterone in livestock by gas chromatography/combustion/isotope mass spectrometry: influence of feeding and age, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 14 (8), 652–656

Frank, C.; Dietrich, A.; Kremer, U.; Mosandl, A. (1995): GC-IRMS in the authenticity control of the essential oil of coriandrum sativum L., *J Agric Food Chem*, 43, 1634–1637

Glaser, B.; Amelung, W. (2002): Determination of ^{13}C natural abundance of amino acid enantiomers in soil: methodological considerations and first results, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 16, 891–898

- González, J.; Remaud, G.; Jamin, E. (1999):** Specific natural isotope profile studied by isotope ratio mass spectrometry (SNIP-IRMS): $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of fructose, glucose and sucrose for improved detection of addition to pineapple juices and concentrates, *J Agric Food Chem*, 47 (6), 2316–2321
- Goodman, K.J.; Brenna, J.T. (1994):** Curve fitting for restoration of accuracy for overlapping peaks in gas chromatography/combustion isotope ratio mass spectrometry, *Anal Chem*, 66, 1294–1301
- Goodman, K.J.; Brenna, J.T. (1995):** High-precision gas-chromatography combustion isotope ratio mass-spectrometry at low signal levels, *J Chromatogr A*, 689 (1), 63–68
- Grob, K. (2001):** Split and splitless injection for quantitative gas chromatography: concepts, processes, practical guidelines, sources of error; 4. überarbeitete Auflage, *Wiley-VHC Verlag*, Weinheim
- Guillou, C.; Jamin, E.; Martin, G.J.; Reniero, F.; Wittkowski, R.; Wood, R. (2001):** Isotopic analysis of wine and products derived from grape, *Bulletin de L'O.I.V.*, 839–840, 27–36
- 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, 2850–2858
- Hener, U.; Mosandl, A.; Hagenauer-Hener, U.; Dietrich, H. (1995):** Stabilisotopenanalyse mittels Headspace-GC-IRMS – ein Beitrag zur Analytik alkoholhaltiger Getränke, *Vitic Enol Sci*, 50 (4), 113–117
- Hener, U.; Mosandl, A.; Hilkert, A.; Bahrs-Windsberger, M.; Großmann, J.; Sponholz, W.R. (1998):** (Headspace-)GC-IRMS zur $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Analyse von Ethanol aus alkoholhaltigen Getränken und Destillaten, *Vitic Enol Sci*, 53 (2), 49–53
- ISO 5725-1 (1997):** Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen – Teil 1 : Allgemeine Grundlagen und Begriffe
- ISO/WD 13530 (2003):** Water Quality – Guide to Analytical Quality Control for Water Analysis
- Jones, D.M.; Carter, J.F.; Eglinton, G.; Jumeau, E.J.; Fenwick, C.S. (1991):** Determination of $\delta^{13}\text{C}$ values of sedimentary straight chain and cyclic alcohols by gas chromatography/isotope ratio mass spectrometry, *Biological Mass Spectrometry* 20 (10), 641–646
- Juchelka, D.; Beck, T.; Hener, U.; Dettmar, F.; Mosandl, A. (1998):** Multidimensional gas chromatography coupled on-line with isotope ratio mass spectrometry (MDGC-IRMS): progress in the analytical authentication of genuine flavor components, *HRC J High Resol Chromat*, 21 (3), 145–151
- Jung, J.; Jaufmann, T.; Hener, U.; Münch, A.; Kreck, M.; Dietrich, H.; Mosandl, A. (2006):** Progress in wine authentication: GC-C/P-IRMS measurements of glycerol and GC analysis of 2,3-butanediol stereoisomers, *Eur Food Res Technol*, 223 (6), 811–820
- Kahle, K.; Preston, C.; Richling, E.; Heckel, F.; Schreier, P (2005):** On-line gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-C/P-IRMS) of

major volatiles from pear fruit (*Pyrus communis*) and pear products, *Food Chem*, 91 (3), 449–455

Kelly, S.D.; Parker, I.; Sharman, M.; Dennis, J.; Goodall, I. (1997): Assessing the authenticity of single seed vegetable oils using fatty acid stable carbon isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), *Food Chem*, 59, 181–186

Kelly, S.D.; Rhodes, C.; Lofthouse, J.H.; Anderson, D.; Burwood, C.E.; Dennis, M.J.; Brereton, P. (2003): Detection of sugar syrups in apple juice by $\delta^2\text{H}\text{‰}$ and $\delta^{13}\text{C}\text{‰}$ analysis of hexamethylenetetramine prepared from fructose, *J Agric Food Chem*, 51 (7), 1801–1806

Kromidas, S. (1999): Validierung in der Analytik; 1. Auflage, *Wiley-VCH Verlag*, Weinheim

Leckrone, K.L.; Hayes, J.M. (1998): Water-induced errors in continuous-flow carbon isotope ratio mass spectrometry, *Anal Chem*, 70, 2737–2744

Macko, S.A.; Ryan, M.; Engel, M.H. (1998): Stable isotopic analysis of individual carbohydrates by chromatographic/combustion/isotope ratio mass spectrometry, *Chemical Geology*, 152, 205–210

Martin, G.G.; Hanote, V.; Lees, M.; Martin, Y.-L. (1996): Interpretation of combined ^2H SNIF/NMR and ^{13}C SIRA/MS analyses of fruit juices to detect added sugar, *Journal of AOAC International*, 79, 62–72

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

Mathurin, J.C.; Herrou, V.; Bourgogne, E. (2001): Gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry analysis of 19-norsteroids: application to the detection of nandrolone metabolite in urine, *J Chromatogr B*, 759 (2), 267–275

Meier-Augenstein, W.; Watt, P.; Langhans, C.-D. (1996): Influence of gas chromatographic parameters on measurement of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios by gas-liquid chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 752, 233–241

Meier-Augenstein, W. (1999a): Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 842, 351–371

Meier-Augenstein, W. (1999b): Use of gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry in nutrition and metabolic research, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2, 465–470

Meier-Augenstein, W.: (2002): Stable isotope analysis of fatty acids by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry, *Anal Chimica Acta*, 465 (1–2), 63–79

Meier-Augenstein, W. (2004): GC and IRMS technology for ^{13}C and ^{15}N analysis on organic compounds and related gases, in: DeGroot, P.: Handbook of stable isotope analytical techniques, volume I, 1. Auflage, Elsevier, Amsterdam 153–176

Merrit, D.A.; Freemann, K.H.; Ricci, M.P.; Studley, S.A.; Hayes, J.M. (1995): Performance and optimization of a combustion interface for isotope ratio monitoring gas chromatography/mass spectrometry, *Anal Chem*, 67, 2461–2473

- Metges, C.C.; Daenzer, M. (2000):** ^{13}C gas chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry analysis of N-pivaloyl amino acid esters of tissue and plasma samples, *Anal Biochem*, 278 (2), 156–164
- Mosandl, A. (1994):** GC-IRMS in der Aromastoffanalytik, *GIT Laborfachzeitschrift*, 38 (9), 882
- Parker, I.G.; Kelly, S.D.; Sharman, M.; Dennis, M.J.; Howie, D. (1998):** Investigation into the use of carbon isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) of Scotch whiskey congeners to establish brand authenticity using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry, *Food Chem*, 63 (3), 423–428
- Preston, C; Richling, E; Elss, S; Appel, M; Heckel, F; Hartlieb, A; Schreier, P. (2003):** On-line gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-C/P-IRMS) of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) volatiles, *J Agric Food Chem*, 51, 8027–8031
- Prevost, S.; Nicol, T.; Monteau, F.; Le Bizec, B. (2001):** Gas chromatography/combustion/isotope mass spectrometry to control the misuse of androgens in breeding animals: new derivatisation method applied to testosterone metabolites and precursors in urine samples, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 15 (24), 2509–2514
- Redondo, R.; Yélamos, J.G. (2005):** Determination of CO_2 origin (natural or industrial) in sparkling bottled waters by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio analysis, *Food Chemistry* 92 (3), 507–514
- Rieley, G. (1994):** Derivatization of organic compounds prior to gas chromatographic-combustion-isotope ratio mass spectrometric analysis: identification of isotope fractionation processes, *Analyst*, 119, 915–919
- Rosman, K.J.R.; Taylor, P.D.P. (1998):** Isotopic composition of the elements 1997 (Technical Report), *Pure & Appl Chem*, 70, 217–235
- Rossmann, A. (2001):** Determination of stable isotope ratios in food analysis, *Food Reviews International*, 17 (3), 347–382
- Royer, A.; Gerard, C.; Naulet, N.; Lees, M.; Martin, G. (1999):** Stable isotope characterization of olive oils. I – Compositional and carbon-13 profiles of fatty acids, *J Amer Oil Chem Soc*, 76 (3), 357–363
- Ruff, C.; Hör, K.; Weckerle, B.; König, T.; Schreier, P. (2002):** Authenticity assessment of estragole and methyl eugenol by on-line gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry, *J Agric Food Chem*, 50 (5), 1028–1031
- Saudan, C.; Baume, N.; Mangin, P.; Sazgy, M. (2004):** Urinary analysis of 16(5 α)-androst-3 α -ol by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: implications in anti-doping analysis, *J Chromatogr B*, 810, 157–164
- Schänzer, W.; Geyer, H.; Gotzmann, A.; Mareck-Engelke, U. (1997):** Recent advances in doping-analysis (5): Proceedings of the Manfred Donike Workshop, 15th Cologne Workshop on Dope Analysis, 23rd to 28th February 1997, *Sport und Buch Strauss*, Cologne, 135
- Scharrer, A.; Mosandl, A. (2002):** Progress in the authenticity assessment of vanilla. $2\delta^{13}\text{C}$ (VPDB) correlations and methodical optimisations, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 98 (4), 117–121

Schimmelmann, A. (2009): Internet: <http://mypage.iu.edu/~aschimme/hc.html>, vom 06.03.2009

Schmitt, J.; Glaser, B.; Zech, W. (2003): Amount-dependent isotopic fractionation during compound-specific isotope analysis, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 17, 970–977

Schumacher, K.; Hener, U.; Patz, C.; Dietrich, H.; Mosandl, A. (1999): Authenticity assessment of 2- and 3-methylbutanol using enantioselective and/or $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio analysis, *Eur Food Res Technol*, 209, 12–15

Serra, F.; Janeiro, A.; Calderone, G.; Moreno Rojas, J.M.; Rhodes, C.; Gonthier, L.A.; Martin, F.; (...); Guillou, C. (2007): Inter-laboratory comparison of elemental analysis and gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS). Part I: $\delta^{13}\text{C}$ measurements of selected compounds for the development of an isotopic Grob-test, *J Mass Spectrom*, 42 (3), 361–369

Sewening, S.; Hener, U.; Mosandl, A. (2003): Online determination of $^2\text{H}/^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios of cinnamaldehyde from different sources using gas chromatography isotope ratio mass spectrometry, *Eur Food Res Technol*, 217 (5), 444–448

Sewening, S.; Bullinger, D.; Hener, U.; Mosandl, A. (2005): Comprehensive authentication of (E)- $\alpha(\beta)$ -ionone from raspberries, using constant flow MDGC-C/P-IRMS and enantio-MDGC-MS, *J Agric and Food Chem*, 53 (4), 838–844

Shackleton, C.H.L.; Phillips, A.; Chang, T.; Li, Y. (1997a): Confirming testosterone administration by isotope ratio mass spectrometric analysis of urinary androstenediols, *Steroids*, 62, 379–387

Shackleton, C.H.L.; Roitman, E.; Phillips, A.; Chang, T.; Li, Y. (1997b): Androstenediol and 5-androstenediol profiling for detecting exogenously administered dihydrotestosterone, epitestosterone, and dehydroepiandrosterone: potential use in gas chromatography isotope mass spectrometry, *Steroids*, 62 (10), 665–673

Silfer, J.A.; Engel, M.H.; Macko, S.A.; Jumeau, E.J. (1991): Stable carbon isotope analysis of amino acid enantiomers by conventional isotope ratio mass spectrometry and combined gas chromatography/isotope ratio mass spectrometry, *Anal Chem*, 63, 370–374

Spangenberg, J.; Macko, S.; Hunziker, J. (1998): Characterization of olive oil by carbon isotope analysis of individual fatty acids: implications for authentication, *J Agric Food Chem*, 46, 4179–4184

Spangenberg, J.; Ogrinc, N. (2001): Authentication of vegetable oils by bulk and molecular carbon isotope analyses with emphasis on olive oil and pumpkin seed oil, *J Agric Food Chem*, 49, 1534–1540

Spangenberg, J.E.; Dionisi, F. (2001): Characterization of cocoa butter and cocoa butter equivalents by bulk and molecular carbon isotope analyses: implications for vegetable fat quantification in chocolate, *J Agric Food Chem*, 49, 4271–4277

Tamura, H.; Appel, M.; Richling, E.; Schreier, P. (2005): Authenticity assessment of γ - and δ -decalactone from prunus fruits by gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (GC-C/P-IRMS), *J Agric Food Chem*, 53 (13), 5397–5401

Ueki, M.; Okano, M. (1999): Analysis of exogenous dehydroepiandrosterone excretion in urine by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 13 (22), 2237–2243

Weber, D.; Roßmann, A.; Schwarz, S.; Schmidt, H.-L. (1997): Correlations of carbon isotope ratios of wine ingredients for improved detection of adulteration: organic acids and ethanol, *Z Lebensm Unters Forsch A*, 205 (2), 158

Weinert, B.; Ulrich, M.; Mosandl, A. (1999): GC-IRMS analysis of black Ceylon, Assam and Darjeeling teas, *Z Lebensm Unters Forsch A*, 208, 277–281

Woodbury, S.E.; Evershed, R.P.; Rossell, J.B.; Griffith, R.E.; Farnell, P. (1995): Detection of vegetable oil adulteration using gas-chromatography combustion isotope ratio mass-spectrometry, *Anal Chem*, 67, 2685–2590

Woodbury, S.E.; Evershed, R.P.; Rossell, J.B. (1998a): $\delta^{13}\text{C}$ analyses of vegetable oil fatty acid components, determined by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry, after saponification or regiospecific hydrolysis, *J Chromatogr A*, 805, 249–257

Woodbury, S.E. ; Evershed, R.P.; Rossell, J.B. (1998b): Purity assessment of major vegetable oils based on $\delta^{13}\text{C}$ -values of individual fatty acids, *J Amer Oil Chem Soc*, 75, 371–379

Zwank, L.; Berg, M.; Schmidt, T.C.; Haderlein, S. B. (2003): Compound-specific carbon isotope analysis of volatile organic compounds in the low-microgram per liter range, *Anal Chem*, 75, 5575–5583

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Natürliche Isotopenfraktionierung des Kohlenstoffs	10
Abbildung 3.2: Auszug aus einem GC/C-IRMS-Chromatogramm: Massen 44, 45 und 46 eines Standard-Peaks	12
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der verwendeten GC/C-IRMS, modifiziert nach Thermo Finnigan	13
Abbildung 3.4 : Beispiel für ein GC/C-IRMS-Chromatogramm: oben Verhältnis der Massen 45 und 44 zueinander, unten Amplitude der Masse 44, vorne im Chromatogramm fünf CO ₂ -Referenzgas-Peaks, hinten Steroid-Acetat-Standards	14
Abbildung 3.5: Standards und verwendetes Kalibrierschema für die GC/C-IRMS	15
Abbildung 3.6: Anzahl der unter den Suchbegriffen „GC/C-IRMS“, „GC-IRMS“ und „Compound Specific Carbon Isotope Analysis“ gefundenen Artikel der Jahre 1990 bis 2008	16
Abbildung 3.7: Aufteilung der Literatur nach Fachgebieten	16
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung aller Aufarbeitungsschritte zur Isolierung und Aufreinigung der Steroidhormone aus Rinderurin; Methode nach Hebestreit et al. [2006] und Buisson et al. [2005], in dieser Arbeit näher untersuchte Einzelschritte sind blau unterlegt.	22
Abbildung 4.2: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von DHEA-Sulfat vor der Aufarbeitung mittels EA-IRMS bestimmt, nach der Solvolyse und nach der Acetylierung im Vergleich mit den Werten nach der Aufarbeitung in Spiked Water (jeweils mit der GC/C-IRMS gemessen)	24
Abbildung 4.3 a+b: Darstellung der relativen Peakflächen (am GC/C-IRMS) und der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der HPLC-Fraktionen (1. HPLC, Normalphase), von oben: DHEA und unten: Epiandrosteron	26
Abbildung 4.4 a+b: Darstellung der relativen Peakflächen (am GC/C-IRMS) und der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der HPLC-Fraktionen (2. HPLC, Reversed Phase), von oben: 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol-Diacetat und unten: Epiandrosteron-Acetat	27
Abbildung 4.5: Ausschnitt aus der Androgenfraktion 3 einer Rinderurinprobe vor und nach einer 2. HPLC-Aufreinigung, hellblau: vor der 2. HPLC, dunkelblau: 5-Androsten-3 β ,17 α -diol (Peak Nr. 1) und 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol (Peak Nr. 2) nach der zweiten HPLC	28
Abbildung 4.6: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Steroid-Acetate vor und nach einer zweiten HPLC-Aufreinigung, Mittelwerte und einfache Standardabweichungen aus einer sieben- bis zehnfachen Aufarbeitung derselben Probe	29
Abbildung 4.7: Zweifach acetyliertes Steroid-Diol- und einfach acetyliertes Steroid-Keton-Grundgerüst	30
Abbildung 4.8: Differenzen der gemessenen und berechneten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Steroid-Acetate zu den Messwerten der underivatisierten Steroide	31
Abbildung 4.9: Theoretisch ermittelter Faktor f für jedes während der Derivatisierung eingefügte C-Atom	32
Abbildung 4.10: Beispielchromatogramme mit den Substanzen der Androgenfraktion mit 1: Etiocholanolon, 2: DHEA, 3: Epiandrosteron, 4:	

Epitestosteron, 5: 5-Androsten-3 β ,17 α -diol, 6: 5 α -Androstan-3 β ,17 α -diol	33
Abbildung 4.11: Standardabweichungen der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einiger Steroide nach jeweils zehnfacher Aufarbeitung der Urine von fünf verschiedenen Tieren und einer Standardlösung (SW, Spiked Water)	34
Abbildung 4.12: Ausschnitt zweier GC/C-IRMS-Chromatogramme der Sulfatfraktion mit 1: DHEA-Acetat und 2: Epiandrosteron-Acetat	35
Abbildung 4.13: Ausschnitte der GC/C-IRMS-Chromatogramme von Urin 4 und 5 mit 1: 5-Androsten-3 β ,17 α -diol und 2: 5 α -Androstan, 3 β ,17 α -diol	36
Abbildung 4.14: Standardabweichungen der Messwerte der Androgenfraktion von Teilprobe 1.4 einfach aufgearbeitet und fünf- bis siebenfach injiziert verglichen mit den Werten nach zehnfacher Aufarbeitung und jeweils einfacher Injektion	38
Abbildung 4.15: Peakflächen des Steroid-Acetat-Standards in Abhängigkeit von der Injektionsgeschwindigkeit (normiert auf die Peakflächen bei 50 $\mu\text{l/s}$), Anordnung der Analyten in Elutionsreihenfolge	39
Abbildung 4.16: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Analyten des Steroid-Acetat-Standards in Abhängigkeit von der Injektionsgeschwindigkeit, Anordnung der Analyten in Elutionsreihenfolge, jeweils $n = 3$	40
Abbildung 4.17: Peakflächen des Schimmelmann-Alkan-Mixes in Abhängigkeit von der Injektionsgeschwindigkeit (normiert auf die Peakflächen bei einer Injektionsgeschwindigkeit von 50 $\mu\text{l/s}$)	40
Abbildung 4.18: Differenzen in den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten [‰] bei Injektionen von 1 $\mu\text{l/s}$ und 100 $\mu\text{l/s}$ in Abhängigkeit von der Kettenlänge der Alkane	41
Abbildung 4.19: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Analyten des Steroid-Acetat-Standards in Abhängigkeit von der Injektortemperatur, jeweils $n = 3$	42
Abbildung 4.20: Peakflächen von Alkanen in Abhängigkeit von der Injektortemperatur; $n = 3$	43
Abbildung 4.21: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Alkanen in Abhängigkeit von der Injektortemperatur; $n = 3$	43
Abbildung 4.22: Peakflächen der Analyten des Steroid-Acetat-Standards mit einem Splitless-Liner (Liner 1) und einem Split/splitless-Liner mit Glaswolle (Liner 2) in Vs; $n = 5$	44
Abbildung 4.23: Differenzen der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte in ‰ (Liner 2 – Liner 1), jeweils aus $n = 5$	44
Abbildung 4.24: Peakflächen der Analyten des Steroid-Acetat-Standards in Abhängigkeit von der Purgetime (normiert auf 1,5 min Purgetime), $n = 3$	45
Abbildung 4.25: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Steroide des Steroid-Acetat-Standards in Abhängigkeit von der Purgetime	46
Abbildung 4.26: Differenzen der mit verschiedenen Purgetimes aufgenommenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte in ‰; schraffierte Balken markieren signifikante Unterschiede (t-Test, $p < 0,05$)	46
Abbildung 4.27: Peakflächen der Alkane bei verschiedenen Purgetimes (normiert auf eine Purgetime von 1,5 min), $n = 3$	47

Abbildung 4.28: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Alkan-Mixes [‰] bei unterschiedlichen Purgetimes, $n = 3$	48
Abbildung 4.29: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Steroid-Acetat-Standards nach Split- und Splitless-Injektion, injizierte Menge jeweils 100 ng, je $n = 3$	49
Abbildung 4.30: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte bei Splitverhältnissen von 1:10 bis 1:100 am Beispiel von DHEA-Acetat, jeweils $n = 3$, bei splitless $n = 12$	49
Abbildung 4.31: Temperaturverlauf der verwendeten GC-Methoden	51
Abbildung 4.32: Retentionszeiten der untersuchten Alkane in Abhängigkeit vom verwendeten GC-Temperaturprogramm	51
Abbildung 4.33: Abhängigkeit des gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes (im Verhältnis zum Referenzwert) vom verwendeten GC-Temperaturprogramm	52
Abbildung 4.34: Abhängigkeit des gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes einiger Alkane (im Verhältnis zum EA-Wert) in Abhängigkeit vom verwendeten GC-Temperaturprogramm	53
Abbildung 4.35: IRMS-Chromatogramme eines Steroid-Acetat-Standards mit verschiedenen GC-Methoden aufgenommen; mit 1: AOL, 2: DHEA-Acetat, 3:EA-Acetat, 4: Estron-Acetat, 5: Cholestan, 6: 17β -Estradiol	54
Abbildung 4.36: Peakflächen des Steroid-Acetat-Mixes [Vs] in Abhängigkeit von der verwendeten GC-Methode	54
Abbildung 4.37: Isotopenverhältnisse des Steroid-Acetat-Standards [‰] in Abhängigkeit von der verwendeten GC-Methode	55
Abbildung 4.38: Isotopenverhältnisse einzeln vermessener Steroide in Abhängigkeit von der verwendeten GC-Methode, $n = 3$	56
Abbildung 4.39: Isotopenverhältnisse einzeln vermessener Steroid-Acetate in Abhängigkeit von der verwendeten GC-Methode, $n = 3$	56
Abbildung 4.40: Verhältnis der Masse 45 zur Masse 44 innerhalb eines DHEA-Acetat-Peaks (vgl. Abb. 3.4 in Kap. 3.3 – GC/C-IRMS)	57
Abbildung 4.41: Differenzen der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der ersten und zweiten Peakhälften der Standards des Steroid-Acetat-Mixes und einiger Alkane	58
Abbildung 4.42: Unterschied in den ermittelten $\delta^{13}\text{C}$ -Werten [‰] einiger Steroide aus Rinderurinen in Abhängigkeit von der Art der Background-Korrektur	59
Abbildung 4.43: Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einiger Steroide aus Urinproben zwischen der 17O -Korrektur nach Craig und nach Santrock, Studley, Hayes (SSH)	59
Abbildung 4.44: Darstellung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Steroid-Acetat-Standards in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung des Oxidationsofens	61
Abbildung 4.45: Verlauf der Peakflächen der untersuchten Analyten in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung des Oxidationsofens (in Abhängigkeit von der Anzahl der Analysen)	62
Abbildung 4.46: Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte [‰] von Steroiden bei einer Ofentemperatur von $620\text{ }^\circ\text{C}$ gegenüber einer Temperatur von $940\text{ }^\circ\text{C}$ (jeweils $n = 3$)	64
Abbildung 4.47: Veränderung der Peakflächen [Vs] bei einer Herabsetzung der Ofentemperatur auf $620\text{ }^\circ\text{C}$, jeweils $n = 3$	65

Abbildung 4.48: Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte [‰] von Alkanen bei einer Ofentemperatur von 840 °C gegenüber einer Temperatur von 940 °C (jeweils n = 3)	65
Abbildung 4.49: Funktionsweise des verwendeten Open-Split-Ventils	66
Abbildung 4.50: Funktionsweise des Referenzgas-Einlasses	67
Abbildung 4.51: Einfluss des CO ₂ -Druckes auf die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Substanzen des Steroid-Acetat-Standards, dargestellt als Differenz zum $\delta^{13}\text{C}$ -Wert bei einem CO ₂ -Druck von 1,1 bar (bei einem gleichbleibenden He-Druck von 1,0 bar), schraffierte Balken kennzeichnen signifikante Unterschiede (t-Test, p<0,05); aus jeweils n = 3	68
Abbildung 4.52: Chromatogramme des Steroid-Acetat-Standards mit einem Referenzgasdruck von 0,8 bar (oben) und 1,4 bar (unten), vorne im Chromatogramm jeweils fünf Referenzgaspeaks, gefolgt von 5 α -Androstan-3 β -ol, DHEA-Acetat, Estron-Acetat, Testosteron-Acetat, 5 α -Cholestan und 17 β -Estradiol-Diacetat	69
Abbildung 4.53: Einfluss des Heliumdruckes auf die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Substanzen des Steroid-Acetat-Standards, dargestellt als Differenz zum $\delta^{13}\text{C}$ -Wert bei einem Heliumdruck von 1,0 bar (bei einem gleichbleibenden CO ₂ -Druck von 1,1 bar); schraffierte Balken kennzeichnen signifikante Unterschiede; aus jeweils n = 3	70
Abbildung 4.54: Peakflächen des Steroid-Acetat-Standards [Vs] in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit während der Gaschromatographie, Temperaturprogramm jeweils bei Methoden 9 und 13 bzw. 11 und 12 identisch	71
Abbildung 4.55: Chromatogramme des Steroid-Acetat-Standards mit einem Trägergasfluss von oben: 1,5 ml/min und unten: 2 ml/min bei identischem GC-Temperaturverlauf; jeweils vorne drei Referenzgaspeaks, gefolgt von den Analyten	72
Abbildung 4.56: Einfluss der Fließgeschwindigkeit im Gaschromatographen auf die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Analyten des Steroid-Acetat-Standards, dargestellt als Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen Messungen mit 2 ml/min und 1,5 ml/min, signifikante Unterschiede (p<0,05) sind schraffiert dargestellt	72
Abbildung 4.57: Abhängigkeit des relativen $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes [‰] von der Intensität des Referenzgaspeaks [mV], gemessen mit zwei verschiedenen Quellen zu verschiedenen Zeitpunkten	74
Abbildung 4.58: Abhängigkeit des $\delta^{13}\text{C}$ -Messwertes [‰] einiger Alkane von der Intensität des Probenpeaks [mV]	75
Abbildung 4.59: Linearität von DHEA-Acetat, dargestellt als relativer $\delta^{13}\text{C}$ -Wert [‰] in Abhängigkeit von der Peakhöhe [mV]	76
Abbildung 4.60: Linearität der Analyten des Steroid-Acetat-Standards, dargestellt als Abhängigkeit des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes [‰] (relativ zum Messwert mit der kleinsten Amplitude) von der Peakhöhe [mV]	77
Abbildung 4.61: Linearität der Analyten des Steroid-Acetat-Standards, dargestellt als Abhängigkeit des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes [‰] relativ zum Messwert mit der größten Amplitude) von der Peakhöhe [mV], alle Daten ab einer Peakhöhe von etwa 2 V	77

- Abbildung 4.62: Vergleich der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einiger als Standard für die GC/C-IRMS verwendeter Substanzen, Anzahl der Messwerte EA-IRMS $n = 5$, GC/C-IRMS $n = 3$ 78
- Abbildung 4.63: Vergleich von $\delta^{13}\text{C}$ -Werte [‰] von Alkanen, mit EA-IRMS und GC/C-IRMS aufgenommen, Anzahl der Messwerte je $n = 3$ 79
- Abbildung 4.64: Vergleich der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von A: Tetramethylanilin, B: Dimethylanilin, C: Methyl-N-methyl-anthranilat, D: Dodecan, E: Octanol, F: Methyldecanoat, G: Methyldecanoat, H: Vanillin, gemessen mit EA-IRMS und GC/C-IRMS, Anzahl der Messwerte je $n = 3$ 80
- Abbildung 4.65: Vergleich der EA-IRMS-Messwerte des BfR mit dem Mittelwert aller Teilnehmer des Ringversuches EU-Projekt Nr. G6RD-CT-2001-00515 vom 24.03.2005; mit A: Tetramethylanilin, B: Dimethylanilin, C: Methyl-N-methyl-anthranilat, D: Dodecan, E: Octanol, F: Methyldecanoat, G: Methyldecanoat, H: Vanillin 80
- Abbildung 4.66: Vergleich der GC/C-IRMS-Messwerte des BfR mit denen aller Teilnehmer des Ringversuches EU-Projekt Nr. G6RD-CT-2001-00515 vom 24.03.2005; mit A: Tetramethylanilin, B: Dimethylanilin, C: Methyl-N-methyl-anthranilat, D: Dodecan, E: Octanol, F: Methyldecanoat, G: Methyldecanoat, H: Vanillin 81
- Abbildung 4.67: Differenzen der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des BCR-Standards N 656 zum zertifizierten Sollwert in Abhängigkeit von der Messmethode und dem verwendeten Gerät 82
- Abbildung 4.68: Beispiel einer Qualitätskontrollkarte: messtägliche Mittelwerte [‰] von DHEA-Acetat aus einem Zeitraum von sechs Monaten 83
- Abbildung 4.69: Steroid-Acetat-Standard-Mix mit a: 5α -Androstan- 3β -ol und b: 5α -Cholestan als interne Standards 84
- Abbildung 4.70: Urinmix mit a: 5α -Androstan- 3β -ol und b: 5α -Cholestan als interne Standards 85

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Die wichtigsten Bioelemente und die Häufigkeit ihrer stabilen Isotope	9
Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten Standardmischungen	23
Tabelle 4.2: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einiger Standardsubstanzen vor ihrer Aufarbeitung (EA-IRMS) und nach der Aufarbeitung und Derivatisierung mit der GC/C-IRMS gemessen	23
Tabelle 4.3: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Steroiden und ihre theoretisch berechneten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte nach der Addition weiterer C-Atome durch die Acetylierung, ¹⁾ gemessen mit der EA-IRMS	30
Tabelle 4.4: Mittelwerte der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einiger Steroide (gemessen als Acetat) nach zehnfacher Aufarbeitung; n.n.: Analyt nicht oder in zu geringer Konzentration vorhanden	34
Tabelle 4.5: Mittelwerte und Standardabweichungen derivatisierter Steroidstandards (in ‰) nach zehnfacher Injektion	37
Tabelle 4.6: Mittelwerte und Standardabweichungen derivatisierter Steroidstandards (in ‰) nach je einfacher Injektion nach zehnfacher Derivatisierung	37
Tabelle 4.7: ^{13}C -Isotopenverhältnisse einiger Alkane [‰], gemessen mit der EA-IRMS	52
Tabelle 4.8: Auswertung der Messwerte des Steroid-Acetat-Standards gemessen unter sinkender Sauerstoffsättigung im Oxidationsofen, aufgenommen mit GC-Methode 9, n = 85, alle Werte in ‰	62
Tabelle 4.9: Auswertung der Messwerte des Steroid-Acetat-Standards gemessen unter sinkender Sauerstoffsättigung im Oxidationsofen, aufgenommen mit GC-Methode 12, n = 87 und Unterschiede zu den Werten der GC-Methode 9, alle Werte in ‰	63
Tabelle 4.10: Verdünnung des GC-Eluates im „Open-Split“ in Abhängigkeit von der GC-Flussgeschwindigkeit	70
Tabelle 4.11: Vergleich der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Etiocholanolon-Acetat aus Spiked Water, Positive Control Urin und dem GC-IRMS-Standard	85
Tabelle 4.12: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte einiger Standardsubstanzen vor ihrer Aufarbeitung (EA-IRMS) und nach der Aufarbeitung (GC-C-IRMS) gemessen	86
Tabelle 5.1: Darstellung der Relevanz aller untersuchten Aufarbeitungsschritte für die Richtigkeit und die Präzision der mittels GC/C-IRMS gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Steroiden aus Rinderurin, \emptyset = kein signifikanter Einfluss, ++ = signifikanter Einfluss auf alle untersuchten Analyten, + = signifikanter Einfluss auf einzelne Analyten	101
Tabelle 5.2: Darstellung der Relevanz aller untersuchten Geräte- und Messparameter für die Richtigkeit der mittels GC/C-IRMS gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Steroiden und Alkanen; \emptyset = kein signifikanter Einfluss, ++ = signifikanter Einfluss auf alle untersuchten Analyten, + = signifikanter Einfluss auf einzelne Analyten	101
Tabelle 6.1: Einwaagen für die EA-IRMS	107
Tabelle 6.2: Verwendete GC-Temperaturprogramme	109

10 Danksagung

Ich danke Fr. Dr. Angelika Preiß-Weigert vom Bundesinstitut für Risikobewertung für die Bereitstellung des Themas sowie ihr und allen Mitarbeitern für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Für die freundliche Betreuung der Arbeit gilt mein herzlicher Dank Frau Hildburg Fry und für die Durchsicht des Manuskriptes und konstruktive Diskussionen Herrn Dr. Carsten Fahl-Hassek sowie Frau Madeleine Spitzke für die Durchsicht der Arbeit.

Für die Begutachtung meiner Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. Reiner Wittkowski und Herrn Professor Dr. Lothar Kroh.

Für die tatkräftige Unterstützung bei Reparatur- und Wartungsarbeiten an der GC/C-IRMS möchte ich Herrn Werner-Karl Blaas und Frau Barbara Donbavand herzlich danken.

Frau Kerstin Mietle und Angelika Hiller danke ich sehr für die fleißige Hilfe bei der Probenaufarbeitung.

Meiner Familie, vor allem meinem Mann, danke ich für ihre Unterstützung und für die Geduld, die sie in den letzten Jahren aufgebracht hat.